

UNIVERSITE DES SCIENCES ET
TECHNOLOGIES DE LILLE

Numéro d'ordre : 2583

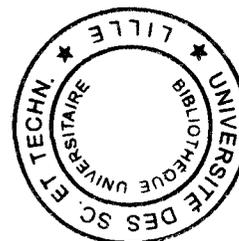
THESE

Présentée à
l'Université des Sciences et Technologies de Lille
pour obtenir le grade de

**DOCTEUR EN GENIE ENZYMATIQUE, BIOCONVERSION ET
MICROBIOLOGIE**

par

Noureddine ATMANE



**Multiplication d'une Lycopodielle médicinale menacée de disparition
[*Lycopodiella inundata* (L.) Holub] par les techniques de
culture *in vitro* et intérêts pour ses alcaloïdes endogènes**

Soutenue le 24 Septembre 1999 devant la commission d'Examen

Mr J. VASSEUR	Professeur à l'USTL	Président
Mme N. MICHAUX-FERRIERE	Directrice de recherches CIRAD, Montpellier	Rapporteur
Mr M.A. FLINIAUX	Professeur à la faculté de Pharmacie d'Amiens	Rapporteur
Mme A.S. BLERVACQ	Maître de Conférences à l'USTL	Examineur
Mr V. BOULLET	Directeur Scientifique au Conservatoire Botanique National de Bailleul	Examineur
Mr F. TROTIN	Professeur à la faculté de Pharmacie de Lille	Examineur

Multiplication d'une Lycopodiale médicinale menacée
de disparition [*Lycopodiella inundata* (L.) Holub] par
les techniques de culture *in vitro* et intérêts pour ses
alcaloïdes endogènes

Je dédie ce travail à mes deux chers parents qui m'ont toujours encouragé

à mon frère Mohammed qui a financé toutes mes études

à tous mes frères et soeurs qui m'ont toujours aidé et soutenu

à M. El-Khoumci, mon instituteur, qui a tout fait pour m'inscrire à l'école publique

à Federica dont le soutien et l'aide m'ont été nécessaires

à tous mes neveux et nièces

à tous mes enseignants qui m'ont appris ce qui a de plus beau dans ce monde : le SAVOIR

à tous mes amis

Remerciements

Je remercie Monsieur et Madame Géhu de m'avoir accueilli au sein du Centre Régional de Phytosociologie / Conservatoire Botanique National de Bailleul durant cinq années.

Je remercie le Professeur Jacques Vasseur de m'avoir accueilli au sein de son laboratoire et d'avoir mis à ma disposition tout le matériel nécessaire pour réaliser ce travail. Je le remercie fortement pour les corrections qu'il a apportées à ce manuscrit.

Je tiens à remercier Monsieur Marc-André Fliniaux de m'avoir accueilli au sein de son laboratoire pour les analyses phytochimiques. Je le remercie d'avoir accepté de juger ce travail en tant que rapporteur.

Je tiens à remercier Madame Michaux-Ferrière de toutes les explications concernant l'embryogenèse somatique et de nous avoir guidé dans nos analyses. Je la remercie également d'avoir accepté de juger ce travail en tant que rapporteur.

Je tiens à remercier Monsieur Trotin de toutes les informations concernant les métabolites secondaires et de la correction de mon manuscrit. Je le remercie également d'avoir accepté de juger ce travail en tant qu'examineur.

Je tiens à remercier M. Vincent Boulet d'avoir été à l'origine de ce projet de recherche et de m'avoir encadré pour la partie conservation.

Je suis très reconnaissant à Madame Anne-Sophie Blervacq de m'avoir initié à la cytologie, d'avoir été toujours à l'écoute et toujours disponible. Je la remercie pour le suivi très régulier au cours de ce travail et pendant la rédaction de ce mémoire. Enfin je la remercie pour sa sympathie et pour son humanisme.

Je tiens à remercier Monsieur et Madame Dubois pour leur aide et leurs conseil.

Je tiens à remercier Monsieur Lamine Bensadek pour son aide au cours des extractions et purifications des alcaloïdes.

Je remercie Mademoiselle Maria del-Pilar Nicasio Torres pour toutes les explications en chimie analytique, en HPLC et en CCM. Je la remercie pour les pizzas du soir.

Je tiens à remercier ma femme Federica des dessins qu'elle a accepté de réaliser, pour son soutien, pour son aide au cours de la rédaction de ce manuscrit et pour son affection.

Je tiens à remercier Laurent Seytre, Guillaume Choynet et Arnaud Szwab pour leur correction et leur sympathie.

Je tiens à remercier Messieurs : J. Bruneton, E. Chamberlin, D. Whittier, M. Ford, J. Delay, J.P. Ferry, J.M. Nuziualard et G. Lippens pour leur aides et leur conseils pratiques au cours de la réalisation de ce travail.

Je tiens à remercier Monsieur le Député Maire de Bailleul Jean Delobel pour son aide et sa sympathie.

Je remercie l'équipe du Centre Régional de Phytosociologie, du laboratoire de Physiologie cellulaire et Morphogenèse Végétales et du laboratoire de Phytotechnologie à Amiens.

Je tiens à remercier tous ceux qui, de près ou de loin, ont permis à ce travail d'être réalisé dans les meilleurs conditions.

Enfin, je remercie mes parents, mes frères, mes soeurs, et toute la famille de leurs aides et leur soutien.

SOMMAIRE

ABRÉVIATIONS.....	9
AVANT - PROPOS.....	10
INTRODUCTION.....	11

CHAPITRE I - SYNTHÈSE BIBLIOGRAPHIQUE

I. GÉNÉRALITÉS.....	12
1. Classification taxonomique.....	12
2. Répartition géographique.....	12
3. Écologie, phytosociologie et habitats.....	15
4. Disparition et raréfaction des Lycopodes.....	15
4.1. Causes naturelles.....	15
4.2. Causes humaines.....	16
5. Morphologie et cycle biologique.....	18
5.1. Phase gamétophytique.....	18
5.2. Phase sporophytique.....	21
II. REPRODUCTION SEXUÉE CHEZ LES LYCOPODES.....	21
III. REPRODUCTION VÉGÉTATIVE CHEZ LES LYCOPODES.....	25
1. <i>In vivo</i>	25
2. <i>In vitro</i>	25
IV. INTÉRÊT MÉDICINAL DES LYCOPODES.....	25
1. Les alcaloïdes chez les Lycopodes.....	27
2. Actions thérapeutiques.....	27

V. PRÉSENTATION DU TRAVAIL DE LA THÈSE.....	28
1. Contexte.....	28
2. Objectifs de la thèse.....	28
3. Contexte scientifique.....	29

CHAPITRE II - MATÉRIELS ET MÉTHODES

A. CULTURE <i>IN VITRO</i> : CROISSANCE ET ACCLIMATATION DES PLANTES.....	31
--	-----------

I. MATÉRIEL VÉGÉTAL.....	31
---------------------------------	-----------

II. PRÉPARATION DES EXPLANTS ET CONDITIONS DE CULTURE.....	31
1. Aseptisation des apex.....	31
2. Conditions générales de culture.....	32
3. Influence des sels minéraux et des vitamines.....	32
4. Influence des cytokinines.....	32

III. FORMATION DE BOURGEONS PAR VOIE DIRECTE.....	33
1. Obtention de plantes.....	33
2. Optimisation de la régénération de plantes.....	33

IV. FORMATION DE PLANTULES PAR VOIE INDIRECTE (CALLOGENÈSE)...	34
1. Obtention et optimisation de la production des cals à partir des apex.....	34
2. Induction de l'embryogenèse et formation de plantules à partir des cals.....	34

V. CROISSANCE ET ENRACINEMENT.....	35
---	-----------

VI. ACCLIMATATION DES VITROPLANTS.....	35
1. Optimisation de l'acclimatation des plantes.....	36
1.1. Acclimatation dans des conditions contrôlées sur des substrats provenant du site naturel.....	36
1.2. Acclimatation sur un site naturel abritant encore la Lycopodielle inondée.....	38
2. Étude préliminaire des micro-organismes présents dans un habitat naturel de <i>L. inundata</i>	38

B. ANALYSES CYTOLOGIQUES.....	39
I. TECHNIQUES CYTOLOGIQUES.....	39
II. MÉTHODES DE COLORATION DES COUPES SEMI-FINES.....	39
C. PHYTOCHIMIE.....	41
I. EXTRACTION ET PURIFICATION DES ALCALOÏDES.....	41
1. Extraction des alcaloïdes.....	41
2. Purification des alcaloïdes.....	42
3. Optimisation de la purification.....	42
II. MISE EN ÉVIDENCE ET ANALYSE DES ALCALOÏDES.....	43
1. Mise en évidence par chromatographie sur couche mince (CCM).....	43
2. Optimisation de la mise en évidence des alcaloïdes par CCM.....	44
3. Mise en évidence et analyse des alcaloïdes par CLHP en phase inverse.....	45
III. SÉPARATION DES ALCALOÏDES TOTAUX.....	46
1. Séparation par CLHP semi-préparative.....	46
2. Par chromatographie sur couche mince.....	47
IV. ANALYSES PRÉLIMINAIRES PAR RMN DE DEUX ALCALOÏDES.....	47

CHAPITRE III - RÉSULTATS

A. MISE EN PLACE ET OPTIMISATION DES PROTOCOLES DE MULTIPLICATION <i>IN VITRO</i>.....	49
I. LE PROTOCOLE D'ASEPTISATION DES EXPLANTS PRIMAIRES.....	49
II. LA COMPOSITION DES MILIEUX.....	49
1. Effets des sels minéraux et des vitamines.....	49
2. Effets des cytokinines sur la formation de bourgeons et la mise en place d'une callogenèse à partir des apex.....	50

III. FORMATION DIRECTE DE BOURGEONS A PARTIR DES APEX.....	51
1. Obtention de bourgeons (sans callogenèse préalable).....	51
2. Optimisation de la formation des bourgeons.....	51
3. Nature des bourgeons formés à partir des apex.....	55
4. Conclusion.....	55
IV. MISE EN PLACE D'UNE CALLOGENÈSE A PARTIR DES APEX ET INDUCTION D'EMBRYONS SOMATIQUES.....	57
1. Production de cals à partir des apex.....	57
2. Obtention d'une embryogenèse somatique à partir de cals.....	62
3. Analyse cytologique de l'embryogenèse somatique à partir de cals.....	64
V. CROISSANCE ET DÉVELOPPEMENT DES PLANTULES.....	66
1. Phase de croissance.....	69
2. Phase de développement : effet du charbon activé.....	69
VI. ACCLIMATATION DES PLANTS OBTENUS <i>IN VITRO</i>.....	71
1. Sur un mélange sable acide et tourbe.....	71
2. Sur sable acide et charbon activé.....	71
3. Sur des substrats provenant du site naturel.....	72
4. Acclimatation sur le site naturel abritant la Lycopodielle inondée.....	72
5. Observations préliminaires sur les micro-organismes présents dans l'habitat naturel de <i>L. inundata</i>	74
VII. CONCLUSION.....	74
B. CARACTÉRISATION DES ALCALOÏDES PRÉSENTS DANS LES CALs ET LES PLANTS CULTIVÉS <i>IN VITRO</i>.....	75
I. PURIFICATION DES ALCALOÏDES.....	75
II. MISE EN ÉVIDENCE PAR CHROMATOGRAPHIE SUR COUCHE MINCE (CCM).....	75
III. EFFETS DE LA POLARITÉ DE LA PHASE MOBILE SUR L'ANALYSE PAR CLHP.....	77
1. Analyse par un système classique.....	77
2. Analyse par un système équipé de barrettes de diodes.....	79

IV. SÉPARATION DES ALCALOÏDES.....	81
1. CLHP semi-préparative.....	81
2. Séparation par CCM.....	83
V. ANALYSES PRÉLIMINAIRES PAR RMN DE DEUX ALCALOÏDES.....	83
VI. CONCLUSION.....	85

CHAPITRE IV - DISCUSSION, CONCLUSION ET PERSPECTIVES.

DISCUSSION.....	86
CONCLUSION GÉNÉRALE ET PERSPECTIVES.....	105
BIBLIOGRAPHIE.....	106
ANNEXES.....	116
Annexe 1. Liste des figures et des tableaux.....	116
Annexe 2. Répartition géographique de <i>Lycopodiella inundata</i> (L.) Holub en Europe...	120
Annexe 3. Embryogenèse zygotique chez les Spermaphytes.....	121
Annexe 4. Agrandissement de la figure 24 (détails).....	122
Annexe 5. Méthode Histologique et méthodes Cytochimiques.....	123

ABRÉVIATIONS

2,4-D : acide 2,4 - dichlorophénoxy acétique

AG3 : acide gibberelique

AIB : acide indolbutyrique

BAP : 6 benzyl-aminopurine

diam. : diamètre

KNO₃ : nitrate de potassium

NH₄NO₃ : nitrate d'ammonium

MB : milieu de bourgeonnement

MD : milieu de développement

MI : milieu d'induction

min : minute

AVANT PROPOS

Le Centre Régional de Phytosociologie / Conservatoire Botanique National de Bailleul (CRP/CBNBL) a entrepris dès 1993 un programme visant à sauvegarder la dernière population picarde (Versigny, 02) de *Lycopodiella inundata* où un seul pied était recensé.

Dans un premier temps, afin de régénérer des pieds de la Lycopodielle inondée *in situ*, des actions de gestion du site de Versigny ont été menées en collaboration avec le Conservatoire des Sites Naturels de Picardie. Parallèlement à ces actions, des essais de bouturage par culture classique ont été menés au jardin du CRP/CBNBL. Malheureusement, aucune de ces deux opérations n'a permis de régénérer de nouvelles pousses de cette Lycopodiale. D'où le choix d'un 3^{ème} mode de régénération, à savoir la multiplication de cette espèce par culture *in vitro*.

C'est dans ce sens que le CRP/CBNBL a initié dès avril 1994 une étude bibliographique préalable sur la culture des Lycopodes afin de mettre en place des expérimentations sur la culture aseptique des spores et sur la culture *in vitro* d'explants végétatifs de la Lycopodielle inondée. Les travaux réalisés jusqu'alors chez les Lycopodes traitaient uniquement de la culture *in vivo* et *in vitro* des spores, en particulier chez les espèces tropicales.

Ce travail a été poursuivi en 1994/1995 et a fait l'objet d'une collaboration avec le laboratoire de Physiologie Cellulaire et Morphogenèse Végétale à l'Université des Sciences et Technologies de Lille. Des essais préliminaires de propagation *in vitro* à partir des spores et d'explants végétatifs chez *L. inundata* ont alors été entrepris.

A travers cette démarche de culture *in vitro*, nous avons voulu montrer que, pour des plantes sauvages récalcitrantes aux méthodes de propagation classique, la micropropagation *in vitro* reste une solution ultime pour les sauvegarder surtout quand elles sont menacées de disparition. De même, nous avons voulu mettre en évidence la valeur scientifique et économique de ce programme et, à travers cela, montrer l'intérêt que certaines plantes dites archaïques peuvent présenter. C'est dans ce cadre général que cette thèse a été menée.

CHAPITRE I - SYNTHÈSE BIBLIOGRAPHIQUE

INTRODUCTION

La Lycopodielle inondée [*Lycopodiella inundata* (L.) Holub] est une espèce typique des milieux hygrophiles oligotrophes. Elle affectionne parfaitement les sables acides argileux ou tourbeux (Atmane *et al.*, 1996a). Elle constitue l'une des neuf espèces de l'ordre des Lycopodiales connues en France (Prelli, 1990). Cette espèce forme avec le reste des Lycopodes des reliques précieuses de l'ère primaire (Emberger, 1968). Malheureusement, ces représentants actuels des Ptéridophytes connaissent une régression qui devient de plus en plus préoccupante à la fois à l'échelle nationale et internationale. Dans le nord de la France, le nombre de populations de la Lycopodielle inondée, recensées depuis la 2^{ème} moitié du XIX^{ème} siècle jusqu'à 1995, est passé de plus de trente à deux stations seulement (Atmane *et al.*, 1998). A cette date, la station se trouvant dans la Réserve Naturelle de Versigny en Picardie, était représentée par un seul pied qui n'a jamais développé de spores.

Le cycle biologique des Lycopodiales est constitué par deux formes indépendantes et autotrophes - le gamétophyte et le sporophyte. Jusqu'à récemment, la plupart des travaux réalisés sur ces plantes s'intéressaient uniquement à l'obtention des gamétophytes à partir des spores et ce, afin d'étudier les relations existant entre le gamétophyte et son champignon endophyte (Treub, 1884 ; Goebel, 1887 ; Freeberg et Wetmore, 1957 ; Whittier, 1981). Selon ces auteurs, le taux de germination *in vitro* des spores ne dépasse jamais 1 %, et les gamétophytes ainsi obtenus n'engendrent pas de sporophytes. C'est pour cette raison qu'une grande partie des phénomènes physiologiques, biochimiques et anatomiques restent encore inconnue chez ce groupe de plantes.

En outre, les Lycopodiales constituent un enjeu économique très important grâce à leurs multiples intérêts, à la fois industriel (Berkefeld, 1993 ; Schippmann, 1995), pharmaceutique et médicinal. Ces vertus médicinales sont notamment dues aux alcaloïdes que ces plantes renferment (Ashani *et al.*, 1994 ; Tang, 1996). Actuellement, ces alcaloïdes sont extraits à partir des plantes récoltées dans la nature ce qui accélère fortement leur régression.

Bien que les Lycopodes appartiennent aux plantes les plus ancestrales du monde végétal, une grande partie de leur biologie reste actuellement totalement inconnue. Ceci est dû surtout au fait que la plupart des données actuelles sur ces plantes proviennent d'observations réalisées dans leur milieu naturel. Ces observations n'ont fourni que peu de résultats en raison de la longue durée de leur cycle biologique ainsi que de sa complexité.

Pour répondre à tous ces problèmes à la fois conservatoire, scientifique et médicinal, une multiplication de *Lycopodiella inundata* par culture *in vitro* semblait être la solution la plus adéquate.

I. GÉNÉRALITÉS

1. Classification taxonomique

L. inundata fait partie de l'embranchement des Ptéridophytes qui regroupe quatre classes dont celle des Lycopodiinées (Fig. 1). Cette classe contient six ordres dont trois seulement sont représentés aujourd'hui, les trois autres étant dits fossiles (Emberger, 1968).

L'ordre des Lycopodiales contient quatre genres : *Lycopodium*, *Lycopodiella*, *Huperzia* et *Diphasiastrum* (Lambinon *et al.*, 1993). Ces quatre genres seront désignés tout le long de ce rapport par le terme général de **Lycopodes**. Ces plantes sont le plus souvent associées aux Fougères sous le terme "Fougères et plantes alliées". *Lycopodiella inundata*, constitue l'une des deux espèces du genre *Lycopodiella* présentes en Europe (Tutin *et al.*, 1993).

Classe	Lycopodiinées
Ordres	Archaeolépidophytales (fossiles)
	Protolépidophytales (fossiles)
	Lépidophytales (fossiles)
	Lycopodiales
	Lépidospermales
	Pleuroméiales

Fig. 1. La classe des Lycopodiinées et les 6 ordres qui la composent, d'après Emberger (1968).

2. Répartition géographique

2.1. Chorologie mondiale

Les exemplaires fossiles des Lycopodes se rattachent généralement aux flores de l'hémisphère septentrional. Si on trouve actuellement de très nombreuses espèces dans les régions tropicales, elles représentent alors la flore montagnarde : Andes, Nouvelle-Guinée, Nouvelle Zélande, etc. (Parent, 1964). En Europe, les Lycopodes ont une aire circumboréale, subboréale ou subalpine.

Lycopodiella inundata est une espèce circumboréale (Eurasie, Amérique du nord) ou subboréale (annexe 2) (Lambinon *et al.*, 1993 ; Tutin *et al.*, 1993).

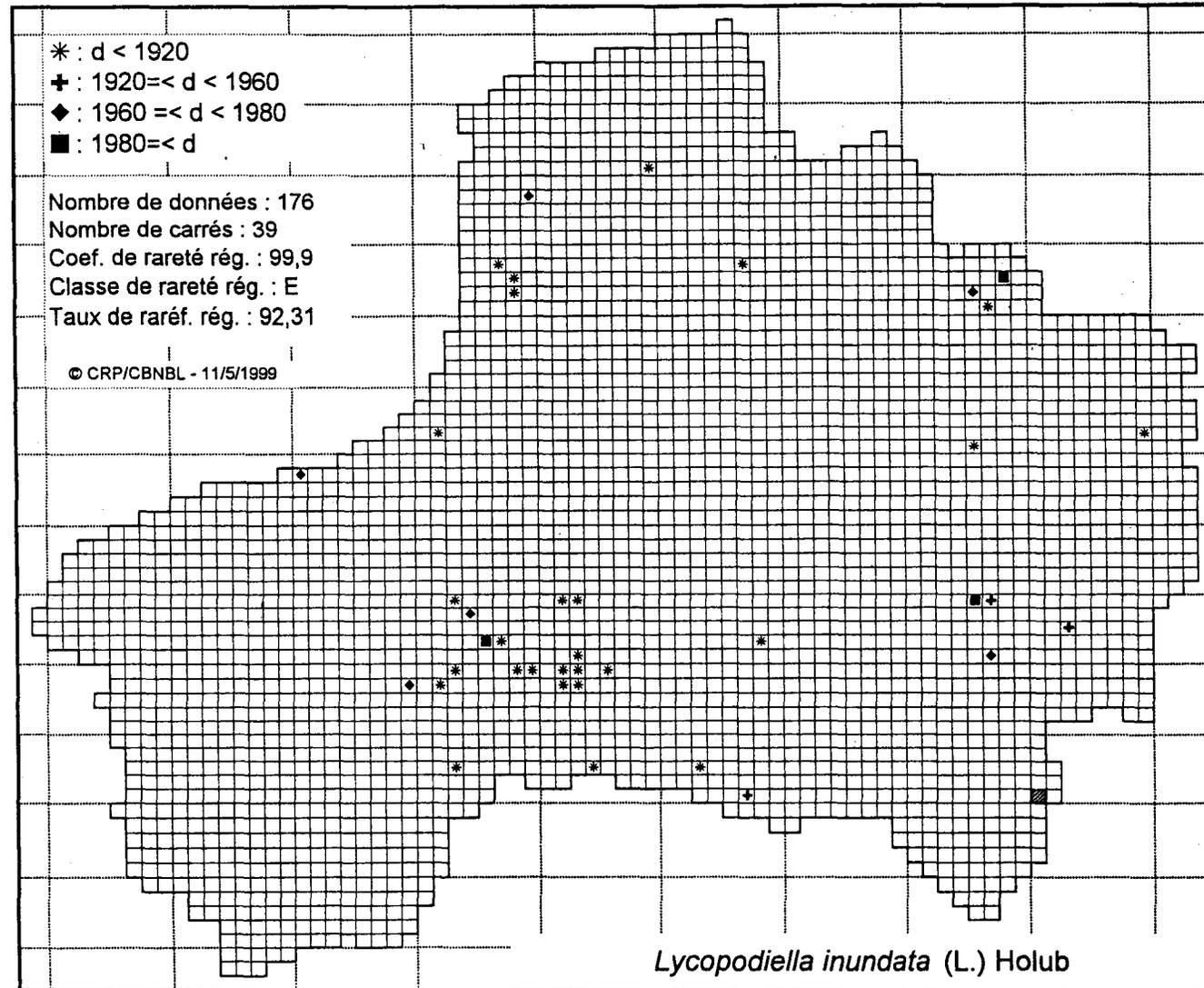


Fig. 2. Répartition géographique de *Lycopodiella inundata* (L.) Holub dans le Nord Pas-de-Calais, la Picardie et la Haute-Normandie. Réseau IFFB 4 x4 km. d = dernière donnée connue.

2.2. A l'échelle nationale

En France, l'ordre des Lycopodiales compte 9 espèces sur les dix connues en Europe (Prelli, 1990). Ces espèces sont rencontrées de manière générale dans des zones montagnardes, et de manière exceptionnelle dans les plaines, notamment dans le nord où le climat est suffisamment rigoureux (Tableau 1). Ceci reste vrai notamment pour *Lycopodiella inundata* qui est encore bien représentée dans les Vosges et le Jura, alors qu'elle est plus disséminée dans le Massif Central. Elle est présente également dans quelques localités ponctuelles des plaines : Bretagne, Maine aux confins de l'Anjou, Ile-de-France, Nord/Pas-de-Calais, Sologne et Sud-Ouest (Prelli et Boudrie, 1992).

Tableau 1. Répartition géographique en France des espèces de l'ordre des Lycopodiales, selon Prelli (1990).
* : depuis l'espèce a disparue des deux stations.

Genres	Espèces et auteurs	Localisations
<i>Huperzia</i>	<i>selago</i> (L.) Bernh	Vosges, Massif Central, Alpes, Pyrénées, Corse
<i>Diphasiastrum</i>	<i>alpinum</i> (L.) Holub	Alpes du Nord, Pyrénées, Massif Central, Vosges
	<i>issleri</i> (Rouy) Holub	Vosges, Massif Central, Alpes du Nord
	<i>tristachyum</i> (Pursh) Holub	Vosges, Massif Central
	<i>complanatum</i> (L.) Holub	Vosges
	<i>zeilleri</i> (Rouy) Holub	Vosges
<i>Lycopodium</i>	<i>clavatum</i> L.	Vosges, Massif Central, Jura, Pyrénées, Nord
	<i>annotinum</i> L.	Vosges, Jura, Alpes du Nord, Massif Central, Pyrénées
<i>Lycopodiella</i>	<i>inundata</i> (L.) Holub	Vosges, Jura, Massif Central, Bretagne, Normandie*, Maine, Picardie*, Nord-Pas-de-Calais, Sologne, Sud-Ouest

2.3. A l'échelle régionale : Nord/Pas-de-Calais, Picardie et Haute-Normandie

Plusieurs espèces de Lycopodes ont été déterminées dans ce territoire, notamment *Lycopodium clavatum* L., *Huperzia selago* (L.) Bernh, *Lycopodiella inundata* (L.) Holub et *Diphasiastrum tristachyum* (Pursh) Rothm. (Géhu, 1958 ; 1964; Sulmont, 1973-1974). Au cours des dernières décennies, le nombre de populations de ces espèces a fortement diminué. Pour *Lycopodiella inundata*, le nombre de populations recensées depuis la 2^{ème} moitié du XIX^{ème} siècle est passé de plus de trente stations à une seule, rencontrée dans la forêt de Saint-Amand-les-Eaux dans le département du Nord (Fig. 2). La dernière disparition en date est celle des landes de Versigny en Picardie, où la plante a été revue pour la dernière fois en 1995.

3. Écologie, phytosociologie et habitats

En Europe, la plupart des Lycopodes vivent sur des zones tourbeuses ou des sables argileux dénudés acides plus au moins humides selon les espèces. Ces plantes montrent une adaptation remarquable aux conditions climatiques rigoureuses. La majorité d'entre elles affiche une préférence pour les terrains siliceux qui sont plus au moins riches en aluminium. Ces plantes peuvent, de manière exceptionnelle, accumuler ce composant qui agirait comme antagoniste du calcium dont il réduirait la toxicité. C'est probablement un moyen propre aux Lycopodes pour ajuster la concentration interne du calcium (Parent, 1964).

Lycopodiella inundata est une espèce pionnière des sables argileux dénudés et des landes tourbeuses régulièrement inondées. Elle est notamment présente dans des régions de plaine et de moyenne montagne, atteignant 1500 m dans les Alpes du nord (Prelli et Boudrie, 1992). Elle fait partie de l'association *Lycopodiello inundatae-Rhynchosporium albae* (Allorge et Gaume, 1931). Cette association représente la végétation initiale des sables et des landes tourbeuses. Le plus souvent, elle s'établit aux endroits où la lande tourbeuse a subi un étrépage (c'est à dire une opération de décapage superficiel du substrat sur une faible épaisseur de l'ordre de 5 cm) et où le sable est alors mis à nu (Durin et Lericq, 1963).

4. Disparition et raréfaction des Lycopodes

Parmi l'embranchement des Ptéridophytes, les Lycopodiacées sont probablement les plantes qui ont subi la régression la plus prononcée (Bournérias *et al.*, 1983). Ces plantes qui ont dominé les grandes forêts du carbonifère, ne sont actuellement représentées que par quatre genres: *Diphasiastrum*, *Huperzia*, *Lycopodiella* et *Lycopodium* (Parent, 1964 ; Emberger, 1968 ; Prelli, 1990). Si, pour une grande partie, la cause de disparition de ces plantes est naturelle, pour le reste, la cause est directement ou indirectement liée à l'activité humaine.

4.1. Causes naturelles

Deux phénomènes majeurs peuvent être signalés : le facteur symbiotique chez les Lycopodes et la dynamique écologique des associations végétales.

Chez les Lycopodes, le gamétophyte présente une symbiose fongique qui se manifeste à un stade précoce de développement (quelques cellules). On ignore jusqu'à maintenant si cette symbiose est spécifique ou si la relation est plus aléatoire. La présence du champignon pourrait être un facteur limitant lié à l'existence des Lycopodes. La disparition du champignon endophyte entraînerait alors celle des Lycopodes.

Le caractère transitoire des associations végétales, de par leur dynamique écologique, peut être une cause de leur disparition. *Lycopodiella inundata* fait partie de la végétation initiale des sables et des landes tourbeuses. Ainsi, dans une zone nouvellement étrepée et où le sable a été mis à nu, *Lycopodiella inundata* et *Drosera* sp. sont parmi les premières espèces qui apparaissent après le recouvrement du sol par de la matière organique (Durin et Lericq, 1963). Une fois que la végétation s'oriente vers une lande à bruyères, elle se densifie et la couche humifère atteint alors une plus grande épaisseur (10-20 mm). En conséquence, la Lycopodielle inondée ne résiste plus à ce changement pédologique et disparaît. De telles situations ont été observées à plusieurs reprises, par exemple en Corrèze (Brunerye, 1971).

4.2. Causes humaines

4.2.1. Modification des biotopes

Dans beaucoup de cas, les activités humaines sont aussi responsables de la raréfaction de ces plantes. L'homme modifie les conditions stationnelles qui assuraient leur survie, et provoque ainsi leur disparition. Par exemple, une plantation de peupliers en bordure d'une station de Lycopodes, en Belgique, a provoqué un drainage suffisant pour appauvrir le site et faire disparaître les plantes pionnières, notamment *Lycopodiella inundata* (Parent, 1964). Le même cas a été observé après la plantation de résineux dans la forêt de Saint-Amand (Durin et Lericq, 1963). La réalisation de fossés de drainage autour des sites abritant ce Lycopode entraîne un assèchement progressif des landes et conduit, par la suite, à la disparition de cette espèce (Gaume, 1937). Enfin, l'eutrophisation d'origine agricole (enrichissement en sels minéraux causés par divers amendements), la pollution des eaux et des sols bouleversent fortement l'équilibre du biotope et par conséquent ses composantes floristiques.

4.2.2. Intérêts thérapeutiques

La médecine populaire s'est intéressée depuis l'antiquité aux remèdes à base des Lycopodes, notamment *Huperzia selago*. Pour tous ces usages, on récoltait, soit la plante entière, soit les tiges sporangifères avant l'ouverture des sporanges. Les récoltes abondantes peuvent être considérées comme une cause majeure de la disparition progressive des Lycopodes. Par manque d'informations et de données officielles en France ou ailleurs, ni la quantité ni la provenance des plantes récoltées ne sont connues.

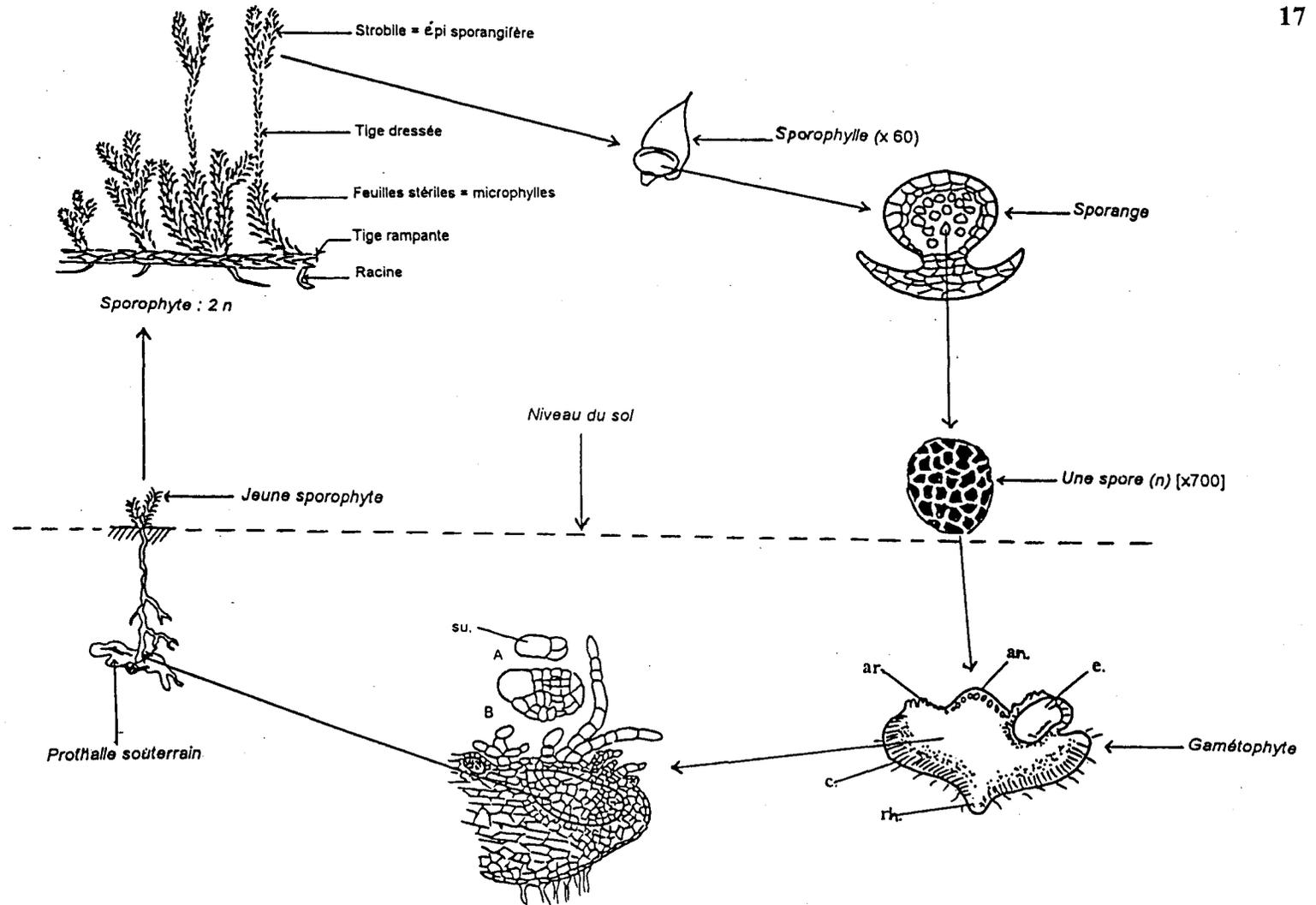


Fig. 3. Cycle biologique du *Lycopodium clavatum*, d'après Atmane (1995). A, embryon zygotique stade 3 cellules ($\times 120$) ; B, embryon au stade plusieurs cellules (Gross. $\times 120$).

an, anthéridie ; ar, archégone ; c, cortex (tissu hébergeant le champignon) ; e, embryon ; rh, rhizoïde ; n, haploïde ; $2n$, diploïde ; su, suspenseur.

En médecine moderne, les Lycopodes sont essentiellement utilisés pour leurs alcaloïdes, notamment l'huperzine A qui possède une activité anti-cholineestérasique.

Par ailleurs, les spores des Lycopodes ont été utilisées pour enrober les médicaments dans les gélules, grâce à la rigidité de leur paroi. Elles ont également été employées, pour longtemps, comme lubrifiant des gants utilisés par les chirurgiens lors des opérations chirurgicales (Antopol, 1931 ; Salén, 1951). Des études récentes ont apporté que l'industrie des préservatifs, notamment en Allemagne, consomme près de 4 tonnes de spores par année (Berkefeld, 1993 ; Schippmann, 1995). Ces spores sont également utilisées comme lubrifiant des préservatifs.

Toutes ces applications thérapeutiques et industrielles font que les Lycopodes sont massivement récoltés, ce qui accélère fortement leur disparition, notamment dans les pays où aucune loi ne les protège. Ceci était vrai pour la plupart des pays de l'Est : Russie, Roumanie, Pologne. Ce dernier pays s'est récemment doté d'une législation protégeant et empêchant la récolte de quelques Lycopodes dont l'espèce *inundata*.

5. Morphologie et cycle biologique

Le cycle biologique des Lycopodes est constitué de deux phases : une gamétophytique et une sporophytique. Comme les Fougères, les Mousses, les Algues ou les Champignon, ces plantes se reproduisent par des spores qui, après germination, engendrent un prothalle bisexué et autonome. Chez certaines espèces, le cycle biologique peut s'étaler sur une vingtaine d'années : les spores ne germent qu'après 3 à 5 ans et le développement complet du prothalle n'est observé qu'à l'issue de cette longue période (Bruchmann, 1910). A maturité, chaque prothalle développe un sporophyte.

5.1. Phase gamétophytique

Le gamétophyte, ou prothalle, des Lycopodes est bisexué. Il nécessite, chez la totalité des espèces, l'intervention d'un champignon endophyte. Selon les cas, le gamétophyte peut être complètement saprophyte (*Lycopodium clavatum*) ou chlorophyllien (*Lycopodiella inundata*). A maturité, le prothalle développe des organes sexuels mâles (**anthéridies**) qui contiennent chacun plusieurs cellules germinatives appelées **anthérozoïdes** et des organes femelles (**archégonés**) qui contiennent chacun une seule cellule germinative appelée **oosphère** (Fig. 3). Après sa fécondation en milieu aquatique par un anthérozoïde, l'oosphère se développe en embryon qui évoluera ensuite en sporophyte. Pour certaines espèces, un prothalle engendrera au maximum un sporophyte (Treub, 1884). Pour d'autres, le prothalle pourra engendrer deux ou plusieurs plantules (Bruchmann, 1910). Néanmoins, le

développement des prothalles varie selon les espèces et la durée minimale peut s'étendre sur 2 ans.

Chez *Lycopodium clavatum* (Fig. 3), la germination des spores n'a lieu qu'après 3 à 5 années, et le taux de germination estimé est toujours inférieur à 1 %. La maturité sexuelle des prothalles n'est atteinte qu'après 12 à 15 ans (Bruchmann, 1910). Le développement du prothalle se fait en deux phases : dans un premier temps, celui-ci se divise de manière autonome jusqu'au stade 5 cellules ; ensuite, le développement ultérieur nécessite la présence d'un champignon endophyte. Ce dernier assure probablement la subsistance du prothalle grâce à l'assimilation de la matière organique provenant de l'humus présent dans le sol (Bruchmann, 1910).

Plusieurs incertitudes persistent encore chez *Lycopodiella inundata* quant à la durée de germination des spores et au temps nécessaire pour le développement d'un prothalle jusqu'à sa maturité sexuelle. Toutefois, d'après les études menées par Goebel (1887), nous savons qu'à l'inverse de *Lycopodium clavatum*, le prothalle de *Lycopodiella inundata* est chlorophyllien et qu'il possède à maturité une longueur de 2.6 mm environ. Comme chez le reste des Lycopodes, ce prothalle nécessite l'intervention d'un champignon endophyte dès les premiers stades de développement (4-5 cellules). Sans le champignon endophyte, le prothalle des Lycopodes ne dépasse jamais le stade 3-10 cellules (de Bary, 1858 ; Goebel, 1887 ; Bruchmann, 1910). Ce phénomène de **mycorrhization** du prothalle des Lycopodes présente une certaine analogie avec les Orchidées chez lesquelles le développement de l'embryon nécessite également la présence d'un champignon (Lindén, 1980).

Plusieurs stades du processus de la formation et du développement du prothalle chez les Lycopodes restent encore inconnus jusqu'à ce jour :

- pour les spores, on ne connaît pas avec certitude la durée du pouvoir germinatif ni les conditions de germination ;
- concernant le prothalle, on ignore encore la durée nécessaire à son développement ;
- concernant la mycorrhization, plusieurs interrogations persistent :
 - * quelle est la nature exacte des substances échangées entre le prothalle et le champignon ?
 - * ce champignon est-il identique pour toutes les espèces ?
 - * quel est ce champignon ?

La réponse à toutes ces questions sera capitale, à la fois pour conserver ces plantes très menacées de disparition et pour comprendre leur biologie qui reste parmi les moins connues du règne végétal, bien que ces plantes soient les plus anciennes.

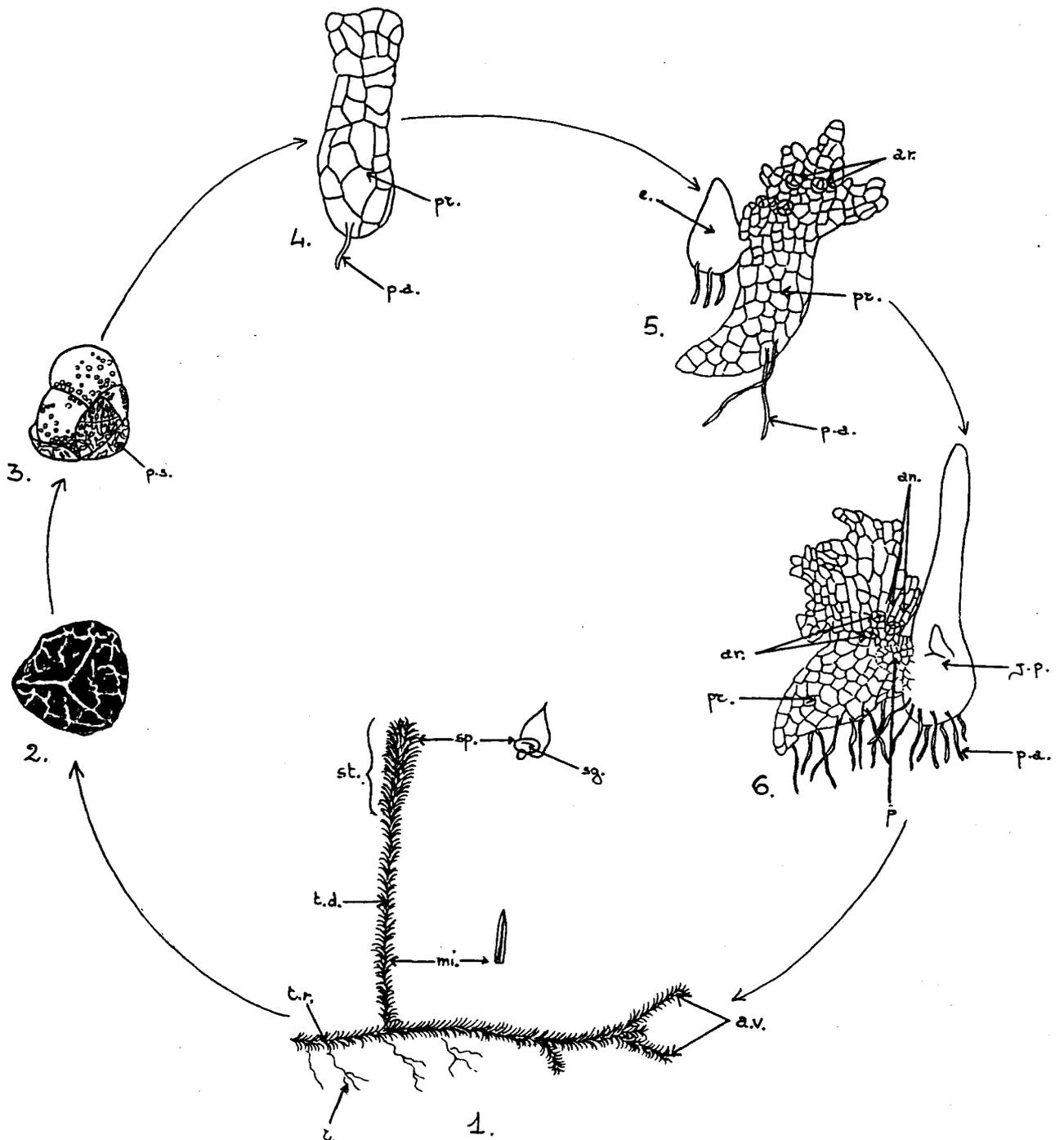


Fig. 4. Cycle biologique de *L. inundata* : de la germination de la spore jusqu'à la formation du sporophyte.

1, sporophyte (G. x 1). 2, face tri-radière de la spore (G. x 600). 3, spore en germination ayant encore des restes de la paroi (G. x 285). 4, jeune prothalle (G. x 15.4). 5, prothalle portant sur son côté un jeune embryon (G. x 15.4). 6, embryon à un stade plus avancé mais toujours attaché au prothalle qui commence à rétrécir (G. x 15.4). Les formes 4, 5 et 6 sont reproduites d'après Goebel (1887). Dessins réalisés par Atmane-Bruschetti F.

an, anthéridie ; ar, archégone ; a v, apex végétatif ; e, embryon ; j p, jeune plantule ; mi, microphyllé ; p a, poils absorbants ; p, pied ; pr, prothalle ; p s, paroi de la spore ; r, racine ; sg, sporange ; sp, sporophylle ; st, strobile ; t d, tige dressée ; t r, tige rampante.

5.2. Phase sporophytique

Dans la description morphologique des Lycopodes, nous tenons compte uniquement des **sporophytes**, partie aérienne et pérenne.

Chez la plupart des Lycopodes, le sporophyte est constitué d'une tige rampante longue de 5 à 10 cm qui donne le plus souvent naissance à une ou plusieurs tiges dressées de 3 à 6 cm. A maturité, ces tiges développent à leur sommet un épi sporangifère qui libère plusieurs millions de spores. Les tiges rampantes, appelées également tiges végétatives, présentent une ou plusieurs ramifications dichotomiques et sont généralement pourvues d'organes radiculaires appelés "racines" (Emberger, 1968 ; Prelli, 1990). D'après ces auteurs, les "racines" des Lycopodes sont des prolongement caulinaires non chlorophylliens qui deviennent souterrains et se spécialisent dans l'assimilation de l'eau et des éléments minéraux. Le plus souvent, ces "racines" sont dichotomiques et portent des poils absorbants. Les feuilles qui recouvrent les tiges sont nombreuses, petites et très peu vascularisées. On y distingue deux catégories : les plus abondantes, qui sont présentes à la fois sur les tiges rampantes et sur les tiges dressées ; puis, celles qui présentent uniquement au sommet des tiges dressées. Ces dernières nommées **sporophylles**, sont légèrement spécialisées car elles portent à leur aisselle les sporanges qui à maturité libèrent les spores. L'ensemble de ces feuilles constituent l'épi sporangifère ou **strobile** (Fig. 4).

Contrairement aux gamétophytes chez lesquels plusieurs auteurs ont mis en évidence la présence de champignon endophyte (Treub, 1884 ; Lang, 1899 ; Bruchmann, 1910), un seul travail a jusqu'à maintenant mis en évidence la présence d'un champignon endophyte chez le sporophyte des Lycopodes (Barrows, 1935). Cet auteur rapporte d'ailleurs que plusieurs espèces sont mycorhizées. Ces mycorhizes ont été observées à la fois à la surface de la plante, dans les racines et dans les rhizomes. A notre connaissance, depuis ces résultats, aucun autre travail confirmant ou infirmant ces données n'a été publié.

II. REPRODUCTION SEXUÉE CHEZ LES LYCOPODES

Comme chez les Spermaphytes, la reproduction sexuée chez les Lycopodes nécessite un gamète mâle (anthérozoïde) et un gamète femelle (oosphère). Mais, à l'opposé des Spermaphytes, la fécondation chez les Lycopodes nécessite absolument un milieu aquatique pour véhiculer l'anthérozoïde jusqu'à l'oosphère.

Durant le dernier siècle, l'embryogenèse zygotique a été largement étudiée chez les Spermaphytes. Les changements morphologiques et anatomiques caractérisant le développement embryonnaire chez ce groupe de plantes ont été largement décrits grâce à la

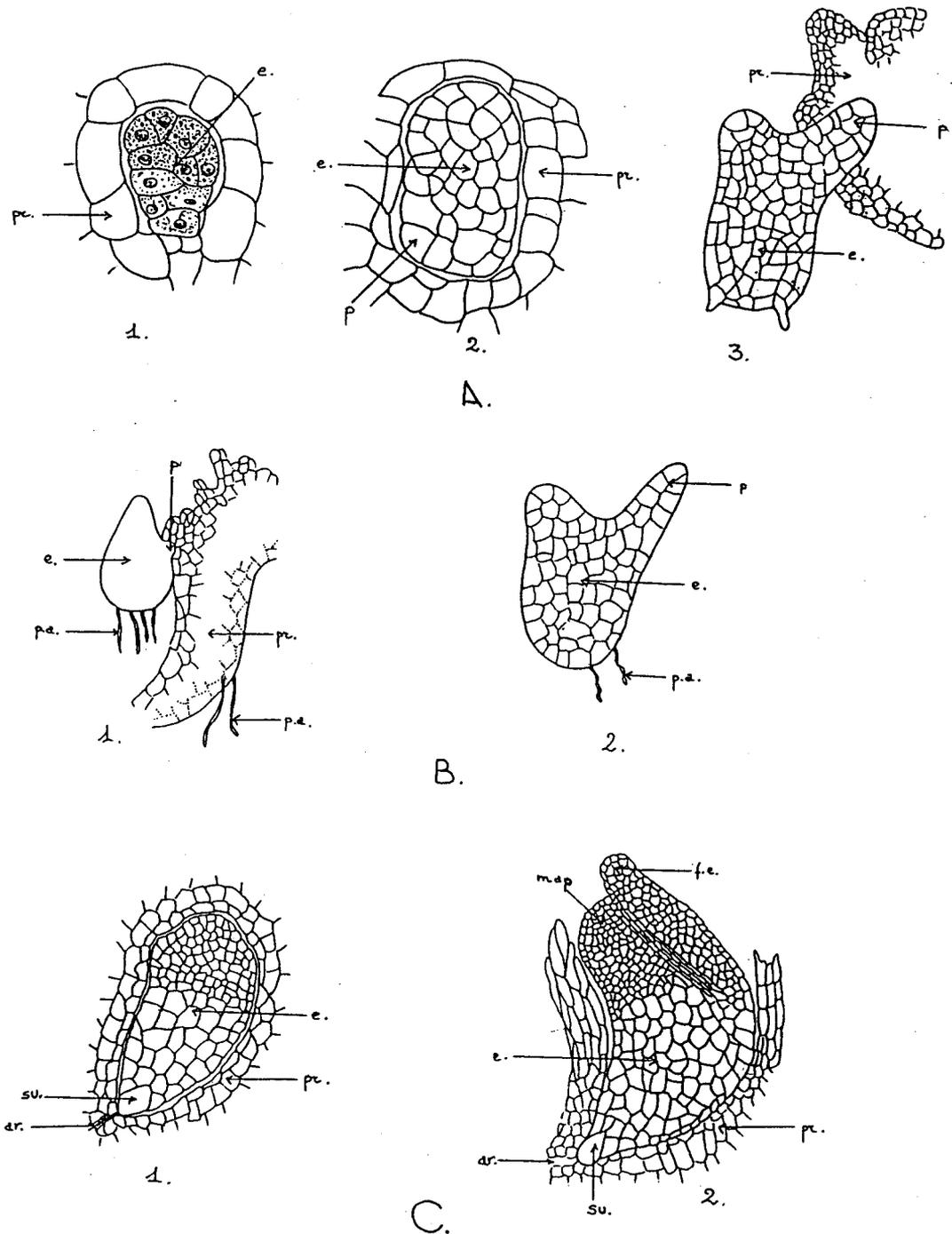


Fig. 5. Quelques formes caractéristiques de l'embryogenèse zygotique chez les Lycopodes. A, *Lycopodium cernum* : 1, coupe légèrement axiale d'un embryon encore enveloppé dans les cellules du prothalle (G. = diam x 300) ; 2, coupe légèrement axiale d'un embryon à un stade plus avancé. L'embryon est sur le point de percer le prothalle (G. = diam. x 300) ; 3, section axiale d'un embryon inséré au prothalle par l'intermédiaire de son pied (G. = diam. x 150). D'après Treub (1884). B, *Lycopodiella inundata* : 1, prothalle portant sur son côté un embryon ; 2, coupe transversale d'un embryon. D'après Goebel (1887). C, *Huperzia selago* : 1, coupe longitudinale d'un jeune embryon encore enveloppé dans les cellules du prothalle (G. x 96) ; 2, coupe longitudinale d'un embryon à un stade plus avancé. Deux zones sont nettement séparées : une inférieure comportant le suspenseur et une supérieure constituant la zone génératrice avec un méristème apical et une feuille embryonnaire (G. x 64). D'après Bruchmann (1910). Dessins réalisés par Atmane-Bruschetti.F.
 ar, archégone ; e, embryon ; f e, feuille embryonnaire ; m ap, méristème apical ; p a, poils absorbants ; p, pied ; pr, prothalle ; su, suspenseur.

microscopie photonique et électronique (annexe 3). En outre, la différenciation cellulaire a été bien étudiée en relation avec la biosynthèse et l'accumulation des protéines, des lipides et de l'amidon (West et Harada, 1993).

Par contre, très peu d'informations sont connues sur l'embryogenèse zygotique des Lycopodes. La plupart de ces données résultent d'observations faites sur ces plantes dans la nature (Treub, 1884 ; Goebel, 1887 ; Bruchmann, 1910). Treub fut le premier à s'intéresser à l'embryogenèse zygotique chez les Lycopodes. Son travail a porté essentiellement sur *Lycopodium cernuum*. Chez cette espèce, chaque prothalle ne donne naissance qu'à un seul sporophyte.

Chez les Spermaphytes, les embryons zygotiques présentent dès leurs premiers stades de développement une bipolarité caractérisée par un pôle apical, qui engendrera l'essentiel de la plante, et un pôle basal, qui engendrera une partie de la racine (Raynal-Roques, 1994). A l'inverse, les embryons zygotiques chez les Lycopodes ne présentent aucune polarité pendant leur jeune âge (Treub, 1884 ; Goebel, 1887 ; Bruchmann, 1910).

En 1884, Treub a réalisé un suivi relativement complet de l'embryogenèse zygotique chez *Lycopodium cernuum*. Au début de son développement, stade moins de 10 cellules, l'embryon est allongé et est constitué par une cellule basale relativement grande et les autres étant plus petites (Fig. 5 A1). A un stade de développement intermédiaire, correspondant à une vingtaine de cellules, l'embryon présente une forme de cylindre relativement allongé (Fig. 5 A2) et ne présente aucune polarité ni aucune organogenèse. A un stade plus avancé, l'embryon chez *L. cernuum* devient également plus bombé à la base et légèrement effilé au sommet avec la mise en place d'un pied qui permet de fixer l'embryon au prothalle (Fig. 5 A3). A partir de ce stade, une couche constituée de cellules de petite taille et plus ou moins allongées peut être distinguée à la périphérie de l'embryon. A un stade encore plus avancé, la partie effilée continuera à s'allonger et l'embryon prendra la forme d'une feuille bombée à la base. Treub qualifie cette partie basale bombée et riche en réserves amylacées de tubercule embryonnaire. Les réserves constituant ce tubercule sont nécessaires au développement de l'embryon. La première racine ainsi que les premiers faisceaux cribro-vasculaires ne se développent qu'au stade plantule avec 2 ou 3 cycles de feuilles.

En 1887, Goebel a réalisé quelques observations sur l'embryogenèse zygotique de *Lycopodiella inundata* dans la nature (Fig. 5 B). Pendant toute sa croissance, l'embryon reste attaché au prothalle par l'intermédiaire de son pied. A un stade pluricellulaire, cet embryon présente une structure bombée à la base et légèrement effilée au sommet. La partie basale peut développer quelques poils absorbants qui joueront un rôle dans l'assimilation de l'eau et des éléments minéraux. A un stade plus avancé, le sommet devient plus effilé et l'embryon prendra alors une forme de feuille bombée à la base. Plus tard, des ébauches foliaires se

développeront. Comme chez *Lycopodium cernuum*, la première racine ainsi que les premiers faisceaux cribro-vasculaires ne se développeront qu'au stade plantule avec plusieurs feuilles.

En 1910, Bruchmann a réalisé un suivi de l'embryogenèse zygotique chez *Huperzia selago*. L'embryogenèse y est peu différente de celle des deux espèces précédentes. En effet, dès les premiers stades, l'embryon zygotique chez *H. selago* présente une bipolarité structurale : une partie basale constituée par une seule cellule de grande taille et une autre partie constituée par de petites cellules. La grande cellule ne se divise plus et constituera le pied de l'embryon. Par contre, les autres cellules se diviseront pour engendrer ultérieurement une plantule. A partir d'une cinquantaine de cellules, la bipolarité de l'embryon devient plus évidente avec une partie basale constituée par des cellules de grande taille, et une partie au sommet constitué par des cellules de petites taille (Fig. 5 C1). Cette dernière partie constitue la zone méristématique qui assurera la formation des feuilles et la croissance en longueur de la tige de la plante (Fig. 5 C2). A l'inverse des deux espèces précédentes, l'embryon chez *H. selago* n'acquiert pas un aspect foliaire et ne forme pas un pied bien développé capable de rester fixé au prothalle. Avec cette bipolarité cellulaire, l'embryon zygotique semble être plus évolué que celui des autres Lycopodes, notamment *L. inundata* et *L. cernuum*.

Dans la plupart des documents reproduits à partir du travail de Bruchmann (1910), les auteurs (Emberger, 1968 ; Bold *et al.*, 1987 ; Prelli, 1990 ; etc.) confondent toujours l'embryon zygotique de *H. selago* et celui de *Lycopodium clavatum*. Dans son travail en 1910, Bruchmann a parlé de *L. clavatum*, mais pour illustrer l'embryogenèse zygotique chez cette espèce, il a montré des figures observées au cours de l'embryogenèse zygotique chez *H. selago*.

Tous ces travaux ont été réalisés pendant le XIX^{ème} ou au début du XX^{ème} siècle ce qui explique les données approximatives concernant la description de cette embryogenèse et le manque total d'informations sur la physiologie de ce phénomène. Ce vide scientifique pourrait aussi être expliqué par le fait que ces embryons se forment sur des prothalles qui sont de petite taille et qui sont le plus souvent enfouis dans un sol très riche en matière organique et en micro-organismes. C'est pourquoi il est très difficile de réaliser des observations sur des embryons dans la nature. La solution serait donc l'obtention in vitro, soit d'embryons zygotiques à partir des prothalles, soit d'embryons somatiques à partir d'explants végétatifs. Mais, aucun travail de culture in vitro n'a jusqu'à aujourd'hui été porté à notre connaissance.

III. REPRODUCTION VÉGÉTATIVE CHEZ LES LYCOPODES

1. *In vivo*

Ce type de reproduction est pratiqué par plusieurs espèces chez les Lycopodes. Chez le genre *Huperzia*, cette propagation est réalisée surtout par des bulbilles. Celles-ci sont situées près du sommet des axes. Chacune comporte un axe muni de 6 paires de feuilles opposées (Bonnet, 1972 et 1973). Une fois détachée de la plante mère, chaque bulbille peut engendrer une nouvelle plante.

Chez *Lycopodiella inundata*, la multiplication végétative est réalisée par des tiges rampantes. A la fin de chaque printemps ou au début de chaque été, les rameaux rampants émettent des nouvelles tiges horizontales qui survivront alors que les anciens rameaux dépérissent. Les nouvelles tiges se forment à partir des bourgeons latéraux qui résistent au froid de l'hiver.

2. *In vitro*

Lors de travaux préliminaires sur *L. inundata*, Atmane (1995) a pu montrer les difficultés liées à l'aseptisation des explants utilisés pour la culture *in vitro*. Etant donné qu'aucun travail de culture *in vitro* n'était connu chez les Lycopodiales, plusieurs milieux de culture ont été testés. Il s'avère que des bourgeons ou des cals peuvent être obtenus. Toutefois, la durée nécessaire à l'obtention d'une réponse physiologique est assez longue (2 à 3 mois) et de plus, les bourgeons obtenus présentaient des feuilles plus longues et mal formées. Enfin, étant donné le nombre extrêmement réduit des données disponibles, il nous a semblé nécessaire de réaliser d'autres expérimentations pour préciser les résultats et optimiser la composition des milieux de culture.

IV. INTÉRÊT MÉDICINAL DES LYCOPODES

C'est surtout la médecine populaire, notamment chinoise, qui a démontré l'intérêt thérapeutique des Lycopodes.

La plante entière de *Huperzia selago* était employée à faible dose pour provoquer le vomissement, pour éliminer des vers intestinaux chez l'Homme ou pour favoriser le cycle menstruel des femmes. On l'utilisait également pour combattre la rage ou en usage externe pour détruire les parasites du bétail (Parent, 1964).

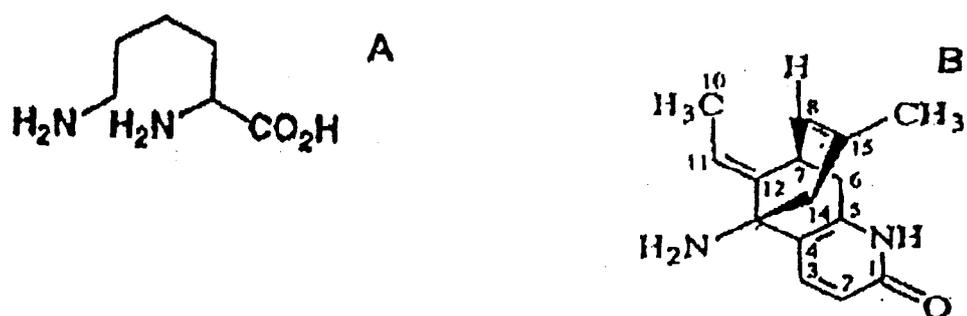


Fig. 6. A, structure chimique de la lysine. B, structure chimique de l'huperzine A.

Lycopodium clavatum servait à guérir les diarrhées, la dysenterie et les entérites, tandis que ses spores étaient utilisées dans la lutte contre les rhumatismes et bien d'autres maladies. Diverses inflammations, allant de l'eczéma aux ulcères, étaient traitées par cette même plante.

1. Les alcaloïdes chez les Lycopodes

Les alcaloïdes sont des substances d'origine biologique. Ils sont présents dans les vacuoles, et sont parfois associés avec les tanins. On les rencontre principalement chez les Angiospermes et les Gymnospermes. Leur présence est exceptionnelle chez les Ptéridophytes. Ils ont d'abord été mis en évidence chez certains membres de l'ordre des Lycopodiales (Garnier *et al.*, 1961).

D'un point de vue biochimique, les alcaloïdes sont formés à partir de la lysine (Fig. 6 A). Leur structure finale permet de les classer dans la famille des alcaloïdes comportant un noyau quinolizidinique.

Au cours du XX^{ème} siècle, de tels métabolites secondaires, comme la lycopodine ont été extraits chez *Lycopodium clavatum* et *Diphasiastrum complanatum* (Garnier *et al.*, 1961). On peut noter toutefois, que le terme lycopodine, utilisé pour ces deux genres, correspond en fait à des molécules un peu différentes. Les alcaloïdes les plus prometteurs au niveau des résultats de tests cliniques ont été extraits chez *Huperzia serrata* (Liu *et al.*, 1986) et *H. selago* (Ayer *et al.*, 1989). Ces deux espèces produisent de l'huperzine A et B (Fig. 6 B).

Jusqu'à présent, ces alcaloïdes ont été analysés à partir d'extraits de plantes entières.

2. Actions thérapeutiques

De nos jours deux voies d'utilisation sont possibles : en homéopathie et en psychiatrie. Ainsi, *Lycopodium clavatum* peut être prescrit en homéopathie pour pallier différentes inflammations (abcès, ulcère, douleurs rhumatismales) (Lathoud, 1932 ; Prat, 1981). Au niveau psychiatrique, c'est l'huperzine A qui est prescrite.

Cette huperzine A est un alcaloïde qui a été isolé pour la première fois en Chine à partir de *Huperzia serrata* (Liu *et al.*, 1986). De par la présence d'un site anti-cholineestérasique, il est utilisé au même titre que certaines drogues habituelles : physostigmine, neostigmine, pyridostigmine ou tetrahydroaminoacridine (Tang *et al.*, 1989). Leurs actions se situent au niveau du système nerveux central et périphérique par inhibition réversible de l'acétylcholineestérase.

C'est ainsi que des tests cliniques sont en cours en Asie avec l'huperzine A sur des malades d'Alzheimer. Ces derniers souffrent d'une déficience en acétylcholine au niveau du cerveau. L'huperzine pourrait stabiliser le taux d'acétylcholine, ce qui améliore les fonctions

liées à la mémoire et de cognition (Xu *et al.*, 1995 ; Tang, 1996). A l'inverse des autres molécules disponibles pour traiter cette maladie, l'huperzine A est facilement tolérée lors de l'administration par voie orale, elle traverse facilement la barrière hémato-encéphalique et son action est de longue durée (Tang, 1996).

Par ailleurs, l'huperzine A, en se fixant sur l'acétylcholinestérase, prive les gaz chimiques utilisés dans les guerres (gaz Sarin, gaz Soman) de leur cible neurologique (Grunwald *et al.*, 1994 ; Lallement *et al.*, 1997).

Toutes ces propriétés font des alcaloïdes des Lycopodes des composés très demandés. Mais, faute de pouvoir les extraire à partir de tissus cultivés in vitro, des récoltes massives sont réalisées dans la nature ce qui accélère considérablement la disparition de ces plantes.

V. PRÉSENTATION DU TRAVAIL DE THÈSE

1. Contexte

Dans les années 80, la population de *Lycopodiella inundata* était bien représentée dans la Réserve Naturelle des landes de Versigny dans l'Aisne (Bournérias *et al.*, 1983). En 1993, cette population ne comptait plus qu'un seul pied stérile. Remarquant l'urgence d'intervenir, le CRP/CBNBL a entrepris, en collaboration avec le Conservatoire des Sites Naturels de Picardie, un programme conservatoire visant à sauver le dernier pied de la Lycopodielle inondée.

En 1994/95, lors d'un stage de D. E. A, deux voies de propagation *in vitro* ont pu être partiellement explorées : voie végétative à partir des explants et voie sexuelle à partir des spores. Après plus de deux années de travail, aucune germination de spore n'a été possible. Par contre, la première voie a permis d'obtenir une organogénèse. Chaque étape de culture dure plus de 3 mois ce qui n'a pas permis de réaliser le cycle de multiplication dans sa totalité, d'où la nécessité de poursuivre ce travail.

2. Objectifs de la thèse

Compte tenu des résultats précédemment obtenus et de l'état des lieux bibliographiques, il est apparu nécessaire de développer des expérimentations selon trois axes :

- *la maîtrise et l'optimisation de chaque phase de la multiplication in vitro de Lycopodiella inundata à partir, soit des apex, soit de cals, puis l'acclimatation des vitroplants en vue de la réintroduction ou du renforcement de cette espèce dans la nature ;*

- la réalisation d'une étude histo-cytologique pour définir l'origine des bourgeons et des structures organisées obtenus et pour permettre la description des différentes phases de cette morphogenèse ;
- l'établissement d'une étude phytochimique préliminaire pour mettre en évidence l'intérêt médicinal de cette plante par une analyse des alcaloïdes.

Chacun des objectifs précités fera l'objet d'une partie de ce mémoire.

3. Contexte scientifique

Compte tenu de la nature de ce sujet, plusieurs collaborations ont été initiées pour mener à bien ce programme de recherche. Ainsi :

- les expérimentations visant la mise au point du protocole de la multiplication *in vitro* ainsi que l'acclimatation ont été réalisées au Centre Régional de Phytosociologie / Conservatoire Botanique National de Bailleul sous la direction du Docteur Vincent BOULLET ;
- pour toutes les expérimentations *in situ*, nous avons travaillé étroitement avec le Conservatoire des Sites Naturels de Picardie ;
- les études de multiplication *in vitro* et d'histo-cytologie ont été menées en collaboration avec le laboratoire de Physiologie Cellulaire et Morphogenèse Végétale à l'Université des Sciences et Technologie de Lille sous la responsabilité du professeur Jacques VASSEUR ;
- enfin, l'étude phytochimique a été développée en collaboration avec le laboratoire de Phytotechnologie à la faculté de Pharmacie d'Amiens sous la responsabilité du professeur Marc-André FLINIAUX.

Afin de réaliser ces objectifs, il a fallu pallier différents problèmes :

- vu le statut de plante protégée à l'échelle nationale dont bénéficie *Lycopodiella inundata*, la récolte de celle-ci dans la nature est très réglementée ce qui nous a obligé à travailler avec un nombre de plantes très réduit tout le long de nos expérimentations ;
- la seule population de *Lycopodiella inundata* persistant encore au nord de Paris n'est pas très abondante, d'où la nécessité d'aller se procurer des plantes en Mayenne (en accord avec le Conservatoire Botanique National de Brest) ;
- aucun des pieds récoltés dans la nature et cultivés dans le jardin conservatoire du CRP/CBNBL n'a formé de nouvelles tiges après l'hiver et ce malgré la construction de tourbières artificielles ;

- les explants mis en culture *in vitro* ont un cycle de multiplication très long ;
- pour connaître l'origine des bourgeons *in vitro*, il a fallu établir pour la première fois une étude histo-cytologique ;
- de la même façon, il a fallu mettre au point des techniques de détermination qualitatives et quantitatives des alcaloïdes à partir des explants cultivés *in vitro*, ainsi que leur pré-purification.

CHAPITRE II : MATÉRIELS ET MÉTHODES

A. CULTURE *IN VITRO*, CROISSANCE ET ACCLIMATATION DES PLANTES

I. MATÉRIEL VÉGÉTAL

Afin de préserver le dernier pied de la population picarde, nous avons utilisé pour nos expérimentations des plants de *Lycopodiella inundata* récoltés à la fois dans la sablière du Lièvre à Saint-Amand dans le Nord, et dans la lande tourbeuse de Villepail en Mayenne. Dans les deux stations, cette espèce est bien représentée et elle n'est pas immédiatement menacée de disparition. Les essais de multiplication *in vitro* ont été réalisés à la fois à partir de fragments de tiges rampantes et de bourgeons apicaux, 3 à 5 mm, qui seront appelés tout le long de ce travail apex végétatifs. Ils constituent la partie terminale des tiges rampantes. Les deux types d'explants sont considérés ici comme explants primaires à cette phase initiale de culture *in vitro*. Pour une bonne conservation des plants récoltés dans la nature, ces derniers ont été placés durant le transport entre leur lieu de récolte et Bailleul dans des bacs contenant du substrat provenant du site naturel et bien humidifié.

II. PRÉPARATION DES EXPLANTS ET CONDITIONS DE CULTURE

1. Aseptisation des apex

Afin de réaliser cette aseptisation, nous avons utilisé et modifié les protocoles décrits par Atmane (1995) et Atmane *et al.* (1996b). Ainsi, les apex ont été tout d'abord rincés abondamment à l'eau courante afin d'éliminer toute la terre fixée à la tige et aux racines des apex, puis, trempés dans plusieurs bains successifs :

- tween 80 (10 %), pendant 20 min
- tween 80 (10 %) - hypochlorite de calcium (2, 5 ou 8 %), le temps d'action de chaque mélange est de 5 ou 8 min
- mercurobutol[®] (10 %), pendant 2 min
- éthanol (70 %), pendant 2 min
- trois rinçages successifs dans de l'eau distillée stérile, pendant 5, 5 et 10 min.

Tous les bains ont été réalisés dans des piluliers stériles (25 x 40 mm) sous une hotte à flux laminaire.

2. Conditions générales de culture

Les différentes phases de culture comportent des paramètres communs. Les milieux de culture sont solidifiés par 7.5 g L⁻¹ d'agar (Pronatec) et contiennent 20 g L⁻¹ de saccharose. Le pH a été ajusté à 5.4 avec KOH 0.1 N avant autoclavage à 120 °C pendant 20 min. Les cultures sont réalisées dans des tubes 24 x 200 mm contenant 12.5 mL du milieu de culture. Ensuite, les apex sont maintenus en culture sous une photopériode de 14 h / 10 h (20 ± 1 °C pendant la phase lumineuse et 16 ± 1 °C pendant la phase d'obscurité). L'éclairage est réalisé avec des lampes fluorescentes 36 W (Philips Cool) avec un flux de 96 W m⁻².

3. Influence des sels minéraux et des vitamines

Cinq milieux d'induction (MI) ont été testés (Tableau 2). Ces milieux diffèrent essentiellement par leur composition en sels minéraux. Ces derniers ont été sélectionnés sur une base du milieu de Murashige et Skoog (1962). Les résultats ont été analysés après 11 semaines de culture pour l'induction des bourgeons et 13 semaines pour l'induction du cal.

Tableau 2. Différents milieux de culture testés durant la phase d'induction du bourgeonnement et de la callogenèse à partir des apex. *, milieu de Murashige et Skoog (1962), MS, le chiffre correspond au degré de dilution. MI: Milieu d'induction.

Milieux testés	Macro-éléments*	Micro-éléments *	Additifs (mg L ⁻¹)		
			myo-inositol	thiamine	acide nicotinique
MI-a	MS 1	MS 1	100		
MI-b	MS 1	MS 1			
MI-c	MS	MS	100		
MI-d	MS	MS	50	16	16
MI-e	MS	MS	50		

4. Influence des cytokinines

Dans le but de tester l'influence des cytokinines sur l'induction de l'organogenèse et la callogenèse, les apex ont été mis en culture sur le milieu MI-e additionné de 0.01 mg L⁻¹ de AIB combiné avec 0, 0.3, 0.5, 1 ou 1.5 mg L⁻¹ de BAP ou de kinétine. Les résultats ont été analysés après 13 semaines de culture.

III. FORMATION DE BOURGEONS PAR VOIE DIRECTE

1. Obtention de plantes

Afin d'induire un bourgeonnement, les apex ont été tout d'abord cultivés sur le milieu d'induction (MI-e additionné de 0.01 mg L⁻¹ de AIB et 0.3 mg L⁻¹ de kinétine) pendant 11 semaines puis, transférés sur le milieu de bourgeonnement MB-a ou MB-b (Tableau 3) selon le protocole décrit par Atmane (1995). Les résultats ont été analysés après 13 semaines de culture sur chacun des deux milieux.

2. Optimisation de la formation de bourgeons

Dans le but d'optimiser la qualité et la quantité des bourgeons régénérés, des apex préalablement aseptisés ont été mis en culture sur le milieu MI-e, additionné de 0.01 mg L⁻¹ de AIB et de 0.3 mg L⁻¹ de kinétine, pendant 11 semaines puis transférés sur l'un des milieux (MB-c à MB-f) décrits dans le Tableau 3. Ces milieux diffèrent essentiellement par leur composition en macro-éléments et en phytohormones. L'analyse des résultats a été réalisée après 13 semaines de culture.

Tableau 3. Composition des différents milieux de bourgeonnement testés pour optimiser les résultats à partir des apex. MS 1/4, milieu de MS dilué 4 fois. **A**, NH₄NO₃; **B**, KNO₃; **C**, KH₂PO₄; **D**, KCl; **E**, CaCl₂, 2H₂O; **F**, MgSO₄, 7H₂O. * les quatre combinaisons hormonales testées pour le milieu MB-c ont aussi été appliquées pour les milieux MB-d, MB-e et MB-f.

Milieux testés	Macro-éléments (mg L ⁻¹)						Micro-éléments	L-glutamine (mg L ⁻¹)	Phytohormones (mg L ⁻¹)		
	A	B	C	D	E	F			AIB	Kinetin	AG ₃
MB-a	412.5	475	42.5	0	110	92.5	MS		0.01	0.3	0
MB-b	412.5	475	42.5	0	110	92.5	MS		1.5		0.5
MB-c	250	250	100	0	100	92.5	MS		0		0
MB-c	250	250	100	0	100	92.5	MS		0.5		0.1
MB-c	250	250	100	0	100	92.5	MS		1		0.2
MB-c	250	250	100	0	100	92.5	MS		1.5		0.5
MB-d*	100	100	200	0	50	80	MS			*	
MB-e*			200	0	50	80	MS	328.5		*	
MB-f*	100		200	0	50	80	MS	146		*	

IV. FORMATION DE PLANTULES PAR VOIE INDIRECTE (CALLOGENÈSE)

1. Obtention et optimisation de la production des cals à partir des apex

Afin d'induire la production et la propagation des cals, des apex initialement cultivés pendant 13 semaines sur le milieu MI-e additionné de 0.01 mg L⁻¹ de AIB et de 0.3 mg L⁻¹ de kinétine ont été repiqués soit sur le milieu MI-e additionné de la même balance hormonale ; soit, sur ce même milieu mais additionné de 0.01 mg L⁻¹ de AIB et de différentes concentrations de BAP et de kinétine. Les résultats ont été observés après un cycle de 13 semaines de culture.

Dans le cadre de l'étude de l'influence du type de milieu (solide ou liquide) et du poids initial des cals sur la production de matière fraîche, nous avons procédé de la façon suivante :

- des portions de cals pesant 600 mg (10-12 mm de diamètre) et des portions de 48 mg (3-5 mm de diamètre) ont été mis en culture dans le milieu MI-e solide. Un autre lot similaire a été mis en culture dans un milieu MI-e liquide ;
- les portions de 600 mg ont été mises en culture dans 25 mL de milieu, et celles de 48 mg dans 12.5 mL ;
- les essais menés en milieu solide ont été réalisés dans des tubes (24 x 200 mm) fermés avec des bouchons de cellulose pressée, et disposés en salle de culture sous une photopériode de 16 h/ 8 h (lumière/obscurité).

La masse initiale a été pesée sur balance en conditions aseptiques. La masse fraîche a été mesurée après 7 et 14 semaines de culture. L'augmentation de masse fraîche est calculée comme suit :

$$\frac{\text{Masse fraîche finale} - \text{Masse fraîche initiale}}{\text{Masse fraîche initiale}} \times 100$$

Il n'a pas été possible de mesurer la masse sèche obtenue, car compte-tenu de la faible quantité de matériel disponible, nous avons préféré conserver les cals vivants à l'issue de ces tests de façon à poursuivre les expérimentations.

2. Induction de l'embryogenèse et formation de plantules à partir des cals

Les cals obtenus à partir des apex ont été repiqués chaque 13 semaines sur le milieu MI-e. Pour induire l'embryogenèse somatique et la formation de plantules, les cals ont été transférés sur le milieu MB-a ou MB-b définis au préalable par Atmane (1995) et repris dans

le tableau 3. La durée de culture est de 13 semaines. Cette durée permet d'obtenir des plantules individualisées au stade 2-3 cycles de feuilles.

Pour optimiser le nombre et la qualité de plantules obtenues à partir des cals, nous avons testés à la fois, l'influence des sels minéraux, notamment les macroéléments, et l'influence de la taille initiale des cals sur le nombre de plantules obtenues. Ainsi, des cals mesurant 3 à 7.5 mm en diamètre ont été mis en culture sur l'un des milieux décrits dans le tableau 3. Le total de plantules obtenues a été déterminé pour le seul milieu MB-d additionné de 0.5 mg L⁻¹ de AIB et de 0.1 mg L⁻¹ de AG₃ qui a induit un nombre optimal de plantes.

V. CROISSANCE ET ENRACINEMENT

Les bourgeons (voie directe) et les plantules issues de l'embryogenèse somatique (voie indirecte) ont été placés séparément en tube de culture, sur le milieu MB-d comprenant 0.5 mg L⁻¹ de AIB et 0.1 mg L⁻¹ de AG₃. Afin d'optimiser cette phase de croissance, des tests ont été menés sur les échanges gazeux et donc sur le type de bouchage des tubes de culture. Ainsi, trois types de bouchons ont été testés : polypropylène, coton et cellulose pressée. Dans les trois cas, la longueur des plantes a été mesurée après 13 semaines de culture.

Chaque plante issue de cette première phase de culture a ensuite été placée sur le milieu MB-d sans phytohormone. Cette étape a pour but principal de favoriser à la fois le développement caulinaire (appréciée par le nombre de tiges rampantes et le nombre de dichotomies) et le développement racinaire, y compris la formation de nouvelles racines. De nombreux auteurs ont rapporté que l'addition de charbon activé favorisait ce type d'événements (Fridborg *et al.*, 1978 ; González *et al.*, 1998). Par conséquent, différentes concentrations de charbon activé (0, 0.5, 1, 1.5 et 2 g L⁻¹) ont été ajoutées dans le but d'optimiser à la fois le nombre de tiges et le nombre de racines. Les plantes sont cultivées dans des pots en verre (50 x 70 mm) fermés avec des bouchons en polypropylène (type Magenta, Sigma). La longueur des plantes issues d'*in vitro*, et le nombre et la qualité des racines, ont été analysés après 13 semaines de culture.

VI. ACCLIMATATION DES VITROPLANTS

Quand les vitroplants atteignent une longueur de 30-40 mm, ils sont transférés dans des pots en plastiques contenant soit 75 % de sable acide et 25 % de tourbe blonde, soit 95 % de sable acide et 5 % de charbon activé. Ces substrats sont utilisés comme tels ou stérilisés par autoclavage pendant 20 min à 120 °C. Les pots ont été préalablement désinfectés avec de l'hypochlorite de sodium et abondamment rincés à l'eau distillée. Avant le repotage, chaque vitroplant a été débarrassé de la gélose sous l'eau courante afin de diminuer au maximum le

risque de contamination fongique. La tourbe ou le charbon activé est déposé à la surface du sable acide. Cette disposition est due au fait que, dans le site naturel, la matière organique se trouve à la surface du sable. Les pots sont conservés dans la chambre de culture à une température jour de 20 ± 1 °C pendant 14 h et une température nuit de 16 ± 1 °C pendant 9 semaines puis transférés dans une serre soumise aux conditions climatiques naturelles. Le pourcentage des plants acclimatés, vivants a été déterminé après 31 semaines de culture (soit 7 mois).

1. Optimisation de l'acclimatation des plantes

1.1. Acclimatation dans des conditions contrôlées sur des substrats provenant du site naturel

Nous avons utilisé le sable acide et la matière organique récupérés sur le site de la sablière dite "du Lièvre". La matière organique correspond à la couche superficielle (10 à 20 mm d'épaisseur). C'est une couche de couleur noirâtre contenant une microflore et des bactéries. Sur cette base, différentes conditions ont été testées :

- Condition 1: le substrat est constitué par 98 % de sable acide autoclavé et par 2 % de la matière organique non autoclavée. Le sable est déposé au fond de la mini-serre, tandis que, la matière organique est déposée en surface comme dans la nature. L'ensemble est arrosé avec de l'eau de pluie.
- Condition 2: il s'agit des mêmes traitements que dans la condition 1 ; mais dans ce cas, la matière organique est autoclavée.
- Condition 3: le substrat est constitué par 99 % de sable acide autoclavé et 1 % de charbon activé autoclavé. Le sable est déposé au fond de la mini-serre, tandis que, le charbon activé est déposé en surface. Les vitroplants sont arrosés avec le filtrat non autoclavé de la matière organique.
- Condition 4: il s'agit des mêmes traitements que dans la condition 3, mais, le filtrat de la matière organique a été autoclavé.
- Condition 5: il s'agit des mêmes paramètres que dans les conditions 3 et 4, sauf qu'ici les vitroplants sont arrosés avec de l'eau de pluie.

Les vitroplants repiqués dans ces différentes conditions, ont été placés dans la chambre de culture à une température jour de 20 ± 1 °C / 14 h et une température nuit de 16 ± 1 °C / 10 h pendant 9 semaines puis transférés en serre. Le pourcentage des vitroplants survivants et le degré de leur croissance (longueur de la tige, nombre de racines et d'apex végétatifs formés) ont été déterminés après 31 semaines.



Fig. 7. *Lycopodiella inundata* (L.) Holub dans son site naturel : sablière du lièvre (Saint-Amand, Nord).

- A. Pied développant une tige rampante avec un apex végétatif (a v) et une tige dressée avec un apex sporangifère (a s). Barre = 10 mm.
- B. Plants obtenus *in vitro* et acclimatés momentanément dans la sablière du lièvre. Barre = 37.5 mm.
- C. Habitat naturel de *L. inundata* dans la sablière du lièvre (* *Drosera rotundifolia* L.). Barre = 10 mm.

1.2. Acclimatation sur un site naturel abritant encore la *Lycopodiella inundata*

Afin de vérifier l'influence des micro-organismes sur l'acclimatation, plusieurs vitroplants de *Lycopodiella inundata* ont été placés momentanément dans le site de la sablière "du Lièvre" qui abrite encore cette plante (Fig. 7 A, B, C).

Les vitroplants ont été tout d'abord mis en pots sur sable acide et charbon activé autoclavés, puis gardés pendant 9 semaines à une température jour de 20 ± 1 °C/14 h et une température nuit de 16 ± 1 °C / 10 h, et enfin transférés dans le site naturel. Ces vitroplants ont été complètement isolés de la population locale pour éviter tout flux de gènes entre vitroplants et plantes naturelles. Après 3 semaines, tous ces vitroplants ont été retirés du site puis laissés en culture en serre.

2. Étude préliminaire des micro-organismes présents dans un habitat naturel de *L. inundata*

Le but est de savoir si des micro-organismes spécifiques sont présents dans un site naturel de *L. inundata* et s'il y a une relation entre cette espèce et ces micro-organismes. Pour se faire, des analyses de substrats ont été réalisées sur trois sites différents de *L. inundata* : la sablière "du Lièvre" (Saint-Amand, Nord), la lande tourbeuse de Villepail (Mayenne) et la tourbière de Rimat (Massif du Mont Dore).

Ces analyses ont été réalisées sur du substrat fixé sur les racines et sur du substrat situé à quelques cm et à plusieurs mètres des plants de *L. inundata*.

B. ANALYSES CYTOLOGIQUES

I. TECHNIQUES CYTOLOGIQUES

1. Fixation, déshydratation et inclusion

Les explants à analyser sont prélevés sous hotte à flux laminaire puis sont placés dans 0.5 mL de fixateur, F.A.E. (formaldéhyde 37 % : 6.5 mL, acide acétique glacial 100 % : 3.5 mL, éthanol 50 % : 100 mL). L'ensemble est placé à 4 °C et à l'obscurité pendant 48 à 72 h.

Après fixation, chaque explant est placé à température ambiante pendant 30 min successivement dans l'éthanol à 50 %, 70 %, 90 % et 100 % (annexe 5).

Après déshydratation, chaque explant est imprégné sous vide pendant 18 h par un mélange de résine JB-4, 100 mL de la solution à JB-4 + 0.9 g du catalyseur C (Polysciences). La résine est de type butyl methacrylate hydrophile.

L'inclusion est réalisée à 4 °C (sur glace) avec une solution de résine fraîchement préparée (solution A additionnée du catalyseur C à 0.9 %, et du durcisseur B à 4 %). Chaque explant est placé dans une capsule de gélatine taille 2, avec un diamètre de 6 mm (TAAB) contenant 330 µL de la solution de résine " A+B+C ". Aussitôt après, les moules sont refermés et la polymérisation se fait en condition anaérobie à température ambiante pendant 60 min.

2. Confection des coupes semi-fines

Les coupes sont réalisées avec un ultramicrotome LEICA RM 2065. Les coupes de 3 µm sont obtenues avec un couteau de verre sec (verre de qualité d'ultramicrotomie, Pelanne), récupérées avec des pinces et déposées sur un ménisque d'eau bidistillée additionnée d'ammoniaque pour faciliter leur déplissage. La lame de verre est ensuite séchée sur une platine chauffante à 50 °C pendant 15-20 min.

II. MÉTHODES DE COLORATION DES COUPES SEMI-FINES

Trois types de colorations ont été utilisées (annexe 5) :

- Bleu de Toluidine

Les coupes sont laissées pendant 30 secondes dans une solution de Bleu de Toluidine,

chlorhydrate de triméthylthionine, (0.5 % p/v dans l'eau distillée). Après rinçage, la coloration est régressée à l'eau distillée jusqu'à décoloration complète de la résine. Le bleu de toluidine est metachromatique sous toutes ses formes. C'est un bon colorant des noyaux et des nucléoprotéines (Langeron, 1949).

- Simple coloration : Acid Periodic-Schiff : P. A. S.

Les coupes sont tout d'abord placées pendant 50 min dans l'acide périodique (0.5 % p/v) et abondamment rincées à l'eau distillée. Elles sont ensuite traitées par un bain de réactif de Schiff (BDH) pendant 4 min et rincées à l'eau distillée. Cette réaction permet de mettre en évidence les polysaccharides qui prennent une coloration rosâtre.

- Double coloration : P. A. S. + Naphtol-Blue-Black

Les coupes précédemment colorées avec le P. A. S. sont placées dans le Naphtol Blue Black (1 % p/v dans l'acide acétique 7 % v/v) à 50 °C pendant 5 min puis la coloration est régressée par l'acide acétique à 7 % (v/v). Le Naphtol Blue Black colore spécifiquement les protéines solubles et insolubles en bleu noir.

Après colorations, les lames histologiques sont séchées à l'air comprimé, puis montées dans une résine synthétique de montage (Eukitt®, Kindler).

C. PHYTOCHIMIE

Pour tenter de caractériser les alcaloïdes chez *Lycopodiella inundata*, nous avons surtout utilisé comme matière première végétale des vitroplants et des cals. Vu le statut de plante protégée à l'échelle nationale dont bénéficie *L. inundata*, seuls quelques pieds venant de la nature ont été utilisés pour pouvoir comparer les profils alcaloïdiques de ces derniers à ceux des cals ou plantes issues d'*in vitro*.

Les cals et les vitroplants ont été obtenus et entretenus *in vitro* selon les conditions de culture décrites précédemment dans la partie A au début de ce chapitre. Les cals ont été cultivés soit sur milieu solide soit sur milieu liquide. Au moment de leur utilisation, les vitroplants possédaient plusieurs racines et mesuraient 20-40 mm en longueur.

I. EXTRACTION ET PURIFICATION DES ALCALOÏDES

Avant chaque analyse, la masse fraîche de chaque explant a été mesurée. Les cals et les vitroplants ont été retirés des tubes et pesés ; les fragments des plantes sauvages et les plantes issues d'*in vitro* ont été épongées sur filtre. La masse sèche correspond à la masse de ces différents matériels après 36 h de lyophilisation (Vitris N° 10-324).

1. Extraction des alcaloïdes

Le caractère amphotère des alcaloïdes permet leur extraction à l'état de composés par une solution aqueuse d'acide dilué, ou sous forme de bases libres par un solvant organique en milieu basique. Ils peuvent également être extraits sous l'une ou l'autre forme par des solvants semi-polaires tels que les alcools (Fliniaux, 1991).

Pour extraire les alcaloïdes chez *L. inundata*, nous avons choisi un protocole habituellement employé pour extraire les alcaloïdes tropaniques (Manceau, 1992). Ce protocole consiste à la réalisation d'une double extraction (2 heures puis 1 heure) par un mélange chloroforme / ammoniacque 27 % (49/1, v/v). Cette opération est effectuée sous réfrigérant à reflux à chaud dans les ballons dont la taille est adaptée au volume des solvants utilisés. L'ammoniacque est l'agent d'alcalinisation qui permet de déplacer les alcaloïdes de leurs combinaisons salines. Les bases ainsi libérées sont ensuite solubilisées dans le chloroforme (solvant organique). Après chaque extraction, la solution chloroformique est séparée du marc par filtration, puis séchée sur du sulfate de sodium qui permet d'éliminer les traces d'eau que le filtrat peut contenir. Ensuite, le chloroforme est éliminé par évaporation sous pression réduite à 40 °C (Rotavapor) ce qui permet d'obtenir un premier **extrait brut**. Cet extrait brut est fortement chlorophyllien.

2. Purification des alcaloïdes

Pour purifier l'extrait brut obtenu après extraction, nous avons testé deux procédés :

Procédé 1 : C'est le protocole classique (Paris et Cosson, 1965). L'extrait brut est repris 3 fois par 10 à 30 mL, selon la quantité des extraits bruts, de H₂SO₄ 0.1 N ; un chauffage modéré à 40 °C pendant 10 min permet d'en augmenter l'efficacité. La solution d'acide va redissoudre les substances hydrosolubles de l'extrait brut ainsi que les alcaloïdes sous forme de sels. La solution est filtrée pour éliminer les composés insolubles. Après filtration sur une ampoule à décanter, on alcalinise à pH = 9-10 avec de l'ammoniaque 27 % ce qui transforme les alcaloïdes en bases solubles dans les solvants organiques. La phase aqueuse est alors épuisée par 3 x 20 mL de chloroforme. Les phases chloroformiques sont réunies, séchées sur sulfate de sodium, filtrées et concentrées sous pression réduite. Les **résidus secs** ainsi obtenus ne contiennent que les **alcaloïdes totaux** (Bruneton, 1993). Pour une analyse par Chromatographie Liquide Haute Performance (CLHP), les résidus secs sont repris à 40 °C pendant 10 min par 10 à 30 mL de la phase mobile utilisée pour l'analyse par CLHP. Cette phase mobile est composée d'un mélange de (v/v) : acétonitrile (330 mL), triéthylamine (400 µL), acide phosphorique (2 mL) et eau (1670 mL). Par contre, pour une analyse par Chromatographie sur Couche Mince (CCM), chaque résidu sec a été repris par 10 à 30 mL de méthanol.

Procédé 2 : Ce procédé est classiquement utilisé pour les alcaloïdes non ou très peu polaires (Fliniaux, 1991). Il consiste à reprendre l'extrait brut directement par la phase mobile après un chauffage à 40 °C pendant 10 min. Il n'y a donc pas de passage par l'acide sulfurique ni d'alcalinisation. Pour notre cas précis, l'extrait brut a été repris par 10 à 30 mL de la phase mobile dont la composition a été détaillée ci-dessus. Après filtration et dilution, la solution a été analysée par CLHP.

3. Optimisation de la purification

Les procédés 1 et 2 n'ont pas permis d'obtenir l'ensemble des alcaloïdes du résidu sec, puisque dans la fraction aqueuse épuisée (chloroforme à pH 9-10), nous trouvions encore des alcaloïdes après analyse par CLHP. C'est pour cette raison que nous avons essayé d'améliorer cette étape. Ainsi, nous avons légèrement modifié le procédé 1 en nous basant sur les travaux de Ayer *et al.* (1989).

L'extrait brut obtenu a été repris 6 fois, au lieu de 3 fois pour le procédé 1, par 10 à 30 mL d' H_2SO_4 0.1 N après un chauffage à 40 °C pendant 10 min. Les solutions aqueuses de sels d'alcaloïdes ainsi obtenues sont réunies et alcalinisées à pH 9-10 avec de l'ammoniaque 27 %. Ces phases sont ensuite épuisées par 6 x 20 mL de chloroforme, au lieu de 3 fois pour le procédé 1. Enfin, les phases chloroformiques décantées, sont réunies, séchées sur sulfate de sodium, filtrées et concentrées sous pression réduite. Il résulte alors un **résidu sec** : les **alcaloïdes totaux**. Comme pour le procédé 1, pour une analyse par CLHP, les alcaloïdes totaux sont repris à 40 °C pendant 10 min par 10 à 30 mL de la phase mobile CLHP. Par contre, pour une analyse par CCM, les alcaloïdes totaux sont repris par 10 à 30 mL de méthanol.

Ce nouveau procédé de purification, P3, a été retenu pour purifier les alcaloïdes après leur extraction à partir des calcs et des vitroplants.

II. DOSAGE ET ANALYSE DES ALCALOÏDES

Deux techniques d'analyse ont été utilisées : la chromatographie sur couche mince (CCM) et la chromatographie liquide haute performance (CLHP) en phase inverse.

1. Mise en évidence par chromatographie sur couche mince (CCM)

Les résidus secs des calcs et des vitroplants ont été séparément repris par du méthanol avant chaque analyse par CCM. Cent μL de cette solution seront utilisés comme dépôt sur la plaque de couche mince.

Support : Plaque de **gel de silice** F1500, 20 x 20 cm fluorescente à 254 nm (Macherey-Nagel, Polygram®).

Solvant de développement : Acétone / eau / ammoniaque 27 % (90/7/3 ; v/v).

Dépôt : Le volume des dépôts est de 100 μL .

Révélateur : **Réactif de Dragendorff**

Solution A : nitrate de bismuth basique	8.5 g
acide tartrique	100 g
eau	QSP 400 mL
Solution B : iodure de potassium	80 g
eau	QSP 200 mL
Solution mère : un volume de la solution A pour un volume de la solution B	

Réactif prêt à l'emploi : solution mère	50 mL
acide tartrique	100 g
eau distillée	500 mL.

Après migration du solvant, les plaques sont séchées à l'étuve à 100 °C, 5-10 min, puis pulvérisées avec le réactif de Dragendorff qui révèle les alcaloïdes en les colorant en rouge-orangé.

2. Optimisation de la mise en évidence des alcaloïdes par CCM

Afin de mieux séparer les produits révélés dans les résidus secs, nous avons testé d'autres types de plaques de Silice, et d'autres solvants de développement. Les plaques diffèrent notamment par le type de Silice selon le fabricant. Par contre, les solvants de développement diffèrent notamment par leur degré de polarité qui change selon la nature et la concentration des constituants et qui conditionne la distance de migration des molécules sur la plaque.

Au total, 6 solvants de développement ont été testés :

- solvant 1 : acétone / eau / ammoniacque 27 % (90/7//3 ; v/v)
- solvant 2 : acétone / eau / ammoniacque 27 % (7/903 ; v/v)
- solvant 3 : chloroforme
- solvant 4 : chloroforme / méthanol (50/50 ; v/v)
- solvant 5 : chloroforme / méthanol / ammoniacque 27 % (75 / 25 / 3, v/v)
- solvant 6 : méthanol / eau / ammoniacque 27 % (90/7//3 ; v/v)

Parallèlement, nous avons testé quatre types de plaques de silice :

- plaque 1 : F1500, G/UV 254, (Macheray-Nagel, Polygram®)
- plaque 2 : F1500 LS 254 (Schleicher & Schuell®)
- plaque 3 : 60 F254, Oxyde d'aluminium (Merck®)
- plaque 4 : plaques en verre, PK6F SILICA GEL (Whatman®)

Pour chaque analyse, nous avons déposé 100 µL de résidus secs préalablement repris par du méthanol.

La révélation des alcaloïdes est réalisée avec le réactif de Dragendorff selon le procédé décrit ci-dessus.

3. Mise en évidence et analyse des alcaloïdes par CLHP en phase inverse

Pour chaque analyse, nous avons injecté 10 μL d'alcaloïdes totaux.

Le système Waters utilisé est constitué d'une pompe à solvant modèle 481 et d'un injecteur. La lecture de la densité optique est réalisée par un spectromètre Lambda-Max 481. L'enregistrement des chromatogrammes est réalisé par un enregistreur-intégrateur Shimadzu (Crga Chromatopac) qui intègre automatiquement les surfaces des pics et les compare avec celles des témoins. La phase stationnaire est constituée par une colonne de silice de type C18 4,6 x 25 cm, 7 μm , (Macherey-Nagel). Une précolonne de silice RP 18 est placée entre l'injecteur et la colonne afin d'en prolonger la durée d'utilisation. La phase mobile est constituée d'un mélange (v/v) de : acétonitrile (330 mL), triéthylamine (400 μL), acide phosphorique (2 mL) et eau distillée (1670 mL). Le pH de cette phase mobile est égal à 2,22. Afin de déceler le maximum d'alcaloïdes présents dans les extraits, nous avons choisi dans un premier temps une détection à 204 nm. Bien que cette longueur d'onde soit moins spécifique, elle s'est montrée suffisante pour l'analyse d'extraits alcaloïdiques de drogues végétales (Planck et Wagner, 1986 ; Fliniaux, 1991). Dans un second temps, les analyses ont été effectuées à des longueurs d'ondes plus spécifiques, 233 et 272 nm. De plus, nous avons également utilisé un système de barrettes de diodes qui permet de réaliser automatiquement les spectres pour chaque substance contenue dans les alcaloïdes totaux.

Enfin, en faisant varier la phase mobile en condition isocratique, nous avons essayé d'optimiser la séparation des composés. Ainsi, nous avons testé plusieurs pH et plusieurs concentrations en acétonitrile de la phase mobile (Tableau 4).

Tableau 4. Différents pH et concentrations de l'acétonitrile des phases mobiles testés au cours de l'analyse par CLHP en phase inverse des alcaloïdes totaux.

Phase mobile	Composition				pH
	Acétonitrile (mL)	Triéthylamine (μL)	H ₃ PO ₄ (mL)	Eau (mL)	
1	330	400	2	1670	2.22
2	330	400	1	1670	2.56
3	430	400	2	1570	2.22
4	430	400	1	1570	2.56
5	230	400	2	1770	2.22
6	230	400	1	1770	2.56
7	130	400	2	1870	2.22
8	130	400	1	1870	2.56
9	200	400	2	1800	2.22
10	150	400	2	1850	2.22
11	100	400	2	1900	2.22
12	0	400	2	2000	2.22

III. SÉPARATION DES ALCALOÏDES TOTAUX

Le résidu sec obtenu par purification constitue les alcaloïdes totaux, mélange complexe de bases qu'il est nécessaire de séparer. Pour cela, plusieurs méthodes de résolution d'un mélange complexe sont employées. En ce qui nous concerne, nous avons choisi la séparation par chromatographie liquide haute performance (CLHP) semi-préparative et la CCM préparatives.

1. Séparation par CLHP semi-préparative

Le système de séparation préliminaire est constitué d'une pompe à solvant Spectra Series modèle P 200 et d'un injecteur de type vanne Rhéodyne. La mesure de la densité optique est réalisée par un spectrophotomètre Shimadzu SPD-6AV. La détection UV a été réalisée à la longueur d'onde 204 nm, puisque la plupart des molécules ayant des doubles liaisons sont détectées à cette longueur d'onde. Le profil d'élution est obtenu par un enregistreur OSI Tracelab. Les analyses chromatographiques ont été réalisées à température ambiante. Nous avons tout d'abord testé un type de colonne peu hydrophile [Lichrosorb R-P 8 (7 μm)] puis un second plus hydrophile [Lichrosorb R-P (18)]. De plus, la séparation a été effectuée dans un premier temps en condition isocratique avec un seul solvant et ensuite les essais ont été réalisés avec deux solvants combinés et avec plusieurs programmes de gradients d'élution.

Pour améliorer la séparation des composés constituant les alcaloïdes totaux, nous avons maintenu constants plusieurs paramètres : solvant B, acétonitrile / méthanol / eau, 1/1/1, v/v ; colonne, Lichrosorb R-P 18 (7 μm) ; débit fixé à 3 mL/min. Ainsi, nos essais d'optimisation se sont axés notamment sur le pH et la composition du solvant A (Tableau 5). La séparation a été suivie à 204 nm, car cette longueur d'onde permet de détecter la majorité des molécules possédant des doubles liaisons.

Tableau 5. Différents pH et concentrations de l'acétonitrile du solvant A testés pour optimiser la séparation des produits constituant les alcaloïdes totaux.

Solvants	Composition				pH
	Acétonitrile (mL)	Triéthylamine (μL)	H ₃ PO ₄ (mL)	Eau (mL)	
A1	330	400	2	1670	2.22
A2	330	400	1	1670	2.56
A3	430	400	2	1570	2.22
A4	430	400	1	1570	2.56
A5	260	400	2	1740	2.22
A6	260	400	1	1740	2.56

2. Par chromatographie sur couche mince (CCM)

Nous avons testé des plaques à couches de silice sur un support en verre (PK6F Silica Gel Whatman®) ou en polyester (F1500 LS 254 Schleicher & Schuell). Deux solvants ont été testés pour chaque type de plaque : le premier est constitué par un mélange acétone / eau / ammoniacque 27 % (90/7/3, v/v) et le second est constitué par une solution méthanol / eau / ammoniacque 27 % (90/7/3, v/v). Nous avons déposé sur chaque plaque un volume de 1 à 1.5 mL d'alcaloïdes totaux ou de fractions en partie purifiées par la CLHP semi-préparative.

Après le développement et la localisation des fractions par visualisation des plaques à 254 nm, chacune de ces dernières a été séparément récupérée par grattage de la silice que nous gardions dans du méthanol pendant 12 à 24 heures. Le contact prolongé avec le méthanol permet de libérer les substances adsorbées sur la silice. Après centrifugation à 2000 tours/min pendant 4 min, le surnageant a été prélevé à la pipette Pasteur puis concentré au Rotavapor. Enfin, chaque fraction obtenue a été dissoute dans du méthanol puis analysée par CLHP en phase inverse.

VI. ANALYSES PRÉLIMINAIRES PAR RMN DE DEUX ALCALOÏDES

Nous avons choisi pour cette expérimentation préliminaire, deux parmi les huit alcaloïdes mis en évidence dans les cals et dans les vitroplants. Il s'agit des alcaloïdes ayant un maximum d'absorption à 271 nm et à 200.4 nm. Le R_f du premier est de 0.82, alors que celui du second est de 0.2. Le but de cette expérience est d'établir une première approche de la nature des spectres RMN de ces alcaloïdes.

Pour cela, nous avons utilisé une RMN au ¹³C et les deux alcaloïdes analysés ont été dissous dans du chloroforme marqué au ¹³C.

CHAPITRE III - RÉSULTATS

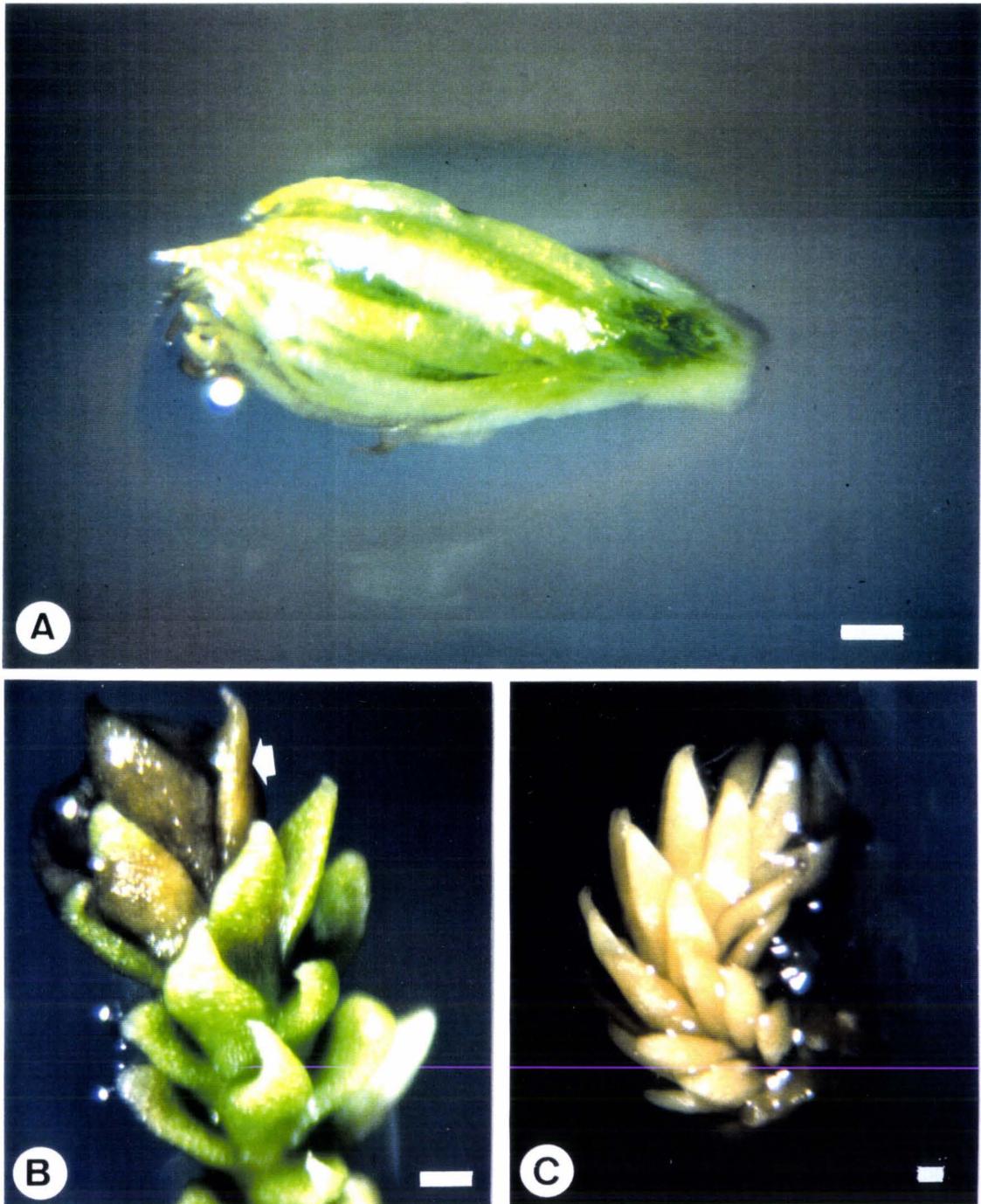


Fig. 8. Effets de la quantité de BAP sur la nécrose des apex végétatifs primaires au cours de la phase d'induction après une aseptisation de 5 min dans 8 % d'hypochlorite de calcium. Barre = 400 μ m.

A. Après 1 semaine en présence de la BAP : 61,7 % d'explants restent vivants.

B. Après 2-3 semaines en présence de la BAP : le méristème commence à se nécroser (flèche).

C. Après 10-13 semaines en présence de la BAP : l'ensemble de l'apex s'est nécrosé.

A. ETABLISSEMENT ET OPTIMISATION DES CONDITIONS DE CULTURE DES VITROPLANTS ET DE LEUR ACCLIMATATION

I. LE PROTOCOLE D'ASEPTISATION DES EXPLANTS PRIMAIRES

La concentration et le temps d'action de l'hypochlorite de calcium sur les apex se sont révélés être primordiaux pour l'obtention d'explants à la fois aseptiques et vivants (Tableau 6). En effet, en utilisant l'hypochlorite de calcium à une faible concentration (2 %), la totalité des apex se sont contaminés par des champignons et sont morts quelques jours après leur mise en culture. Par contre, avec une concentration plus élevée (8 %), aucune contamination fongique n'est observée, mais, un contact plus ou moins prolongé avec l'hypochlorite de calcium diminue le taux d'apex qui restent vivants (Tableau 6). Ainsi, dans le meilleur des cas, un temps de contact de 5 min en présence d'une solution d'hypochlorite de calcium à 8 %, permet d'observer que plus de 61 % des apex restent aseptiques et vivants (Fig. 8 A). Ce même protocole d'aseptisation a permis d'avoir 40 % de portions de tiges rampantes aseptiques.

C'est ce protocole d'aseptisation qui sera maintenu pour l'aseptisation des explants végétatifs.

Tableau 6. Effets de la concentration et du temps d'action de l'hypochlorite de calcium sur les apex lors de la phase d'aseptisation.

Hypochlorite de calcium		Nombre d'apex aseptisés	Apex aseptique	
Concentration (g/100 ml d'eau)	Temps d'action (min)		Nombre	%
2	5	15	0	0
	8	15	0	0
5	5	15	4	26.7
	8	15	7	46.7
8	5	81	50	61.7
	8	15	0	0

II. LA COMPOSITION DES MILIEUX

1. Effets des sels minéraux et des vitamines

La plupart des apex et la totalité des autres portions de tiges mises en culture sur un milieu d'induction de type MS non modifié (MI-a à MI-d, Tableau 2) deviennent jaunâtres et meurent après 3 semaines de culture. Quand le milieu de culture est relativement pauvre en sels minéraux et en vitamines (MI-e, Tableau 2), tous les apex survivent. Par contre, les autres

fragments, au deçà de l'apex végétatif, de tiges rampantes meurent quelques soient les milieux de culture testés. C'est pourquoi, dans la suite de ce travail nous n'avons considéré que les apex végétatifs.

2. Effets des cytokinines sur la formation de bourgeons et la mise en place d'une callogenèse à partir des apex

C'est le milieu de culture MI-e qui a été retenu pour rechercher une balance hormonale adéquate à l'induction d'une réponse morphogénétique. Le milieu de base MI contient 0.01 mg L^{-1} de AIB. Les apex sont considérés vivants quand ils restent verts, et morts quand ils deviennent jaunâtre ou nécrosés

La kinétine et la BAP agissent différemment sur les apex durant la phase d'induction. En l'absence des cytokinines, 50 % des apex mis en culture restent verts sans montrer de changement morphologique. En présence de BAP, les apex ne montrent aucune réponse morphogénétique et le nombre d'explants nécrosés augmentent ensuite en fonction de la concentration de la BAP (Tableau 7). C'est tout d'abord la zone terminale méristématique de chaque apex qui se nécrose après 2 à 3 semaines de culture (Fig. 8 B), puis, c'est la totalité de l'explant qui est nécrosée après 10 à 13 semaines de culture (Fig. 8 C).

Par contre, quand la BAP est remplacée par la kinétine et ce, dans les mêmes proportions, le nombre d'apex nécrosés est relativement plus faible. Mais, c'est la concentration de 0.3 mg L^{-1} qui permet d'obtenir un maximum d'apex vivants, et présentant une réponse morphogénétique. La nature de cette réponse dépend essentiellement de la durée de culture sur le milieu MI-e additionné de 0.01 mg L^{-1} de AIB et de 0.3 mg L^{-1} de kinétine. En effet, quand cette durée est de 11 semaines seulement, les apex croissent légèrement en longueur (+ 2 à 3 mm), et leur feuilles entourant le méristème apical gonflent. A ce stade, aucune formation de cal n'est observée. Par contre, quand la durée de culture sur ce même milieu est de 13 semaines, en plus des changements morphologiques observés ci-dessus, nous remarquons un début de callogenèse. Cette callogenèse est strictement limitée au méristème apical et à la base des 5-6 cycles de feuilles qui l'entourent.

Désormais, le milieu de culture MI-e additionné de 0.01 mg L^{-1} de AIB et de 0.3 mg L^{-1} de kinétine sera appelé **milieu d'induction (MI)**. Ce choix a été effectué tant sur le pourcentage de survie des explants que sur leur comportement dans les phases ultérieures de culture (bourgeonnement direct ou callogenèse, croissance et enracinement).

Tableau 7. Effets des cytokinines sur la survie des apex pendant la phase d'induction. Les apex ont été cultivés pendant 11 à 13 semaines sur le milieu MI-e additionné de 0.01 mg L⁻¹ de AIB et de différentes concentrations de kinétine ou de BAP.

Hormones (mg L ⁻¹)		Nombre d'apex mis en culture	Apex restant verts	
kinétine	BAP		Nombre	%
0.00	0.00	42	21	50.00
0.30	0.00	30	30	100.00
0.00	0.30	30	16	53.54
0.50	0.00	30	9	30.00
0.00	0.50	30	7	23.33
1.00	0.00	30	11	36.67
0.00	1.00	30	4	13.33
1.50	0.00	30	8	26.67
0.00	1.50	30	3	10.00

III. LA FORMATION DIRECTE DE BOURGEONS A PARTIR DES APEX

1. Obtention de bourgeons (sans callogenèse préalable)

Aucune morphogenèse n'a été observée à partir des apex quand ces derniers ont été cultivés pendant 8 à 11 semaines sur le milieu MI puis transférés sur un milieu pauvre en sels minéraux mais contenant de la kinétine (MB-a, Tableau 3). Dans ce cas, après avoir développé un petit cal au niveau de leur méristème, les apex deviennent jaunâtres et meurent après quelques semaines de culture.

Quand les apex sont cultivés sur le milieu MI pendant 8 à 11 semaines puis transférés sur le milieu MB-b (Tableau 3), un grand nombre d'entre eux se nécrosent après quelques semaines de culture. Néanmoins, les apex qui restent verts développent quelques bourgeons. Ces derniers apparaissent à la base des feuilles entourant le méristème apical. Le milieu MB-b contient moins de sels minéraux, par comparaison avec le milieu MI, et est complètement dépourvu de vitamines et de kinétine. Dans ces conditions de culture, nous avons obtenu 3 à 5 bourgeons par apex.

Ces bourgeons apparaissent plus foncés et leurs feuilles sont plus longues que celles des apex d'origine. Ces différences morphologiques nous ont incité à tester d'autres milieux.

2. Optimisation de la formation des bourgeons

La qualité et la quantité des bourgeons produits dépendent de la concentration en macro-éléments, de la balance hormonale et de la source d'azote. Afin de trouver un milieu de culture optimisé pour la formation des bourgeons, plusieurs milieux ont été préparés puis testés.

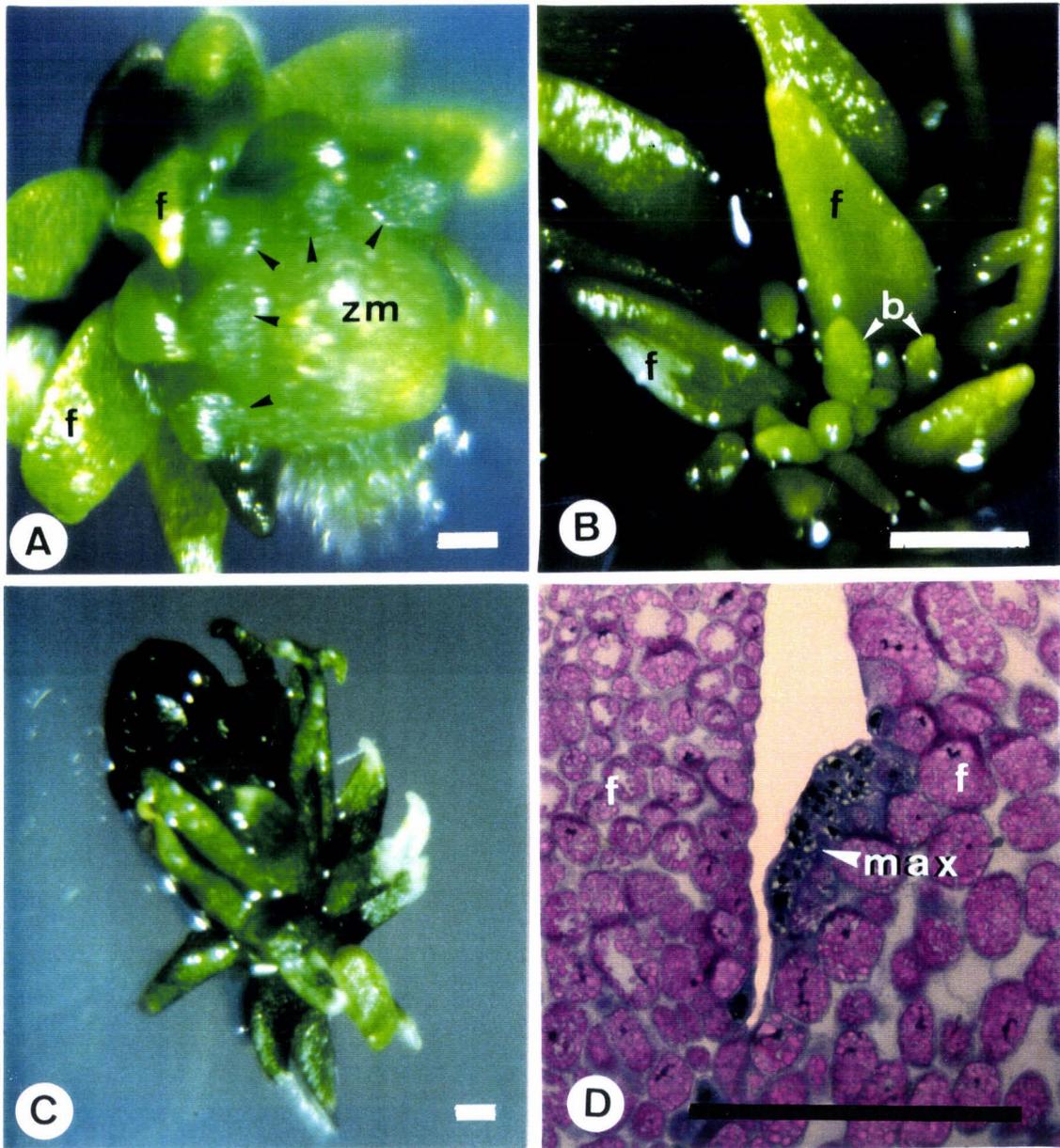


Fig. 9. Bourgeonnement axillaire à partir des apex végétatifs. **A**, **B** et **C**, aspect macroscopique du bourgeonnement direct. **D**, aspect cytologique du début du bourgeonnement. Barre = 400 μ m.

- A.** Après 11 semaines (1 cycle) de culture sur le milieu MI : la zone méristématique (**z m**) est légèrement bombée (flèches).
- B.** Après 11 semaines de culture sur la milieu MI et 6-8 semaines de culture sur le milieu MB : une multitude de bourgeons (**b**) apparaît à la base des feuilles (**f**).
- C.** Après 13 semaines : les bourgeons se sont développés en plantules.
- D.** Une zone méristématique axillaire (**m ax**) caractérisée par l'abondance de protéines (coloration bleue) apparaît à la base des feuilles (**f**). Double coloration : P. A. S. + Naphtol Blue Black.

Tous les explants deviennent jaunâtres et meurent après 3 semaines de culture quand ils sont transférés sur des milieux où l'azote est complètement (MB-e, Tableau 3), ou en partie (MB-f, Tableau 3) d'origine organique (L-glutamine). Avec des milieux de culture riches en azote minéral réduit ou oxydé (KNO_3 , NH_4NO_3) et en calcium (MB-c, Tableau 3), un grand nombre d'apex se nécrosent et peu de bourgeons sont régénérés par les apex restant vivants.

C'est le milieu MB-d qui a permis d'avoir des apex qui restent verts et qui montrent une réponse organogène. Ce milieu contient de faibles concentrations de KNO_3 , NH_4NO_3 et CaCl_2 ainsi qu'une concentration relativement élevée de KH_2PO_4 (Tableau 3). C'est ce milieu de culture qui sera choisi pour déterminer la concentration optimale en régulateurs de croissance.

Quatre équilibre hormonaux ont été testées pour améliorer le bourgeonnement à partir des apex. Avec le milieu MB-d sans régulateur de croissance, les apex développent quelques poils absorbants sans aucune organogénèse. Quand la concentration en AIB et en AG_3 est relativement élevée ($1 \text{ mg L}^{-1} + 0.2 \text{ mg L}^{-1}$ ou $1.5 \text{ mg L}^{-1} + 0.5 \text{ mg L}^{-1}$, respectivement), la réponse se limite à une production massive de poils absorbants au niveau de la zone méristématique. Par contre, quand la concentration en AIB et en AG_3 est relativement faible ($0.5 \text{ mg L}^{-1} + 0.1 \text{ mg L}^{-1}$, respectivement), chaque apex engendre en moyenne 10 à 16 bourgeons. Ce processus de bourgeonnement se déclenche une à deux semaines après le transfert des apex sur le milieu MB-d. Il peut être divisé en 3 phases majeures :

1. Stade "1 feuille" : ces structures apparaissent après 6 à 8 semaines de culture sur le milieu MB. Elles ont la même morphologie qu'une feuille mais sont plus bombées à la base et sont situées à l'aisselle des 4 à 5 cycles de feuilles entourant le méristème apical de l'apex. Plusieurs structures peuvent être observées à la base d'une même feuille (Fig. 9 A, B).
2. Stade "1^{er} cycle de feuilles" : après 8 à 10 semaines de culture, chaque structure présentant la même morphologie qu'une feuille évolue en bourgeon montrant un premier cycle de feuilles. Chez les Lycopodes, les feuilles sont regroupées en niveaux sur la tige. Chacun d'eux constitue un cycle de feuilles. Nous les dénombrons à partir de la zone méristématique apicale.
3. Stade "plantule" : après 10 à 13 semaines de culture, ces bourgeons développent 3 à 4 cycles de feuilles et chacun développe dans sa partie ventrale 1 à 2 racines (Fig. 9 C).

Ces bourgeons sont morphologiquement identiques aux apex initialement mis en culture. Chacun d'eux peut être isolé et repiqué séparément.

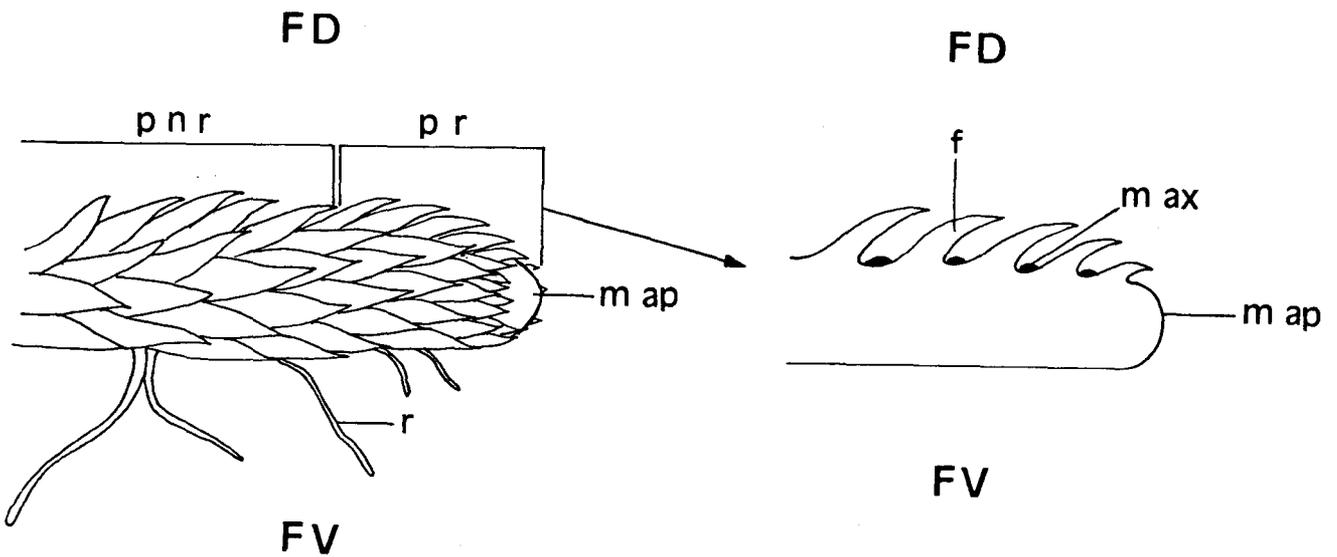


Fig. 10. Schéma d'une portion de tige végétative de *L. inundata* montrant les différentes zones considérées au cours de la mise en culture des apex végétatifs. G. x 2.

f, feuille ; F D, face dorsale ; F V, face ventrale ; m ap, méristème apical ; m ax, méristème axillaire ; p n r, portion non réactive ; p r, portion réactive ; r, racines.

Ces bourgeons sont morphologiquement identiques aux apex initialement mis en culture. Chacun d'eux peut être isolé et repiqué séparément.

*Le milieu MB-d additionné de 0.5 mg L⁻¹ de AIB et de 0.1 mg L⁻¹ de AG₃ permet non seulement d'obtenir des bourgeons identiques aux apex d'origine mais également d'obtenir 6 fois plus de bourgeons par rapport au milieu MB-b. Désormais ce milieu sera donc retenu pour la formation de bourgeons à partir des apex. Il sera nommé **milieu de bourgeonnement (MB)**.*

3. Nature des bourgeons formés à partir des apex

Les apex ont été tout d'abord cultivés sur le milieu MI pendant 11 semaines puis, ont été transférés sur le milieu MB. La durée de culture sur ce milieu est de 13 semaines. Les coupes cytologiques ont été réalisées sur les apex après 11 semaines de culture sur le milieu MI et pendant les trois premières semaines de culture sur le milieu MB.

Les bourgeons obtenus prennent naissance directement, sans callogenèse, à partir de la base du 4^{ème} - 5^{ème} cycle de feuilles entourant le méristème apical de chaque apex. Au dessous du 5^{ème} verticille, portion précise de l'apex, aucun bourgeon n'a pu être observé. En réalisant des coupes cytologiques de 3 µm une semaine après le transfert sur le milieu MB des apex préalablement cultivés sur le milieu MI pendant 11 semaines, nous avons pu mettre en évidence la présence de massifs cellulaires mitotiquement actifs à l'aisselle de ces feuilles (Fig. 9 D). Ces massifs sont localisés à la base des feuilles sur la face dorsale de l'apex (Fig. 10). Ils sont constitués par quelques cellules (< 20 cellules). Ces cellules sont de petite taille (~ 10-12 µm) et la plupart d'entre elles sont dépourvues de réserves amyliacées mais contiennent dans leur cytoplasme des réserves protéiques, colorées en bleu-noir par le Naphtol Blue Black. Toutes ces cellules présentent des caractéristiques méristématiques : un noyau central de taille importante doté d'un nucléole très dense, un vacuome fragmenté en de nombreuses petites vacuoles, des parois fines faiblement colorées par le réactif de Schiff et des réserves protéiques cytoplasmiques colorées en bleu par le Naphtol Blue Black. Ces massifs cellulaires peuvent être qualifiés de zones méristématiques axillaires.

4. Conclusion

Les bourgeons obtenus *via* les apex prennent naissance à partir de méristèmes axillaires préexistant, ce qui nous permet de les qualifier de **bourgeons axillaires**.

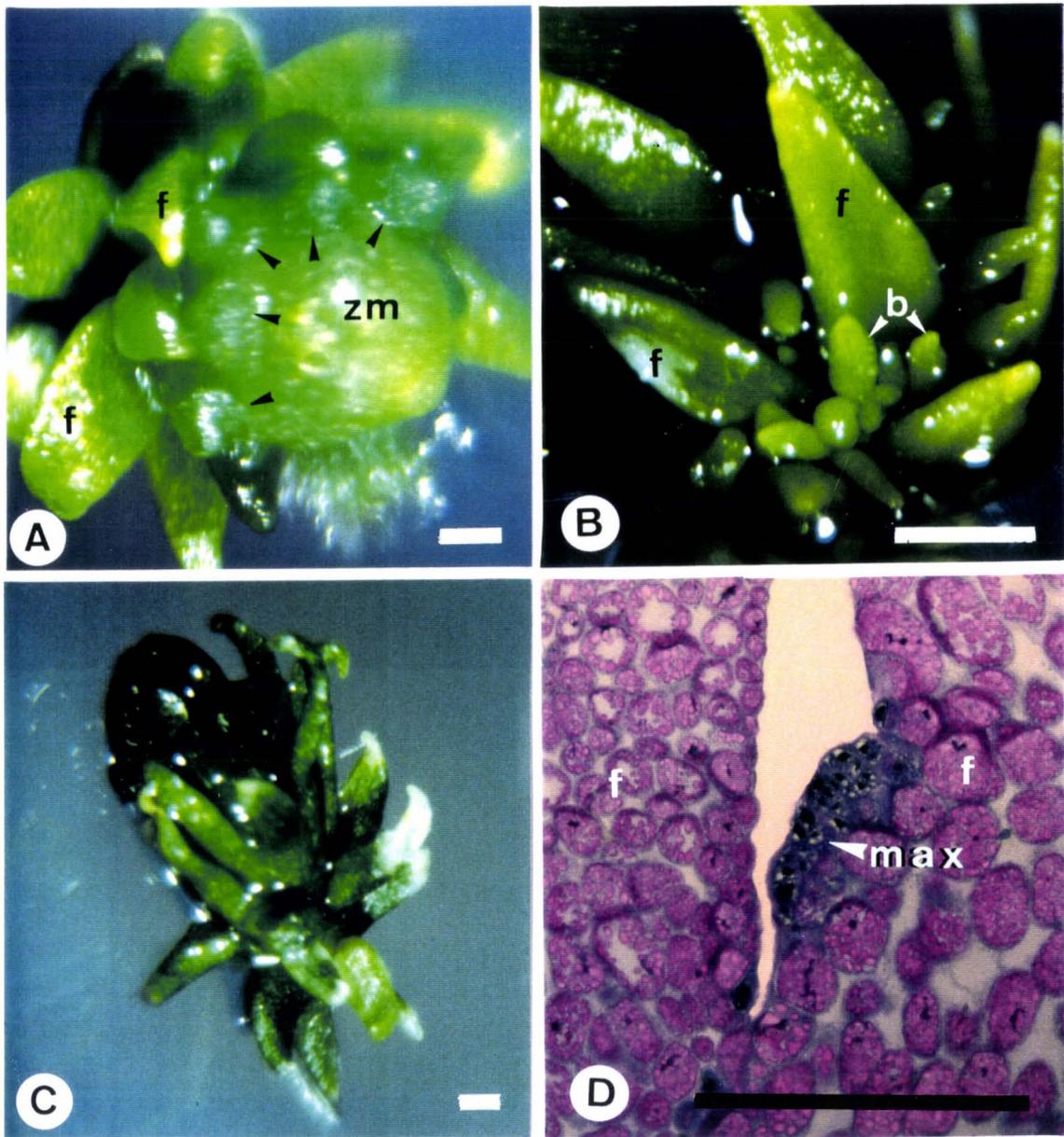


Fig. 9. Bourgeonnement axillaire à partir des apex végétatifs. **A, B** et **C**, aspect macroscopique du bourgeonnement direct. **D**, aspect cytologique du début du bourgeonnement. Barre = 400 μ m.

A. Après 11 semaines (1 cycle) de culture sur le milieu M1 : la zone méristématique (z m) est légèrement bombée (flèches).

B. Après 11 semaines de culture sur la milieu M1 et 6-8 semaines de culture sur le milieu MB : une multitude de bourgeons (b) apparaît à la base des feuilles (f).

C. Après 13 semaines : les bourgeons se sont développés en plantules.

D. Une zone méristématique axillaire (m ax) caractérisée par l'abondance de protéines (coloration bleue) apparaît à la base des feuilles (f). Double coloration : P. A. S. + Naphtol Blue Black.

IV. MISE EN PLACE D'UNE CALLOGENÈSE A PARTIR DES APEX ET INDUCTION D'EMBRYONS SOMATIQUES

1. Production de cals à partir des apex

1.1. Origine et nature des cals

Afin de connaître l'origine du cal formé à partir des apex, nous avons réalisé des coupes cytologiques de 3 μm d'épaisseur. Les coupes ont été réalisées après 9, 18, 27, 34, 41, 48, 55, 62, 69, 76 et 83 jours de culture sur le milieu MI-e additionné de 0.01 mg L⁻¹ de AIB et de 0.3 mg L⁻¹ de kinétine. Ces coupes cytologiques ont été colorées avec le P. A. S. et le Naphtol Blue Black.

Un début de callogenèse a été observé quand les apex ont été gardés en culture sur le milieu MI au delà de 11 semaines. Cette callogenèse s'est manifestée au niveau du méristème apical et des méristèmes axillaires situés à la base des 4 à 5 cycles de feuilles qui l'entourent. Au bout de la 13^{ème} semaine de culture sur le milieu MI, chaque apex peut être divisé en deux parties : la première montrant le cal qui s'étend sur toute la zone regroupant les méristèmes apical et axillaires, et la seconde, comprenant la portion d'apex au delà du 5^{ème} cycle de feuilles, qui commence à jaunir (Fig. 11 A). Au cours du 2^{ème} cycle de 13 semaines de culture sur le milieu MI, le cal continu à s'étendre tandis que la partie jaunâtre commence à se nécroser. A la fin du 3^{ème} cycle de 13 semaines de culture sur le milieu MI, le cal est complètement établi car les feuilles et la tige de l'apex d'origine ne sont plus observés. Ce cal est fortement chlorophyllien, très compact et est constitué par de nombreux nodules (Fig. 11 B). Ce cal sera désormais appelé **cal-nodulaire**.

Des observations cytologiques ont été effectuées au cours de la mise en place de cette callogenèse. En effet, à partir du deuxième cycle de culture sur le milieu MI, l'ensemble des cellules constituant le méristème apical et les méristèmes axillaires de chaque apex acquièrent toutes le même aspect cytologique qui se caractérise par :

- une quantité d'amidon très importante dans le cytoplasme d'une grande majorité des cellules, notamment celles situées sur la face dorsale de l'apex (Fig. 11 C) ;
- des noyaux situés au centre des cellules et chacun est doté d'un, deux ou trois nucléoles très évidents et très denses ;
- des parois cellulaires fines.

Comme ce qui a été observé pendant le bourgeonnement direct, ces cellules sont surtout localisées dans la zone méristématique et dans la partie dorsale des apex. Elles sont très actives et continuellement en division mitotique. Dans le cas présent, les cellules

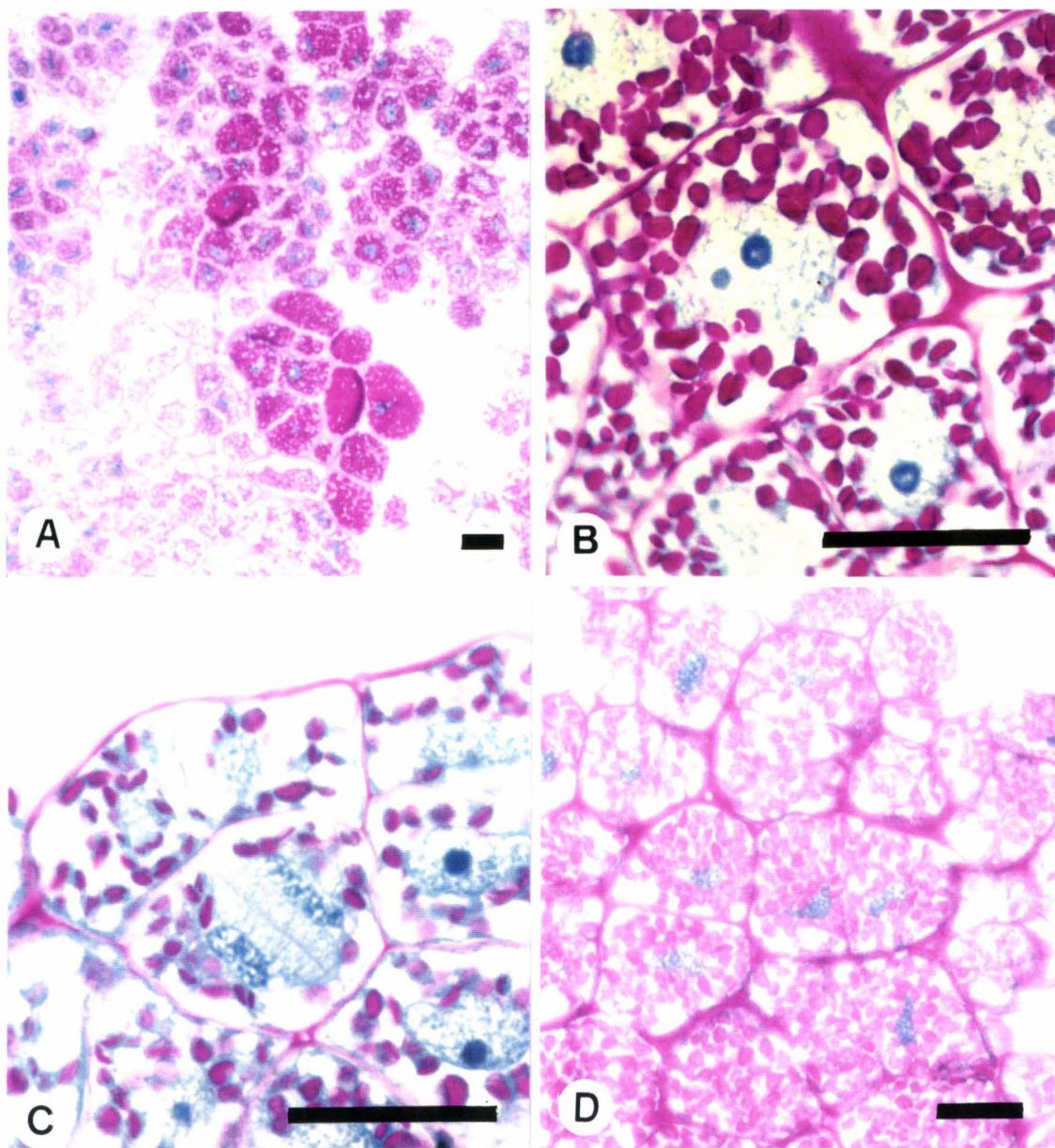


Fig. 12. Mise en évidence de l'évolution des réserves amylacées au cours de la division cellulaire en phase d'entretien du cal-nodulaire. Double coloration : P. A. S. + Naphtol Blue Black. Barre = 25 μ m.

- A.** Vue générale du cal-nodulaire : mise en évidence de la richesse en amyloplastes.
- B.** Phase S (synthèse de l'ADN) : la quantité d'amyloplastes diminue, le noyau est plus volumineux et montre 1 à 2 nucléoles très denses.
- C.** Fin de télophase montrant une division symétrique : le nombre d'amyloplastes continue de diminuer, les protéines du cytoplasme sont très facilement observables, le phragmoplaste est visible.
- D.** Interphase : les cellules sont très riches en amyloplastes, les noyaux sont petits et en position centrale.

méristématiques sont très riches en amidon ; alors que lors du bourgeonnement, elles étaient très riches en protéines cytoplasmiques (Fig. 9 D).

Des coupes cytologiques colorées avec le réactif de Schiff nous confirment l'aspect nodulaire du cal. Ces nodules sont plus au moins individualisés (Fig. 11 D). Une fois isolé et repiqué sur le milieu MI, chaque nodule peut engendrer un cal-nodulaire.

1.2. Description cytologique des cal-nodulaires et évolution des réserves amylicées

Pour entretenir les cals, ces derniers sont repiqués toutes les 13 semaines sur le milieu MI.

Pour mieux comprendre l'importance des réserves amylicées au cours de la prolifération des cals, des coupes cytologiques ont été réalisées sur les mêmes cals tous les 9 jours et ce pendant 41 jours de culture sur le milieu MI. Ces coupes ont été colorées par le réactif de Schiff et le Naphtol Blue Black (Fig. 12 A). L'analyse de ces coupes révèle que le noyau des cellules est toujours central et doté d'un nucléole volumineux ce qui témoigne d'une activité mitotique très intense. Un parallélisme peut être effectué entre l'activité mitotique de ces cellules et le nombre d'amyloplastés présents dans leur cytoplasme. En effet, au début du cycle cellulaire, phase S (synthèse de l'ADN), les cellules contiennent en moyenne une vingtaine d'amyloplastés (Fig. 12 B). Ce nombre d'amyloplastés diminue jusqu'à une dizaine à la fin de la télophase (Fig. 12 C), puis augmente jusqu'à une quarantaine en moyenne pendant l'interphase (Fig. 12 D).

1.3. Influence des cytokinines sur la production des cals

Les mêmes effets, notés avec les différentes concentrations de BAP et de kinétine lors de l'induction du bourgeonnement et de la callogenèse à partir des apex, ont été observés durant la phase d'entretien.

Des concentrations élevées en BAP et en kinétine favorisent la nécrose et semblent défavorables à l'augmentation de la masse fraîche (Tableau 8). A faible dose (0.3 mg L^{-1}), la kinétine assure une augmentation importante de la masse fraîche des cals (Tableau 8). L'obtention d'une grande quantité de masse fraîche de cals est primordiale pour l'extraction et l'analyse des alcaloïdes.

En conclusion, le milieu **MI** favorise à la fois l'induction du bourgeonnement direct à partir des apex après 11 semaines de culture, et la formation d'une callogenèse importante par repiquages successifs toutes les 13 semaines sur ce même milieu.

Tableau 8. Effets des cytokinines sur l'augmentation de la masse fraîche (MF) et sur le nombre de cals restant en vie après 13 semaines de culture sur le milieu MI contenant différentes combinaisons de cytokinines. Chaque valeur est la moyenne \pm s.e. de trois répétitions.

Hormones (mg L ⁻¹)		Cals mis en culture		Masse Fraîche (mg)		% de l'augmentation de la MF
kinétine	BAP	totaux	survivants	initiale	finale	
0.00	0.00	15	13	51.5 \pm 5.7	236.9 \pm 34.3	359.0
0.30	0.00	15	12	46.6 \pm 2.8	304.3 \pm 29.0	553.2
0.00	0.30	15	12	49.7 \pm 2.9	169.3 \pm 24.0	243.1
0.50	0.00	15	12	46.3 \pm 4.8	255.0 \pm 69.3	442.1
0.00	0.50	15	7	47.5 \pm 7.7	109.7 \pm 42.3	139.5
1.00	0.00	15	11	49.6 \pm 7.7	227.7 \pm 45.3	363.2
0.00	1.00	15	7	51.9 \pm 9.3	135.9 \pm 39.3	159.5
1.50	0.00	15	10	61.4 \pm 9.4	196.8 \pm 39.3	232.4
0.00	1.50	15	5	51.1 \pm 8.0	117.4 \pm 88.9	143.3

1.4. Influence de la nature physique du milieu de culture sur l'augmentation de la masse fraîche des cals

Cette expérience a pour objectif l'optimisation de la quantité de cals obtenue, dans la perspective d'une production massive pour l'extraction d'alcaloïdes. Le poids des cals a été mesuré tout d'abord après 7 puis 14 semaines de culture sur le milieu MI solide ou liquide sous agitation orbitale.

L'augmentation de la masse fraîche des cals la plus importante a été enregistrée pendant les sept premières semaines et ce indépendamment des conditions de culture. Néanmoins, c'est le milieu de culture MI liquide qui induit le taux de croissance le plus important par comparaison avec le même milieu, mais solide (Tableau 9). Par contre, le poids initial des cals ne semble pas influencer fortement cette croissance (Tableau 9).

Tableau 9. Effets de la nature physique du milieu de culture sur l'augmentation de la masse fraîche des cals. L'augmentation globale correspond à la croissance de la masse fraîche entre la 1^{ère} et la 14^{ème} semaine. * : la masse initiale correspond à celle des cals à la 7^{ème} semaine.

Masse fraîche initiale (mg)	Durée de culture (semaine)		Augmentation globale (%)
	semaine 1 A 7	semaine 8 A 14*	
Milieu liquide			
600	2280.2 \pm 431.6 mg (+ 380%)	4499.4 \pm 321.8 mg (+ 97%)	650
48	260.1 \pm 52.1 mg (+ 442%)	386.5 \pm 30.6 mg (+ 48.5%)	706
Milieu solide			
48	231.8 \pm 6.5 mg (+ 383%)	304.2 \pm 28.9 mg (+ 33.77%)	534

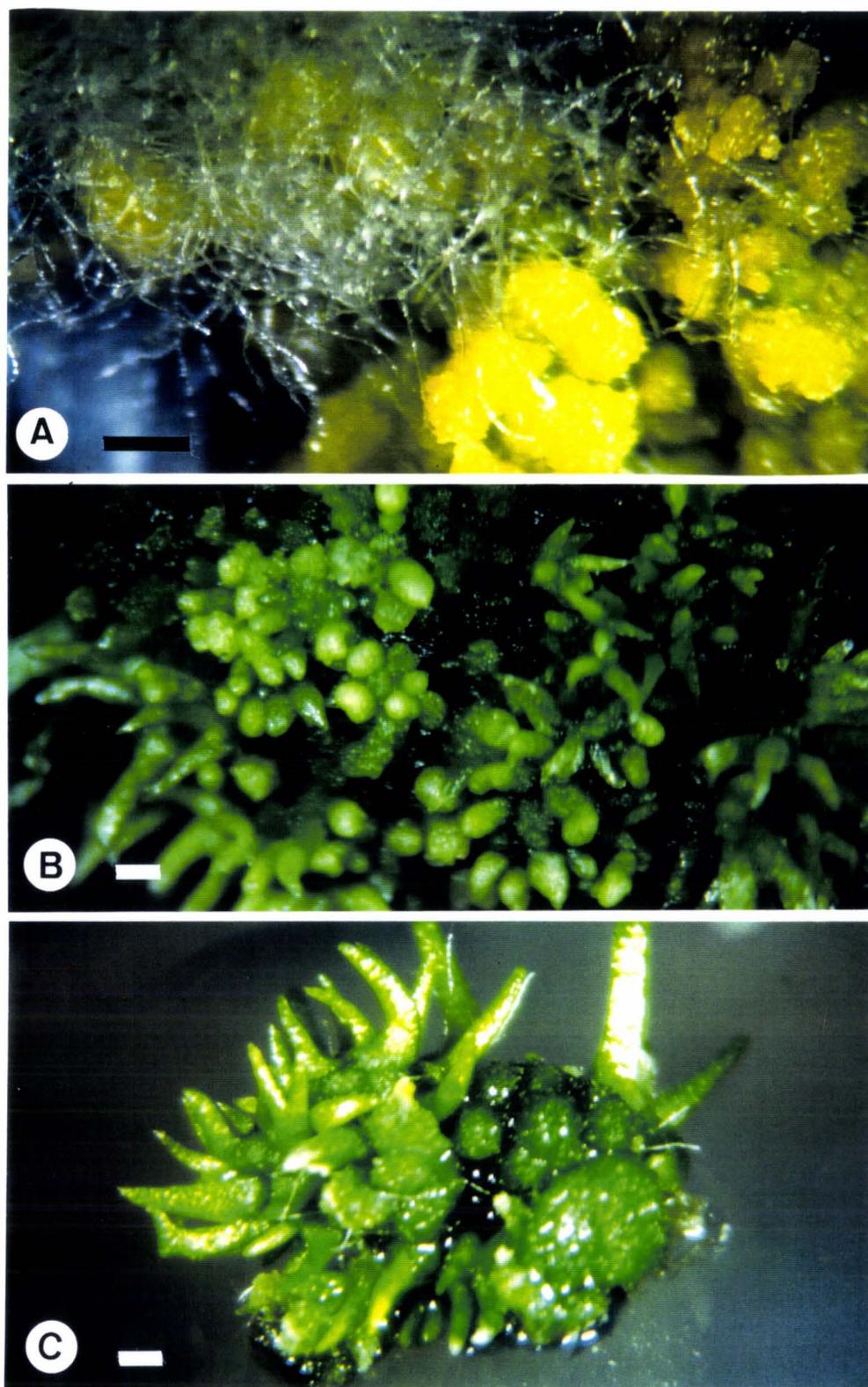


Fig. 13. Aspects macroscopiques de l'embryogenèse indirecte à partir du cal. Effet de la balance hormonale sur l'obtention des embryons somatiques. Barre = 500 μm .

- A. Cal-nodulaire après 6 semaines de culture sur le milieu MB-d additionné de 1.5 mg L⁻¹ de AIB et 0.5 mg L⁻¹ de AG₃.
- B. Cal-nodulaire après 6 semaines de culture sur le milieu MB : présence d'embryons à différents stades.
- C. Cal-nodulaire après 8 semaines de culture sur le milieu MB : présence d'embryons au stade feuille embryonnaire et de quelques plantes au stade 1 cycle de feuilles.

2. Obtention d'une embryogenèse somatique à partir de cals

Les mêmes exigences en éléments minéraux, azote et phytohormones que celles décrites lors de l'analyse du bourgeonnement direct ont été remarquées lors de la mise en place d'une morphogenèse à partir des cals. De la même façon, c'est le milieu MB-d qui a été retenu pour expérimenter la balance hormonale.

En effet, en présence de concentrations élevées en AIB et en AG₃ (respectivement 1.5 et 0.5 mg L⁻¹), les cals deviennent jaunes et ne développent que des poils absorbants (Fig. 13 A). Les cals développent des plantes uniquement quand ils sont cultivés sur le milieu MB-d additionné de 0.5 mg L⁻¹ de AIB et 0.1 mg L⁻¹ de AG₃ (milieu MB). Cette morphogenèse se manifeste tout d'abord par l'apparition, après 2 à 3 semaines de culture, de dômes vert-clair à la surface du cal-nodulaire. Le plus souvent, des poils absorbants se développent à la base de ces dômes. Après 3 à 5 semaines de culture, ces dômes évolueront en structures morphogènes sous forme de cylindre légèrement allongé. Ces structures recouvrent la quasi totalité de la surface du cal-nodulaire (Fig. 13 B). Conformément aux ressemblances morphologiques avec les embryons zygotiques chez quelques Lycopodes (Treub, 1884 ; Goebel, 1887 ; Bruchmann, 1910), ces structures seront qualifiées d'**embryons somatiques**. Entre la 6^{ème} et la 8^{ème} semaine de culture, ces embryons deviennent plus bombés à leur base, plus effilés à leur sommet, et présentent une morphologie foliacée (Fig. 13 C). Entre la 8^{ème} et la 13^{ème} semaine, chaque embryon se développera en plantules avec 2 à 3 cycles de feuilles et 1 à 2 racines. Dans ces conditions, le taux de plantules formées varie de 10 à 23 par cal (Tableau 10). La taille initiale du cal ne semble pas influencer le nombre final obtenu. En effet, des cals de petites tailles donnent sensiblement le même nombre et type de plantules que des cals ayant une taille initiale 2 fois plus grande (Tableau 10). Donc, pour limiter au mieux la quantité de cals lors du repiquage, il est plus judicieux de prendre des cals de petite taille (de l'ordre de 3 mm) pour induire la formation de plantules.

De la même façon que pour le bourgeonnement direct, c'est le milieu MB qui sera retenu pour la formation de plantules à partir de cals.

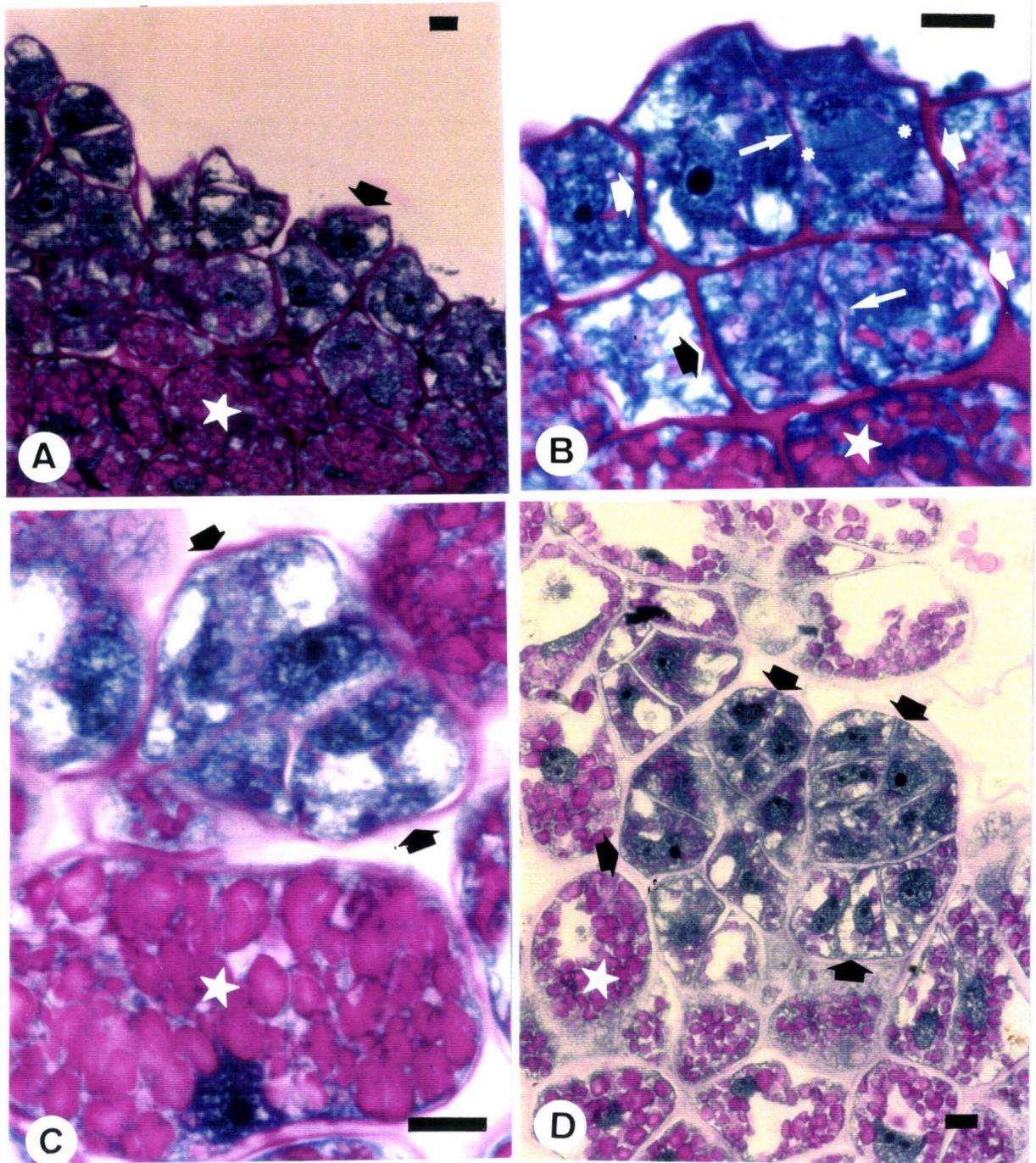


Fig. 14. Mise en évidence de l'origine unicellulaire des embryons somatiques issus du cal-nodulaire. L'amidon est coloré en rouge par le P. A. S., par contre, les protéines cytoplasmiques sont colorées en bleu par le Naphtol Blue Black. Barre = 10 μ m.

- A.** Après 1 semaine de culture sur le milieu MB : les cellules embryogènes situées sur la périphérie du cal sont très riches en protéines cytoplasmiques (flèche). Par contre, les cellules du reste du cal sont très riches en amidon (☆).
- B.** Au cours de la 2^{ème} semaine : la première mitose des cellules embryogènes est asymétrique (flèches). La seconde est préférentiellement perpendiculaire à la première (*). Une intense activité mitotique est observée.
- C.** Dès la 3^{ème} semaine : les mitoses suivantes conduisent à une segmentation de la cellule initiale. Les autres cellules du cal sont très riches en amidon (☆).
- D.** Plusieurs structures embryonnaires (flèches) sont aisément distinguables au sein du cal.

Tableau 10. Nombre de bourgeons formés à partir des cals cultivés sur le milieu MB. Chaque valeur est la moyenne \pm s. e. de 3 répétitions. *, plantes au stade 2 - 3, 4 - 6 et 6 - 8 cycles de feuilles.

Nombre de cals mis en culture	Diamètre des cals (mm)		Nombre de plantes* formées par cal		
	initial	final	2 - 3	4 - 6	6 - 8
10	3	10.00 \pm 2.03	11.00 \pm 3.20	7.33 \pm 1.90	1.50 \pm 0.75
10	4	14.00 \pm 2.83	15.20 \pm 0.90		
10	5	13.33 \pm 1.15	8.70 \pm 1.57	2.00 \pm 0.75	
10	6	15.67 \pm 3.39	7.80 \pm 1.51	5.33 \pm 1.13	
10	6.5	12.00 \pm 0.00	10.20 \pm 1.00	3.00 \pm 0.91	
10	7	12.00 \pm 0.00	18.12 \pm 3.39		1.33 \pm 0.56
10	7.5	14.00 \pm 0.00	14.43 \pm 3.16	9.00 \pm 2.83	

3. Analyse cytologique de l'embryogenèse somatique à partir de cals

Afin de prouver l'origine unicellulaire ou multicellulaire des structures organisées d'une part, et de déterminer leur nature, embryons ou bourgeons, d'autre part ; des coupes cytologiques ont été effectuées sur les cals repiqués sur le milieu de bourgeonnement (MB). Ces coupes ont été réalisées sur des portions prélevées aseptiquement chaque semaine sur les mêmes cals (13 semaines). Les colorants utilisés sont le bleu de toluidine, le P. A. S. seul ou associé avec le Naphtol Blue Black. L'obtention de la séquence des événements cytologiques et son analyse permettra une comparaison avec l'embryogenèse zygotique chez les Lycopodes.

Les premiers signes de cette embryogenèse somatique sont observés après une semaine de culture sur le milieu MB. Il s'agit de cellules très particulières qui apparaissent sur la périphérie de chaque cal (Fig. 14 A). Ces cellules sont dépourvues ou contiennent très peu d'amidon. Par contre, elles renferment des réserves protéiques, colorées en bleu-noir par le Naphtol Blue Black. Elles possèdent un noyau central doté d'un nucléole dense et très volumineux. La première division de ces cellules est asymétrique (Fig. 14 B). Les divisions ultérieures des cellules initiales conduiront à la formation de structures pluricellulaires (Fig. 14 C, D). Macroscopiquement, ces structures constituent des dômes vert-clair situés à la surface du cal (Fig. 13 B).

Nous allons maintenant revenir en détail sur les événements précoces de cette embryogenèse somatique. Comme nous l'avons fait remarquer ci-dessus, la première division est asymétrique. Par contre, la seconde se fait selon un plan d'inclinaison de 45° (Fig. 15 A) à 90° (Fig. 14 B) par rapport à la première. Les quelques divisions qui suivent donneront lieu à des structures pluricellulaires entourées par une couche de mucilage, colorée en rouge par le P. A. S., plus ou moins épaisse. Ces structures embryonnaires résultent d'une segmentation à l'intérieur de la même cellule. Parfois, elles présentent une cellule très active : avec un noyau

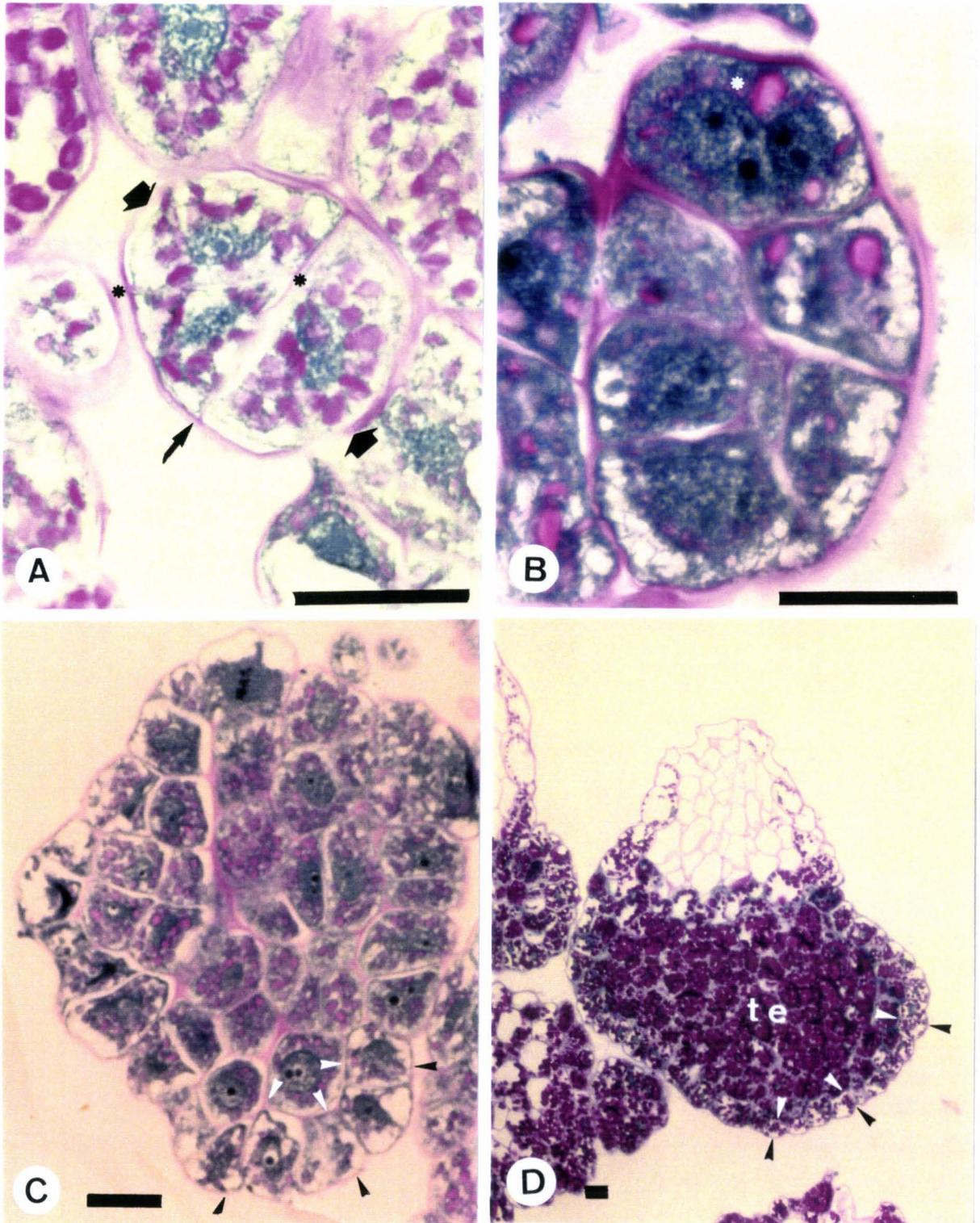


Fig. 15. Analyse cytologique de l'embryogenèse somatique indirecte chez *L. inundata*. Double coloration : P. A. S. + Naphtol Blue Black. Barre = 25 μ m.

- A. Embryon au stade 3 cellules : la 2^{ème} division se fait selon un plan de 45° (*) par rapport à la première.
- B. Embryon au stade cylindre : présence d'une cellule apicale très active (*).
- C. Embryon au stade pyramidal : mise en place d'une couche unicellulaire délimitant l'embryon vers l'extérieur (flèches).
- D. Embryon au stade début feuille : le protoderme est établi (flèches). Les cellules du tubercule embryonnaire (t e) sont très riches en amidon.

central très volumineux, un à deux nucléoles très denses, quelques grains d'amidon et plusieurs protéines cytoplasmiques (Fig. 15 B). Entre la 4^{ème} et la 6^{ème} semaine de culture, ces structures embryonnaires augmentent de taille et acquièrent une forme pyramidale (Fig. 15 C). A partir de la 6^{ème} semaine, le sommet de ces structures embryonnaires commence à s'allonger vers le haut. A ce stade, nous pouvons distinguer deux parties : inférieure bien bombée est constituée par des cellules très riches en amidon ; supérieure légèrement effilée est constituée par des cellules complètement dépourvues d'amidon. Conformément aux descriptions des embryons zygotiques chez *Lycopodium cernuum* par Treub (1884), nous qualifions la partie inférieure de **tubercule embryonnaire**, et la partie supérieure de **feuille embryonnaire**. L'ensemble est limité par une couche unicellulaire dont les cellules contiennent moins d'amidon que celles de la zone interne (Fig. 15 D). Entre la 6^{ème} et la 7^{ème} semaine, la feuille embryonnaire devient encore plus allongée. Elle est constituée, dans sa partie centrale, par des cellules allongées ayant une grande vacuole et ne contenant aucun grain d'amidon, tandis que la périphérie est constituée par une couche de cellules vacuolisées et contenant quelques grains d'amidon. Ces derniers sont alignés sur la face interne des cellules (Fig. 15 E). Jusqu'à ce stade, ces structures restent imbriquées sur le cal par un prolongement latéral du tubercule embryonnaire toujours très riche en amidon. Entre la 7^{ème} et la 8^{ème} semaine, chaque structure embryonnaire s'organise en développant un méristème apical constitué par des cellules de petite taille et riches en protéines (Fig. 15 F). Entre la 8^{ème} et la 10^{ème} semaines de culture, chaque embryon développe un premier cycle de feuilles. C'est le stade "plantule". A ce stade, aucune formation de trachéides ou de racines n'est observée. Enfin, entre la 10^{ème} et la 13^{ème} semaine, chaque "plantule" développe son 2^{ème} et parfois, son 3^{ème} cycle de feuilles (Fig. 15 G). A partir du stade 3 cycles de feuilles, chaque plante développe 1 à 2 racines et commence à former des trachéides. Ces dernières prennent naissance à partir du centre de la tige et s'orientent vers le méristème apical. Ce n'est que tardivement que ces faisceaux s'étendent à l'intérieur des feuilles.

A partir de ce stade, les plantules sont isolées les unes des autres et repiquées sur un nouveau milieu qui favorise leur croissance et leur enracinement.

V. CROISSANCE ET DÉVELOPPEMENT DES PLANTULES

Les plantules obtenues par le bourgeonnement direct ou par l'embryogenèse somatique indirecte ne présentaient pas toutes les caractéristiques suffisantes pour permettre leur acclimatation. C'est pourquoi une étape de croissance et une autre de développement étaient nécessaires avant de procéder à une acclimatation.

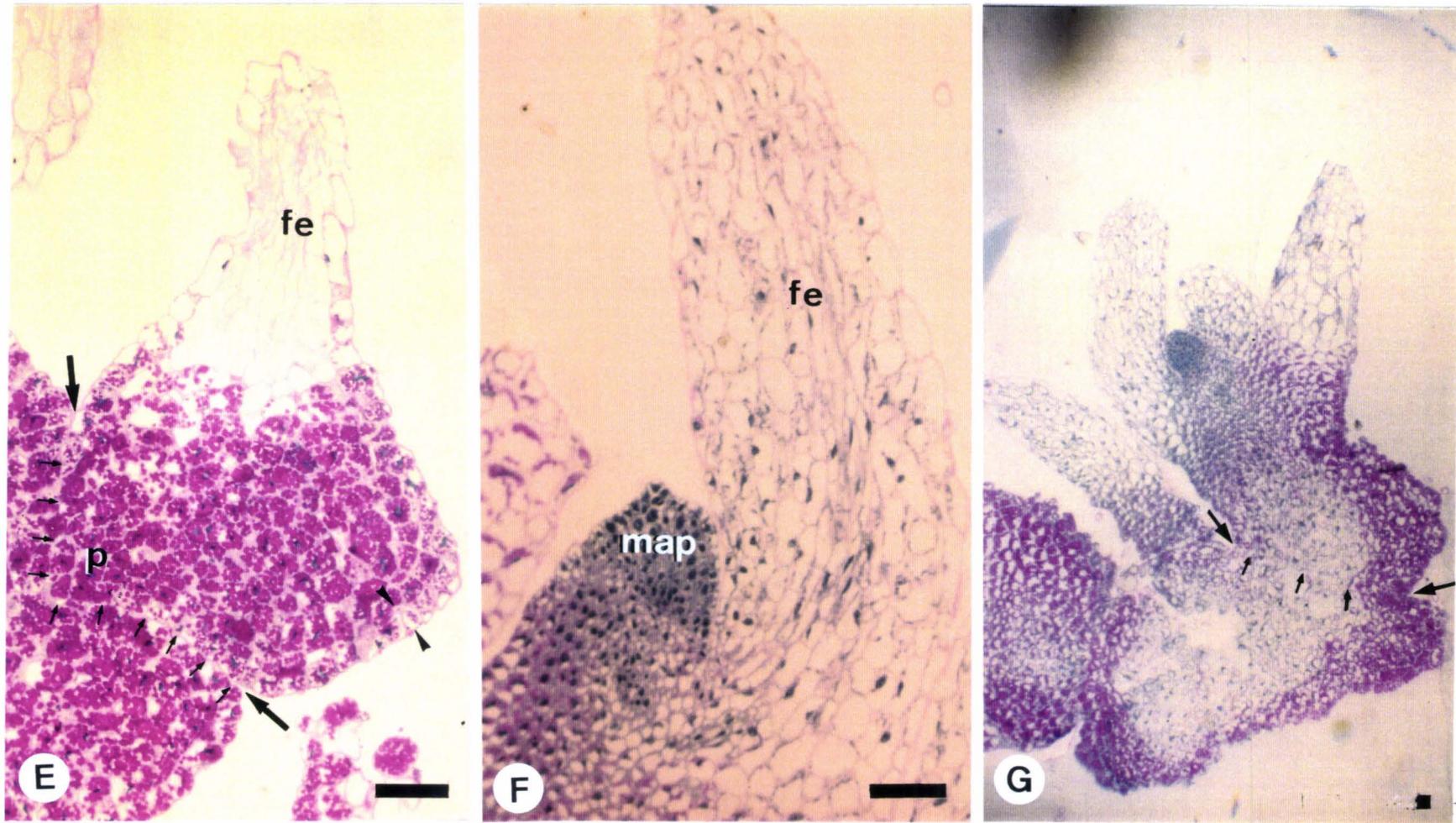


Fig. 15. Analyse cytologique de l'embryogenèse somatique indirecte chez *L. inundata*. Double coloration : P. A. S. + Naphtol Blue Black. Barre = 100 μ m.

- E. Embryon au stade feuille embryonnaire : la partie inférieure est imbriquée dans le cal (flèches) par l'intermédiaire de son pied (p). L'embryon est délimité vers l'extérieur par le protoderme constitué d'une couche unicellulaire (flèches).
- F. Passage au stade "plantule" : le méristème apical (m ap) est bien évident à la base de la feuille embryonnaire (f e).
- G. Croissance de la plantule : un premier cycle de feuille a été formé. Le plan de coupe montre la limite (flèches) avec une autre plantule.

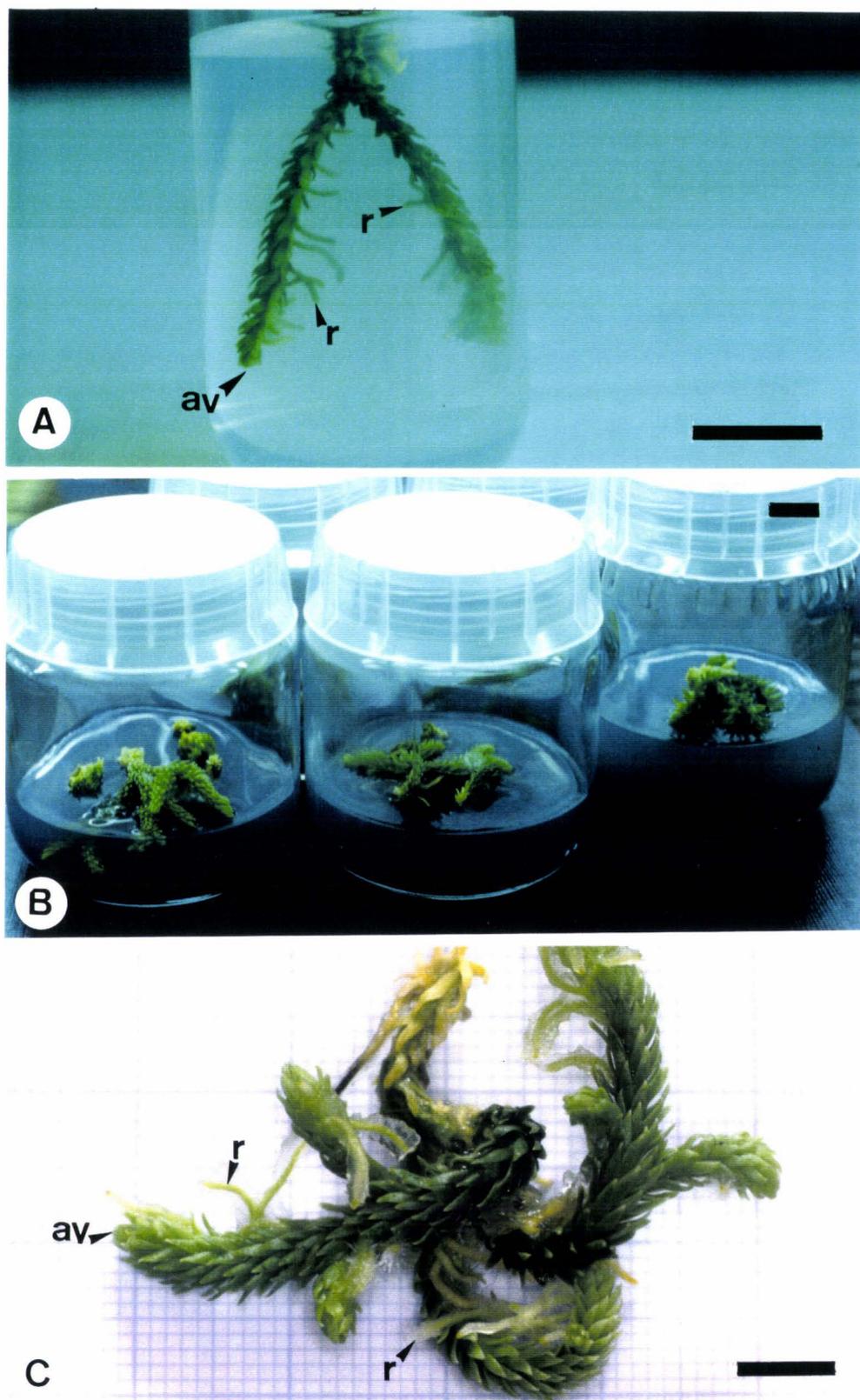


Fig. 16. Croissance et développement des plantules. Barre = 15 mm.

- A. Après 13 semaines de culture sur le milieu MB : plantule montrant une dichotomie et deux apex végétatifs (a v). Chacune des deux tiges végétatives présentent plusieurs racines (r).
- B. Après 13 semaines de culture sur le milieu MD : chaque plant a développé plusieurs tiges végétatives avec dichotomies.
- C. Plant retiré du milieu de développement et prêt à être acclimaté : présence de plusieurs apex végétatifs (a v) et plusieurs racines (r).

1. Phase de croissance

Les plantules formées à partir des apex ou des cals sont au stade 2 à 3 cycles de feuilles et possèdent une à deux racines. Dans les deux cas, elles sont isolées et cultivées séparément sur le milieu MB. L'origine (apex ou cal-nodulaires) ne semble pas influencer leur croissance. Par contre, le type de fermeture des tubes semble l'influencer fortement. En effet, la croissance maximale des plantes a été obtenue avec des tubes fermés par des bouchons de cellulose pressée (Tableau 11). Dans ces conditions, elles développent des tiges rampantes et atteignent une longueur moyenne de 11 mm. Chacune possède une ou deux dichotomies et plusieurs racines (Fig. 16 A). Au delà d'une certaine longueur (10-15 mm), toutes les plantes montrent une tendance à s'enfoncer dans le milieu de culture.

Le type de bouchon sélectionné (cellulose pressée) laisse à penser que le fait de favoriser les échanges gazeux garantissent une harmonie entre la formation des tiges végétatives d'une part, et des racines d'autre part. Toutefois, chaque plantule obtenue après cette phase de croissance ne possède qu'une seule tige avec 1 à 2 dichotomies (Fig. 16 A). C'est pourquoi, une phase de développement de ces plantules a été envisagée.

Tableau 11. Effets de différents types de fermeture des tubes sur la croissance des bourgeons mis en culture sur le milieu MB.

Type de fermeture	Total de plantules mises en culture	Longueur moyenne (mm)		Taux de croissance (mm)
		initial	final	
coton	30	2.83 ± 1.41	7.60 ± 2.54	4.77
cellulose pressée	58	3.68 ± 1.52	14.86 ± 2.60	11.18
polypropylène	30	4.80 ± 1.65	6.92 ± 2.40	2.12

2. Phase de développement : effet du charbon activé

Comme nous l'avons mentionné ci-dessus, la phase de croissance précédente a permis d'obtenir des plantules constituées d'une seule tige végétative avec 1 ou 2 dichotomies. Ces critères n'étaient pas suffisants pour envisager une acclimatation. D'où, l'intérêt d'une phase de développement. Cette phase consiste à obtenir des vitroplants comprenant plusieurs tiges végétatives avec de nombreuses dichotomies et racines. Durant cette phase, les plantules sont cultivées dans des pots en verre (50 x 70 cm) fermés avec des bouchons en polypropylène (type Magenta, Sigma).

Ce développement a été fortement lié à la quantité de charbon activé ajouté au milieu MB sans phytohormone. En effet, une forte concentration, 2 g L⁻¹, de charbon activé réduit fortement le développement des tiges (15 à 20 mm) mais augmente de façon anormale, par

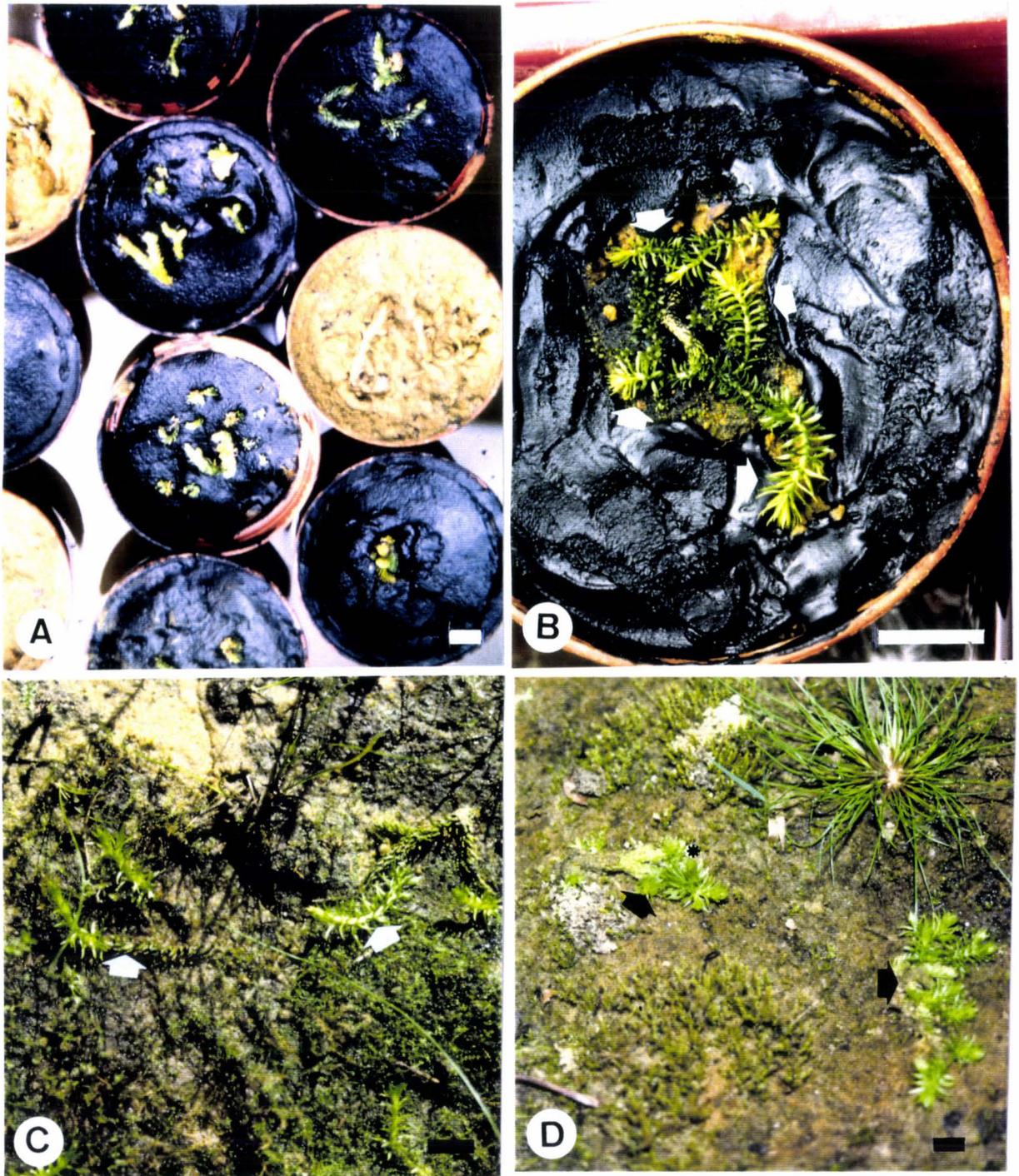


Fig. 17. Acclimation des plants issus de l'*in vitro*. A et B, plants acclimatés soit sur sable acide seul soit sur sable acide et charbon activé. C et D, plants acclimatés sur le substrat naturel non autoclavé. Barre = 20 mm.

- A. Acclimation sur sable acide et sur charbon activé : les plants acclimatés sur sable seul sont morts ; par contre, ceux acclimatés sur sable et charbon activé sont verts.
- B. Plant ayant passé un hiver dans la serre : formation de tiges végétatives nouvelles (flèches).
- C. Plants ayant passé l'hiver dans la serre : formation de nouvelles tiges végétatives (flèches).
- D. Plants ayant passés deux hivers successifs dans la serre : formation de tiges végétatives nouvelles (flèches) et débuts de formation d'une tige sporangifère (*).

comparaison avec les plantes de *L. inundata in situ*, le nombre et la longueur des racines (10 à 15 mm). Sans charbon activé, la longueur des plantes peut atteindre 30 mm, mais les tiges ne forment que très peu de racines. C'est la concentration de 0.5 g L⁻¹ de charbon activé qui permet d'avoir un équilibre entre la croissance des tiges et la formation de racines (Fig. 16 B). Ainsi, après 13 semaines de culture, les plantes atteignent une longueur de 30 à 40 mm et chacune d'elles possède 8 à 14 racines et plusieurs dichotomies (Fig. 16 C).

Les rôles du charbon activé sont variés : adsorbe les phytohormones encore présentes dans le milieu de culture, favorise le gravitropisme (limite le passage de la lumière).

Le milieu de culture MB sans phytohormone et additionné de 0.5 g L⁻¹ de charbon activé est désormais nommé **milieu de développement (MD)**.

Les plantes obtenues après cette phase de développement possèdent, comme celles dans la nature, plusieurs tiges rampantes avec des ramifications dichotomiques et plusieurs racines également dichotomiques. C'est pourquoi, leur acclimatation a été envisagée.

VI. ACCLIMATATION DES PLANTS OBTENUS *IN VITRO*

1. Sur un mélange sable acide et tourbe

Tous les plants acclimatés soit sur du sable acide et de la tourbe brune du commerce, soit sur du sable acide et de la tourbe provenant du site naturel autoclavés ou non autoclavés, ont été contaminés par plusieurs champignons quelques jours après leur transfert. Même si les plants ont été régulièrement pulvérisés avec le mercurobutol[®] à 10 %, les champignons ont persisté et tous les plants se sont nécrosés après 2 à 3 mois de culture.

2. Sur sable acide et charbon activé

Afin de constituer une fine couche de matière organique sur le sable acide comme c'est le cas dans l'habitat naturel de *L. inundata*, nous avons remplacé la tourbe par le charbon activé.

Avec des substrats non autoclavés, tous les plants ont été contaminés et se sont nécrosés quelques mois après leur transfert dans des pots.

Par contre, quand les substrats sont autoclavés, 62 % de plants repotés restent verts et ne présentent aucune contamination fongique (Fig. 17 A). Après avoir passé tout l'hiver dans la serre, ces plants développent une à plusieurs tiges végétatives (Fig. 17 B). Mais, la croissance de ces tiges n'est pas très importante, d'où l'idée de tester d'autres modes d'acclimatation.

3. Sur des substrats provenant du site naturel

La plupart des vitroplants acclimatés sur du substrat naturel non autoclavé sont restés vivants. Après avoir passé 6 semaines dans la chambre de culture et plusieurs mois en serre, ils ont tous développé plusieurs tiges végétatives nouvelles (Fig. 17 C). La plupart d'entre eux ont développé des tiges avec dichotomies comme c'est le cas dans la nature. Pour la première fois, plusieurs plants ont développé des tiges dressées portant à leur sommet un épi sporangifère (Fig. 17 D).

Quand le substrat naturel est autoclavé mais arrosé avec le filtrat de la matière organique du site naturel non autoclavé, la quasi totalité des plants survivent. Mais, contrairement au cas précédent, les plants ne commencent à croître que quelques semaines plus tard par rapport à ceux acclimatés sur du substrat naturel non autoclavé. Durant ces semaines, un tapis bactérien s'est formé à la surface du substrat d'acclimatation. A partir de ce stade, tous les plants se sont développés et ont montré, comme précédemment, des tiges dichotomiques rampantes et des tiges dressées avec un épi sporangifère.

Par contre, la majorité des plants sont morts quand ces derniers sont acclimatés, soit sur du substrat naturel autoclavé arrosé avec de l'eau de pluie, soit sur du substrat naturel autoclavé arrosé avec le filtrat de la matière organique du site nature également autoclavé.

4. Acclimatation sur le site naturel abritant la *Lycopodielle inondée*

Pendant les 3 semaines de culture dans la sablière du lièvre, tous les vitroplants sont restés vivants et chacun a développé une à quelques racines. Après leur transfert et leur mise en culture en serre pendant 12 mois, tous les pieds ont développé des tiges végétatives nouvelles. Ce développement est plus important que celui obtenu avec les essais précédents. Ces plants ont été gardés pendant deux années successives en serre, et après deux hivers, chacune de ces plantes a développé des tiges nouvelles.

*Après ces différents résultats, il nous apparaît que l'acclimatation momentanée in situ des vitroplants sur le site naturel de *Lycopodiella inundata*, tout comme l'acclimatation ex situ, mais sur de la matière organique non autoclavée provenant du site naturel de cette espèce, favorisent la croissance des plants et leur permettent de développer des tiges dichotomiques et plusieurs racines. Ce n'est qu'avec ces conditions d'acclimatation, que les plants ont développé chacun une tige dressée avec un épi sporangifère. Ceci laisse suggérer que pour acclimater des vitroplants de *L. inundata*, la présence dans le substrat naturel d'éléments vivants ou de produits d'excrétion labiles à l'autoclave, semble être nécessaire. Il pourrait s'agir de micro-organismes ou de champignon(s).*

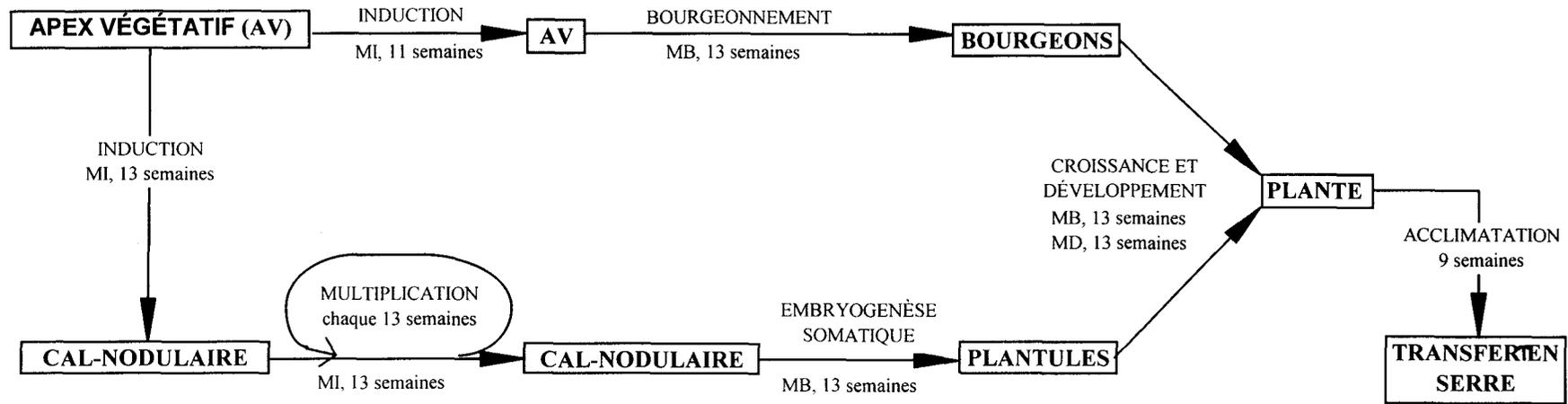


Fig. 18. Diagramme résumant les différentes étapes potentielles de la propagation *in vitro* de *Lycopodiella inundata* (L.) Holub.

Pour répondre en partie à cette interrogation, des analyses préliminaires ont été réalisées sur les substrats provenant de l'habitat naturel de *L. inundata*.

5. Observations préliminaires sur les micro-organismes présents dans l'habitat naturel de *L. inundata*

Afin de réaliser une observation préliminaire sur les micro-organismes présents dans un site naturel abritant encore cette espèce, des analyses ont été réalisées sur les substrats de trois sites différents de *L. inundata* : sablière du lièvre (Saint-Amand, Nord), la lande de Villepail (Mayennes) et la tourbière de Rimat (Massif du Mont Dore). Dans les trois cas, les mêmes micro-organismes ont été rencontrés autour des racines de cette plante. Il s'agit de Cyanobactéries appartenant à quatre genres différents : *Lyngbia* sp., *Microcystis* sp., *Oscillatoria* sp. et *Nostoc* sp.

Ces quatre micro-organismes pourraient avoir des rôles complémentaires dans l'installation et dans le maintien d'une population de *L. inundata*.

Ces différentes observations confirment l'idée selon laquelle, les tiges rampantes de *L. inundata* formeraient une symbiose avec des Cyanobactéries.

VII. CONCLUSION

Le protocole de multiplication *in vitro* de *L. inundata* a été maîtrisé et optimisé dans sa totalité. Des plantules ont été obtenues à la fois par bourgeonnement direct à partir des apex végétatifs et par embryogenèse somatique indirecte à partir du cal-nodulaire (Fig. 18). Les plants issus de l'un ou l'autre mode de morphogenèse se sont développés normalement et ont formé plusieurs tiges rampantes dichotomiques ayant plusieurs racines comme c'est le cas chez la plante *in situ*. Quand il sont acclimatés sur un substrat naturel non autoclavé, les plants forment des nouvelles tiges rampantes et plusieurs racines. En outre, chaque plant développe une tige dressée avec un épi sporangifère comme c'est le cas chez la plante *in situ*. Enfin, nos analyses préliminaires, ont révélé la présence simultanée de quatre espèces de Cyanobactéries qui sont toujours accolées aux cellules des racines de *L. inundata in situ*.

B. CARACTÉRISATION DES ALCALOÏDES PRÉSENTS DANS LES CALS ET LES PLANTS CULTIVÉS *IN VITRO*

Le but primordial de ces analyses phytochimiques est de savoir si les cals et/ou les vitroplants de *L. inundata* contiennent des alcaloïdes, puis de mettre au point des procédés d'extraction, de purification et d'analyse adaptés, car, aucun procédé de ce genre n'a été auparavant décrit chez cette espèce. Enfin, il s'agit essentiellement d'évaluer la différence qualitative en alcaloïdes entre les cals et les vitroplants, c'est pourquoi, les résultats qui suivront ne seront pas discutés selon le poids de matière sèche ou fraîche des explants.

I. PURIFICATION DES ALCALOÏDES

En utilisant l'un ou l'autre procédé de purification décrit dans la partie "matériels et méthodes", nous avons obtenu, après concentration un résidu jaunâtre qualifié de fraction "alcaloïdes totaux". L'analyse de cette fraction issue de cals et de vitroplants a permis de détecter plusieurs alcaloïdes.

Le résultat obtenu après chaque procédé de purification a été différent selon le protocole. Ainsi, l'analyse par CLHP de la fraction des "alcaloïdes totaux" purifiée selon le procédé P1 a permis d'obtenir des chromatogrammes avec une quinzaine de pics. Par contre, son analyse après purification selon le procédé P2 a permis d'obtenir des chromatogrammes présentant seulement 6 à 7 pics. Enfin, l'analyse de ces alcaloïdes totaux obtenus selon le procédé de purification P3 montre les mêmes produits que ceux récupérés avec le procédé P1, mais par contre en quantité plus importante. Ce qui s'explique par une meilleure extraction grâce à des contacts successifs des résidus bruts avec des solutions d' H_2SO_4 0.1 N.

C'est ce dernier protocole de purification d'alcaloïdes (qui consiste tout d'abord à dissoudre le résidu brut chlorophyllien 6 fois dans H_2SO_4 0.1 N, puis d'épuiser 6 fois la solution aqueuse alcaline par du chloroforme), à partir des cals et de vitroplants de *L. inundata*, qui a été retenu pour la suite des expérimentations.

II. MISE EN ÉVIDENCE PAR CHROMATOGRAPHIE SUR COUCHE MINCE (CCM)

Aucune migration de produits n'a été observée lorsque nous avons utilisé le chloroforme ou le mélange chloroforme / méthanol (1/1, v/v) comme solvants éluants. Par contre, 7 à 8 produits constituant chacun une tache colorée en rouge orangée, ont pu être révélés par le réactif de Dragendorff en utilisant respectivement le solvant constitué par acétone / eau / ammoniac 27 % (90/7/3, v/v) ou par méthanol / eau / ammoniac 27 % (90/7/3, v/v). Ces

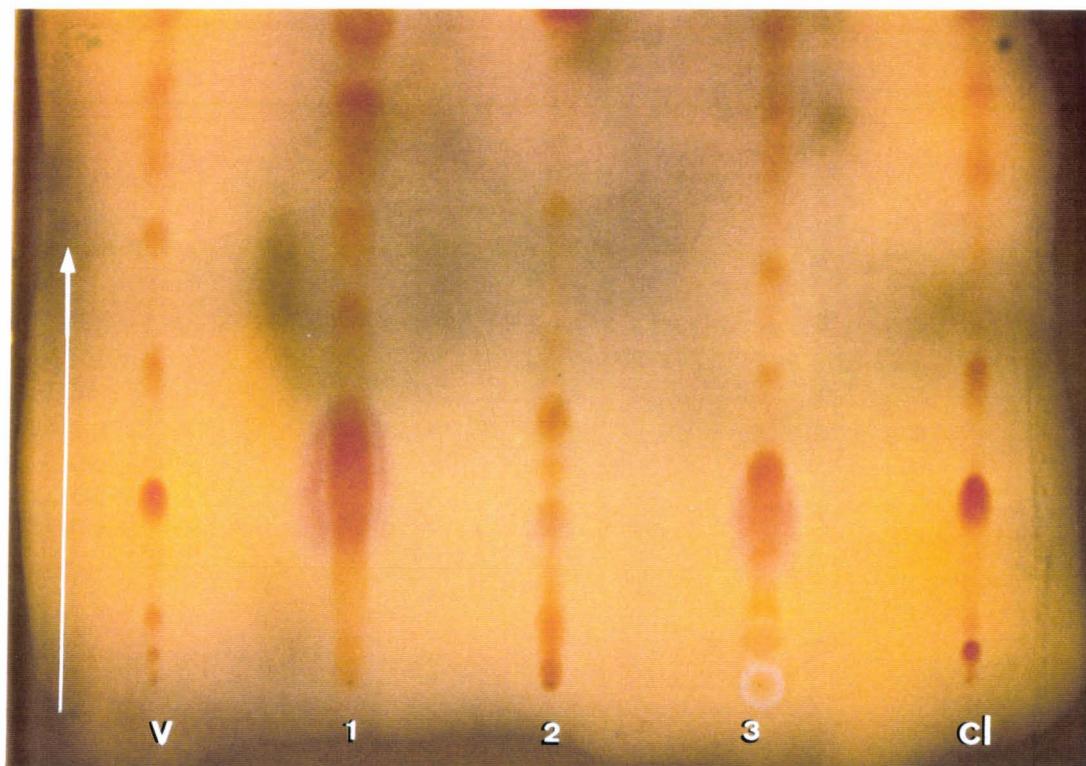


Fig. 19. Chromatogramme (CCM) des alcaloïdes totaux des cals et des vitroplants de *L. inundata* obtenu avec une plaque à couche de silice PK6F Silica Gel (Whatman®) et un solvant de développement constitué de : méthanol/eau/ammoniaque 27 % (90/7/3, v/v). Révélation par le réactif de Dragendorff.

Plusieurs alcaloïdes sont présents à la fois dans l'extrait des vitroplants (v) et des cals (cl). Les fractions 1, 2 et 3, issues d'une séparation préliminaire par CLHP semi-préparative des alcaloïdes totaux, montrent que ces derniers sont encore constitués de la plupart de leurs composants. La migration du solvant de développement est ascendante (flèche). Le poids sec initial des cals et des vitroplants n'est pas considéré.

résultats ont été obtenus uniquement avec les plaques F1500 LS 254 (Schleicher & Schuell) ou PK6F Silica Gel (Whatman®). Néanmoins, c'est le deuxième solvant de développement qui a engendré une meilleure migration et une bonne séparation de chacun des alcaloïdes (Fig. 19). Ceci a permis d'établir le facteur de rétention, Rf (qui correspond à la distance parcourue par l'alcaloïde/distance parcourue par le solvant éluant) de chaque composé (Tableau 12). Le solvant de développement constitué de : acétone/eau/ammoniaque 27 % a permis de révéler 7 alcaloïdes, alors que celui constitué de : méthanol/eau/ammoniaque 27 % a permis de révéler 8 alcaloïdes (Tableau 12). Ceci suggère que le deuxième solvant favorise mieux la séparation des substances constituant la fraction des alcaloïdes totaux.

L'analyse de l'ensemble des plaques CCM réalisées, n'a révélé aucune différence qualitative dans la présence des alcaloïdes entre les cals et les vitroplants.

C'est le solvant de développement constitué par méthanol / eau / ammoniaque 27 % (90/7/3, v/v) qui sera choisi pour le reste des expérimentations.

Tableau 12. Les différents Rf des alcaloïdes mis en évidence dans les cals et dans les vitroplants en utilisant deux solvants de développement différents. a : acétone/eau/ammoniaque 27 % (90/7/3, v/v). b : méthanol/eau/ammoniaque 27 % (90/7/3, v/v).

N° de tâches	Rf	
	a	b
1	0.046	0.066
2	0.42	0.20
3		0.31
4	0.69	0.43
5	0.76	0.56
6	0.81	0.62
7	0.88	0.71
8	0.94	0.82

III. EFFETS DE LA POLARITÉ DE LA PHASE MOBILE SUR L'ANALYSE PAR CLHP

1. Analyse par un système classique

Ce système permet d'avoir un diagramme d'élution dont chaque pic correspond à un produit élué après un certain temps qui correspond au "temps de rétention" qui constitue l'une des caractéristiques de chaque produit analysé.

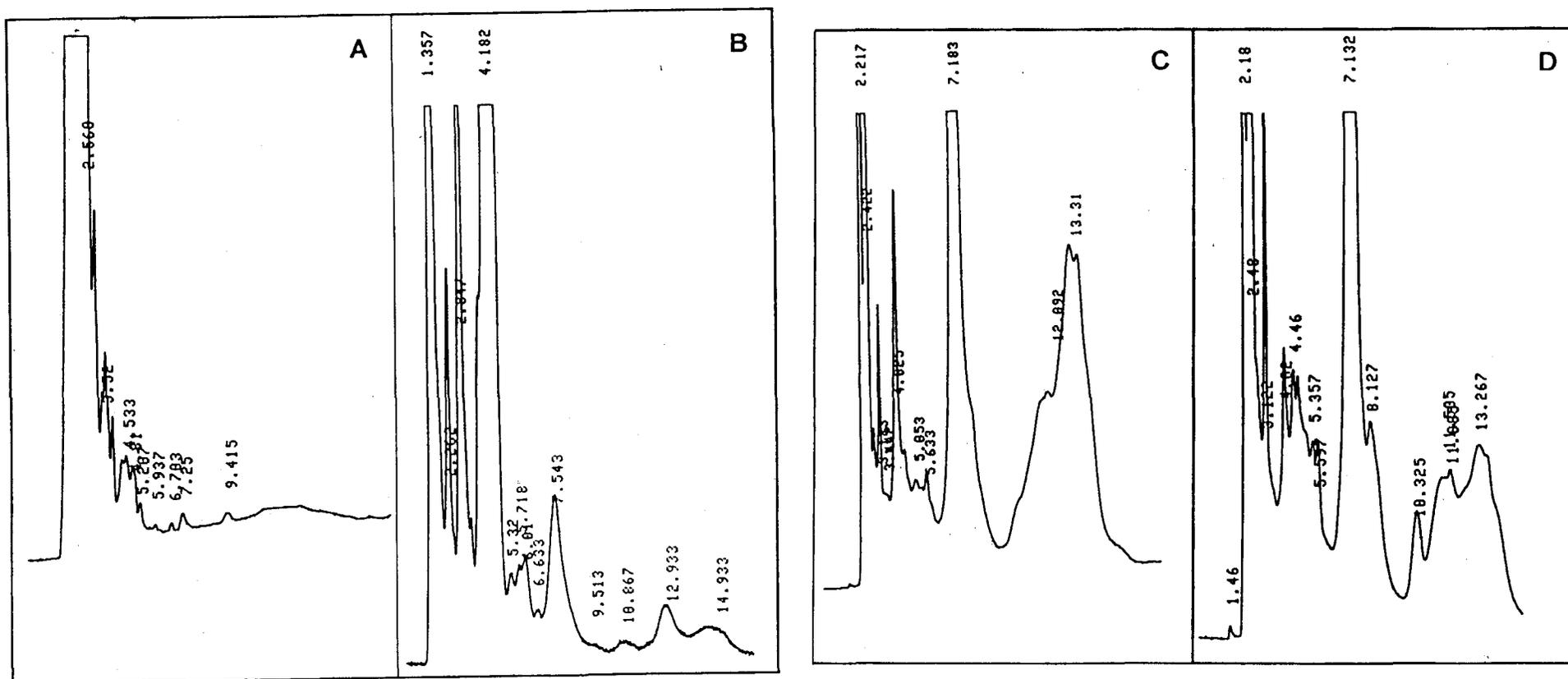


Fig. 20. Diagrammes d'élution des alcaloïdes totaux des cals de *L. inundata* obtenus par CLHP en phase inverse.

Mode de détection : UV = 204 nm.

- A. Extrait élué avec une phase mobile contenant 0 % de solvant organique (phase mobile 12, Tableau 4).
- B. Extrait élué avec une phase mobile contenant 16.5 % de solvant organique (phase mobile 1, Tableau 4).
- C. Extrait élué avec une phase mobile contenant 10 % de solvant organique (phase mobile 9, Tableau 4).
- D. Extrait élué avec une phase mobile contenant 7.5 % de solvant organique (phase mobile 10, Tableau 4).

A la longueur d'onde de 204 nm il est possible de détecter, dans les cals et dans les vitroplants, une dizaine de pics.

Le pH ne semble pas avoir une incidence majeure sur le temps de rétention des composés élués. Par contre, le degré de polarité de la phase mobile influence fortement les temps de rétention. Ce degré est estimé en fonction de la concentration de l'acétonitrile dans la phase mobile : moins cette dernière est riche en acétonitrile, plus elle est polaire. Ainsi, avec très peu ou sans acétonitrile (solvants 11, 12, Tableau 4), la majorité des produits est éluee dans les trois premières minutes ce qui donne un chromatogramme difficilement interprétable à cause des temps de rétention très proches (Fig. 20 A). Par contre, avec une concentration de 16.5 % en acétonitrile (solvant 1, tableau 4), nous obtenons des chromatogrammes avec des temps de rétention relativement espacés (Fig. 20 B). Quand le solvant contient 7.5 % d'acétonitrile, (solvant 9, tableau 4), nous obtenons un chromatogramme avec des temps de rétention plus espacés (Fig. 20 C). Enfin, la meilleure séparation est obtenue avec un solvant contenant 10 % d'acétonitrile (solvant 10, tableau 4). Cette séparation est appréciée par les temps de rétentions des alcaloïdes relativement espacés (Fig. 20 D).

C'est le solvant 10 qui sera choisi pour les expérimentations ultérieures.

2. Analyse par un système équipé de barrettes de diodes

Ce système d'analyse permet d'obtenir simultanément un spectre d'absorption de chacun des composés constituant l'extrait. Ainsi, nous pouvons déterminer à la fois le temps de rétention et la longueur d'onde d'absorption maximale de chaque composé.

Chacun des produits analysés par ce système a montré un spectre d'absorption spécifique bien que les temps de rétention de plusieurs d'entre eux soient relativement proches (Fig. 21 A, B, C, D,).

L'analyse des extraits des cals et des vitroplants par la CLHP classique ou équipée de barrettes de diodes a permis de dénombrer une dizaine de pics dont chacun correspond à un alcaloïde (Tableau 13).

Comme lors de l'analyse par CCM, aucune différence qualitative n'a été observée dans les alcaloïdes entre les cals et les vitroplants suite aux analyses par CLHP. Ceci signifie que les cals et les vitroplants synthétisent les mêmes alcaloïdes. C'est pourquoi, afin de ne pas multiplier le nombre d'expériences à réaliser, nous mettons ensemble dès maintenant les extraits provenant des cals et des vitroplants et nous les considérons comme un seul extrait sec.

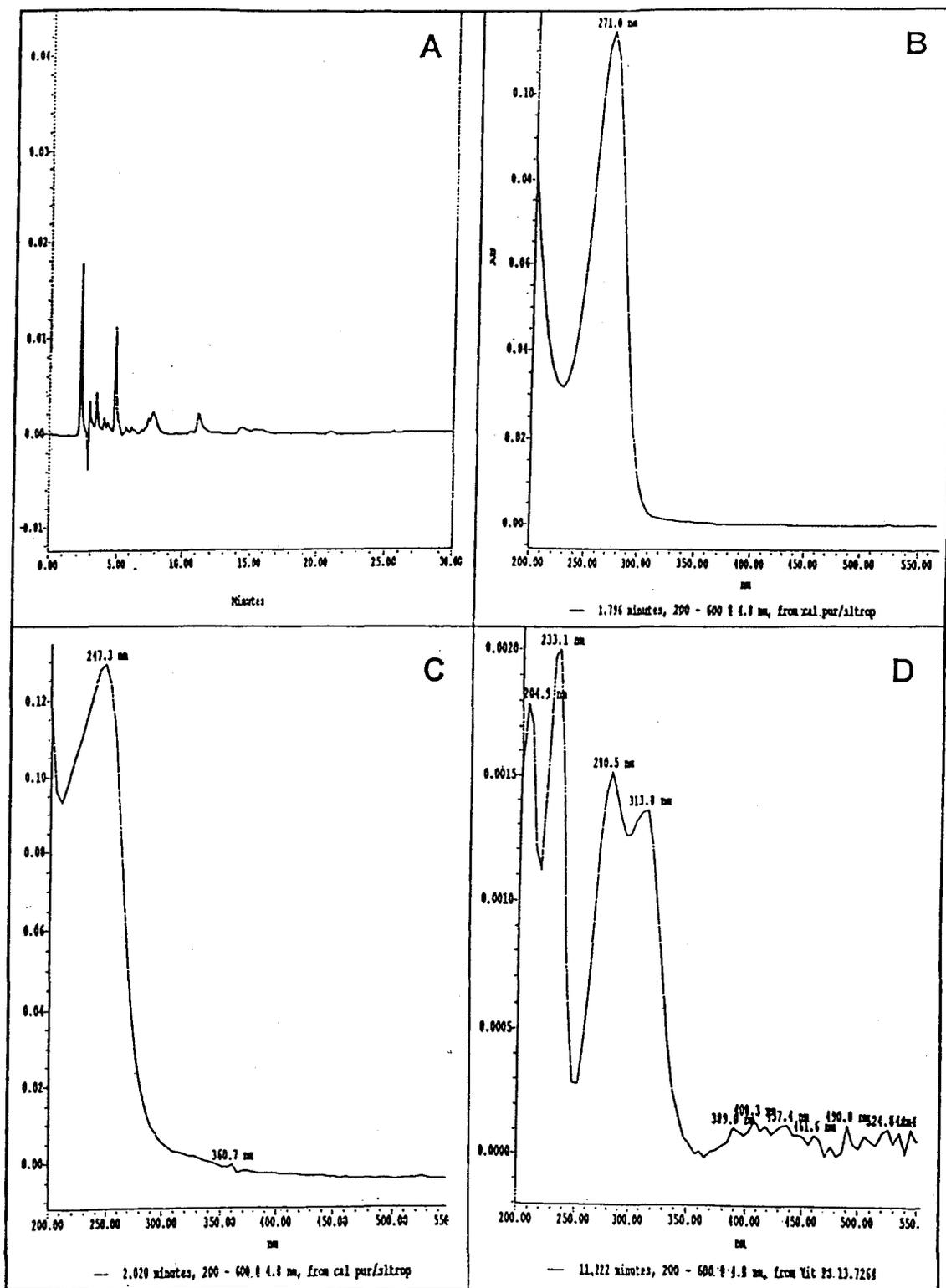


Fig. 21. Chromatogramme et spectres de certains alcaloïdes de *L. inundata* analysés par CLHP équipé d'un système de barrettes de diodes.

A. Chromatogramme des alcaloïdes totaux analysés à 204 nm.

B. C. et D. Spectres de trois alcaloïdes différents.

Tableau 13. Temps de rétention et maxima d'absorption des différents alcaloïdes extraits à partir des calcs et des vitroplants.

Alcaloïdes	Temps de Rétention (min)	Pics d'Absorption Maximale (nm)
1	2.24	271
2	3.52	200.2, 237.8
3	4.34	200.2, 223.7, 271
4	4.86	252.0
5	5.46	247.3
6	6.14	200.2, 228.4
7	6.66	200.2, 228.4, 490.8
8	7.41	200.2, 237.8,
9	11.30	204.9, 233.1, 280.5, 313.8
10	15.86	200.2, 228.4, 490.8

IV. SÉPARATION DES ALCALOÏDES PURS

Le but de cette expérimentation est de séparer les différentes substances constituant le mélange "alcaloïdes totaux" afin de les analyser une à une. Deux méthodes de séparation sont utilisées : la CLHP semi-préparative et la CCM.

1. CLHP semi-préparative

En utilisant une colonne peu hydrophile (Lichrosorb RP 8) et des solvants peu polaires, les chromatogrammes n'ont montré qu'un seul pic (Fig. 22 A) ce qui signifie que tous les produits ont été élués ensemble sans qu'ils soient séparés.

Par contre, en employant une colonne plus hydrophile (Lichrosorb R-P 18) et un solvant polaire contenant 16.5 % d'acétonitrile (solvant A1, Tableau 5); au moins 4 produits ont été élués séparément (Fig. 22 B).

Ce n'est qu'en combinant deux solvants au sein de plusieurs programmes avec gradients d'élution que nous avons eu un début de séparation des composés. Parmi les nombreux programmes d'élution un seul a été retenu (Tableau 14).

Parmi les deux solvants employés au sein de ce programme, un seul a été à chaque fois modifié, solvant A, alors que le second, solvant B, a été toujours gardé constant.

La séparation des alcaloïdes dépend essentiellement du pH du solvant A et de sa concentration en acétonitrile. En effet, avec le solvant A1, contenant 16.5 % d'acétonitrile et ayant un pH de 2,22, nous obtenons 8 pics. Néanmoins, la plupart de ces pics n'était pas bien séparée les uns des autres (Fig. 22 C). Une meilleure séparation d'alcaloïdes, notamment ceux élués pendant les cinq premières minutes, a été obtenue en employant le solvant A6 (Tableau 5) qui contient 13 % d'acétonitrile et qui possède un pH de 2,56 (Fig. 22 D).

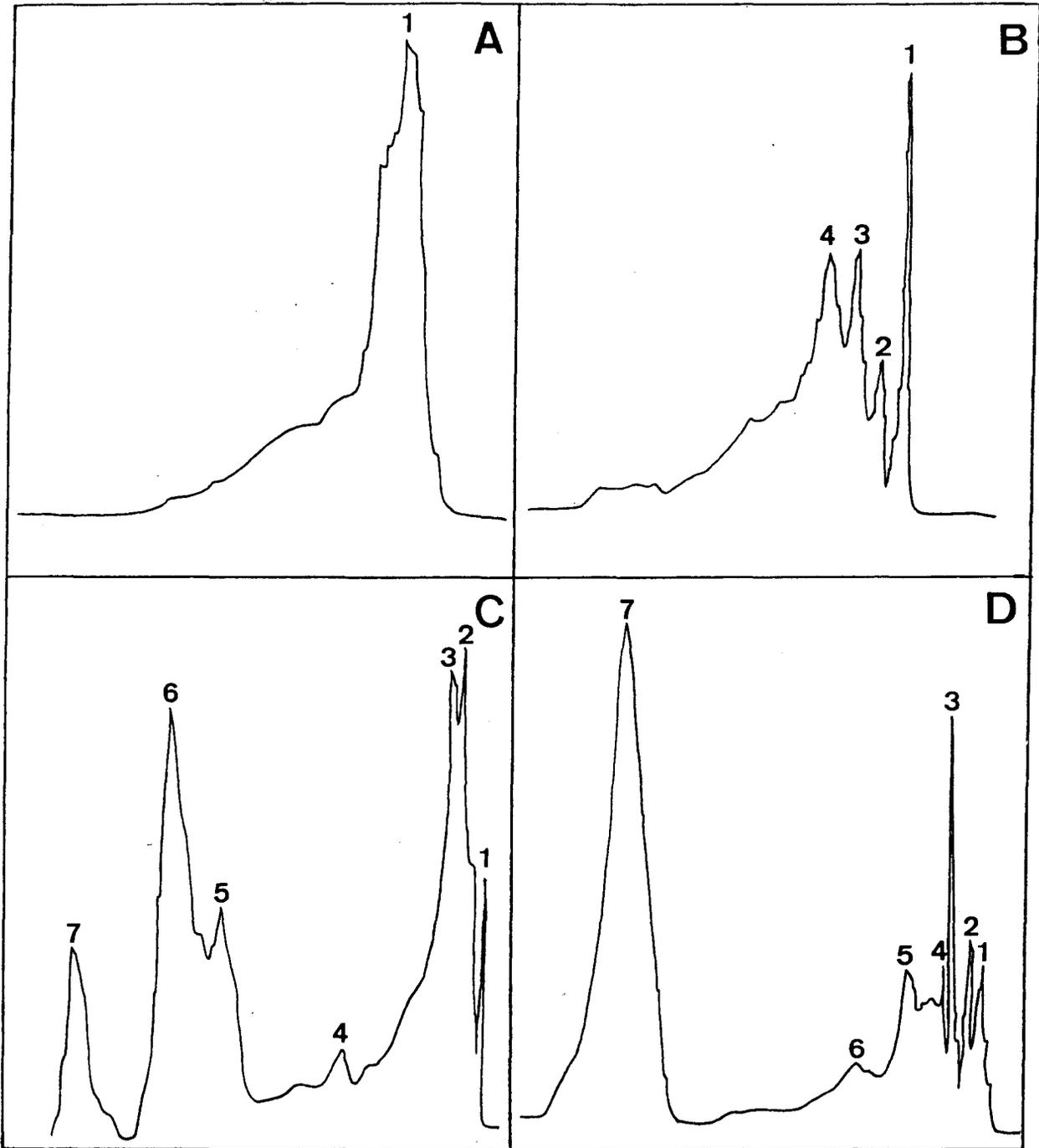


Fig. 22. Chromatogrammes obtenus par CLHP semi-préparative en utilisant différentes conditions de séparation des alcaloïdes totaux des cals et des vitroplants de *L. inundata*. C et D, chromatogrammes obtenus en utilisant le programme d'élution détaillé dans le tableau 14.

A. Type de chromatogrammes obtenus avec une colonne R-P 8 (peu hydrophile).

B. Type de chromatogrammes obtenus avec une colonne R-P 18 (plus hydrophile).

C. Type de chromatogrammes obtenus avec gradient d'élution en utilisant la colonne R-P 18 et les solvants A1 et B (Tableau 14).

D. Type de chromatogrammes obtenus avec gradient d'élution en utilisant la colonne R-P 18 et les solvants A6 et B (Tableau 14).

C'est le solvant A6 qui sera combiné avec le solvant B selon le programme détaillé dans le tableau 14 pour la séparation des alcaloïdes extraits à partir des calcs et des vitroplants.

Tableau 14. Programme de gradients d'élution retenu pour la séparation des alcaloïdes totaux de *L. inundata*. Solvant A1 : eau (1670 mL), acétonitrile (330 mL), triéthylamine (400 µL), H₃PO₄ (2 mL). Solvant A6 : eau (1740), acétonitrile (260 mL), triéthylamine (400 µL), H₃PO₄ (1 mL). Solvant B : méthanol / eau / acétonitrile (1/1/1, v/v).

	Durée du programme d'élution (min)						
	0	25	30	35	45	55	65
% solvant A1 ou A6	100	100	70	50	0	0	100
% solvant B	0	0	30	50	100	100	0

2. Séparation par CCM

Comme lors de la mise en évidence par CCM des alcaloïdes de *L. inundata*, c'est le solvant constitué par méthanol / eau / ammoniac 27 % (90/7/3, v/v) qui a permis d'avoir une bonne migration et une meilleure séparation des alcaloïdes. Ces résultats ont été obtenus notamment avec les plaques en verre à couche de silice (Whatman®). Au total, 8 substances ont pu être obtenues et analysées par CLHP en phase inverse. Après analyse, chacune de ces substances semble être constituée par un seul alcaloïde avec 1, 2 ou 3 pics d'absorption maximale.

V. ANALYSES PRÉLIMINAIRES PAR RMN DE DEUX ALCALOÏDES

Le maximum d'absorption et le R_f du premier alcaloïde sont respectivement de 271 nm et de 0.82, alors qu'ils sont respectivement de 200.4 nm et de 0.2. pour le second.

L'analyse des spectres de ces deux alcaloïdes nous a amené à penser que seul l'alcaloïde ayant un maximum d'absorption de 271 nm était relativement pur pour pouvoir dégager un premier renseignement. Il s'agirait d'une petite molécule aromatique. Cette information reste très partielle et devrait être complétée par d'autres analyses par RMN et par Spectrométrie de Masse. Ce qui suppose de nouvelles extractions, purifications et séparations d'alcaloïdes à partir des calcs et des vitroplants.

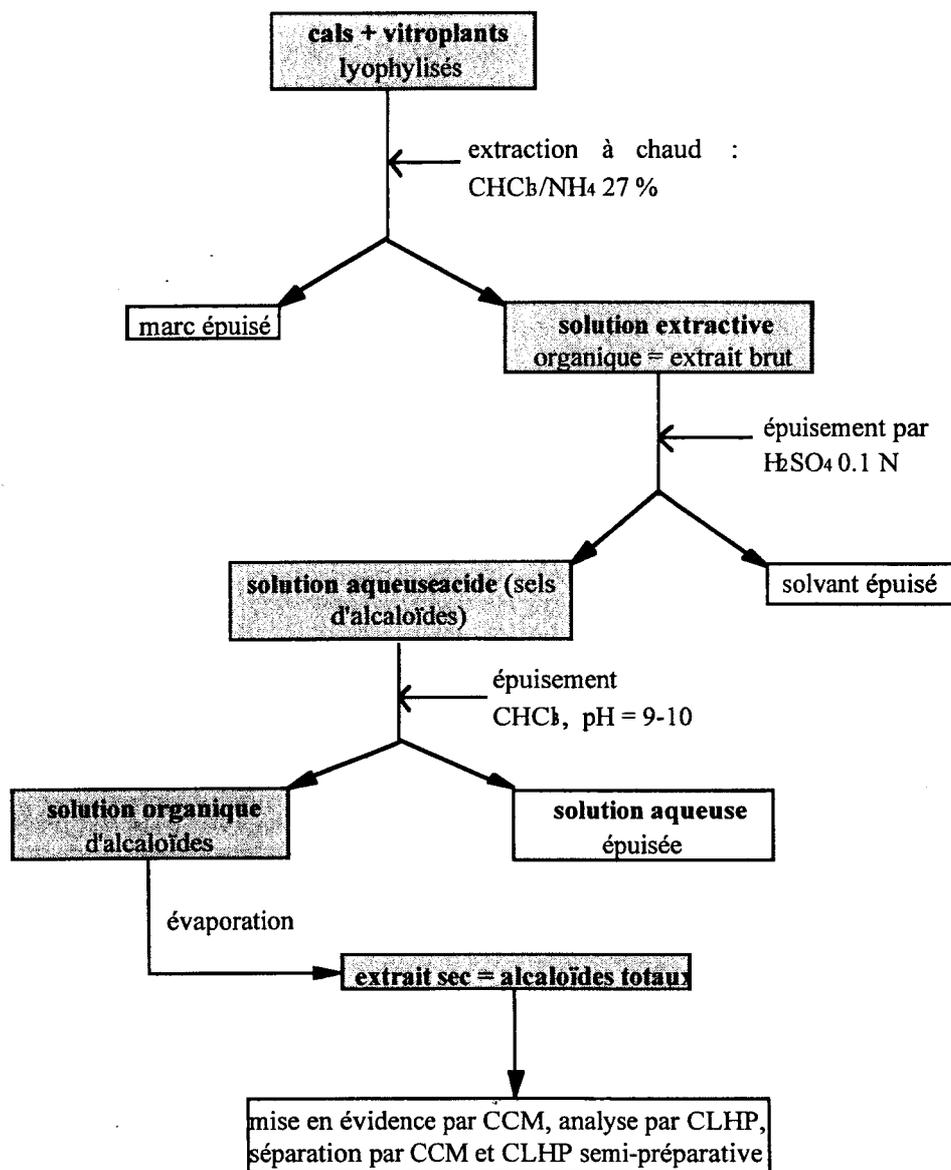


Fig. 23. Diagramme résumant les principales étapes de l'extraction à la séparation des alcaloïdes à partir des cals et des vitroplants de *L. inundata*.

VI. CONCLUSION

Cette analyse phytochimique préliminaire a permis de mettre en évidence la présence de plusieurs alcaloïdes à la fois dans les cals et dans les vitroplants. L'extraction et la purification ainsi que la séparation de ces substances ont pu être partiellement optimisées (Fig. 23). Une comparaison préliminaire entre *L. inundata* d'origine *in vivo* et *in vitro*, a montré qu'une partie des alcaloïdes relevée chez la plante à l'état naturel, est également présente chez les explants cultivés *in vitro*. D'où, l'intérêt de réaliser de nouvelles expériences qui permettraient de déterminer de façon précise la formule chimique de chacun des alcaloïdes mis en évidence dans les cals et dans les vitroplants.

L'huperzine A rencontré sur le marché est toujours extrait à partir de Lycopodes récoltés dans la nature ce qui accélère leur régression. La culture *in vitro* de *L. inundata* pourrait substituer les plantes naturelles pour l'obtention de cet alcaloïde. Cela, non seulement permet une production en masse des explants durant toute l'année, mais permet également d'épargner les populations sauvages de *L. inundata* ainsi que les autres Lycopodes des récoltes massives.

**CHAPITRE IV : DISCUSSION, CONCLUSION
ET PERSPECTIVES**

DISCUSSION

Ce travail constitue une somme de résultats novateurs et originaux chez les Lycopodiales, puisque c'est la première fois qu'une multiplication *in vitro* est réalisée chez ce groupe de plantes à partir d'explants végétatifs. De ce fait, peu de références sont disponibles pour permettre une comparaison et une discussion approfondie de nos résultats. Les quelques travaux disponibles dans ce domaine datent du XIX^{ème} ou du début du XX^{ème} siècle et sont strictement descriptifs. Le statut de plante protégée à l'échelle nationale dont bénéficie *L. inundata*, a par ailleurs fortement limité le matériel végétal susceptible d'être utilisé pour nos expérimentations. Enfin, cette plante a un rythme de croissance très lent à la fois *in vivo* et *in vitro*. Chacune des quatre phases de la multiplication *in vitro* dure en moyenne 13 semaines.

L'objectif principal de ce travail est de compléter et d'optimiser le programme de recherche initié en 1995 sur la mise au point d'un protocole de multiplication *in vitro* chez *L. inundata* dans le but de sauvegarder l'unique pied présent dans la réserve nationale dans les landes de Versigny en Picardie (Atmane, 1995). Malheureusement, ce dernier a disparu avant que notre protocole ne soit complètement maîtrisé. Malgré cet incident, nous avons continué à développer ce programme de recherche en utilisant comme explants primaires des plantes de *L. inundata* récoltées dans la sablière du lièvre à Saint-Amand et dans la lande tourbeuse à Villepail en Mayenne. Pour approfondir les connaissances scientifiques et faire valoir l'intérêt économique de *L. inundata*, nous avons tout d'abord complété et optimisé chacune des phases de la multiplication *in vitro* de cette espèce. Puis, nous avons cherché à montrer l'origine des formations initiées à partir des apex des plantes *in vivo* et des cals issus de la culture *in vitro* par des analyses cytologiques. Enfin, nous avons initié une méthodologie d'analyse des alcaloïdes présents dans les cals et les vitroplants de *L. inundata*.

1. Phase préparatoire à l'induction de bourgeons et à la callogenèse

En combinant plusieurs agents désinfectants, nous avons pu obtenir plus de 61 % d'apex végétatifs aseptiques et capables d'engendrer un bourgeonnement ou une callogenèse et plus de 40 % de portions de tiges aseptiques. Vu la nature des explants employés, ces pourcentages constituent des taux très importants. En effet, les apex végétatifs et les portions de tiges utilisés pour la multiplication *in vitro* de *L. inundata* sont issus des tiges horizontales enfouies dans un sol régulièrement inondé et relativement riche en matière organique. De ce fait, ils sont constamment en contact avec une multitude de bactéries et de champignons ce qui rend leur aseptisation très difficile. En appliquant d'autres méthodes d'aseptisation à des

rhizomes de Fougères, Higuchi et Amaki (1989) n'ont obtenu que 23.3 % d'explants aseptiques. Ainsi, notre protocole d'aseptisation pourrait désormais être employé pour désinfecter des explants récupérés à partir de plantes vivants en symbiose ou en mycorhize avec des micro-organismes.

Seuls les apex ont permis d'établir un protocole de multiplication *in vitro* chez *L. inundata*. Par contre, les portions de tiges aseptiques n'ont montré aucune réponse morphogénétique dans les conditions de culture appliquées aux apex. C'est pourquoi, nous parlerons uniquement des apex dans la suite de ce travail.

Pour établir ce protocole de multiplication *in vitro* à partir des apex, de nombreux milieux de culture ont été testés et plusieurs phases ont dû être mis en place pour obtenir des plantules acclimatées (Fig. 18). En effet, de nombreuses phases ont été nécessaires pour l'obtention de plantules par bourgeonnement direct : phase d'induction de 11 semaines, phase de bourgeonnement, phase de croissance des bourgeons, phase de développement des plantules et enfin, phase d'acclimatation. Par contre, 6 phases ont été nécessaires pour l'obtention de plantules par embryogenèse somatique indirecte à partir des cals : phase d'induction de 13 semaines, phase de callogenèse, phase d'embryogenèse somatique indirecte, phase de croissance des plantules obtenues à partir des embryons, phase de développement des plantules et enfin, phase d'acclimatation.

L'initiation du bourgeonnement axillaire ou de la callogenèse à partir des apex dépend de plusieurs paramètres. En effet, parmi les nombreux milieux de culture testés, seul celui qui est relativement pauvre en sels minéraux et ne contenant que 50 mg L⁻¹ de myo-inositol (milieu MI) a permis d'induire une réaction chez ces explants. Ceci est probablement lié au milieu naturel oligotrophe de la plante. Par ailleurs, cette induction dépend également de la nature et de la concentration en cytokinines. En effet, en présence de BAP à différentes concentrations, la majorité des apex se sont nécrosés quelques jours après leur mise en culture. La kinétine seule présente dans le milieu MI à une faible concentration, 0.3 mg L⁻¹, a permis d'initier un bourgeonnement ou une callogenèse à partir des apex. Cette même constatation a été faite chez *Thuja occidentalis* L. chez lequel le méristème embryonnaire s'est nécrosé en présence de BAP (Nour *et al.*, 1993).

L'orientation de la réponse morphogénétique des apex vers un bourgeonnement ou une callogenèse a été conditionnée par la durée de culture sur le milieu MI pendant la phase d'induction. En effet, quand ils sont cultivés pendant 11 semaines sur le milieu MI, les apex ont tendance à développer des bourgeons. Par contre, quand la durée de culture est plus longue, les apex ont tendance à développer un cal. Le même phénomène a été observé chez *Picea abies*, chez lequel des aiguilles cultivées pendant moins de 6 semaines sur un milieu de base contenant une cytokinine développent des bourgeons ; par contre, au delà de cette durée,

ces aiguilles développent un cal (Von Arnold et Eriksson, 1979). L'influence de la durée de culture pendant la phase d'induction a été également vérifiée chez plusieurs variétés de tabac (Attfield et Evans, 1991). Ces auteurs parlent de l'acquisition d'une détermination par les explants. D'après eux, pour engendrer un bourgeonnement, les feuilles du tabac nécessitent un temps de contact précis, soit 6 jours, en présence de cytokinine. Au cours de cette durée de culture, les feuilles sont déterminées pour engendrer une morphogénèse en absence de l'hormone qui l'a conditionnée. Ainsi, après cette durée de 6 jours de culture, les feuilles de tabac peuvent développer des bourgeons quand elles sont repiquées sur un milieu de bourgeonnement dépourvu de cytokinine (Attfield et Evans, 1991).

Nous pouvons utiliser cette même analyse pour expliquer la détermination des apex de *L. inundata* au bourgeonnement ou à la callogenèse. En effet, après 11 semaines de culture en présence de la kinétine dans le milieu d'induction, les apex sont déterminés au bourgeonnement qui se manifeste après un repiquage sur le milieu de "bourgeonnement" (MB) dépourvu de kinétine. Pour ce cas précis, 11 semaines représentent la durée maximale pour l'acquisition de la détermination au bourgeonnement par les apex de *L. inundata*. Il est peut être possible de réduire le temps de cette phase d'induction, mais des expérimentations supplémentaires seront alors nécessaires. Il s'agirait alors de cultiver les apex de *L. inundata* sur le milieu MI, puis, de les transférer après des durées de culture allant de 0 à 11 semaines sur le milieu MB.

Au delà de 11 semaines de culture sur le milieu MI, les apex initient un processus de callogenèse. Cette callogenèse nécessite de faibles concentrations en AIB (0.01 mg L^{-1}) et en kinétine (0.3 mg L^{-1}). Ce résultat semble être différent de ceux obtenus chez plusieurs Gymnospermes et Angiospermes chez lesquels la production de cals nécessite des auxines dites "fortes" comme par exemple le 2,4-D (Verdeil *et al.*, 1992 ; van der Valk *et al.*, 1995 ; Dimps Rao *et al.*, 1996). Une combinaison 2,4-D plus kinétine (1 mg L^{-1}) est nécessaire pour la callogenèse chez une Gymnosperme primitive *Encephalartos cycadifolius* (Jäger et van Staden, 1996). Ceci, pourrait être expliqué chez *L. inundata* par la présence d'un gradient endogène de phytohormones dont le maximum se localiserait au niveau des apex qui en serait le lieu de synthèse.

L'établissement d'un cal bien individualisé à partir d'un apex nécessite 3 cycles de culture de 13 semaines chacun sur le même milieu. Une fois obtenu, ce cal peut être subdivisé et repiqué toutes les 13 semaines sur le milieu MI. Ce cal très compact et fortement chlorophyllien est constitué par des nodules liés les uns aux autres. Sa morphologie et sa texture sont comparables à ce qui a été décrit chez la chicorée (Dubois *et al.*, 1988 ; Piéron *et al.*, 1993). Selon la nomenclature employée par ces auteurs, le cal obtenu dans notre travail sera nommé **cal-nodulaire**. L'obtention de cal-nodulaire est très fréquent chez les Fougères *Asplenium nidus* (Higuchi et Amaki, 1989), *Matteuccia struthiopteris* (Thakur *et al.*, 1998), *Nephrolepis cordifolia* (Sulklyan et Mehra, 1977).

Le cal que nous avons obtenu chez *L. inundata* prend naissance à partir du méristème apical et des méristèmes axillaires situés sur la partie dorsale des apex (partie qui ne développe pas de racines) (Fig. 10). Cette polarité est liée au plagiotropisme naturel rencontré chez cette espèce. Les coupes cytologiques effectuées sur les apex en phase d'induction confirment cette polarité, avec une partie dorsale et une ventrale. La première est constituée par des cellules montrant des caractères spécifiques à savoir, une paroi mince, un noyau volumineux en position centrale doté d'un nucléole très dense (le noyau est particulièrement volumineux en phase S. Ceci pourrait être la conséquence du niveau de ploïdie (tetraploïde) chez *L. inundata* et du nombre élevé de chromosomes, $2n = 156$), et surtout une richesse en grains d'amidon. Ainsi, la partie dorsale constituerait le vrai méristème des apex végétatifs et assurerait l'élongation horizontale des tiges rampantes, la formation des feuilles et l'édification des rameaux latéraux et des tiges sporangifères. La seconde partie, ventrale, quant à elle, est constituée par de cellules pauvres en réserves amylacées et ne montrant pas d'activité mitotique. De par son contact permanent avec le sol, cette partie ventrale jouerait un rôle dans l'assimilation de différents composants puisque cette plante ne possède pas de véritables racines mais des prolongements caulinaires (Emberger, 1968).

Une fois établi, le cal-nodulaire est constitué dans sa totalité par des nodules très fortement liés les uns aux autres. Chacun de ces nodules est constitué par des cellules de type méristématique (Schwendiman *et al.*, 1990 ; Michaux-Ferrière *et al.*, 1992) mais très riches en amidon. La richesse en amidon est souvent considéré comme une caractéristique des cellules embryogènes (Schwendiman *et al.*, 1990 ; Michaux-Ferrière *et al.*, 1992). C'est pourquoi, nous qualifions les nodules chez *L. inundata* de **nodules embryogènes**. A l'instar des calcs obtenus à partir des feuilles chez *Medicago sativa* L. (Dos Santos *et al.*, 1983), chez *Quercus suber* (El Maâtaoui *et al.*, 1990) et chez *Hevea brasiliensis* (Michaux-Ferrière *et al.*, 1992) où on pouvait distinguer une zone avec des cellules méristématiques et une autre constituée de cellules type parenchymeuses, tout le cal chez *L. inundata* est constitué par des cellules de type méristématique.

Les divisions de ces cellules méristématiques sont accompagnées par une variation dans la quantité d'amidon. En effet, avant l'entrée en mitose, chaque cellule accumule une quantité importante d'amidon, jusqu'à 40 amyloplastés. Une fois que la mitose est déclenchée, chaque cellule commence à dégrader ses réserves amylacées jusqu'à ne contenir que 8 à 12 grains d'amidon à la fin de la mitose. Ce cycle de synthèse et de dégradation de l'amidon se renouvelle pendant chaque cycle cellulaire au cours duquel les amyloplastés restent disposés autour du noyau. Les divisions cellulaires sont à la fois anticlinales et périclinales mais elles sont toujours symétriques. Les réserves chez l'ensemble des cellules constituant le cal-nodulaire semblent être exclusivement de type amylacé.

2. Phase de bourgeonnement

La formation de bourgeons à partir des apex a nécessité un changement de milieu avec réduction importante de la concentration en macro-éléments et une absence totale de cytokinines par rapport au milieu d'induction.

En effet, après une phase inductive sur le milieu MI qui est relativement riche en sels minéraux et qui contient de la kinétine, la morphogenèse n'a été possible qu'après repiquage des apex sur un milieu pauvre en sels minéraux et dépourvu de kinétine, le milieu MB. Tous les bourgeons obtenus sont semblables aux apex primaires. En utilisant un milieu relativement riche en sels minéraux, Atmane *et al.* (1996b) ont obtenu chez la même espèce trois fois moins de bourgeons à partir des apex. Ces bourgeons présentaient des dissemblances morphologiques avec les explants d'origine puisqu'ils étaient plus foncés et leurs feuilles étaient plus longues.

Pour aboutir à une composition minérale optimale du milieu MB, nous avons essayé de nous rapprocher de l'habitat naturel de *L. imundata*. Cet habitat est très pauvre en nitrates et en calcium, par contre, il est relativement riche en phosphate (Brunerye, 1971 ; Waughman et Bellamy, 1980 ; Prelli, 1990). C'est cette constatation qui nous a permis d'établir notre milieu MB.

Les phytohormones sont également déterminantes pour la régénération de plantules à partir des apex. En effet, la kinétine s'est avérée être indispensable pour initier la morphogenèse durant la phase d'induction ; mais, la régénération n'a été observée que lorsqu'elle a été retirée du milieu de culture. Cette même nécessité a été remarquée pour la régénération de plantules à partir des cal-nodulaires chez deux Fougères, *Asplenium nidus* L. (Higuchi et Amaki, 1989) et *Nephrolepis cordifolia* Prsel. (Higuchi *et al.*, 1987). Par contre, chez *Thuja occidentalis* L. (Nour *et al.*, 1993) et chez *Paulownia* sp. (Dimps Rao *et al.*, 1996) la présence d'une cytokinine combinée à une auxine était indispensable pour mettre en place une organogenèse à partir d'apex, de feuilles ou de cal.

Les bourgeons obtenus *via* les apex prennent naissance à partir des méristèmes axillaires présents à l'aisselle des feuilles entourant le méristème apical et ce sans callogenèse préalable (Atmane *et al.*, 1999a). Les cellules de ces méristèmes possèdent les mêmes caractéristiques que les cellules méristématiques chez les plantes supérieures (El Maâtaoui *et al.*, 1990 ; Blervacq *et al.*, 1995 ; Decout, 1998) : cellules de petite taille, vacuome divisé en de nombreuses vacuoles, noyau central et volumineux doté d'un nucléole très dense, présence de réserves protéiques.

Plusieurs bourgeons peuvent être obtenus à partir d'un même méristème axillaire chez *L. imundata* (Atmane *et al.*, 1999a); alors que chez *Thuja occidentalis* L., chaque méristème axillaire n'a développé qu'un seul bourgeon axillaire (Nour *et al.*, 1993). Ce phénomène chez *L. imundata* est-il induit par les conditions de culture *in vitro* ? ou, est-il lié au phénomène de

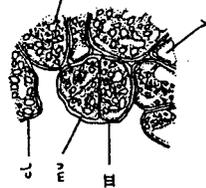
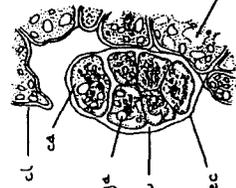
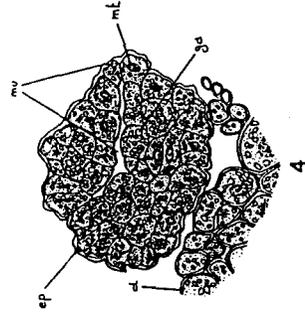
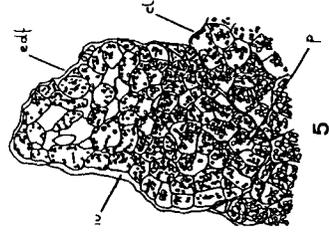
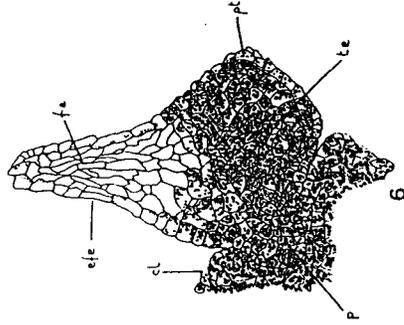
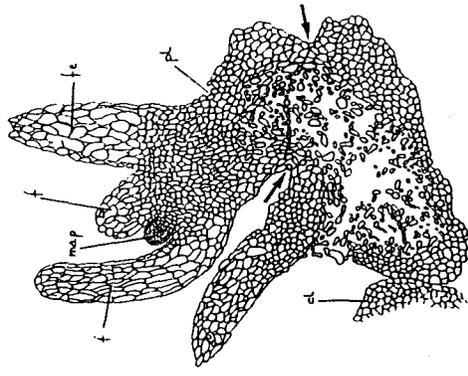
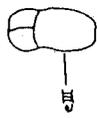
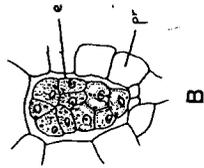
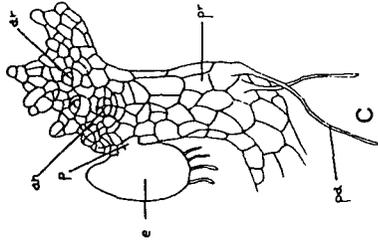
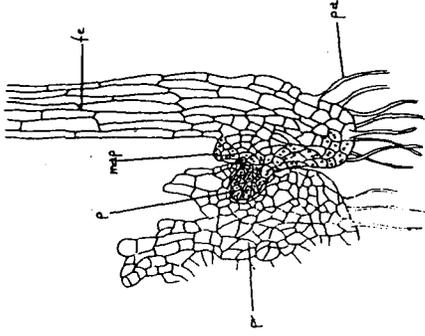
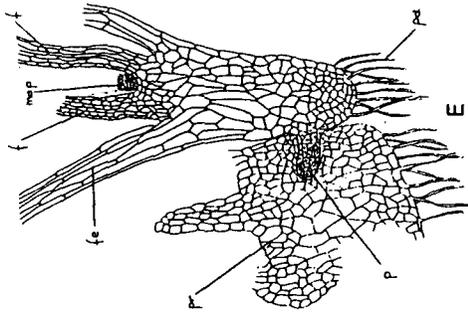
dichotomisation qui est un mécanisme naturel chez les Lycopodes ? Les bourgeons ainsi obtenus sont d'origine axillaire et leur obtention ne nécessite pas le passage par un cal. Ceci nous laisse supposer que les plantules obtenues via cette morphogenèse sont conformes aux plantes d'origine. Pour établir cette conformité, des analyses moléculaires pourraient être réalisées.

3. Embryogenèse somatique indirecte

Comme pour le bourgeonnement axillaire, la morphogenèse via le cal n'a été possible qu'après transfert de ce dernier sur le milieu MB.

Cette morphogenèse via le cal-nodulaire chez *L. imundata* prend son origine à partir de cellules particulières. Ces cellules sont situées préférentiellement sur la périphérie de la partie du cal qui n'est pas en contact avec le milieu de culture. A l'opposé des cellules qui sont à l'origine des bourgeons axillaires décrites ci-dessus, ces cellules possèdent une paroi pectocellulosique relativement épaisse et doublée vers l'extérieur par une couche de mucilage polysaccharidique coloré en rouge par le P. A. S., un noyau central doté d'un nucléole très dense, parfois quelques grains d'amidon, beaucoup de réserves protéiques cytoplasmiques et un vacuome divisé en de nombreuses petites vacuoles. Ces mêmes critères ont été décrits chez des cellules embryogènes à partir de calcs ou d'explants végétatifs chez plusieurs Angiospermes (Schwendiman *et al.*, 1990 ; Dornelas *et al.*, 1992 ; Michaux-Ferrière et Schwendiman, 1992 ; Blervacq *et al.*, 1995 ; Loiseau *et al.*, 1998). Ces similitudes, nous permettent de penser que les cellules situées sur la périphérie du cal de *L. imundata* sont bien des cellules embryogènes. Comme chez *L. imundata*, la localisation des cellules embryogènes sur la périphérie du cal a été décrite chez plusieurs espèces végétales (Schwendiman *et al.*, 1990 ; Michaux-Ferrière et Schwendiman, 1992).

Nous avons observé les premières divisions cellulaires après une dizaine de jours de culture du cal sur le milieu MB. La première division de ces cellules embryogènes est plus ou moins asymétrique (Fig. 15 B). Cette asymétrie a été également observée à la suite de la première division de l'embryon zygotique de *Huperzia selago* (Bruchmann, 1910) avec la mise en place d'une cellule basale et d'une cellule sommitale. C'est dans cette dernière qu'auront lieu les divisions suivantes. La première division de cette cellule se fait selon un plan de 45° à 90° par rapport au plan de la première division de la cellule embryogène (Figs. 15 A, 24). Il en résulte une structure légèrement arrondie au stade 3 cellules. La structure ainsi obtenue, pourrait être comparée à ce qui a été décrit lors de l'embryogenèse zygotique chez *Huperzia selago* (Bruchmann, 1910). Les divisions ultérieures s'effectueront selon le plan anticlinal pour aboutir à une structure pluricellulaire qui prend la forme d'un petit cylindre (Fig. 24). Une structure analogue a été décrite au cours de l'embryogenèse



7

6

5

4

3

2

1

zygotique chez *Lycopodium cernuum* L. (Treub, 1884). A partir de ce stade, les divisions cellulaires deviennent plus importantes, et la structure embryonnaire prend une forme pyramidale. Ultérieurement, la structure embryonnaire devient plus bombée à la base et légèrement effilée au sommet (Fig. 24 et annexe 5). A partir de ce moment, trois types de cellules peuvent être distingués :

- des cellules de petite taille légèrement allongées, dotées d'une à trois vacuoles et contenant une dizaine de grains d'amidon. Elles constituent une couche unicellulaire autour de la partie bombée. Cette couche de cellules constitue le protoderme ;
- des cellules de grande taille, très riches en amidon et dotées d'un noyau en position centrale avec parfois un nucléole bien évident ;
- des cellules plus grandes et plus ou moins allongées avec une grande vacuole, très peu de grains d'amidon et un noyau pariétal. Ces cellules sont situées dans la partie supérieure, légèrement effilée.

Une structure morphologiquement comparable à ce que nous avons obtenu a été observée au cours de l'embryogenèse zygotique chez *L. inundata* (Goebel, 1887). Malheureusement, cet auteur n'a effectué aucune description cytologique de cet embryon. A un stade plus avancé, la partie basale devient encore plus bombée et présente un prolongement latéral qui s'imbrique dans le cal pour y fixer la structure embryonnaire (Figs. 15 E, 24 et annexe 5). La partie supérieure devient de plus en plus allongée. Elle est constituée au centre par des cellules ayant une grande vacuole et ne contenant aucun grain d'amidon, et sur la périphérie, par des cellules allongées avec une grande vacuole et quelques grains d'amidon qui

Fig. 24. Analyse comparée de l'embryogenèse somatique de *Lycopodiella inundata* et l'embryogenèse zygotique chez trois Lycopodes : *Huperzia selago*, *Lycopodiella inundata* et *Lycopodium cernuum*.

A. Embryon zygotique de *Huperzia selago* au stade 3 cellules (**eIII**), d'après Bruchmann (1910).

B. Embryon zygotique de *Lycopodium cernuum* : coupe légèrement axiale d'un embryon (**e**) encore enveloppé dans les cellules du prothalle (G.= diam x 300), d'après Treub (1884).

C. Embryon zygotique de *Lycopodiella inundata* : embryon (**e**) à un stade plus avancé mais toujours attaché au prothalle qui commence à rétrécir (G. x 15.4), d'après Goebel (1887).

D et E. Embryon zygotique de *Lycopodium cernuum* : **D**, embryon au stade feuille embryonnaire encore attaché au prothalle grâce au pied (**p**). Un méristème apical (**m ap**) se forme à la base de la feuille embryonnaire (**f e**) ; **E**, embryon au stade "plantule", d'après Treub (1884).

1-6. Embryon somatique de *Lycopodiella inundata* : **1**, stade 2 cellules (**eII**) ; **2**, stade 3 cellules (**eIII**) ; **3**, stade cylindre (**e c**) ; **4**, stade pyramidal (**e pd**) ; **5**, stade début feuille (**e d f**) ; **6**, stade feuille embryonnaire (**e f e**).

7. Plantule (**pl**) de *Lycopodiella inundata*. Dessins réalisés par Atmane-Bruschetti F.

an, anthéridie ; **ar**, archégone ; **c a**, cellule apicale ; **cl**, cal ; **g a**, grains d'amidon ; **mi**, mitose ; **mu**, mucilage ; **p a**, poils absorbants ; **pr**, prothalle ; **pt**, prothoderme ; **te**, tubercule embryonnaire ; **v**, vacuole.

sont tous alignés sur la face interne des cellules. Une structure très comparable à ce que nous avons obtenu a été observée au cours de l'embryogenèse zygotique chez *L. cernuum* (Treub, 1884).

Dans sa description morphologique de l'embryon zygotique, Treub avait qualifié la partie basale bombée de **tubercule embryonnaire**, le prolongement latéral de **ped** et la partie effilée de **feuille embryonnaire**. Ce même auteur a remarqué que le tubercule embryonnaire et le ped sont constitués par des cellules riches en amidon. Il a attribué au premier le rôle de stockage des réserves de l'embryon, et au second, la fonction de fixation de l'embryon zygotique sur le prothalle. En nous basant sur la nomenclature employée par Treub et sur ses explications, nous appellerons également la partie basale bombée de nos structures **tubercule embryonnaire**, la partie latérale **ped** et la partie effilée **feuille embryonnaire**. Comme chez l'embryon zygotique, le tubercule embryonnaire que nous avons observé est constitué par des cellules très riches en amidon. Nous pensons donc qu'il constitue le lieu de stockage des réserves dans les structures que nous avons obtenu.

Le passage au stade plantule se manifeste par l'instauration à la base de la feuille embryonnaire d'un **méristème apical** constitué par des cellules de petite taille dépourvues de grains d'amidon, mais, très riches en protéines. A ce stade, les plantules n'ont développé ni trachéides ni racines. Ce n'est qu'au stade 2 à 3 cycles de feuilles que ces dernières commenceront à développer des trachéides et des racines. Les mêmes observations ont été faites au cours de l'embryogenèse zygotique chez *L. cernuum* par Treub (1884) et chez *L. inundata* par Goebel (1887).

Durant toute la morphogenèse à partir du cal, du stade unicellulaire au stade plantule, aucune connexion vasculaire n'a été observée entre le cal et les structures régénérées. Compte-tenu de cette dernière considération et sur les similitudes relevées entre les embryons zygotiques des différents Lycopodes et nos structures organisées obtenues chez *L. inundata*, nous pouvons considérer cette morphogenèse comme étant une **embryogenèse somatique indirecte** d'origine unicellulaire. Ainsi, les structures organisées seront désormais appelées **embryons somatiques**.

Ce résultat est original puisqu'un tel phénomène n'a jamais été décrit auparavant chez une Lycopodiale.

En nous basant sur l'analogie constatée entre les quelques descriptions de l'embryogenèse zygotique réalisées chez *L. cernuum* par Treub (1884), chez *L. inundata* par Goebel (1887) et enfin, chez *H. selago* par Bruchmann (1910) d'une part, et les structures que nous avons obtenues à partir du cal-nodulaire chez *L. inundata* d'autre part, nous pouvons diviser ce phénomène d'embryogenèse somatique chronologiquement en un certain nombre de stades :

- **stade unicellulaire** : l'embryon est constitué par une seule cellule embryogène ;
- **stade cylindrique** : l'embryon est constitué par plusieurs cellules et présente la forme d'un cylindre (nomination employée par Treub en 1884) ;
- **stade pyramidal** : l'embryon est au stade plusieurs cellules avec une base légèrement bombée ;
- **stade préfeuille** : l'embryon est bombé à la base et commence à devenir effilé dans son sommet ;
- **stade feuille embryonnaire** : l'embryon est bien effilé, il possède dans sa partie basale un tubercule embryonnaire et un pied, et dans sa partie supérieure sa première feuille dite embryonnaire. L'ensemble est délimité vers l'extérieur par une couche unicellulaire que nous appelons protoderme.

L'embryogenèse somatique que nous avons décrite à partir de cals issus de la culture *in vitro* d'apex de *L. inundata* présente de nombreuses similitudes avec les séquences morphologiques de l'embryogenèse zygotique chez cette même espèce : passage par le stade début feuille, présence du pied et du tubercule embryonnaire, formation tardive des trachéides et des racines (Goebel, 1887).

Par ailleurs, cette embryogenèse somatique montre des caractères sensiblement différents de ceux représentant l'embranchement des Spermaphytes. Chez ces derniers, la première division embryogène possède un plan très variable dans les différents systèmes embryogènes. Chez les Gymnospermes primitives comme *Encephalartos cycadifolius* (Jacq.) Lehm. (Jäger et van Staden, 1996), *E. dyerianus* Lavr. et Goode et *E. natalensis* Dyer et Verd. (Jäger et van Staden, 1996) et *Ceratozamia mexicana* var. *robusta* (Miq.) Dyer (Chavez *et al.*, 1995), les embryons somatiques sont issus d'une division asymétrique conduisant à la formation d'un pseudo-suspenseur et d'une masse embryonnaire. Des cas de polyembryonie sont fréquents ce qui n'est pas chez *L. inundata*. Par contre, ces systèmes possèdent en commun le temps extrêmement long nécessaire à la réalisation du processus complet (généralement de 12 - 18 mois). Chez les Magnoliopsides, les divisions embryonnaires suivantes conduisent à l'obtention d'un embryon globulaire (stade commun avec l'embryogenèse zygotique). On observe, dès lors, la présence d'un protoderme protégeant l'embryon. Chez *L. inundata*, on passe d'abord par un stade cylindrique sans différenciation histogène ; l'embryon cylindrique poursuit son développement et devient par la suite pyramidal. Au stade première feuille

embryonnaire, l'embryon acquiert un protoderme et présente une bipolarité structurale marquée par la présence de trois types cellulaires :

- des cellules de petite taille légèrement allongées constituant le protoderme ;
- des cellules de grande taille très riches en amidon constituant le tubercule embryonnaire ;
- enfin, des cellules plus grandes plus ou moins allongées et très vacuolisées constituant la feuille embryonnaire.

Par ailleurs, cette bipolarité est caractérisée par une répartition particulière des réserves amyliques au niveau du tubercule embryonnaire. Ce stade pourrait être comparé au stade cordiforme des embryons somatiques chez les Magnoliopsides. Ces derniers montrent aussi une bipolarité sous-tendue par la présence d'un méristème caulinaire, d'un méristème racinaire et d'un procambium. Par conséquent, de tels embryons cordiformes possèdent des ébauches de feuilles, de racines et de faisceaux vasculaires. Par contre, chez *L. inundata*, ces ébauches n'apparaîtront qu'ultérieurement au stade plantule avec, tout d'abord, la mise en place du méristème apical au stade 1 cycle de feuille, puis des faisceaux cribro-vasculaires au stade 2-3 cycles de feuilles.

A l'opposé des algues, des mousses ou la plupart des Ptéridophytes, où les méristèmes apicaux (points végétatifs) comprennent une cellule apicale plus grande que le reste des cellules constituant le point végétatif (Michaux-Ferrière et Hallet, 1985) ; le méristème apical des plantules de *L. inundata* obtenues *in vitro* semble d'une part, ne pas contenir cette cellule apicale, et d'autre part, semble plus proche des méristèmes primaires des plantes supérieures (Robert et Catesson, 1990).

Mis à part ces descriptions morphologiques et cytologiques des embryons somatiques chez *L. inundata*, aucune autre information d'ordre physiologique ou moléculaire n'est connue chez les Lycopodiales. Grâce à notre protocole de multiplication *in vitro*, nous pouvons envisager la réalisation d'études de ce type ainsi que des comparaisons, notamment des phases précoces, entre l'embryogenèse somatique de *L. inundata* et celle d'autres plantes notamment supérieures. Ceci pourrait nous informer sur les mécanismes communs éventuels qui permettent à certaines cellules somatiques, appartenant à deux embranchements différents, d'acquérir des compétences embryogènes. Par ailleurs, l'établissement *in vitro* de l'embryogenèse somatique chez un représentant des Lycopodiales nous permettra de comprendre les différentes étapes de l'embryogenèse zygotique chez ce groupe de plantes. Ceci est d'une grande importance sur le plan fondamental, car malgré le fait d'être classée parmi les plantes les plus ancestrales, il n'existe actuellement que très peu de données sur la reproduction sexuée de ces plantes.

4. Croissance, développement et acclimations des plantules issues de l'*in vitro*

Les plantules obtenues via le bourgeonnement axillaire ou l'embryogenèse somatique sont, dans les deux cas, morphologiquement similaires aux apex primaires. Pour avoir des plants prêts à être acclimatés, il a fallu tout d'abord réaliser une étape de croissance, puis une étape de développement, ce qui nous a permis d'obtenir des plantules ayant les mêmes caractéristiques que celles observées sur les *L. inundata* à l'âge adulte dans la nature. Nous avons réalisé les deux étapes successives de croissance et développement pour avoir des plants présentant plusieurs tiges végétatives et plusieurs racines et ce, afin de favoriser au maximum l'étape d'acclimation. Lors de l'étape de développement, le charbon activé s'est montré indispensable pour donner une bonne croissance des plantules. Cette même constatation a été faite lors de la multiplication *in vitro* de *Pinus pinea* L. (González *et al.*, 1998) et *Matteuccia struthiopteris* (L.) Todaro (Thakur *et al.*, 1998). Chez *L. inundata*, les racines ne sont pas des organes complètement différenciés, mais, elles sont considérées comme des simples prolongements des tiges végétatives, qui se sont spécialisés dans l'assimilation de l'eau et des sels minéraux à partir du sol (Emberger, 1968). Cette caractéristique nous a posé beaucoup de problèmes lors la phase de développement, car, en absence du charbon activé, les plantules ont montré une bonne croissance des tiges végétatives mais très peu de racines se sont formées. Par contre, en présence d'une quantité importante de charbon activé, les tiges végétatives se sont très peu développées alors que le nombre de racines était très élevé (jusqu'à 25) et leur taille anormalement grande (jusqu'à 30 mm). Il a donc fallu déterminer une concentration de charbon activé (0.5 g L^{-1}) permettant à la fois une croissance normale des tiges végétatives, et la production de racines en nombre suffisant, mais aussi un développement ultérieur satisfaisant.

Les plantules ainsi obtenues montrent exactement les mêmes caractères morphologiques que les plants de *L. inundata* rencontrés dans la nature, à savoir des tiges végétatives munies de plusieurs ramifications dichotomiques et de plusieurs racines. Cette conformité morphologique est très importante pour un programme conservatoire visant à sauvegarder une plante sauvage, en l'occurrence *L. inundata*, menacée de disparition dans le nord de la France.

Pour réintroduire les plantes dans leur habitat, la phase d'acclimation est souvent primordiale. Ceci reste d'autant plus vrai lorsque les plantes sont mycorhizées ou lorsqu'elles vivent en symbiose avec des micro-organismes. L'acclimation de plants de *L. inundata* obtenus *in vitro* n'a été possible qu'en utilisant le charbon activé ou le substrat naturel non autoclavé comme source de nutriments organiques. Dans ces conditions, les plants acclimatés ont développé de nouvelles tiges végétatives après deux hivers successifs passés dans une

serre. Par ailleurs, pour la première fois, chaque plant a développé une tige sporangifère dont le développement est sans doute lié à la présence de micro-organismes dans le substrat provenant du site naturel. La formation de ces tiges sporangifères n'a en fait été possible qu'en plaçant des plants issus de l'*in vitro*, pendant 3 semaines, dans un site contenant encore une population de *L. inundata*, ou après acclimatation *ex situ* des plants sur du substrat naturel non autoclavé. Nos analyses sur les racines de *L. inundata* venant de trois stations différentes, nous ont permis de noter la présence de quatre espèces de Cyanobactéries : *Lyngbia* sp., *Oscillatoria* sp., *Nostoc* sp. (ordre des Hormogonales) et *Microcystis* sp. (ordre des Chroococcales) susceptibles d'avoir un rôle dans la réapparition et le maintien de cette plante dans la nature.

Sur un site nouvellement étrepé, *Lyngbia* constituerait le premier dépôt de matière organique nécessaire à l'installation de cette espèce. Ceci a été remarqué après l'étrepage réalisé dans une nouvelle parcelle de la sablière du Lièvre à Saint-Amand dans le Nord en 1996 (Atmane *et al.*, 1999b). En effet, parmi les premiers micro-organismes qui se sont installés sur la zone étrepée, nous avons noté *Lyngbia* qui formait un tapis brunâtre sur toute cette zone. Cette couche brunâtre était constituée de longs filaments constituant cette Cyanobactérie. La couche brunâtre nous laisse penser qu'il s'agirait de l'espèce *ochracea*. Car cette dernière imprègne sa paroi d'oxyde de fer hydraté qui lui donne une forte couleur brune (Abbeyes *et al.*, 1978).

Microcystis, assurerait le maintien d'une humidité permanente autour des racines de la plante grâce à son aspect gélatineux et ses cellules très riches en eau.

Enfin, *Nostoc* sp. jouerait un rôle dans la fixation de l'azote atmosphérique, car cette dernière contient des hétérocystes.

Ces Cyanobactéries pourraient constituer une symbiose particulière en se fixant sur la face externe des racines.

Enfin, *Oscillatoria* sp., qui serait hétérotrophe et donc saprophytique, n'interviendrait vraisemblablement pas dans la survie de *L. inundata*.

La reconnaissance entre les plantes hôtes et les bactéries est spécifique, puisque chaque plante excrète dans le rhizosphère des molécules particulières pour attirer les bactéries symbiotiques (Stachel *et al.*, 1985). Ce rôle est généralement assuré par des cellules spécifiques bordant la coiffe des racines (Hawes et Pueppke, 1986).

A part notre constatation sur le rôle des micro-organismes dans l'acclimatation des plants issus de l'*in vitro* et la mise en évidence de la présence des quatre Cyanobactéries autour des racines de *L. inundata* dans la nature, aucun autre travail, à notre connaissance, n'a été réalisé pour démontrer une éventuelle symbiose entre une ou plusieurs bactéries et cette espèce. Ceci suggère qu'il faudrait approfondir plusieurs points :

- préciser les partenaires de cette association ;

- déterminer les apports de chacun des partenaires dans cette relation (antibiotique, carbone, eau, azote) ;

- comprendre les bases cytologiques de cette relation : y a-t-il une implication de cellules racinaires spécialisées comme chez les végétaux supérieurs ? y a-t-il des cellules spécifiques bordant la coiffe des racines ? Cette lignée cellulaire est largement étudiée pour son impact dans la rhizosphère et dans la régulation du partenariat plante-symbionte (Hawes, 1991 ; Hawes *et al.*, 1998). Ainsi, de telles cellules peuvent attirer très rapidement par chimiotactisme des organismes et en favoriser le développement. Par ailleurs, elles peuvent excréter des substances qui vont éloigner et inhiber la croissance d'autres micro-organismes considérés nuisibles. Une telle spécificité peut constituer un mécanisme de contrôle dans la dynamique de la population microbienne adjacente à la racine. Des gènes impliqués dans cette relation sont en cours d'étude (Hawes, 1991 ; Hawes *et al.*, 1998).

La disparition de *L. inundata* dans certains sites pourrait être due à une disparition d'une ou de toutes ces Cyanobactéries de ces sites. Ainsi, pour le succès de toute opération de réintroduction ou de renforcement de population de cette espèce, une réponse précise au type d'association existant entre *L. inundata* et ces Cyanobactéries est indispensable. Dans le cas où cette association serait vérifiée, deux stratégies conservatoires pourraient être adoptées. La première, qui répondrait à une urgence, consisterait à multiplier *in vitro* ces micro-organismes puis à les réintroduire dans le site naturel dans lequel une réintroduction ou un renforcement de ce Lycopode serait envisagé. La seconde, qui correspondrait à une étude plus approfondie, consisterait à renfoncer nos connaissances sur les modalités de la symbiose *in vitro*. Dans de nombreux cas de production *in vitro* de ligneux (*Pinus sylvestris*- Niemi *et al.*, 1998; *Castanea sativa*- Martins *et al.*, 1996; *Populus deltoides*- Reddy et Satyanarayana, 1998), un effort particulier est porté à la mise en présence avec le symbionte. En l'occurrence, ce type de travaux concernant la phase d'acclimatation se porte principalement sur la mycorhization *in vitro*. La Lycopodielle préfère établir une symbiose avec des Cyanobactéries tout comme les *Cycas* (Gymnosperme primitive), et les *Azolla* (Hydroptéridophytes). Par contre, l'emploi et l'étude de Cyanobactéries dans le cadre de la symbiose *in vitro* n'ont pas été rapportées, à notre connaissance, dans la littérature.



5. Importance de la culture *in vitro* dans la sauvegarde des plantes sauvages menacées de disparition

Le seul pied qui constituait la population de *L. inundata* dans la Réserve Naturelle de Versigny (Aisne, Picardie) a disparu en 1995. C'est pour sa sauvegarde que ce programme de multiplication *in vitro* a été mis en place et notamment après les échecs de toutes les tentatives de propagation par culture classique et par régénération à partir des spores qui seraient présentes dans le site naturel. Malheureusement, ce seul pied a disparu avant que notre protocole de multiplication *in vitro* ne soit complètement maîtrisé. Quoiqu'il en soit, la finalité d'un tel programme serait la réintroduction dans un site, de pieds issus de l'*in vitro*. Cet objectif doit pourtant faire l'objet d'une réflexion approfondie.

Pour certains, à cause de problèmes écologiques et de génétique des populations, la réintroduction d'un clone donc d'un seul type de patrimoine génétique dans une population naturelle a pour effet négatif de limiter toute évolution car aucun brassage génétique ne pourra s'effectuer, dans la mesure où il y aura peu de diversité génétique entre les individus de cette population. Certains pensent donc qu'il ne faudrait pas protéger un seul individu dans un site, de façon à ne pas engendrer une population clonale. Toutefois chez *L. inundata*, on observe la mise en place d'épi sporangifère chez les plants issus d'*in vitro*. On peut donc penser qu'une diversité génétique est envisageable à partir du stade prothalle et après fécondation.

Ce raisonnement doit aussi prendre en compte les modes de vie de la plante à l'état naturel. En effet, *L. inundata* se propage essentiellement par voie végétative assurée par les apex végétatifs qui résistent au froid pendant l'hiver, et développent des nouvelles tiges végétatives au début de chaque printemps. Par conséquent, ce mode de multiplication conduit à la formation de "clone" naturel. En outre, quand la propagation s'effectue par voie sexuée, chaque plante provient d'un embryon issu de l'union de deux gamètes du même prothalle. Nous sommes très proches de l'autogamie utilisée par les plantes supérieures. Par conséquent, la propagation par voie sexuée chez *L. inundata* conduit elle aussi à la production d'individus très semblables. Ainsi, en utilisant l'un ou l'autre moyen de propagation naturelle, une population *L. inundata* est principalement constituée d'individus qui ne présenteraient finalement que peu de polymorphisme (diversité minimale).

Par ailleurs, une multiplication *in vitro* par voie végétative a déjà été effectuée pour sauvegarder des plantes sauvages menacées de disparition, notamment en Espagne. Il s'agit de *Centaurea pau*i Loscos ex Willk. (Cuenca *et al.*, 1999) et *Gentiana lutea* L. subsp. *aurantiaca* Lainz (Feijoo et Iglesias, 1998). On peut noter que ces plantes supérieures, elles, ne présentent pas à priori de préférence naturelle pour la multiplication végétative. Pourtant, les protocoles d'*in vitro* sont proposés pour palier leur disparition.

6. Analyse quantitative des alcaloïdes présents dans les cals et les plants cultivés *in vitro* chez *L. inundata*

Plusieurs alcaloïdes ont pu être extraits à partir des Lycopodes (Ayer *et al.*, 1989 ; Ayer, 1991 ; Shen *et al.*, 1994). Jusque là, tous ces Lycopodes ont été récoltés dans la nature.

Récemment, des chercheurs chinois ont pu déterminer la composition chimique de deux alcaloïdes, il s'agit de l'huperzine A et B isolés à partir d'un Lycopode chinois, *Huperzia serrata* (Thunb.) Trev. (Liu *et al.*, 1986). Le premier composé a été ensuite extrait à partir de *Lycopodium selago* L. (Ayer *et al.*, 1989). Grâce à son activité anticholinestérasique très importante, l'huperzine A est actuellement testée pour le traitement de plusieurs maladies liées à la perte de la mémoire (Bruneton, 1993). Elle a également eu des incidences favorables sur des sujets souffrant de la maladie d'Alzheimer (Xu *et al.*, 1995 ; Tang, 1996). Enfin, cet alcaloïde peut agir contre les gaz toxiques, tel que le gaz Soman, en inhibant leur action au niveau du système nerveux humain (Lallement *et al.*, 1997).

Tous ces intérêts, à la fois médicinal, pharmaceutique et écologique nous ont amené à vérifier si nos explants obtenus *in vitro* contenaient des alcaloïdes, et si ces alcaloïdes présentaient une parenté chimique avec l'huperzine A. D'où l'originalité de notre travail, car c'est la première fois qu'une tentative d'extraction d'alcaloïdes à partir d'explants cultivés *in vitro* est entreprise chez une Lycopodiale. Cette considération rendait notre démarche scientifique relativement délicate dans la mesure où très peu de données bibliographiques sont disponibles dans ce domaine précis. Ainsi, dans nos expérimentations, nous avons tout d'abord utilisé des procédés déjà employés pour certains groupes d'alcaloïdes, notamment les alcaloïdes tropaniques (Fliniaux, 1991 ; Fliniaux *et al.*, 1993) ; puis, nous avons optimisé et mis au point des procédés adaptés à notre matériel végétal.

Comme pour la plupart des alcaloïdes (Fliniaux, 1991 ; Bruneton, 1993), le procédé d'extraction par un solvant organique en milieu basique a permis d'obtenir plusieurs alcaloïdes à partir des cals et des vitroplants de *L. inundata*. Néanmoins, faute d'avoir des molécules témoins correspondantes, l'efficacité de ce protocole n'a pu être quantifiée, ni comparée avec d'autres protocoles.

Généralement, les alcaloïdes extraits à partir des explants végétatifs demeurent mélangés à d'autres composés également présents dans ces explants (tels que la chlorophylle dans notre cas). Ainsi, l'opération la plus importante, consiste tout d'abord à séparer ces alcaloïdes de tous les autres composés, pour enrichir au maximum la fraction "alcaloïdes". Cette dernière phase est habituellement appelée purification. Parmi les 3 procédés de purification que nous avons testé, c'est l'un d'entre eux (P3) dans lequel nos extraits bruts ont

été repris 6 fois par l'acide sulfurique 0.1 N, qui nous a permis de récupérer le plus d'alcaloïdes. A l'inverse de nos résultats, Fliniaux (1991) a montré lors de ses essais pour optimiser la purification des alcaloïdes tropaniques à partir des feuilles de *Datura stramonium* L. et d'*Atropa belladonna* L. que la récupération des extraits bruts directement avec la phase mobile CLHP permettait d'obtenir davantage d'alcaloïdes. Ceci peut être expliqué par la différence du degré de polarité entre les alcaloïdes tropaniques et les alcaloïdes présents dans nos explants.

Grâce à la coloration spécifique en rouge-orangé des alcaloïdes par le réactif de Dragendorff, nous avons pu mettre en évidence, en utilisant la chromatographie sur couche mince, la présence d'au moins huit alcaloïdes différents à la fois dans les cals et dans les vitroplants.

Les analyses du mélange "alcaloïdes totaux" par CLHP en phase inverse ont confirmé la présence d'alcaloïdes à la fois dans les cals et dans les vitroplants. La séparation de ces produits s'est avérée être très liée à la richesse de la phase mobile en solvant organique, l'acétonitrile. En effet, avec, des concentrations faibles, 0 à 7.5 %, ou relativement élevées, 11.5 à 21.5 %, presque la totalité des produits a été éluée au bout des trois premières minutes. Par contre, une concentration intermédiaire d'acétonitrile (10 %) a permis une meilleure séparation des alcaloïdes. Lors de nos analyses, aucune différence qualitative en alcaloïdes n'a été remarquée entre les cals cultivés sur milieu solide ou liquide et les vitroplants. Néanmoins, à ce stade d'analyse, aucune comparaison quantitative sur la richesse en alcaloïdes de ces explants n'a pu être réalisée.

Comme lors des analyses des alcaloïdes totaux par CLHP en phase inverse, la séparation de ces produits par CLHP semi-préparative semble dépendre à la fois des phases mobiles et stationnaires. Seule l'utilisation d'une phase stationnaire plus hydrophile, type colonne Lichrosorb R-P 18, a permis de bien séparer les différents constituants de l'extrait. Par ailleurs, la teneur de la phase mobile en solvant organique s'est avérée primordiale pour une meilleure séparation des produits. En effet, comme lors des analyses, la séparation des alcaloïdes par CLHP semi-préparative était plus efficace en utilisant 13 % d'acétonitrile. Ces conditions de séparation sont très proches de celles employées par Fliniaux (1991). Par contre, elles sont complètement différentes de celles employées par Planck et Wagner (1986) qui, eux utilisaient une phase mobile contenant 40 % de solvant organique.

Contrairement à Ayer *et al.* (1989) qui ont purifié les alcaloïdes de *Huperzia selago* par CCM préparative en employant un éluant composé de chloroforme / méthanol (50/50, v/v), nos alcaloïdes n'ont montré aucune sensibilité en présence de ce solvant. Par contre, en employant le solvant constitué par méthanol / eau / ammoniacque 27 % (90/7/3, v/v), huit spots

d'alcaloïdes ont pu être révélés avec le réactif de Dragendorff, tous bien isolés les uns des autres. Ce dernier point est primordial pour toute opération visant une identification ultérieure des molécules séparées.

L'objectif souhaité après la séparation par l'une ou l'autre méthode, est l'identification de chaque molécule isolée. Cette identification est généralement réalisée par Résonance Magnétique Nucléaire (RMN), par Spectrométrie de Masse (SM) ou par les deux à la fois. L'identification d'une nouvelle molécule par RMN nécessite au minimum une quantité pure de 10 mg de cette molécule, ce qui correspond à plus de 3000 g de matière fraîche de *L. inundata*. Vu la petite taille des plants à l'âge adulte et la vitesse de croissance de cette espèce, une pareille quantité en matière fraîche n'a pu être réunie durant la période de ce travail. Néanmoins, un essai d'identification par RMN de deux molécules isolées à partir des cals et des vitroplants a été effectué. Cet essai d'identification, nous a révélé que l'une des deux substances n'était pas pure, par contre, la seconde qui était plus ou moins pure, constituerait une molécule aromatique dont l'identification exacte nécessite la réalisation d'autres spectres RMN et des analyses par Spectrométrie de Masse.

La comparaison des chromatogrammes CLHP a révélé que les cals et les vitroplants de *L. inundata* semblent contenir les quatre alcaloïdes que cette espèce contenait à l'état naturel. Faute de quantité suffisante en plantes récoltées dans la nature, cette comparaison n'a pu être confirmée. De plus, les cals et les vitroplants chez *L. inundata* contiennent au moins quatre alcaloïdes supplémentaires. Cela signifie que le passage par la culture *in vitro* n'a pas fait disparaître la synthèse de ces métabolites secondaires ; mais, au contraire a généré une synthèse de nouveaux alcaloïdes. Cette synthèse semble être parfaitement stable, puisque l'ensemble de ces produits a été détecté à la fois dans les cals après plusieurs repiquages successifs et dans les vitroplants obtenus soit à partir des cals soit directement à partir des apex. Ces données sont d'une grande importance pour une production accrue de ces alcaloïdes. Néanmoins, pour une application exclusivement pharmaceutique, ce sont les cals qui présentent les meilleurs avantages puisque l'obtention de vitroplants nécessite non seulement quatre fois plus de temps que les cals, mais aussi 3 repiquages successifs sur 3 milieux différents. Par ailleurs, la masse de cal obtenue peut être augmenté en cultivant ces derniers sur un milieu liquide.

Un modèle d'embryogenèse somatique procure la possibilité d'effectuer des études sur les processus régulant les modalités de la différenciation chez les plantes, mais aussi conduit à la production génétiquement homogène de matériel végétal (Niemi *et al.*, 1998). Le modèle d'embryogenèse somatique indirecte qui vient d'être présenté ici chez *L. inundata* est d'autant plus intéressant qu'il laisse entrevoir la possibilité d'étudier la production quantitative et qualitative des alcaloïdes au cours de ce phénomène très particulier. De telles études ont été entreprises chez deux génotypes de *Papaver somniferum* dans le cadre de la recherche

d'alcaloïdes morphiniques. Ainsi, sans phénomène de différenciation, aucun alcaloïde morphinique n'est détecté. Par contre, lorsque l'embryogenèse ou la rhizogenèse est initiée, une synthèse d'alcaloïde est observée (Laurain-Mattar *et al.*, 1999). De telles remarques ont aussi été faites lors de la comparaison de l'induction de cal, de l'embryogenèse somatique ou du phénomène de différenciation chez *Narcissus confusus* (Selles *et al.*, 1999). Ils ont souligné la différence qualitative des alcaloïdes entre le cal embryogène ayant des embryoïdes globulaires et le cal constitué de cellules de type méristématique. De plus, il semble que les embryons accumulent de tels métabolites secondaires dès le stade globulaire. Enfin, le taux d'alcaloïdes est sensiblement égal entre les bourgeons initiés et les embryons. Ces résultats laissent suggérer que la régulation des gènes spécifiques liés à la biosynthèse de ces alcaloïdes pourraient être sous le contrôle de programme de développement (Laurain-Mattar *et al.*, 1999; Selles *et al.*, 1999). A la différence de ces auteurs, nous ne pouvons pas juger l'aspect quantitatif des alcaloïdes présents dans les différents matériels testés chez *L. inundata* (plantes sauvages, plantes issues *d'in vitro*, cal en phase de propagation). Par contre, nous avons montré qu'il y avait un nombre identique d'alcaloïdes présents dans les cals constitués des cellules considérées comme méristématiques et dans les plantules issues *d'in vitro*, mais ce nombre est moindre dans les plantes sauvages.

Par ailleurs, il a été montré que des alcaloïdes différents se trouvaient dans les embryons somatiques de *Papaver* d'une part, et les cultures tissulaires issues d'hypocotyle, de racines ou de cotylédons d'autre part (Laurain-Mattar *et al.*, 1999). Ce type d'analyse pourrait nous apporter de nombreuses informations chez la Lycopodielle puisque nous possédons un matériel où une organogenèse, une callogenèse et une embryogenèse peuvent être initiées.

En conclusion, ce travail de recherche a permis de mettre en évidence la présence de plusieurs alcaloïdes à la fois dans les cals et dans les vitroplants de *Lycopodiella inundata*. Il a également permis de faire le point sur des procédés de purification, d'analyse et de séparation de ces alcaloïdes. Ces résultats préliminaires sont d'un grand intérêt à la fois conservatoire et économique. En effet, la production de ces alcaloïdes par culture *in vitro* stopperait la récolte sauvage dans la nature de ces plantes hautement menacées de disparition à la fois en France et dans le reste de l'Europe. Ceci permettrait, d'une part de préserver ces plantes dans la nature, et d'autre part de fournir à l'industrie pharmaceutique les alcaloïdes dont elle a besoin.

CONCLUSION GÉNÉRALE ET PERSPECTIVES

Ce travail a permis d'obtenir des plants *in vitro* via un bourgeonnement direct à partir des apex de *L. inundata*. Ce mode de multiplication permet d'avoir des plantes conformes à celles d'origine. Malheureusement, la disparition de l'unique pied de *L. inundata* de la réserve nationale de Versigny au cours du développement de notre programme de recherche, ne nous a pas permis de mettre en application le protocole de multiplication *in vitro*. Néanmoins, ce protocole sera très utile pour répondre immédiatement à toute situation identique se produisant par ailleurs. A ce propos, des essais sur *Lycopodium annotinum* et sur *Huperzia selago* ont donné des résultats intéressants, notamment en ce qui concerne la rapidité de la réponse à la mise en culture.

Par ailleurs, ce travail nous a permis d'établir pour la première fois une embryogenèse somatique indirecte à partir des cals de cette espèce. Ceci constitue une première chez les Lycopodiales pour lesquelles très peu d'informations sont connues notamment en ce qui concerne l'embryogenèse zygotique. Ce manque d'informations pourrait être comblé par une étude détaillée de l'embryogenèse somatique *in vitro*. En plus, une comparaison de marqueurs morphologiques et moléculaires pourra être effectuée entre l'embryogenèse chez les Lycopodes d'une part, et les Gymnospermes et les Angiospermes d'autre part. De telles comparaisons permettraient de compléter les données concernant le phénomène de l'embryogenèse somatique chez les végétaux.

Enfin, la présence d'alcaloïdes dans les cals et dans les plants obtenus *in vitro* chez *L. inundata* pourra non seulement répondre à l'attente de développement industriel potentiel mais aussi épargner ces plantes de la destruction massive qu'elles subissent à cause de leur propriétés médicinales. Pour répondre à ces objectifs, il faudrait partir des processus d'extraction et de purification qui ont été mis au point dans ce travail ; puis, optimiser la méthode de séparation des fractions contenues dans les alcaloïdes totaux des cals et des vitroplants. L'identification de molécules identiques ou proches à l'huperzine A devrait nous laisser envisager la réalisation de tests pharmacologiques pour le traitement des maladies liées à la perte de la mémoire. De tels tests, nécessiterait une voire plusieurs collaborations avec des équipes de recherches travaillant sur ces thématiques.

BIBLIOGRAPHIE

- Abbayes H. (des), Chadefaud M., Feldmann J., Ferré Y. (de), Gaussen H., Grassé P.P. et Prévot A.R. 1978.** Précis de Botanique. Végétaux inférieurs. Tome I. 2^{ème} édition. Paris : Masson, pp. 67-93.
- Allorge P. et Gaume R. 1931.** Esquisse phytogéographique de la Sologne. *Bulletin de la Société Botanique de France* **72**: 5-59.
- Antopol W.M.D. 1931.** *Lycopodium granuloma*. Its clinical and pathologic significance, together with a note on granuloma produced by talc. *Archives of Pathology* **16** : 326-331.
- Ashani Y., Peggins J.O. et Doctor B.P. 1992.** Mechanism of inhibition of cholinesterases by huperzine A. *Biochemical and Biophysical Research Communication* **30** : 719-726.
- Ashani Y., Grunwald J., Kronman C., Velan B. et Shafferman A. 1994.** Role of tyrosine 337 in the binding of huperzine A to the active site of human acetylcholinesterase. *Molecular Pharmacology* **45** : 555-560.
- Atmane N. 1995.** La biotechnologie au service de la sauvegarde des espèces végétales sauvages en voie de disparition : la culture *in vitro* du Lycopode inondé [*Lycopodiella inundata* (L.) Holub]. Mémoire de D.E.A., Université de Compiègne. pp. 1-54.
- Atmane N., Boulet V., Dubois J. et Vasseur J. 1996a.** La biotechnologie au service de la sauvegarde des espèces végétales sauvages en voie de disparition : la culture *in vitro* du Lycopode inondé [*Lycopodiella inundata* (L.) Holub]. 13^{ème} Forum des Jeunes Chercheurs de la Société Française de Biochimie et Biologie Moléculaire. Poitiers (2-5 juillet). p. 94.
- Atmane N., Destiné B. et Boulet V. 1996b.** *In vitro* micropropagation of *Lycopodiella inundata* (L.) Holub [LYCOPODIALES]. *Mededeling Faculteit Landbouwkundige en Toegepaste Biologische Wetenschappen*. Tenth Forum for Biotechnology (Gent, 26-27 september). **61** : 1469-1472.
- Atmane N., Blervacq A.S., Boulet V. et Vasseur J. 1998.** Importance de la culture *in vitro* dans la sauvegarde des plantes sauvages menacées de disparition : cas de la Lycopodielle inondée [*Lycopodiella inundata* (L.) Holub, LYCOPODIALES]. 5^{ème} Forum des Jeunes Chercheurs de la Société Française de Physiologie Végétale. Montpellier (15-17 juillet). p. 139.

- Atmane N., Blervacq A.-S., Boulet V. et Vasseur J. 1999a.** Direct shoot regeneration from vegetative apices of an endangered and medicinal Marsh clubmoss [*Lycopodiella inundata* (L.) Holub]. *Plant Cell Reports* (soumise). pp. 1-15.
- Atmane N., Choynet G., Hendoux F., Szwab A., Boulet V. et Géhu J.M. 1999b.** Plan de conservation spécifique de *Lycopodiella inundata* (L.) Holub. Étude pour la Région Nord/Pas-de-Calais. Centre Régional de Phytosociologie / Conservatoire Botanique National de Bailleul.
- Attfeld E.M. et Evans P.K. 1991.** Stages in the initiation of root and shoot organogenesis in cultured leaf explants of *Nicotiana tabacum* cv. *xanthi* nc. *Journal of Experimental Botany* **42** : 59-63.
- Ayer W.A., Browne L.M., Orszanska H., Valenta Z. et Liu J.-S. 1989.** Alkaloids of *Lycopodium selago*. On the identity of selagine with huperzine A and the structure of a related alkaloid. *Canadian Journal of Chemistry* **67** : 1538-1540.
- Ayer W.A. 1991.** The *Lycopodium* alkaloids. *Nature Products Reports* **8** : 455-463.
- Barrows F.L. 1935.** Propagation of *Lycopodium*. II. Endophytic fungus in gametophyte and sporophyte. *Contribution from Boyce Thompson Institute* **7** : 295-309.
- Bary A. (de). 1858.** Sur la germination des Lycopodes. *Annales de Sciences Naturelles*, série botanique **9** : 30-36.
- Berkefeld K. 1993.** Eine nachweismöglichkeit für kondombenutzung bei sexualdelikten. *Archiv für Kriminologien* **192** : 37-41.
- Blervacq A.-S., Dubois J., Hilbert J.-L. et Vasseur J. 1995.** Effects of caffeine on somatic embryogenesis induction and expression in leaves of a *Cichorium* hybrid. *Plant of Physiology and Biochemistry* **33** : 741-749.
- Bold H.C., Alexopoulos C.J. et Delevoryas T. 1987.** Morphology of plants and fungi. 5^{ème} édition. New York : Harper & Row, Publishers.
- Bonnet A.L.M. 1972-73.** Sur la multiplication végétative et l'organogenèse de *Huperzia selago* (L.) Bernh. *Naturalia Monspeliensia*, série botanique, Fasc. 23-24 : 113-142.

- Bournérias M., Géhu J.M. et Wattez R. 1983.** Landes tourbeuses et milieux voisins. Manuscrit original. pp. 37-42.
- Bruchmann H. 1910.** Die keimung der sporen und die entwicklung der prothallien von *Lycopodium clavatum* L., *L. annotinum* L. und *L. selago* L. *Flora* **101** : 220-267.
- Brunerye L. 1971.** Note écologique sur *Lycopodium inundatum* en Corrèze et remarques sur la croissance de plantes de tourbières. *Cahiers des Naturalistes, Bulletin des Naturalistes Parisiens* **27** : 1-11.
- Bruneton J. 1993.** Pharmacognosie, phytochimie et plantes médicinales. 2^{ème} édition. Paris : Tec & Doc.
- Chavez V.M., Litz R.E. et Marquez J. 1995.** Histology of somatic embryogenesis of the cycad *Ceratozamia mexicana* var. *robusta* (Miq.) Dyer. *Plant Sciences* **108** : 191-200.
- Choi Y.E., Yang D.C., Kim H.S. et Choi K.T. 1997.** Distribution and changes of reserve materials in cotyledon cells of *Panax ginseng* related to direct somatic embryogenesis and germination. *Plant Cell Reports* **16** : 841-846.
- Cuenca S., Amo-Marco J.B. et Parra R. 1999.** Micropropagation from inflorescence stems of the Spanish endemic plant *Centaurea paui* Loscos ex Willk. (Compositae). *Plant Cell Reports* **18** : 674-679.
- Decout E. 1998.** Recherche de marqueurs cytologiques et biochimiques de la différenciation embryogène et caulogène dans des feuilles d'une chicorée hybride. Thèse de doctorat. Université de Reims-Champagne-Ardenne. Reims. pp. 133.
- Dimps Rao C., Goh C.-J. et Kumar P.P. 1996.** High frequency adventitious shoot regeneration from excised leaves of *Paulownia* spp. cultured *in vitro*. *Plant Cell Reports* **16** : 204-209.
- Dodeman V.L., Ducreux G. et Kreis M. 1997.** Zygotic embryogenesis versus somatic embryogenesis. *Journal of Experimental Botany* **48** : 1493-1509.
- Dornelas M.C., Vieira M.L.C. et Appezzato-Da-Gloria B. 1992.** Histological analysis of organogenesis and somatic embryogenesis induced in immature tissues of *Stylosanthes scabra*. *Annals of Botany* **70** : 477-482.

- Dos Santos A.V.P., Cutter E.G. et Davey M.R. 1983.** Origin and development of somatic embryos in *Medicago sativa* L. (alfalfa). *Protoplasma* **17** : 107-115.
- Dubois J., Droujininski A. et Vasseur J. 1988.** Croissance et potentialités organogènes de suspensions cellulaires de *Cichorium intybus* L. var *witloof*. *Bulletin de la Société de Botanique de France, Lettres Botaniques* **135** : 311-322.
- Durin M.L. et Lericq R. 1963.** La lande à *Erica* de la forêt de Saint Amand les Eaux. *Bulletin de la Société Botanique de Nord de la France* **16** : 47-51.
- El Maâtaoui M., Espagnac H., Jaber B. et Alonso-Lopez A. 1998.** Regulation of *in vitro* callogenesis and organogenesis from *Albizia* root explants by carbohydrate source modifications. *Journal of Plant Physiology* **152** : 494-501.
- Emberger L. 1968.** Les plantes fossiles dans leurs rapports avec les végétaux vivants. 2^{ème} édition. Paris : Masson & Cie, pp. 162-384.
- Etienne H., Lartaud M., Carron M.P. et Michaux-Ferrière N. 1997.** Use of calcium to optimize long-term proliferation of friable embryogenic calluses and plant regeneration in *Hevea brasiliensis* (Müll.) Arg.. *Journal of Experimental Botany* **48** : 129-137.
- Feijoo M.C. et Iglesias I. 1998.** Multiplication of an endangered plant : *Gentiana lutea* L. subsp. *aurantiaca* Lainz, using *in vitro* culture. *Plant Tissue Culture and Biotechnology* **4** : 87-94.
- Fliniaux M.-A. 1991.** Optimisation des conditions d'analyse immunoenzymatique et chromatographique des alcaloïdes tropaniques et nicotiniques, ainsi que de certains polyphénols. Application à l'étude des conditions de production de ces métabolites par du matériel végétal issu de culture *in vitro* de Solanacées. Thèse de doctorat d'état. Université de Picardie, Faculté de Pharmacie. Amiens. pp. 142.
- Fliniaux M.-A., Manceau F. et Jacquin-Dubreuil A. 1993.** Simultaneous analysis of *l*-hyoscyamine, *l*-scopolamine and *dl*-tropic acid in plant material by reversed-phase high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography* **644** : 193-197.
- Flinn B.S., Webb D.T. et Newcomb W. 1988.** The role of cell clusters and promeristemoids in determination and competence for caulogenesis by *Pinus strobus* cotyledons *in vitro*. *Canadian Journal of Botany* **66** : 1556-1565.

- Freeberg J.A. et Wetmore R.H. 1957.** Gametophytes of *Lycopodium* as grown *in vitro*. *Phytomorphology* 7: 204-217.
- Fridborg G., Pedresen M., Landstrom L. et Eriksson T. 1978.** The effect of activated charcoal on tissue culture : absorption of metabolites inhibiting morphogenesis. *Physiologica Plantarum* 43 : 104-106.
- Garnier G., Bézanger-Beauquesne L. et Debraux G. 1961.** Ressources médicinales de la flore française. Tome 2. Paris : Vigot Frères. pp. 82-89.
- Gaume R. 1937.** Le *Lycopodium inundatum* L. [Lycopodiacees] à Arbonne (S.-et-M.). *Bulletin de l'Association des Naturalistes de la Vallée du Loing* 20 : 198-199.
- Géhu J.-M. 1958.** Notes pour la flore du Boulonnais et observations écologiques. *Bulletin de la Société Botanique du Nord de la France* 11 : 31-37.
- Géhu J.-M. 1964.** A propos d'une nouvelle station de *Lycopodium clavatum* dans le nord. *Buletin de la Société Botanique du Nord de la France* 17 : 87-89.
- Goebel K. 1887.** Ueber prothallien und keimpflanzen von *Lycopodium inundatum*. *Botanische Zeitung.* 45 : 161-168 et 177-192.
- González M.V., Rey M., Tavazza R., La Malfa S., Cuzzo L. et Ancora G. 1998.** *In vitro* adventitious shoot formation on cotyledons of *Pinus pinea*. *Horticultrae Scientia* 33 : 749-750.
- Grunwald J., Raveh L., Doctor B.P. et Ashani Y. 1994.** Huperzine A as a pretreatment candidate drug against nerve agent toxicity. *Life Sciences* 54 : 991-997.
- Hawes M.C. et Pueppke S.G. 1986.** Sloughed peripheral root cap cells : yield from different species and callus formation from single cells. *American Journal of Botany* 73 : 1466-1473.
- Hawes M.C. 1991.** Living plant cells released from the root cap : a regulator of microbial populations in the rhizosphere ? In : The rhizosphere and plant growth. Eds. D.L. Keister and P.B. Cregan. Dordrecht : Kluwer, pp. 51-59.

- Hawes M.C., Brigham L.A., Wen F., Woo H.H. et Zhu Y. 1998.** Function of root border cells in plant health : pioneers in the rhizosphere. *Annual Reviews of Phytopathology* **36** : 311-327.
- Higuchi H., Amaki W. et Suzuki S. 1987.** *In vitro* propagation of *Nephrolepis cordifolia* Prsel. *Scientia Horticulturae* **32** : 105-113.
- Higuchi H. et Amaki W. 1989.** Effects of 6-benzylaminopurine on the organogenesis of *Asplenium nidus* L. through *in vitro* propagation. *Scientia Horticulturae* **37** : 351-359.
- Jäger A.K. et van Staden J. 1996.** Somatic embryogenesis in *Encephalartos cycadifolius*. *Plant Cell Reports* **15** : 437-440.
- Jäger A.K. et van Staden J. 1996.** Somatic embryogenesis and organogenesis in *Encephalartos dyericanus* and *E. natalensis*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* **45** : 99-102.
- Lallement G., Veyret J., Masqueliez C., Aubriot S., Burckhart M.F. et Baubichon D. 1997.** Efficacy of huperzine in preventing soman-induced seizures, neuropathological changes and lethality. *Fundamental Clinical and Pharmacology* **11** : 387-394.
- Lambinon J., Langhe J.E. (De), Delvosalle L. et Duvigneaud J. 1993.** Nouvelle Flore de la Belgique, du Grand-Duché de Luxembourg, du Nord de la France et des Régions voisines (Ptéridophytes et Spermaphytes). 4^{ème} édition. Meise (Belgique) : Patrimoine, Jardin botanique national de Belgique.
- Lang W.H. 1899.** The prothallus of *Lycopodium clavatum* L. *Annals of Botany* **13** : 279-317.
- Langeron M. 1949.** Précis de Microscopie. Paris : Masson.
- Lathoud L.A. 1932.** Etude de la matière médicale homéopathique. Tome 2. Vienne : Martin et Ternet.
- Laurain-Mattar D., Gillet-Manceau F., Buchon L., Nabha S., Fliniaux M.-A. et Jacquin-Dubreuil A. 1999.** Somatic embryogenesis and rhizogenesis of tissue cultures of two genotypes of *Papaver somniferum* : relationships to alkaloid production. *Planta Medica* **65**: 167-170.

- Liu J.-S., Zhu Y.L., Yu C.M., Zhou Y.Z., Han Y.Y., Wu F.W. et Qi B.F. 1986.** The structures of huperzine A and B, two new alkaloids exhibiting marked anticholinesterase activity. *Canadian Journal of Chemistry* **64** : 837-839.
- Lindén B. 1980.** Aseptic germination of seeds of northern terrestrial orchids. *Annals of Botany Fennici* **17** : 174-182.
- Loiseau J., Michaux-Ferrière N. et Le Deunff Y. 1998.** Histology of somatic embryogenesis in pea. *Plant of Physiology and Biochemistry* **36** : 683-687.
- Manceau F. 1992.** Étude d'une suspension cellulaire de *Nicotiana plumbaginifolia*. Production endogène d'alcaloïdes nicotiniques et activité démethylente. Thèse de doctorat. Université de Picardie, Faculté de Pharmacie. Amiens. 136 pages
- Martins A., Barroso J. et Pais M.S. 1996.** Effect of ectomycorrhizal fungi on survival and growth of micropropagated plants and seedlings of *Castanea sativa* Mill. *Mycorrhiza* **6** : 265-270.
- Michaux-Ferrière N. et Hallet J.N. 1985.** La cellule apicale : son rôle dans le contrôle de l'activité méristématique caulinaire. *Bulletin de la Société de Botanique de France, Actualités Botaniques* **132** : 49-61.
- Michaux-Ferrière N., Grout H. et Carron M.P. 1992.** Origin and ontogenesis of somatic embryos in *Hevea brasiliensis* (Euphorbiaceae). *American Journal of Botany* **79** : 174-180.
- Michaux-Ferrière N. et Schwendiman J. 1992.** Histology of somatic embryogenesis. In : Reproductive biology and plant breeding. Dattée Y., Dumas C. et Gallais A., édés. Berlin : Springer-Verlag. pp. 247-259.
- Murashige T. et Skoog F. 1962.** A revised medium for rapid growth and bioassays with Tobacco tissue cultures. *Physiologica Plantarum* **15** : 473-497.
- Niemi K. Krajnakova J et Häggman H. 1998.** Interaction between embryogenic cultures of scots pine and ectomycorrhizal fungi. *Mycorrhiza* **8** : 101-107.

- Nour K.A., Yeung E.C. et Thorpe T.A. 1993.** Shoot bud histogenesis from mature embryos and shoots of eastern white cedar (*Thuja occidentalis* L.) cultured *in vitro*. *International Journal of Plant Sciences* **154** : 378-385.
- Parent G.H. 1964.** Disparition et survie des Lycopodes. *Bulletin des Naturalistes Belges* **45** : 506-556.
- Paris R.R. et Cosson L. 1965.** Sur la biogenèse des alcaloïdes des *Datura*. Étude des variations ontogéniques à l'aide d'une méthode chromatographique chez le *Datura metel* Sims. *Compte-Rendu de l'Académie de Sciences de Paris*, série D, **260** : 3148-3151.
- Paris R.R. et Moyse H. 1967.** Précis de matière médicale. Tome 3. Paris : Masson.
- Piéron S., Belaizi M., Boxus Ph. 1993.** Nodule culture, a possible morphogenetic pathway in *Cichorium intybus* L. propagation. *Scientia Horticulturae* **53** : 1-11.
- Planck K.H. et Wagner K.G. 1986.** Determination of hyoscyamine and scopolamine in *Datura innoxia* plants by high performance liquid chromatography. *Zeitsch. Naturforsch.* **41** : 391-395.
- Prat H. (du). 1981.** Traité de la matière médicale homéopathique. Tome 2. 2^{ème} édition. Paris : Baillière & fils.
- Prelli R. 1990.** Guide des fougères et plantes alliées. 2^{ème} édition. Paris : Lechevalier, pp. 65-77.
- Prelli R. et Boudrie M. 1992.** Atlas écologique des fougères et plantes alliées. Illustration et répartition des Ptéridophytes de France. Paris : Lechevalier.
- Raynal-Roques A. 1994.** La botanique redécouverte. Paris : Belin, pp. 328-337.
- Reddy M.S. et Satyanarayana T. 1998.** Ectomycorrhizal formation in micropropagated plantlets of *Populus deltoides*. *Symbiosis* **25** : 343-348.
- Robert D. et Catesson A.M. 1990.** Organisation végétative. Paris : Doin.
- Salén E.B. 1951.** *Lycopodium* allergy. *Acta Allergologica* **4** : 308-319.

- Schippmann U. 1995.** Plant uses and species risk - from horticultural to medicinal plant trade. Acte de la 1^{ère} Conférence Européenne de *Planta Europa* sur la conservation des plantes sauvages. éd. Newton J. Londres : Ipswich Book Company Limited, pp. 161-165.
- Schwendiman J., Pannetier C. et Michaux-Ferrière N. 1990.** Histology of embryogenic formations during *in vitro* culture of oil palm *Elaeis guineensis* Jacq. *Oléagineux* **45** : 409-415.
- Shen Y.C. et al. 1994.** Alkaloids from *Lycopodium casuarinoides*. *Journal of Nature Products* **57** : 824-826.
- Stachel S.E., Messens E., van Montagu M. et Zambryski P. 1985.** Identification of the signal molecules produced by wounded plant cells that activate T-DNA transfer in *Agrobacterium tumefaciens*. *Nature* **318** : 624-629.
- Selles M., Viladomat F., Batisda J. et Codina C. 1999.** Callus induction, somatic embryogenesis and organogenesis in *Narcissus confusus* : correlation between the state of differentiation and the content of galanthamine and related alkaloids. *Plant Cell Reports* **18** : 646-651.
- Sulklyan D.S. et Mehra P.N. 1977.** *In vitro* morphogenetic studies in *Nephrolepis cordifolia*. *Phytomorphology* **27** : 396-407.
- Sulmont G. 1973-1974.** Une tourbière à sphaignes et *Huperzia selago* dans la vallée de l'avre à Boves (Somme). *Bulletin de la Société Botanique du Nord de la France* **26-27** : 17-20.
- Tang X. C., De Sarno P., Sugaya K. et Giacobini E. 1989.** Effect of huperzine A, a new cholinesterase inhibitor, on the central cholinergic system of the rat. *Journal of Neurosciences Research* **24** : 276-285.
- Tang X.C. 1996.** Huperzine A (Shuangyiping) : a promising drug for Alzheimer's disease. *Acta Pharmacologica Sinica* **17** : 481-484.
- Thakur R.C., Hosoi Y. et Ishii K. 1998.** Rapid *in vitro* propagation of *Matteuccia struthiopteris* (L.) Todaro - an edible fern. *Plant Cell Reports* **18** : 203-208.

- Treub M. 1884.** Études sur les Lycopodiacees. 1. Le prothalle du *Lycopodium cernuum* L. *Annales du Jardin Botanique de Buitenz.* **4** : 107-138.
- Tutin T.G., Burges N.A., Chater A.O., Edmondson J.R., Heywood V.H., Moore D.M., Valentine D.H., Walters S.M. et Webb D.A. 1993.** Flora Europaea (Psilotaceae to Platanaceae). Volume 1. 2^{ème} édition. Cambridge : Cambridge University Press.
- Van der Valk P., Ruis F., Tettelaar-Schrier A.M., Van de Velde C.M. 1995.** Optimizing plant regeneration from seed-derived callus cultures of Kentucky bluegrass. The effect of benzyladenine. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* **40** : 101-103.
- Verdeil J.L., Huet C., Grosdemanges F., Rival A. et Buffard-Morel J. 1992.** Embryogenèse somatique du cocotier (*Cocos nucifera* L.) : obtention de plusieurs clones de vitroplants. *Oléagineux* **47** : 465-469.
- Von Arnold S. et Eriksson T. 1979.** Bud induction on isolated needles of norway spruce (*Picea abies* L., Karst.) grown *in vitro*. *Plant Science Letters* **15** : 363-372.
- Waughman G.J. et Bellamy D.J. 1980.** Nitrogen fixation and the nitrogen balance in peatland ecosystems. *Ecology* **61** : 1185-1198.
- West M.A.L. et Harada J.J. 1993.** Embryogenesis in higher plants : an overview. *The Plant Cell* **5** : 1361-1369.
- Whittier D.P. 1981.** Gametophytes of *Lycopodium digitatum* (formerly *L. complanatum* var. *flabelliforme*) as grown *in axenic* culture. *Botany Gazete* **142** : 519-524.
- Yeung E.C. et Meinke D.W. 1993.** Embryogenesis in Angiosperms : development of the suspensor. *The Plant Cell* **5** : 1371-1381.
- Xu S.S., Gao Z.X., Weng Z., Du Z.M., Xu W.A., Yang J.S., Zhang M.L., Tong Z.H., Fang Y.S., Chai X.S. et Li S.L. 1995.** Efficacy of tablet huperzine A on memory, cognition, and behavior in Alzheimer's disease. *Acta Pharmacologica Sinica* **16** : 391-395.

ANNEXES

LISTE DES FIGURES ET DES TABLEAUX

Liste des figures

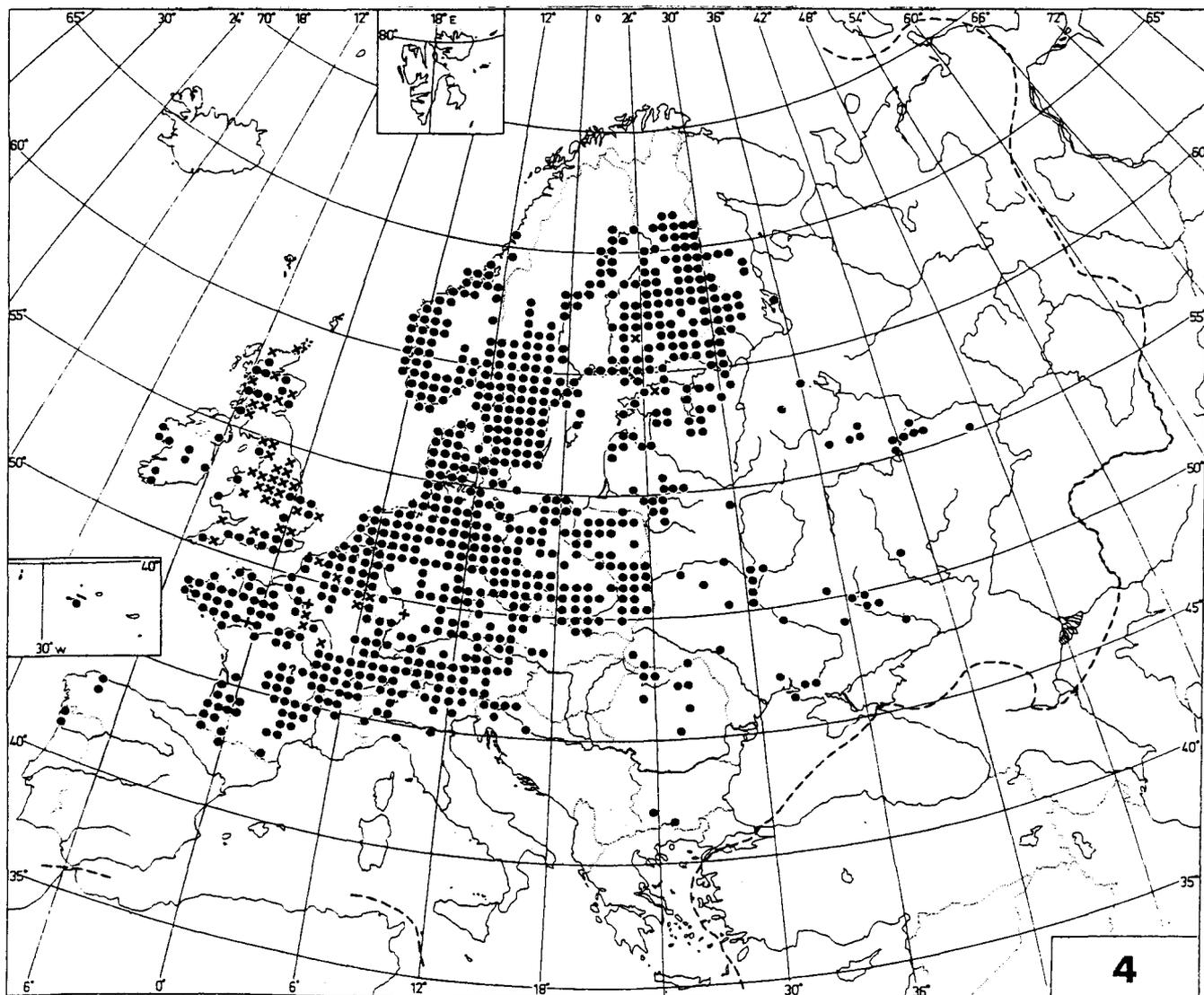
- Fig. 1.** La classe des Lycopodiinées et les 6 ordres qui la composent, d'après Emberger (1968)..... 12
- Fig. 2.** Répartition géographique de *Lycopodiella inundata* (L.) Holub dans le Nord/Pas-de-Calais, Picardie et Haute-Normandie. Réseau IFFB 4 x 4 km..... 13
- Fig. 3.** Cycle biologique du *Lycopodium clavatum*, d'après Atmane (1995)..... 17
- Fig. 4.** Cycle biologique de *Lycopodiella inundata* : de la germination de la spore jusqu'à la formation du sporophyte. (Dessins réalisés par Atmane-Bruschetti F.)..... 20
- Fig. 5.** Quelques formes caractéristiques de l'embryogenèse zygotique chez les Lycopodes, d'après Treub (1884), Goebel (1887) et Bruchmann (1910). (Dessins réalisés par Atmane-Bruschetti F.)..... 22
- Fig. 6. A.** Structure chimique de la lysine. **B.** Structure chimique de l'huperzine A..... 26
- Fig. 7.** *Lycopodiella inundata* (L.) Holub dans son site naturel : sablière du lièvre (Saint-Amand, Nord)..... 37
- Fig. 8.** Effets de la quantité de BAP sur la nécrose des apex végétatifs primaires au cours de la phase d'induction..... 48
- Fig. 9.** Bourgeonnement direct à partir des apex végétatifs..... 52
- Fig. 10.** Schéma d'une portion de tige végétative de *L. inundata* montrant les différentes zones considérées au cours de la mise en culture des apex végétatifs..... 54
- Fig. 11.** Mise en place d'une callogenèse au sein d'un apex végétatif : aspects macroscopique et microscopique..... 56
- Fig. 12.** Mise en évidence de l'évolution des réserves amylacées au cours de la division cellulaire en phase d'entretien du cal-nodulaire..... 58

Fig. 13. Aspects macroscopiques de l'embryogenèse indirecte à partir du cal. Effet de la balance hormonale sur l'obtention des embryons somatiques.....	61
Fig. 14. Mise en évidence de l'origine unicellulaire des embryons somatiques issus du cal-nodulaire.....	63
Fig. 15. Analyse cytologique de l'embryogenèse somatique indirecte chez <i>L. inundata</i> ..	65, 67
Fig. 16. Croissance et développement des plantules.....	68
Fig. 17. Acclimatation des plants issus de l' <i>in vitro</i>	70
Fig. 18. Diagramme résumant les différentes étapes potentielles de la propagation <i>in vitro</i> de <i>Lycopodiella inundata</i> (L.) Holub.....	73
Fig. 19. Chromatogramme (CCM) des alcaloïdes totaux des cals et des vitroplants de <i>L. inundata</i>	76
Fig. 20. Diagrammes d'élution des alcaloïdes totaux des cals de <i>L. inundata</i> obtenus par CLHP en phase inverse.....	78
Fig. 21. Chromatogramme et spectres de certains alcaloïdes de <i>L. inundata</i> analysés par CLHP équipé d'un système de barrettes de diodes.....	80
Fig. 22. Chromatogrammes obtenus avec la CLHP semi-préparative en utilisant différentes conditions de séparation des alcaloïdes totaux des cals et des vitroplants de <i>L. inundata</i>	82
Fig. 23. Diagramme résumant les principales étapes de l'extraction à la séparation des alcaloïdes à partir des cals et des vitroplants de <i>L. inundata</i>	84
Fig. 24. Analyse comparée de l'embryogenèse somatique chez <i>Lycopodiella inundata</i> et de l'embryogenèse zygotique chez trois Lycopodes : <i>Huperzia selago</i> , <i>Lycopodiell a inundata</i> et <i>Lycopodium cernuum</i>	92

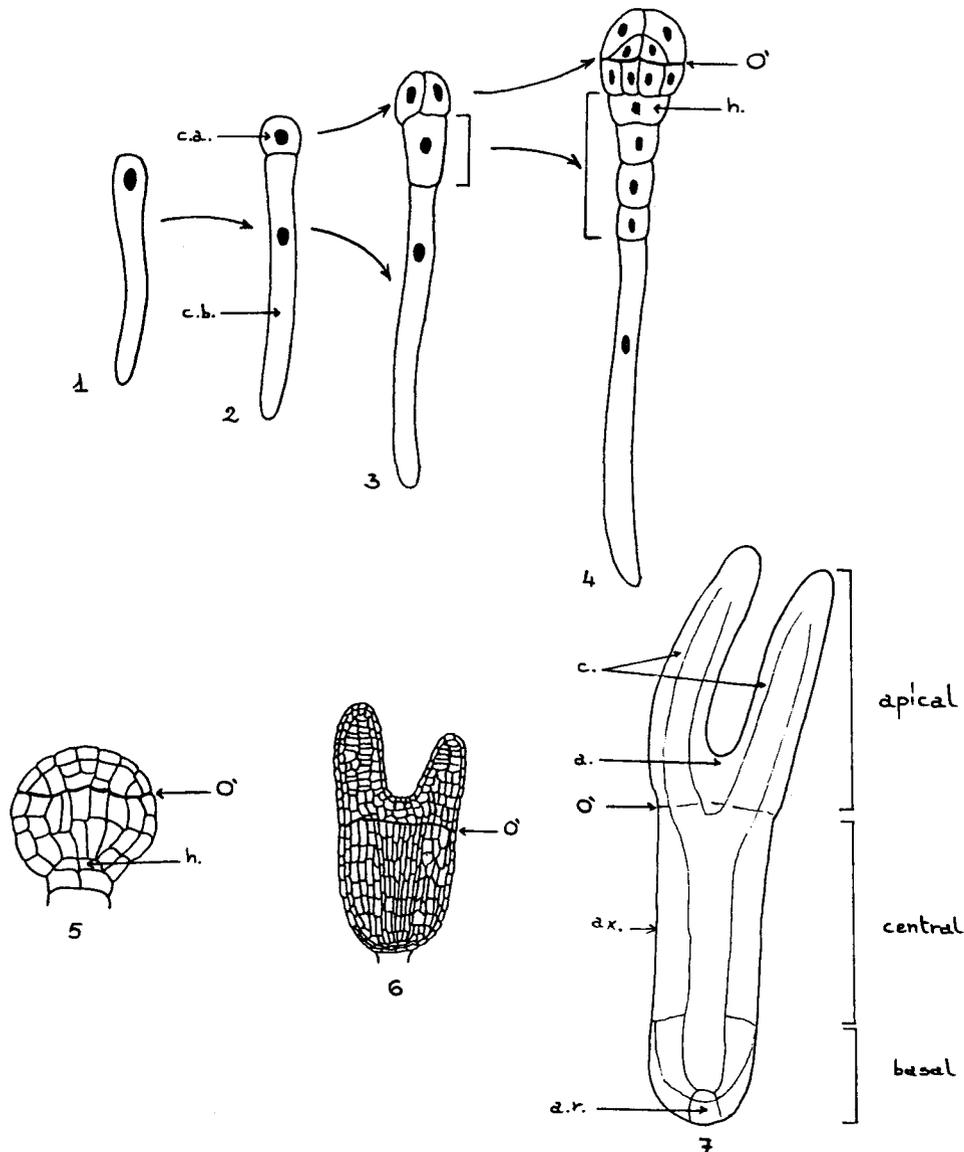
Liste des tableaux

Tableau 1. Répartition géographique en France des espèces de l'ordre des Lycopodiales, selon Prelli (1990).....	14
Tableau 2. Différents milieux de culture testés durant la phase d'induction du bourgeonnement et de la callogenèse à partir des apex.....	32
Tableau 3. Composition des différents milieux de bourgeonnement testés pour optimiser les résultats à partir des apex.....	33
Tableau 4. Différents pH et concentrations de l'acétonitrile des phases mobiles testés au cours de l'analyse par CLHP en phase inverse des alcaloïdes totaux.....	45
Tableau 5. Différents pH et concentrations de l'acétonitrile du solvant A testés pour optimiser la séparation des produits constituant les alcaloïdes totaux.....	46
Tableau 6. Effets de la concentration et du temps d'action de l'hypochlorite de calcium sur les apex lors de la phase d'aseptisation.....	49
Tableau 7. Effets des cytokinines sur la survie des apex pendant la phase d'induction.....	51
Tableau 8. Effets des cytokinines sur l'augmentation de la masse fraîche (MF) et sur le nombre de cals restant en vie après 13 semaines de culture sur le milieu MI.....	60
Tableau 9. Effets de la nature physique du milieu de culture sur l'augmentation de la masse fraîche des cals.....	60
Tableau 10. Nombre de bourgeons formés à partir des cals cultivés sur le milieu MB.....	64
Tableau 11. Effets des différents types de fermeture des tubes sur la croissance des bourgeons mis en culture sur le milieu MB.....	69
Tableau 12. Les différents Rf des alcaloïdes mis en évidence dans les cals et les vitroplants en utilisant deux solvants de développement différents.....	77
Tableau 13. Temps de rétention et maxima d'absorption des différents alcaloïdes extraits à partir des cals et des vitroplants.....	81

Tableau 14. Programme de gradients d'élution retenu pour la séparation des alcaloïdes totaux de <i>L. inundata</i>	83
--	-----------



Répartition géographique de *Lycopodiella inundata* (L.) Holub en Europe. D'après Helsinski (1972).



Quelques formes caractéristiques de l'embryogenèse chez les Spermaphytes. 1, 2, 3 et 4, d'après Paré (1972). 5, 6 et 7, d'après West et Harada (1993).

1. Cellule-œuf (zygote).
2. Première division de l'œuf : apparition des cellules apicales (c a) et basale (c b).
3. c a et c b se divisent selon deux directions orthogonales. Le plan dans lequel se divise c a sera celui dans lequel se différencieront les deux cotylédons ; dès ce moment, la polarité du futur embryon est définie.
4. L'embryon proprement dit résultera du développement de la "tête embryonnaire" issue de c a et de la cellule h qui, elle, est issue de c b. Les autres cellules issues de c b donneront le suspensor (qui ne fait pas partie intégrante de l'embryon).
5. Embryon au stade globulaire. Les cellules de l'hypophyse (h) se sont divisées longitudinalement. Les cellules à l'intérieur de l'embryon se sont divisées à la fois longitudinalement et transversalement.
6. Embryon au stade cœur. Les lobes cotylédonnaires continuent à s'allonger. La ligne O' est encore visible.
7. Embryon au stade cotylédonnaire. L'organisation morphologique de l'embryon est montrée : le domaine apical comprend les cotylédons (c), l'apex (ap) et "the upper axis". Le domaine central comprend l'axe (ax). Le domaine basal comprend l'apex racinaire (a r). Le développement des tissus vasculaires commence juste au dessous de la ligne O'.

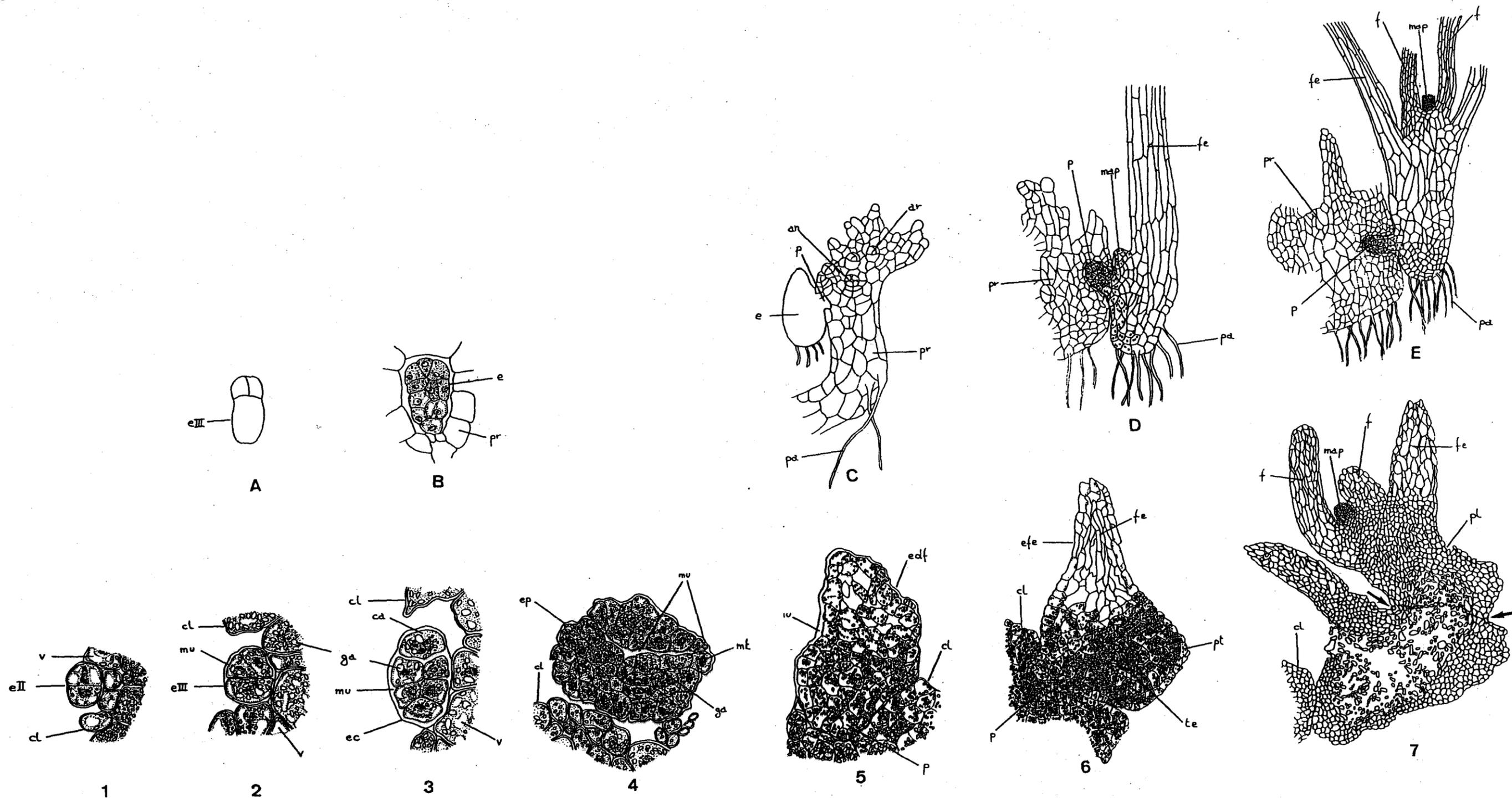


Fig. 22. Analyse comparée de l'embryogenèse somatique de *Lycopodiella inundata* et l'embryogenèse zygote chez trois Lycopodes : *Huperzia selago*, *Lycopodiella inundata* et *Lycopodium cernum*.

A. Embryon zygote de *Huperzia selago* au stade 3 cellules (eIII), d'après Bruchmann (1910).

B. Embryon zygote de *Lycopodium cernum* : coupe légèrement axiale d'un embryon (e) encore enveloppé dans les cellules du prothalle (G. = diam x 300), d'après Treub (1884).

C. Embryon zygote de *Lycopodiella inundata* : embryon (e) à un stade plus avancé mais toujours attaché au prothalle qui commence à rétrécir (G. x 15.4), d'après Goebel (1887).

D et E. Embryon zygote de *Lycopodium cernum* : D, embryon au stade feuille embryonnaire encore attaché au prothalle grâce au pied (p). Un méristème apical (m ap) se forme à la base de la feuille embryonnaire (f e) ; E, embryon au stade "plantule", d'après Treub (1884).

1-6. Embryon somatique de *Lycopodiella inundata* : 1, stade 2 cellules (eII) ; 2, stade 3 cellules (eIII) ; 3, stade cylindre (e c) ; 4, stade pyramidal (e p d) ; 5, stade début feuille (e d f) ; 6, stade feuille embryonnaire (e f e).

7. Plantule (pl) de *Lycopodiella inundata*. Dessins réalisés par Atmane-Bruschetti F.

an, anthéridie ; ar, archégone ; c a, cellule apicale ; cl, cal ; g a, grains d'amidon ; mi, mitose ; mu, mucilage ; p a, poils absorbants ; pr, prothalle ; pt, prothoderme ; t e, tubercule embryonnaire ; v, vacuole.

METHODE HISTOLOGIQUE

1. Fixation

La fixation consiste à tuer les cellules sans altérer sensiblement leur structure. Cela peut être obtenu par l'utilisation d'agents chimiques ou par congélation très rapide du matériel à étudier. Pour ce qui nous concerne nous avons opté pour l'emploi d'agent chimique composé de : formaldéhyde 37 % (6.5 mL), acide acétique glacial 100 % (3.5 mL), éthanol 50 % (100 mL). Cette solution fixatrice à pour effet de coaguler très finement le protoplasme sans le détruire et créer d'artefacts, c'est à dire en le conservant dans un état aussi voisin que possible de l'état vivant.

2. Déshydratation, imprégnation et inclusion

Après fixation, les échantillons sont déshydraté par passages progressifs dans de l'éthanol de degrés de plus en plus élevés : 50 %, 70 %, 90 % et 100 %. Chaque bain dure 30 min.

Après déshydratation, chaque explants est imprégné sous vide pendant 18 h par un mélange de résine JB-4, 100 mL de la solution à JB-4 + 0.9 g du catalyseur C.

L'étape suivante constitue l'inclusion des échantillons. Cette opération consiste à placer les explants à l'intérieur des moules qui contiennent en plus une solution de résine qui se polymérise et devient dure à température ambiante. L'objet ainsi inclus est prêt pour la réalisation de coupes d'une épaisseur de 1 à plusieurs μm (3 μm pour notre cas) à l'aide d'un ultramicrotome. Les coupes sont ensuite traitées par différents colorants.

METHODES CYTOCHIMIQUES

Après une fixation appropriée, une inclusion et la confection des coupes, ces dernières seront colorées par différents réactifs pour mettre en évidence tel ou tel constituant cellulaire.

1. Coloration au réactif de Schiff

Cette coloration est souvent désignée sous le nom de « réaction de PAS ». A la température ordinaire, l'acide périodique attaque, en les oxydants, les groupements glycols du polysaccharide avec libération de groupements aldéhydiques. Ces groupements, ainsi libérés, se colorent par le réactif de Schiff (fuchsine basique). Avec le microscope photonique, les polysaccharides se colorent en rouge violacé.

2. Coloration au Naphtol Blue Black

Ce produit colore spécifiquement les protéines des cellules en bleu noir. Ces protéines peuvent être solubles ou insolubles. Pour cette réaction, les coupes sont placées dans le Naphtol Blue Black (1 % p/v dans l'acide acétique 7 % v/v) à 50 °C pendant 5 min puis la coloration est régressée par l'acide acétique à 7 % (v/v).

Parfois, on peut colorer à la fois les polysaccharides et les protéines, on parle alors de double coloration. Ainsi, on traite tout d'abord les coupes avec le réactif de Schiff, puis avec le Naphtol Blue Black.

