



HAL
open science

Culture in vitro de plantes halophiles du littoral breton et orientation de leur métabolisme vers la production de principes actifs pour la nutrition et la cosmétique

Clément Lemoine

► To cite this version:

Clément Lemoine. Culture in vitro de plantes halophiles du littoral breton et orientation de leur métabolisme vers la production de principes actifs pour la nutrition et la cosmétique. Biologie végétale. Université de Bretagne occidentale - Brest, 2018. Français. NNT : 2018BRES0113 . tel-04416306

HAL Id: tel-04416306

<https://theses.hal.science/tel-04416306v1>

Submitted on 25 Jan 2024

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

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

THESE DE DOCTORAT

DE

L'UNIVERSITÉ
DE BRETAGNE OCCIDENTALE
COMUE UNIVERSITÉ BRETAGNE LOIRE

ÉCOLE DOCTORALE N° 604
Sociétés, Temps, Territoires
Spécialité : Environnement

Par

Clément LEMOINE

Culture *in vitro* de plantes halophiles du littoral breton et orientation de leur métabolisme vers la production de principes actifs pour la nutrition et la cosmétique.

Thèse présentée et soutenue à Brest, le 21 Décembre 2018

Unité de recherche : EA 7462 – Géoarchitecture. Territoire, Urbanisation, Biodiversité, Environnement

Rapporteurs avant soutenance :

Nathalie BOURGOUGNON Présidente de jury
Professeure des universités,
Université Bretagne Sud

Benoît SAINT-PIERRE Professeur des universités,
Université de Tours

Composition du Jury :

Nathalie BOURGOUGNON Présidente du jury
Professeure des universités,
Université Bretagne Sud

Benoît SAINT-PIERRE Professeur des universités,
Université de Tours

Manuelle BODIN Docteur, Vegenov

Solène CONNAN Maître de Conférences, UBO

Christian MAGNE Professeur des universités,
Directeur de thèse, UBO

Gilbert CHARLES Maître de conférences,
Co-directeur de thèse, UBO

Invités

Xavier DAUVERGNE Maître de conférences,
Co-directeur de thèse, UBO

Éric DESLANDES Professeur des universités
UBO

Remerciements

Le présent manuscrit, résultat de quatre ans de recherche, a pu voir le jour grâce au concours de nombreuses personnes. Je tiens à les citer et remercier chacune chaleureusement, en premier lieu mes encadrants qui ont partagé leur expertise et leur rigueur.

Merci à Christian Magné, Directeur de thèse pour sa confiance. Merci de m'avoir accompagné tout en me laissant une grande autonomie dans ce projet.

Merci à Xavier Dauvergne, co-encadrant, pour sa disponibilité, sa créativité. Merci de m'avoir fait partager cet instinct de paillasse.

Merci à Gilbert Charles, co-encadrant, pour son écoute. Merci de m'avoir fait bénéficier de son savoir encyclopédique et toujours avec le sens de la formule.

Merci à vous pour votre complémentarité et vos conseils qui m'ont permis de progresser.

Un grand merci au Laboratoire de Géoarchitecture EA 7462 de l'Université de Bretagne Occidentale pour son accueil et aux professionnels très différents qui m'ont permis de m'ouvrir à d'autres horizons.

Cette thèse CIFRE a été possible grâce à l'équipe Salipouss. Merci à Michel Pronost, Cécile Orsoni, Mélanie Hupel, Elsa Pomes, Angélique Urvoy et Jean-Pierre Riveri pour leur vision, leur écoute et leur compréhension. Merci à Adrien Le Coadou pour son aide précieuse dans les serres.

Par ailleurs, ce travail de recherche a bénéficié de l'apport de nombreux stagiaires. Dans l'ordre chronologique, merci à Samuel Viet, Cassandra Aloccio, Manon Trinel, Florent Velay, Marion Le Henry, Pierre Henri, Ngo Hoang, Anani Missinou, Jeanne l'Her, Marie Le Gad - Le Roy, Vivien Le Vourch, et Marie Armange pour leurs idées et leur motivation à les mettre en œuvre. Chacun a laissé un peu du sien dans ce travail.

Un grand merci aux membres de la plateforme RMN-RPE de l'UBO : Stéphane Cérantola, Gaëlle Simon et Nelly Kervarec pour leur patience, leur disponibilité et leur sens de la pédagogie.

Merci à Monique Arzur, technicienne du laboratoire, pour sa patience, son aide et son optimisme contagieux.

Merci à Pauline et Baptiste, pour les conseils avisés et le soutien tout au long de ces quatre années. Merci à tous les doctorants du laboratoire, Kevin, Pauline, Charlotte, Aurélie.

Merci à Quentin, Vincent, Sarah, Marie, stagiaires du labo pour leur enthousiasme. Merci à Jenny et Judith, collègues de la première heure pour leur présence au moment de me lancer dans la grande aventure du doctorat.

Merci à Axel de communiquer sa passion et de m'avoir soutenu durant la rédaction et la préparation de la soutenance.

Enfin, merci à ma famille, en particulier à mes parents Marie-Claude et Claude, et mes grands mère Bernadette et France. Merci aussi à mes beaux-parents et à Marielle pour leur soutien. Je remercie aussi mes amis, pour les moments de détente qui m'ont permis de souffler. Une pensée particulière à Yannis qui s'est lancé dans l'aventure du doctorat. Enfin merci à Domitille, pour ton soutien sans faille pendant ces années et tes encouragements, plus particulièrement dans les derniers mois de la rédaction.

INTRODUCTION GENERALE

A.	<i>Milieux à contrainte saline</i>	2
B.	<i>Halophytes</i>	4
C.	<i>Adaptations spécifiques des halophytes</i>	4
D.	<i>Historique - Contexte général</i>	5
E.	<i>Présentation des espèces</i>	8

CHAPITRE I : CULTURE IN VITRO DE PLANTES HALOPHILES

I.	INTRODUCTION.....	10
A.	<i>Généralités</i>	10
B.	<i>Quelques techniques de culture in vitro</i>	10
C.	<i>Applications industrielles de la culture in vitro</i>	12
D.	<i>Contexte de l'étude</i>	13
E.	<i>Présentation des espèces - Etat de l'art</i>	16
II.	MATERIEL ET METHODES.....	19
A.	<i>Matériel végétal</i>	19
B.	<i>Conditions de culture</i>	19
C.	<i>Décontamination</i>	20
D.	<i>Méthode de découpe de la Criste</i>	21
E.	<i>Acclimatation</i>	21
F.	<i>Traitement statistique</i>	21
III.	RESULTATS.....	23
A.	<i>Décontamination</i>	23
B.	<i>Culture in vitro de <i>Limonium vulgare</i></i>	24
C.	<i>Culture in vitro de <i>Crithmum maritimum</i></i>	32
D.	<i>Culture in vitro de <i>Tripleurospermum maritimum</i></i>	43
E.	<i>Sevrage et culture sous serres</i>	44
IV.	DISCUSSION.....	49
A.	<i>Décontamination</i>	49
B.	<i>Culture in vitro de <i>Limonium vulgare</i></i>	49
C.	<i>Culture in vitro de <i>Crithmum maritimum</i></i>	52
D.	<i>Culture in vitro de <i>Tripleurospermum maritimum</i></i>	56
E.	<i>Acclimatation et culture sous serre</i>	56
V.	CONCLUSION ET PERSPECTIVES.....	58

CHAPITRE II : ACTIVITES BIOLOGIQUES ET MOLECULES ACTIVES

I.	INTRODUCTION.....	62
A.	<i>Les espèces réactives à l'oxygène (ROS)</i>	62
B.	<i>Les défenses antioxydantes chez les plantes</i>	64
C.	<i>Les mécanismes d'antioxydation</i>	66
D.	<i>Les tests antioxydants</i>	68
E.	<i>Utilisation des antioxydants dans l'industrie</i>	70
F.	<i>Les activités anti-âge</i>	73
G.	<i>Les plantes halophiles, source abondante de molécules actives</i>	75
H.	<i>Contexte de l'étude</i>	77
II.	MATERIEL ET METHODES.....	80
A.	<i>Récolte et stabilisation du matériel végétal</i>	80
B.	<i>Extraction à l'éthanol 50%</i>	80
C.	<i>Fractionnement par chromatographie d'adsorption sur silice C18</i>	80
D.	<i>Hydrolyse acide</i>	81
E.	<i>Contenu en polyphénols totaux</i>	81
F.	<i>Tests antioxydants</i>	81
G.	<i>Activité anti-âge</i>	83
H.	<i>Résonance Magnétique Nucléaire</i>	85
I.	<i>Analyse qualitative des extraits par spectrométrie de masse (MALDI-TOF)</i>	87
III.	RESULTATS.....	89
A.	<i>Activités biologiques et composition des extraits bruts</i>	89
B.	<i>Activités biologiques et composition des fractions</i>	93
IV.	DISCUSSION.....	119
V.	CONCLUSION.....	124

CHAPITRE III : CARACTERISATION DES ACTIVITES BIOLOGIQUES EN CONDITIONS NATURELLES

I.	INTRODUCTION.....	126
II.	MATERIEL ET METHODES.....	128
	A. <i>Méthode phytosociologique</i>	128
	B. <i>Prélèvement</i>	129
	C. <i>Analyses biochimiques</i>	129
	D. <i>Dosage de l'acide chlorogénique par RMN</i>	129
III.	RESULTATS.....	131
	A. <i>Description des sites</i>	131
	B. <i>Activités anti-radicalaire et dosage</i>	139
IV.	DISCUSSION.....	145
V.	CONCLUSION.....	146

CHAPITRE IV : ORIENTATION METABOLIQUE

I.	INTRODUCTION.....	148
II.	MATERIEL ET METHODES.....	154
	A. <i>Analyses biochimiques</i>	154
	B. <i>Conditions de culture</i>	154
	C. <i>Stress in vitro</i>	154
	D. <i>Stress en serre</i>	155
	E. <i>Tests statistiques</i>	156
III.	RESULTATS.....	158
	A. <i>Optimisation métabolique de L. vulgare</i>	158
	B. <i>Optimisation métabolique de C. maritimum</i>	163
	C. <i>Optimisation métabolique de T. maritimum</i>	167
IV.	DISCUSSION.....	172
V.	CONCLUSION - PERSPECTIVES.....	176

CONCLUSION GENERALE

ABREVIATIONS

2,4-D : acide 2,4-dichlorophénoxyacétique

3,5 ADCQ : Acide 3,5 dicaffeoylquinique

ABTS : 2,2'-azino-bis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid)

AIB : Acide 3-indole-butyrique

AIA : Acide indole-3-acétique

AK : Acide kojique

ANA : Acide 1-naphtalène acétique

BAP : Benzyl-aminopurine

COSY : Correlation Spectroscopy

DPPH : 2,2- diphenyl-1-picrylhydrazyl

FRAP : Ferric Reducing Antioxidant Power

FrXX : Fraction éluée sur colonne C18 avec XX% de MeOH

HMBC : Heteronuclear Multiple Bond Correlation

HMQC : Heteronuclear Multiple Quantum Correlation

MSXX : Milieu Murashige et Skoog à XX g.L⁻¹ de saccharose

RMN : Résonance Magnétique Nucléaire

ssFrXX : Sous-fraction éluée sur colonne C18 avec XX% de MeOH

STS : Thiosulfate d'argent

TDZ : Thidiazuron

TPTZ : 2,4,6-Tri(2-pyridyl)-s-triazine

INTRODUCTION GENERALE

Cette étude est le fruit d'une collaboration entre l'Université de Bretagne Occidentale (UBO) et la société Salipouss (Rennes), entreprise qui commercialise des actifs pour l'industrie agroalimentaire et des cosmétiques d'origine biologique, réalisée dans le cadre d'une convention industrielle de formation par la recherche (CIFRE, n°2014/1093). Le projet rapporté ici a pour but d'évaluer l'aptitude de trois espèces de plantes du littoral breton à fournir de tels actifs. Ces plantes provenant de milieux à fortes contraintes ont développé des mécanismes d'adaptation singuliers supposés leur conférer des propriétés intéressantes pour une potentielle exploitation industrielle.

A. Milieux à contrainte saline

Les caractéristiques communes de ces milieux sont la forte concentration en sel présente au niveau des sols. La contrainte saline représente un des facteurs limitants les plus importants pour les grandes cultures. Parmi les terres cultivées, 20% sont sujettes à la salinisation (Grigore et Toma, 2017). Les sels y sont accumulés, soit par évaporations successives et concentration, soit par la proximité de la mer, apportant embruns et paquets de mer. Les milieux à forte contrainte saline sont donc généralement situés dans les régions arides ou semi-arides, les salines et les littoraux.

Au niveau de ces derniers, les principaux habitats à contrainte saline sont les mangroves, les falaises, les dunes et plages, les schorres et les slikkes. Chacun possède d'autres types de contraintes qui lui sont propres, comme l'exondation pour la slikke ou les mangroves, et la forte luminosité, renvoyée par effet d'albédo, pour les dunes et les plages. A cela s'ajoutent généralement de fortes variations de la disponibilité en eau, des vents violents et une pauvreté en nutriments. Sachant que la salinité de ces milieux, à elle seule, est fatale pour 99% des espèces végétales (Flowers et Colmer, 2008), ces contraintes rendent de tels milieux particulièrement hostiles aux organismes vivants.

Certaines espèces végétales ont tout de même développé des capacités de résistance et, grâce à différents mécanismes adaptatifs, sont capables de se développer sur ces différents milieux : les halophytes.

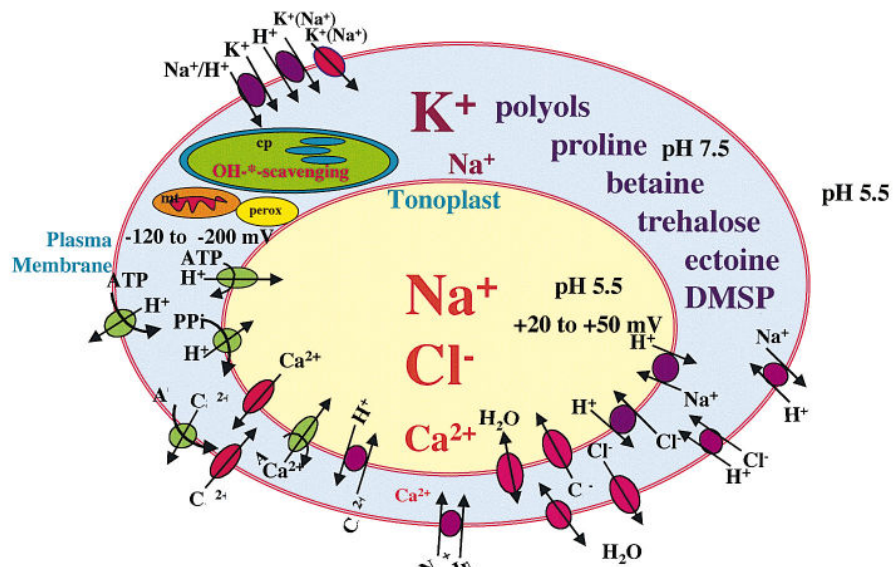


Figure 1: Ajustement osmotique de la cellule végétale, par séquestration du sel dans la vacuole et accumulation d'osmolytes dans le cytosol (Hasegawa *et al.*, 2000).

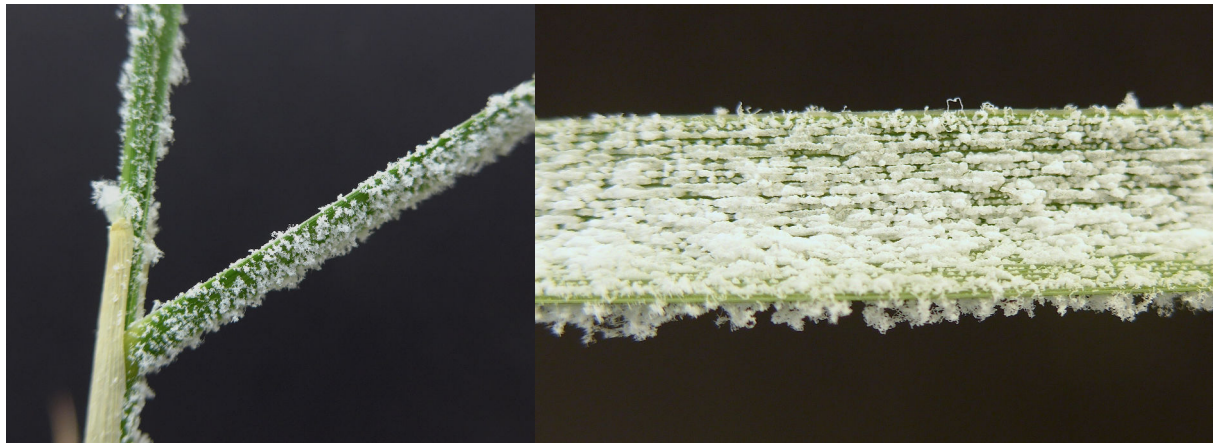


Figure 2 : Sel excrété au niveau de feuilles de *Spartina anglica*, cultivée en condition hypersaline.

B. Halophytes

Les halophytes sont des plantes capables d'effectuer leur cycle de vie dans des milieux salins, à une concentration supérieure ou égale à 200 mM (Flowers *et al.*, 1986). Le nombre total d'halophytes est estimé selon les auteurs entre 2000 et 6000 espèces, représentant 1 à 2% des angiospermes connues (Glenn *et al.*, 1999 ; Yensen, 2006). Cependant, les halophytes présentent une grande diversité botanique, étant présentes dans plus de la moitié des ordres connus (Cheeseman, 2015), autant dans des ordres primitifs (Laurales, Nymphales,...) que plus évolués (Asterales, Orchidales,...) (Glenn *et al.*, 1999). De même, les halophytes sont rencontrées dans environ la moitié des familles (140) et des genres (636) d'Angiospermes (Yensen, 2006). Parmi ces halophytes, une petite minorité (moins de 5%) voient leur croissance stimulée en présence de sel et sont qualifiées d'halophytes strictes ou plantes halophiles. La majorité des halophytes tolèrent mais n'exigent pas le sel pour une croissance optimale, et sont dites pour cette raison halophytes facultatives. En réalité, tous les degrés intermédiaires d'halophilie existent et chaque espèce a la capacité de croître sur des sols plus ou moins chargés en sel, en fonction de ses capacités adaptatives.

C. Adaptations spécifiques des halophytes

Plusieurs adaptations apparues au cours de l'évolution ont permis à des plantes de coloniser les milieux difficiles que sont les régions semi-arides et les franges littorales. De nombreuses espèces possèdent des feuilles et des tiges succulentes, permettant de diluer les ions toxiques tout en faisant des réserves d'eau. Afin de réduire les pertes d'eau par évapotranspiration, la cuticule est épaisse, et le nombre de stomates, ainsi que leur taille, sont réduits (Flowers *et al.*, 1977 ; Flowers, 1985). Les ions Na^+ et Cl^- qui sont absorbés sont séquestrés dans la vacuole pour limiter leurs effets nocifs sur les structures cellulaires (figure 1). Afin d'ajuster le potentiel osmotique cytosolique au niveau du potentiel vacuolaire, et si possible en deçà de celui du milieu externe, les cellules ont besoin de synthétiser des osmolytes ou solutés compatibles pour maintenir le flux d'eau entrant. Ceux-ci peuvent être des acides aminés, des betaines, des sucres, ou des polyols (Flowers et Colmer, 2008).

Certaines espèces, appelées recretahalophytes, ont développé des systèmes qui permettent d'excréter une partie du sel absorbé (figure 2), au moyen de glandes à sel, structures spécialisées rencontrées principalement chez les *Poaceae*, les *Tamaricaceae* et les

Plumbaginaceae. Les mécanismes sont mal connus, mais de récents travaux ont permis de faire émerger un modèle de fonctionnement robuste (Yuan *et al.*, 2016).

Une autre adaptation rencontrée, par exemple au sein des genres *Limonium* et *Aster*, est le rapide *turn-over* des feuilles : les plus jeunes remplacent rapidement les anciennes feuilles, dans lesquelles le sel est majoritairement stocké, afin de s'en débarrasser (Koyro *et al.*, 2008).

Ces mécanismes de prévention permettent d'éviter au maximum la présence d'ions Na^+ et Cl^- à proximité des structures cellulaires sensibles. Malgré leur efficacité, les pressions exercées par les environnements salins hostiles vont générer un stress oxydatif. Les plantes halophiles sont particulièrement armées contre ce stress, et ont mis en place des mécanismes permettant de détoxifier efficacement les produits du stress oxydatif, notamment grâce à une grande variété de molécules antioxydantes (Ozgur *et al.*, 2013). L'ensemble de ces capacités (gestion du sel, production de molécules antioxydantes) confère des propriétés d'intérêt industriel, certaines espèces pouvant faire l'objet de valorisation en alimentation humaine et animale, cosmétique, nutrition-santé, ou peuvent être utilisées en phytoremédiation, pour désaliniser ou fixer des dunes (Abdelly *et al.*, 2006).

D. Historique - Contexte général

1. Laboratoire EA 7462

Le laboratoire EA 7462 (Géoarchitecture - Territoires, Urbanisation, Biodiversité, Environnement) de l'Université de Bretagne Occidentale (UBO) est le lieu de réalisation de l'étude. L'équipe travaille depuis plusieurs années sur les végétations littorales, depuis leur écologie jusqu'à leur valorisation.

2. Salipouss

L'entreprise Salipouss est fondée en 2011. Dans un premier temps, elle vise à valoriser un brevet portant sur la production de salicornes développé par l'UBO (Meudec et Poupard, 2010). La société (SAS) est divisée en deux filiales, pour deux marchés : HALOMIX a pour

but de commercialiser des plantes séchées ou des extraits bruts d'halophytes dans le secteur de l'agro-alimentaire, directement à des industriels de la nutrition animale (*feed, pet-food*). La seconde filiale, 3Point3, est une marque de cosmétiques. Ici, le concept proposé au consommateur est de préparer lui-même ses produits de beauté grâce à des ingrédients dans lesquels sont incorporés les extraits bruts ou purifiés développés au cours de cette étude. Les produits seront donc manufacturés par la filiale et commercialisés directement au consommateur.

Dans ce cadre industriel, le projet de recherche vise à valoriser plusieurs espèces de plantes halophiles, en développant trois axes :

- La production de plants *in vitro* pour une culture ultérieure en serre,
- La recherche d'activités biologiques et de molécules actives par bio-guidage,
- L'optimisation de ces activités biologiques par l'utilisation d'éliciteurs.

Les espèces ont été choisies sur la base de plusieurs critères. Tout d'abord, un screening des activités anti-oxydantes (antiradicalaires) de nombreuses espèces d'halophytes a été effectué. Parmi les plus actives, sont retenues, les espèces les plus pertinentes en termes de toxicité, de rendements potentiels, et de commercialisation d'après la liste des ingrédients autorisés de l'ANSM (Agence Nationale de Santé du Médicament et des produits de santé) pour le marché français, la GRAS (Generally Recognized As Safe) de la FDA (Food & Drug Administration) pour le marché américain, l'IECIC (Inventory of Existing Cosmetic Ingredients in China) pour le marché chinois...

À son commencement en janvier 2015, à la demande du partenaire économique du projet, la thèse porte sur 6 espèces que sont *Tripolium pannonicum* (*ex-Aster tripolium*), *Helichrysum stoechas*, *Beta maritima*, *Crithmum maritimum*, *Tripleurospermum maritimum* (*ex-Matricaria maritima*) et *Limonium vulgare*. La première année, le travail se poursuit sur ces 6 plantes notamment par une étude de la phytochimie de deux espèces mal connues au laboratoire, *B. maritima* et *H. stoechas* (résultats non présentés dans ce travail). Un an plus tard, au début de l'année 2016, le panel d'espèces doit être revu à la baisse. En effet, pour des raisons financières, il a fallu rapidement proposer des modes de production et disposer d'une biomasse qui peut faire l'objet de tests d'activités, de façon à convaincre de potentiels investisseurs de se joindre au projet. Il est donc décidé de se concentrer sur les espèces sur lesquelles les recherches sont les plus avancées, d'un point de vue phytochimique et de

développement en culture *in vitro*, ainsi que celles qui peuvent être commercialisées au plus vite. Sont ainsi choisies trois espèces qui feront l'objet de recherches jusqu'à la fin du projet en mars 2018. Il s'agit de la Lavande de mer, de la Matricaire maritime et de la Criste marine.

Cette étude est divisée en 4 chapitres. Dans un premier temps est présentée (i) la culture *in vitro* et la production de ces espèces en serre, avant d'en examiner (ii) leurs activités biologiques et molécules actives. Puis est exposée une (iii) étude des plantes dans leur milieu naturel. Enfin, une dernière partie présente des (iv) essais d'optimisation des activités biologiques des extraits par orientation métabolique des plantes cultivées.



Figure 3 : A: Planche botanique de *Limonium vulgare* au stade floral. B: Photographie de *Limonium vulgare* au stade végétatif.



Figure 4 : A: Planche botanique de *Crithmum maritimum* au stade floral. B: Photographie de *Crithmum maritimum* au stade végétatif.

E. Présentation des espèces

Limonium vulgare, la Lavande de mer ou statice commun (figure 3), est une plante vivace de la famille des Plombaginacées. En France, elle est présente sur toute la côte Atlantique ainsi que sur la côte Méditerranéenne, essentiellement dans les prés salés vasicoles. Le genre *Limonium* comprend plus de 350 espèces (Akhani *et al.*, 2013), réparties sur tous les continents, avec une diversité remarquable dans le bassin méditerranéen (Palop *et al.*, 2000). C'est une plante à souche épaisse, ligneuse et ramifiée qui présente une rosette de feuilles oblongues de 4 à 15 cm à limbe décurrent, obtuses au sommet et généralement mucronées. La hampe florale, de 30 à 60 cm, se ramifie en panicule colymbiforme au-dessus de son milieu. Les rameaux sont étalés puis arqués. Les fleurs qui se forment d'août à octobre sont nombreuses, bleues, sont en épi contracté et présentent des anthères jaunes (des Abbayes *et al.*, 1971).

Crithmum maritimum, ou Criste marine, est une plante vivace de la famille des Apiacées (figure 4), dont le genre est monospécifique. Elle est présente sur toute la côte Atlantique française, anglaise et portugaise (Pateira *et al.*, 1999), ainsi que sur le pourtour méditerranéen (Tsoukatou *et al.*, 2001), et les littoraux en Asie occidentale et en Afrique septentrionale (Coiffard, 1991).

Cette espèce vivace est glabre, généralement charnue et glauque. Sa tige pleine et striée, légèrement ligneuse à la base, est dressée et peut atteindre jusqu'à 60 cm. Les feuilles bipennées sont composées de folioles linéaires-lancéolés. L'inflorescence, en ombelle composée de 10 à 20 rayons, porte des fleurs vertes à jaunâtres à sépales presque nuls et pétales arrondis au sommet. La floraison a lieu de juillet à octobre. Les fruits ellipsoïdes vert-olive à rougeâtres à maturité sont longs d'environ 6 mm. La Criste se développe essentiellement au niveau des fissures des falaises maritimes exposés aux embruns des cotes Atlantique et Méditerranéenne. Elle se retrouve aussi au niveau de sables maritimes et des cordons de galets (des Abbayes *et al.*, 1971).

Tripleurospermum maritimum (L.) W.D.J. Koch (ex *Matricaria maritima* L.), ou Matricaire maritime, est une plante herbacée bisannuelle à vivace de la famille des Asteracées (figure 5). Elle est présente en France sur l'ensemble de la côte Atlantique, ainsi qu'à l'ouest

de la côte Méditerranéenne. Cette espèce, inodore, présente des tiges rameuses généralement prostrées de 10 à 60 cm. Les feuilles charnues sont profondément divisées en segments linéaires sillonnés au dessus. Le capitule solitaire, de 3 à 4 cm, longuement pédonculé, présente une involucre de bractées oblongues à marges scarieuses. Le réceptacle du capitule est légèrement convexe et toujours plein. Les fleurs internes tubulées jaunes présentent 5 lobes, les fleurs ligulées (20 à 30) sont blanches et étalées. Ce taxon se développe au niveau des sables maritimes au niveau des marées hautes de vives eaux, et fleurit de juin à septembre (des Abbayes, 1971).

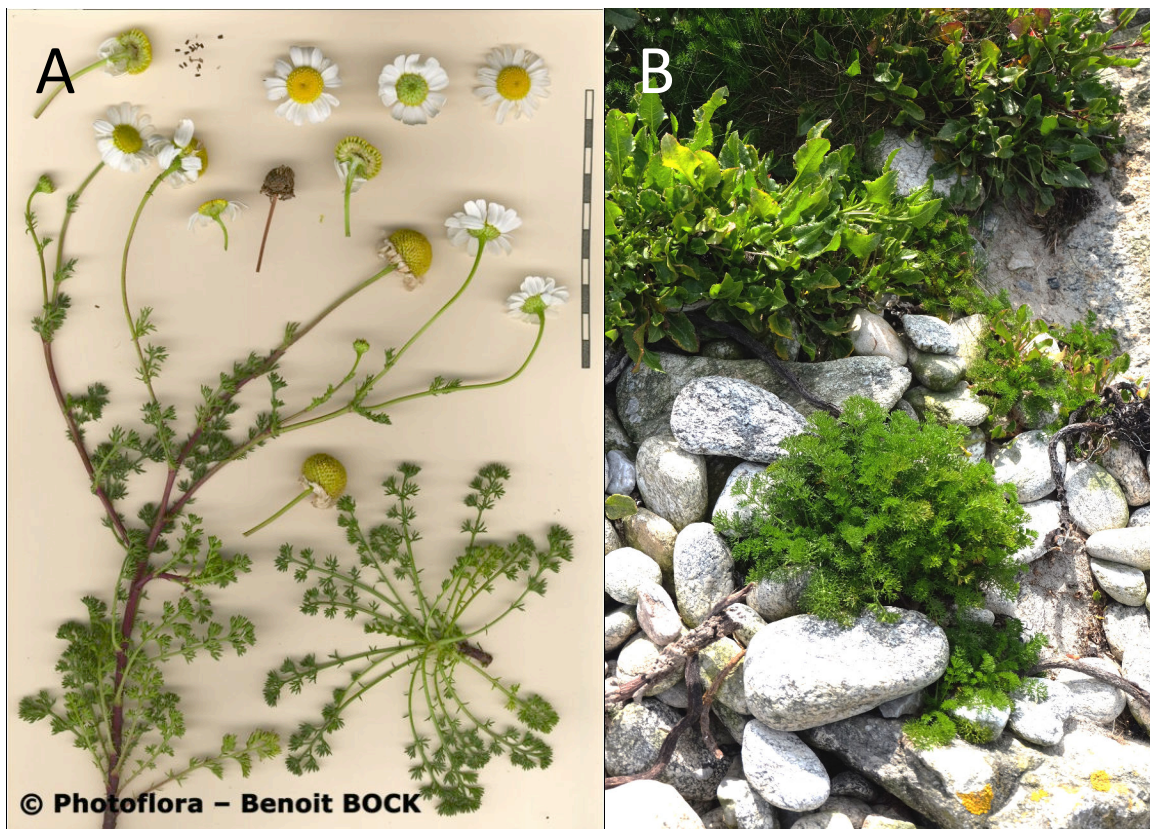


Figure 5 : A: Planche botanique de *Tripleurospermum maritimum* au stade floral. B: Photographie de *Tripleurospermum maritimum* au stade végétatif.

CHAPITRE I : CULTURE *IN VITRO* DE
PLANTES HALOPHILES

I. INTRODUCTION

A. Généralités

La culture *in vitro*, outil majeur de production et de recherche dans le domaine du végétal consiste à cultiver des plantes, tissus ou organes sur un milieu nutritif artificiel en conditions stériles. Le concept de culture *in vitro* est apparu au début du XX^e siècle, faisant suite aux idées de Gottlieb Haberlandt. Il publia dans la revue de l'Académie Impériale des Sciences de Vienne un article dans lequel il énonce le principe de totipotence des cellules végétales, et prédit qu'il est possible, sous certaines conditions, de cultiver des cellules individuellement avec un milieu adapté (Haberlandt, 1902). Il faudra attendre 10 ans pour que Alexis Carrel réussisse à cultiver des cellules animales (Carrel, 1912), et 20 ans pour les premières cultures de méristèmes caulinaires et racinaires (Robbins, 1922). Les premières cultures de tissus à proprement parler ont été faites avec du tissu cambial d'*Acer pseudoplatanus* (Gautheret, 1935). En 1939, trois équipes parviendront à faire croître des cellules végétales indifférenciées pour une longue période : deux en utilisant l'auxine découverte quelques années auparavant (Gautheret, 1939 ; Nobécourt, 1939) et une sans régulateur de croissance, avec du tissu tumoral provenant d'un hybride de deux *Nicotiana* (White, 1939). Les trois décennies suivantes verront l'émergence de nombreuses découvertes : l'isolement et l'utilisation de la première cytokinine (la kinétine) (Miller *et al.*, 1955), la compréhension de l'influence de la balance hormonale dans la morphogénèse (Skoog et Miller, 1957) et enfin la régénération d'une plante complète à partir d'une seule cellule, démontrant ainsi la capacité de totipotence de certaines cellules végétales (Vasil et Hildebrandt, 1965). En 1962, le développement d'une préparation par Murashige et Skoog (Murashige et Skoog, 1962) ouvre la voie à de très nombreuses applications. Ce milieu est toujours aujourd'hui un milieu de référence, utilisé pour un très grand nombre d'espèces.

B. Quelques techniques de culture *in vitro*

La culture *in vitro* est un ensemble de techniques permettant d'étudier plus finement (comparativement à la culture de plantes entières) et de façon répétable les tenants morpho-anatomiques, physiologiques, voire biochimiques des réactions de certains tissus placés en conditions contrôlées. Le modèle peut devenir extrêmement complexe, de par le nombre de paramètres facilement maîtrisables : matériel de départ (génotype, âge, origine, taille de l'explant...), nature et concentration des éléments nutritifs, utilisation de régulateurs de

croissance, technique de découpe, nature physique du milieu, type et puissance d'éclairage, photopériode, température, taille et nature du contenant... Tous ces paramètres peuvent avoir une influence variable sur le développement des tissus et organes isolés. Cette profusion est à la fois un avantage et un inconvénient du modèle, rendant toute volonté d'étude exhaustive impossible.

Selon la nature et l'origine de l'explant, les possibilités offertes par la micropropagation sont nombreuses. La plus simple, appelée microbouturage, consiste à prélever et isoler une bouture uninodale, et à la repiquer sur un milieu permettant son développement. Dans des conditions favorables, le bourgeon se développera, puis formera des racines pour donner une nouvelle plante. Ainsi, un ou plusieurs clones (génétique) de la plante mère peuvent être obtenus. Le microbouturage permet donc, assez simplement, la reproduction d'un individu en s'affranchissant de la fécondation et du stade de graine.

Cette méthode de multiplication est la plus simple offerte par la culture *in vitro*, et a permis la production à grande échelle de nombreuses espèces, surpassant largement les techniques de propagation traditionnelles en termes de taux de multiplication. D'autres techniques, plus lourdes et nécessitant plus de connaissances de l'espèce considérée, permettent des taux de multiplication bien supérieurs.

L'organogénèse est la génération d'organes (pousses feuillées, racines...) à partir de tissus déjà formés (organogénèse directe) ou à partir d'un cal (organogénèse indirecte). Dans la pratique, il est parfois difficile de faire la différence entre les deux phénomènes. Les cellules compétentes à la morphogénèse directe sont peu différenciées, généralement issues des méristèmes. Les types cellulaires les plus compétents sont les cellules compagnes, celles du mésophylle et celles de l'épiderme. En présence d'une balance auxine / cytokinine adéquate, elles vont donner naissance à de multiples pousses (Bhatia et Bera, 2015). Chaque espèce, variété et parfois génotype est plus ou moins sensible à certains régulateurs de croissance, dans des concentrations qui leur sont propres. Maîtrisée, cette technique permet des taux de multiplication très élevés tout en assurant une forte homogénéité génétique (Bhatia et Bera, 2015).

La dernière méthode permettant de régénérer une plante entière à partir d'une cellule est l'embryogénèse somatique. Il s'agit d'obtenir, à partir d'une cellule somatique, le

développement d'un embryon dit somatique. Il suit ensuite les étapes classiques de développement d'un embryon: phase globulaire, cordiforme, torpille et enfin cotylédonaire (Bhatia et Bera, 2005). Tout comme pour l'organogénèse, ce phénomène peut avoir lieu de façon directe (à partir de cellules différenciées), ou indirecte (à partir de cals). Le premier cas est assez rare, et plus fréquent avec certains types cellulaires que d'autres. En général, il a été constaté que les cellules embryonnaires sont les plus embryogènes, suivies de celles issues de l'hypocotyle, des pétioles, des feuilles jeunes, et enfin des racines (Neumann *et al.*, 2009). L'âge des cellules est aussi un facteur décisif pour la réussite d'une embryogénèse : les cellules jeunes présentent généralement des taux d'embryogénèse bien supérieurs à celles provenant de tissus plus âgés (Bhatia et Bera, 2005). De plus, pour déclencher une embryogénèse, les cellules ont besoin d'un stimulus et d'un environnement favorable. L'utilisation d'acide 2,4 dichlorophénoxyacétique (2,4-D) est très classique pour initier une embryogénèse somatique, les cellules ayant besoin d'un « choc » auxinique, souvent combiné à un stress osmotique. Passé ce choc, réduire la quantité d'auxine permet au massif embryogène d'organiser sa symétrie, et de continuer son développement (Bhatia et Bera, 2005).

Dans certains cas, la régénération d'une plante entière n'est pas nécessaire ou souhaitable. Les cellules peuvent être cultivées en suspension cellulaire, sous forme de cellules individuelles ou de petits agrégats. Après génération d'un cal de type friable, les massifs sont placés dans un milieu liquide sous agitation, de façon à individualiser les cellules. Avec l'ajout de régulateurs de croissance, elles peuvent ainsi continuer à se diviser et produire des métabolites d'intérêt (Preil, 2005). Cette approche permet de produire des molécules complexes (protéines, tannins...) difficiles à produire par synthèse chimique (Preil, 2005). Il est toujours possible de se servir de ces cellules individuelles afin de régénérer des plantes de façon efficace, par organogénèse ou embryogénèse somatique (Preil, 2005).

C. Applications industrielles de la culture *in vitro*

Toutes ces techniques sont utilisées dans plusieurs industries, selon les besoins inhérents au secteur concerné. Dans l'agriculture, la culture *in vitro* est devenue indispensable pour la recherche comme pour la production. Elle est un très bon outil, pour l'amélioration et la création de variétés et de génotypes d'intérêt économique majeur (par transformation génétique, hybridation, variation somaclonale, haplodiploïdisation) (Das *et al.*, 2000 ; Gosal

et Gosal, 2000 ; Sehgal *et al.*, 2011) ou pour la production de plants sains dont la multiplication est inefficace ou difficile par d'autres moyens, comme chez le bananier (Bortagaray et Gatchair, 2012), le palmier-dattier (El-Sherif, 2017), ou l'ananas (Be et Debergh, 2006). De la même façon, les techniques de culture *in vitro* sont devenues primordiales pour la production et l'amélioration de nombreux genres d'intérêt horticole comme *Rosa*, *Chrysanthemum*, *Ficus* ou *Begonia* (Rout *et al.*, 2006).

Dans certains secteurs, des composés à haute valeur ajoutée ne pouvant être produits par chimie de synthèse sont produits par des plantes. Ces composés comme les colorants, les arômes ou les principes actifs peuvent être destinés au marché pharmaceutique, médical ou cosmétique. La culture *in vitro* peut là aussi permettre une sélection rapide de variants hyper-producteurs, pour de la culture conventionnelle comme pour de la culture cellulaire (Hussein *et al.*, 2001 ; Zhou et Wu, 2006). En culture conventionnelle, l'utilisation de *Nepenthes* transformés génétiquement pour la production de protéines recombinantes par sécrétion dans les urnes a fait l'objet d'un brevet ainsi que d'une exploitation commerciale (Biteau *et al.*, 2006). En culture cellulaire, quelques cas d'applications à échelle industrielle sont à noter, comme pour la production de shikonines avec *Lithospermum erythrorhizon*, de ginsenosides avec *Panax ginseng*, de purpurine avec *Rubia akane* ou du paclitaxel avec *Taxus sp.* (Alfermann *et al.*, 2003). À cet effet, des bioréacteurs ont été développés, dont la contenance et les accessoires sont dépendants de l'utilisation, permettant de contrôler en temps réel la température, la concentration en oxygène, le pH, et d'autres paramètres. Ces bioréacteurs pouvant contenir jusqu'à 75 m³ de milieu sont utilisés entre autres pour *Echinacea purpurea* pour ses dérivés d'acide caféique et *Rauwolfia serpentina* pour ses alcaloïdes (Preil, 2005). La rentabilité de cette technique, malgré la très haute valeur ajoutée de ces molécules, est amoindrie par de nombreux problèmes techniques inhérents à chaque espèce (Paek *et al.*, 2005), ne la rendant pour le moment exploitable que dans quelques cas seulement.

D. Contexte de l'étude

Dans un premier temps, les potentiels actifs commercialisables dans le cadre de ce projet seront des extraits non purifiés, avec une valeur ajoutée insuffisante pour justifier l'utilisation de cultures cellulaires. La production passera donc par l'utilisation de plantes entières. Les espèces sauvages choisies pour ce projet, issues du littoral français, sont réglementées et les prélèvements en milieu naturel à des fins d'exploitation commerciale ne

sont donc pas permis (Arrêté préfectoral n° 2010-0859 du 21 juin 2010 portant sur la réglementation de la cueillette de certaines espèces végétales sauvages dans le département du Finistère). En effet, les littoraux sont des espaces à l'équilibre fragile, protégés en France par la loi littoral (Articles L.146-1 à L.146-9 du 3 janvier 1986) mais aussi par d'autres réglementations ou protections foncières (Sites Classés, Sites Inscrits, Réserves Nationales ou Régionales, zone de préemption par le conservatoire du littoral, Zone NATURA2000, Parc Naturel...). La culture de ces plantes s'impose, et pour la production d'extraits ou de molécules à haute valeur ajoutée il est nécessaire de sélectionner des conditions de culture ainsi que des génotypes ou des variétés (dans le cas de plantes domestiquées) permettant de garantir des rendements stables et une activité biologique conforme du produit final.

Afin de produire des plants, trois sources ont été envisagées. La première est l'utilisation de semences commerciales. Cette solution serait la plus simple, mais elle est difficilement réalisable dans le cadre de ce projet. Tout d'abord les espèces choisies n'étant pas d'intérêt économique particulier elles n'ont pas été sélectionnées auparavant. Ainsi, il n'existe pas de filière à volume conséquent, ou pas de filière du tout pour la Matricaire maritime. Les fournisseurs de semences pour les deux autres espèces ne possèdent que peu d'informations sur leur origine, ce qui implique un risque d'hétérogénéité des individus et surtout un manque de répétabilité dans le temps si leur origine venait à changer. Du fait de ce manque d'informations, ces semences commerciales ne sont pas présentes au catalogue des semences biologiques du GNIS, ce qui peut compliquer l'obtention de la certification AB. Ces nombreux désavantages et le fait qu'elle crée une dépendance logistique majeure à une autre entreprise font que cette source de plants n'a pas été retenue.

La seconde option est la multiplication végétative classique. Selon l'espèce considérée, cette option peut être d'une efficacité variable en terme de taux de multiplication. De plus, cette méthode peut demander une logistique et une main d'œuvre importantes, coûts n'étant pas amortis par les faibles taux de multiplication potentiels.

La troisième option, la multiplication et production de plants par micropropagation, malgré son coût élevé autant à court terme (coût des installations) qu'à moyen terme (coût de la main d'œuvre), a été retenue car elle présente des avantages majeurs. Le premier est de disposer d'une collection de génotypes et de conserver cette ressource de façon quasi-illimitée dans le temps grâce à des repiquages réguliers. Cette technique permet aussi de s'affranchir des saisons, les plantes pouvant être placées toute l'année dans des conditions idéales de

culture à l'abri des pathogènes et indépendamment des aléas météorologiques. De plus, la multiplication par micropropagation ne dépend pas de la biodisponibilité, la quantité de matériel végétal nécessaire pour initier des cultures étant très réduite. Cette multiplication peut s'avérer très efficace, notamment grâce à l'utilisation de régulateurs de croissance adaptés. De plus, la production peut s'effectuer sur des surfaces très réduites, les contenants utilisés en culture *in vitro* permettant des densités de plants très élevés.

Le développement d'un modèle de production *in vitro* intéresse également la recherche et le développement. Un modèle permettant d'obtenir rapidement des plants homogènes serait un atout pour les études d'ingénierie métabolique, des études préliminaires étant nécessaires avant de passer à une plus grande échelle plus coûteuse et chronophage.

Le cadre du projet impose de développer la culture de ces espèces en respectant les normes de l'agriculture biologique (Règlement CE n°834/2007), de façon à obtenir pour les produits destinés au secteur de la cosmétique la certification Ecocert, et pour le secteur agroalimentaire la certification AB. Les cultures seront donc effectuées sous serre, de façon à allier l'exigence de contrôle des conditions de culture et celles du règlement de l'agriculture biologique.

La finalité industrielle est d'obtenir une source homogène et fiable d'explants pour une culture ultérieure en serres en respectant le cahier des charges de l'agriculture biologique. Légalement, l'utilisation de vitroplants provenant de la culture *in vitro* pour produire des plants à des fins de culture biologique est possible. Il faut pour cela que l'approvisionnement en graines commerciales d'origine biologique soit impossible (ce qui est notre cas), et formuler une demande de dérogation, la qualité de plante protégée étant un atout dans l'obtention d'une dérogation (Règlement CE n°834/2007).

Afin de répondre à ces impératifs de production, les recherches se sont concentrées sur l'optimisation de la croissance des plantes et de leur multiplication en conditions *in vitro*, tout en assurant une homogénéité et un taux de sevrage maximal permettant de préparer au mieux leur développement en serre. Le travail a principalement porté sur trois espèces, les facteurs limitants, possibilités et problématiques étant différentes pour chacune.

E. Présentation des espèces - Etat de l'art

1. *Limonium vulgare*

La propagation par les graines étant un processus assez peu efficace chez *Limonium* (Aly *et al.*, 2002 ; Li, 2008), de nombreuses études sur la micropropagation de représentants du genre ont été menées. Elles ont essentiellement porté sur des espèces d'intérêt horticole, notamment pour le marché des fleurs coupées (Harada, 1992 ; Dam *et al.*, 2017). À des fins de production, plusieurs méthodes utilisant des régulateurs de croissance ont été publiées : par embryogénèse somatique directe (Dam *et al.*, 2010), indirecte (Aly *et al.*, 2002) ou par organogénèse (Xiao et Kozai, 2006). Des méthodes ont aussi été développées pour des besoins de sélection de traits d'intérêt horticole, notamment par hybridation ou par transformation *via Agrobacterium tumefaciens* (Dam *et al.*, 2017).

La seconde utilisation principale de la micropropagation des membres du genre vise les espèces endémiques ou en danger, de façon à produire *ex-situ* des explants en vue d'une réintroduction (Martin et Perez, 1992, 1995) avec des réussites variables en fonction des espèces (Martin et Perez, 1995 ; Casazza *et al.*, 2002). De la même façon, les génotypes d'une même espèce peuvent réagir différemment aux régulateurs de croissance (Martin et Perez, 1995 ; Igawa *et al.*, 2002). Néanmoins, l'utilisation de régulateurs de croissance pour la multiplication *in vitro* du genre *Limonium* fournit un procédé bien plus efficace que la propagation conventionnelle (Jeong *et al.*, 2014).

Selon le contexte, le matériel de départ choisi est différent : les hampes florales sont souvent utilisées dans le cas d'espèces rares ou en danger. Des méthodes permettent une réversion de la hampe florale mature qui, selon le stade de développement, peut fournir une excellente source d'explants (Topoonyanont *et al.*, 2000). En effet, cet organe est abondant et facile à décontaminer comparativement aux bourgeons présents dans la rosette (Amo-Marco et Ibanez, 1998). De plus, utiliser ces derniers reviendrait à détruire la plante mère, ce qui est inenvisageable pour des espèces rares ou en voie de disparition. Dans le cas des espèces d'intérêt horticole, tout matériel de départ est envisageable : feuilles ou fragments foliaires jeunes (Dam *et al.*, 2010) ou matures (Jeong *et al.*, 2001), racines (Bose *et al.*, 2017) et cotylédons (Aly *et al.*, 2002).

Une mise en culture a été initiée à partir de graines. Plusieurs expériences ont été menées afin d'optimiser la multiplication de *L. vulgare*, notamment par l'utilisation de

régulateurs de croissance ainsi que différents matériels de départ. Une optimisation de l'enracinement a aussi été effectuée, de façon à préparer au mieux l'acclimatation.

2. *Crithmum maritimum*

Une seule étude a été publiée sur la culture *in vitro* de *C. maritimum* (Grigoriadou et Maloupa, 2008). Certaines études ont porté sur la germination de cette espèce (Atia *et al.*, 2006, 2009), montrant que la présence de sel ralentit la germination, jusqu'à l'inhiber au-delà de 100 mM. Cet effet néfaste du sel peut être contré par l'utilisation de gibbérellines (GA₃), de nitrate ou de nitrite (Atia *et al.*, 2009).

Un effet positif de l'utilisation de BAP pour la multiplication de *C. maritimum* a été démontré par Grigoriadou et Maloupa (2008) ainsi que la promotion de l'enracinement par les auxines (l'AIB et l'ANA), combinées à de faibles doses de cytokinines (BAP). Néanmoins, les taux de multiplication décrits restent relativement faibles, d'un facteur 2 après 4 semaines sans régulateurs de croissance, et 4 avec.

Après une mise en culture, une optimisation de la croissance de *C. maritimum* avec l'utilisation de différentes compositions et natures physiques de milieux a été initiée. Afin d'améliorer le taux de multiplication, plusieurs options ont été étudiées, comme l'utilisation de différentes méthodes de découpe et/ou celle de différents régulateurs de croissance.

3. *Tripleurospermum maritimum*

À notre connaissance, aucune étude n'a porté sur la micropropagation de *T. maritimum*. Cependant, la tribu des *Anthemideae* contient plus de 1800 espèces (Oberprieler *et al.*, 2007) dont plusieurs sont d'intérêt horticole ou médicinal. Parmi elles, une espèce proche, la camomille sauvage (*Matricaria recutita*), a fait l'objet de nombreuses études en culture *in vitro*. Des protocoles d'embryogénèse somatique (Kintzios et Michaelakis, 1999), de culture de cellules (Singh *et al.*, 2011), ou encore de racines (Maday *et al.*, 1999) ont été mis en place chez cette espèce faisant l'objet d'une valorisation industrielle de grande importance, notamment pour son huile essentielle (Singh *et al.*, 2011).

Au cours de ce projet, la mise en culture ainsi que la recherche des meilleures conditions de culture *in vitro* et de préparation à l'acclimatation de la Matricaire maritime ont été étudiées.

II. MATERIEL ET METHODES

A. Matériel végétal

Les différentes espèces utilisées au cours de cette étude ont été introduites *in vitro* à partir de graines provenant de différentes populations du littoral du Finistère.

B. Conditions de culture

1. Milieux nutritifs utilisés

a. Milieux solides

Le milieu de base servant à l'entretien des cultures est le milieu MS (Murashige et Skoog, 1962). Il est supplémenté de saccharose à 30 g.L⁻¹ en routine. Pour l'expérimentation, les milieux Chée & Pool (Chée & Pool, 1987) et Anderson's Rhododendron (Anderson, 1984) sont testés. Le pH des milieux est ajusté à 5,80±0,05 avec du NaOH (1 N) ou du HCl (1 N). Les régulateurs de croissance ainsi que le thiosulfate d'argent (STS), pouvant modifier le pH, sont ajoutés avant l'ajustement de ce dernier. La structure de gel est obtenue en ajoutant de l'agar à raison de 7 g.L⁻¹ avant autoclavage à 120°C, sous pression de 1 bar pendant 20 minutes. Les milieux utilisés au cours de cette étude proviennent de chez Duchefa Biochemie, l'agar de chez Kalys et le saccharose de Sigma-Aldrich.

b. Milieux liquides

Les milieux liquides sont réalisés de la même façon que les milieux solides, mais sans ajouter d'agar. Les milieux sont autoclavés en bouteille, puis versés en conditions stériles sous hotte à flux laminaire dans des boîtes respirantes de type ECO2BOX (Duchefa Biochemie) à raison de 25 mL par boîte pour *C. maritimum* et dans des erlenmeyers de 250 mL avec bouchons respirants pour *L. vulgare*. Les explants sont placés sous agitation continue (90 rpm). Pour *L. vulgare*, ce sont des explants de petite taille qui sont déposés, et dans le cas de *C. maritimum*, ce sont des boutures binodales.

c. Régulateurs de croissance

De manière à augmenter le taux de multiplication, des essais sont réalisés en utilisant des régulateurs de croissance tels que des cytokinines (BAP, TDZ), connues pour activer la division cellulaire et favoriser la croissance et la caulogénèse (Sakakibara, 2006), et des auxines (ANA, AIB, 2,4-D), connues pour entraîner la formation de racines (Woodward *et al.*, 2005). Une gibbérelline, la GA₃, est aussi testée de façon à allonger la taille des entre-

nœuds (Lang et Reinhard, 1961) et faciliter le prélèvement de boutures chez la Criste. Selon l'espèce et les effets recherchés, différentes combinaisons et concentrations sont utilisées. Tous les régulateurs de croissance proviennent de chez Duchefa Biochemie, sauf la BAP qui provient de chez Sigma-Aldrich.

2. Matériel de culture

Les explants sont repiqués dans des tubes en verre de 25x150 mm contenant 10 mL de milieu et sont maintenus en salle de culture à $25\pm 2^{\circ}\text{C}$, avec une photopériode de 16 heures, sous tubes fluorescents (Mazda 58W BRL/840 ; INC/830), avec une intensité lumineuse de $100 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$. Les repiquages se font toutes les 8 semaines. Les plantes sont découpées de façon à isoler des fragments comprenant un bourgeon terminal ou un bourgeon axillaire. Ces fragments, une fois remis sur du milieu vierge, redonneront une nouvelle plante qui sera elle aussi subdivisée par la suite. L'étape de repiquage s'effectue en conditions stériles sous hotte à flux laminaire.

C. Décontamination

La désinfection des explants s'effectue avant introduction de matériel *in vitro* ou entre deux repiquages d'explants rares et visiblement contaminés. C'est une étape importante puisqu'elle conditionne la viabilité des explants. Ceux-ci sont tout d'abord lavés dans de l'eau savonneuse puis rincés à l'eau du robinet. Ils sont ensuite plongés dans de l'éthanol à 70% (v/v) (selon le type d'explant - 1 minute pour les jeunes plantules, 5 pour du matériel adulte et 24 h pour les graines), puis sont plongés dans un bain d'hypochlorite de calcium ($\text{Ca}(\text{ClO})_2$) à 5% (m/v) (selon le type d'explant – 3 minutes pour des jeunes plantules, 5 minutes pour du matériel adulte, 10 minutes pour des graines) et enfin sont rincés dans 3 bains successifs d'eau stérile pendant 5 minutes, le tout sous hotte à flux laminaire.

Afin de décontaminer des explants déjà introduits en conditions *in vitro*, certains antibiotiques sont ajoutés au milieu de culture. Les antibiotiques sont filtrés sur membrane $0,45 \mu\text{m}$, puis $0,22 \mu\text{m}$, avant d'être ajoutés aux milieux déjà autoclavés. La solution Plant Preservative Mixture (PPM) provient de chez Duchefa, les antibiotiques de chez Sigma-Aldrich.

D. Méthode de découpe de la Criste

Les explants peuvent être découpés selon plusieurs modalités, chaque espèce réagissant de façon différente. Le taux de multiplication de certaines espèces peut être fortement influencé par la manière dont la découpe est faite. La découpe doit être précise et franche, afin de conserver le bourgeon intact et de minimiser l'effet de la blessure sur la repousse de l'explant. Dans le but d'augmenter le taux de multiplication, deux types de découpe ont été testés chez *C. maritimum*, transversale et longitudinale.

E. Acclimatation

Les essais préliminaires sont effectués sur des plants âgés de 2 à 3 semaines. Après rinçage des racines, les plantes sont placées dans un mélange terreau : sable : perlite/vermiculite (1 : 1 : 1), à $25\pm 2^\circ\text{C}$, avec une photopériode de 16 heures, sous tubes fluorescents (Mazda 58W BRL/840 ; INC/830). Les plantes étant sujettes à la déshydratation à leur sortie, elles sont placées dans des mini-serres, régulièrement ouvertes de manière à réduire l'humidité ambiante progressivement pendant les 2 premières semaines.

Les essais à échelle industrielle ont été effectués en collaboration avec la SA TecnoSem (Cléder, 29). Les vitroplants suffisamment développés (à partir de 2 à 3 semaines de croissance) sont retirés des tubes et leurs racines nettoyées de façon à retirer toute la gélose. Ils sont ensuite transférés dans des plaques alvéolées (figure 7) et placés dans une salle d'acclimatation sous éclairage artificiel (LED GreenPower - Phillips) à température constante ($25\pm 2^\circ\text{C}$) et photopériode de 16 h. Le support de culture est composé de tourbe brune, blonde, et de fibres de coco (Jiffy Smart). Les vitroplants sont placés dans un environnement à humidité relative proche de 100% durant une semaine (figure 8). Progressivement, ils sont placés dans des conditions d'humidité moindre pendant deux semaines puis sont retirés de l'environnement humide pour être placés à l'air libre sous serre. La quatrième semaine, ils sont transplantés dans des pots de 500 mL dans le même support de culture (Jiffy Smart). La température est constante ($22\pm 3^\circ\text{C}$) et un complément d'éclairage avec des LED (LED GreenPower - Phillips) assure une photopériode de 14 h. Les plantes sont arrosées en moyenne tous les 3 jours, en fonction des besoins.

F. Traitement statistique

Les variances n'étant pas homogènes, les données ont été comparées avec le test de Kruskal-Wallis.

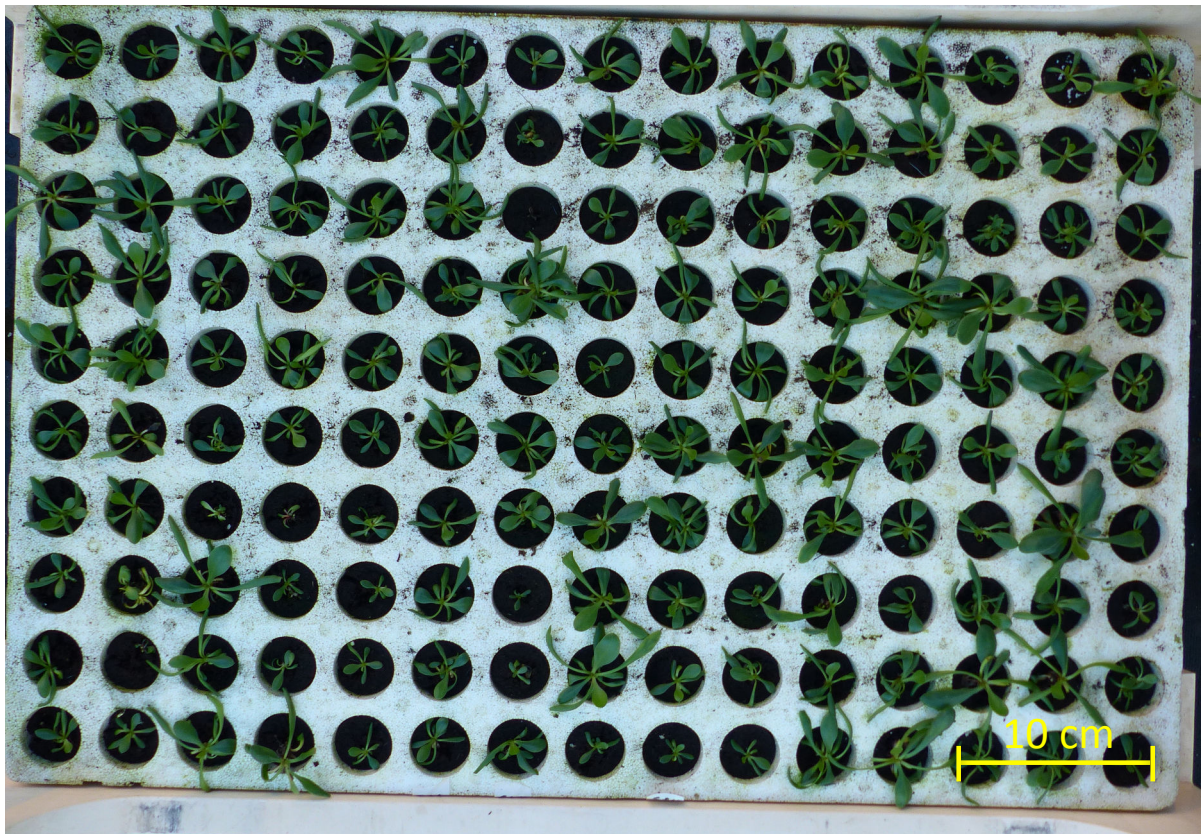


Figure 7 : Plaque de semis 150 trous de *L. vulgare*, une semaine après acclimatation.



Figure 8 : Salle d'acclimatation professionnelle. L'éclairage est assuré par des LEDs dédiés à l'horticulture.

III. RESULTATS

A. Décontamination

Le protocole de décontamination décrit permet d'éviter l'introduction d'agents pathogènes lors de la mise en culture *in vitro* de graines. Pour les trois espèces, 20% du matériel introduit étant exempté de pathogènes, ce qui a permis d'initier les cultures.

Des contaminations ont été observées en milieu liquide, notamment pour la Criste marine et la Lavande de mer (voir figure 9). Les deux espèces semblaient contaminées par le même type de bactérie (Bacille, type Gram -), et qui n'est apparue que dans les cultures liquides. Après nettoyage des explants par bains successifs dans l'éthanol et l'hypochlorite de calcium, les explants sont replacés en milieu liquide, avec différents antibiotiques (tableau 1). De toutes les associations et concentrations testées, une seule s'est avérée efficace, permettant de stopper la croissance des pathogènes : un mélange de céfotaxime à 0,3 g.L⁻¹ et de PPM à 0,04%.

Tableau 1 : Antibiotiques et concentrations testés dans les milieux de décontamination.

Antibiotique	Concentration (g.L ⁻¹)	+ PPM (0,04% v/v)
Vancomycine	0,6	
<u>Carbenicilline</u>	0,3	0,3
<u>Céfotaxime</u>	0,3	0,3

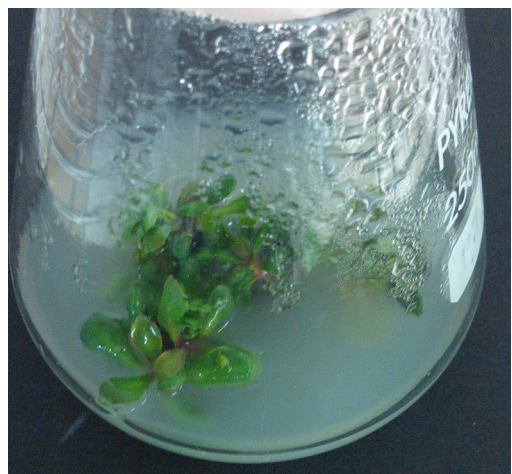


Figure 9 : Contamination en milieu liquide (trouble) avec *L. vulgare*.

B. Culture *in vitro* de *Limonium vulgare*

Sur milieu de base (milieu dépourvu de régulateurs de croissance), la Lavande de mer génère spontanément des pousses feuillées au niveau de son appareil souterrain (figure 10), dont le nombre varie grandement (entre 4 et 8 après 6 semaines de culture). Cependant, leur taille et leur stade de développement varie grandement d'une pousse à l'autre, rendant les explants qui en sont issus hétérogènes.

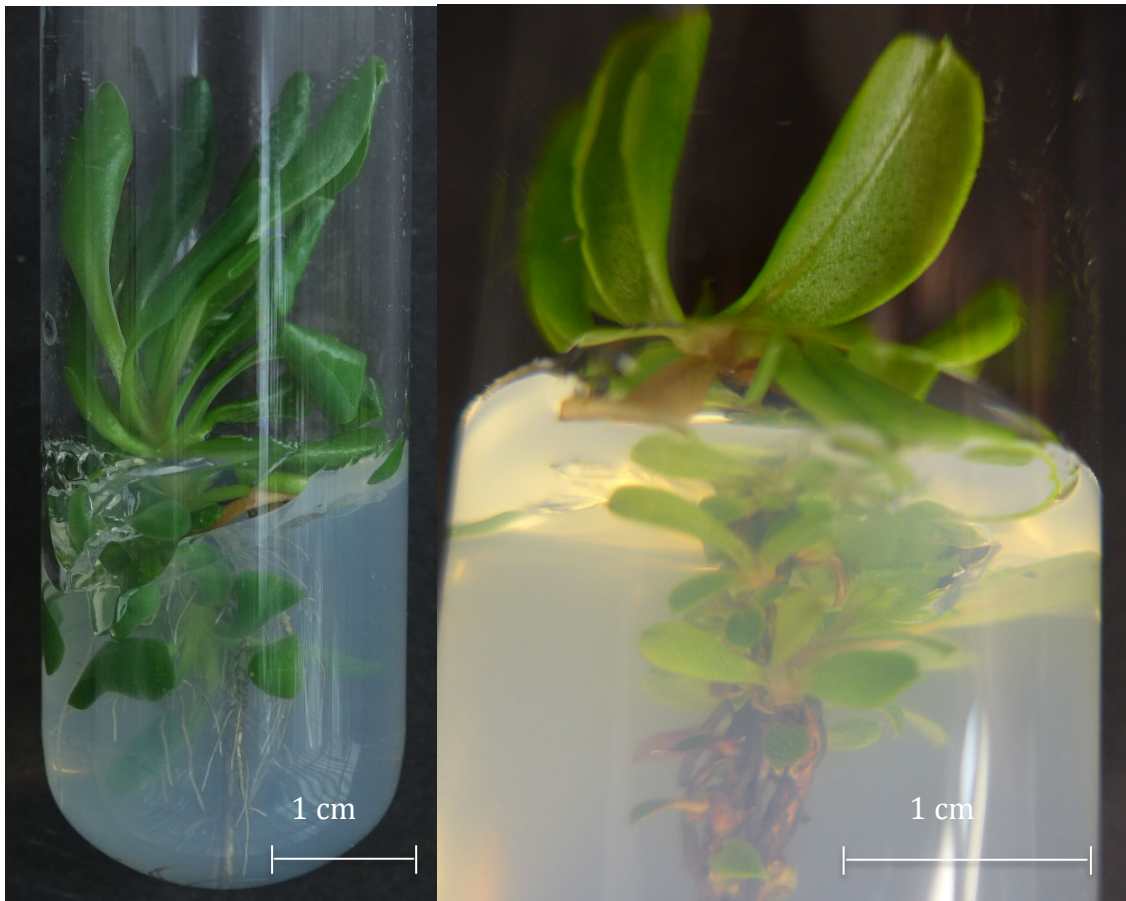


Figure 10 : *Limonium vulgare* en conditions *in vitro*, sur milieu de base après 5 semaines de culture.

1. Effet de la BAP, de la découpe et du milieu liquide

Afin d'évaluer l'influence de la BAP sur la multiplication de *L. vulgare*, plusieurs clones ont été repiqués sur du milieu MS30 avec plusieurs concentrations de BAP sur milieu solide et liquide. Les plantes ont fait l'objet d'observations pendant 8 semaines.

L'utilisation de trois concentrations différentes de BAP (1, 0,5 et 0,1 mg.L⁻¹) a révélé deux réponses différentes. L'utilisation de 1 mg.L⁻¹ de BAP permet d'obtenir une multiplication intense avec la formation d'une structure centrale solide recouverte d'un grand nombre de pousses feuillées, autour de 30 par fragment (figure 11 A-B). Techniquement, la séparation des explants est difficile mais compte tenu de leur très grand nombre, le taux de multiplication reste très élevé (aux alentours de 15 toutes les 6 semaines).

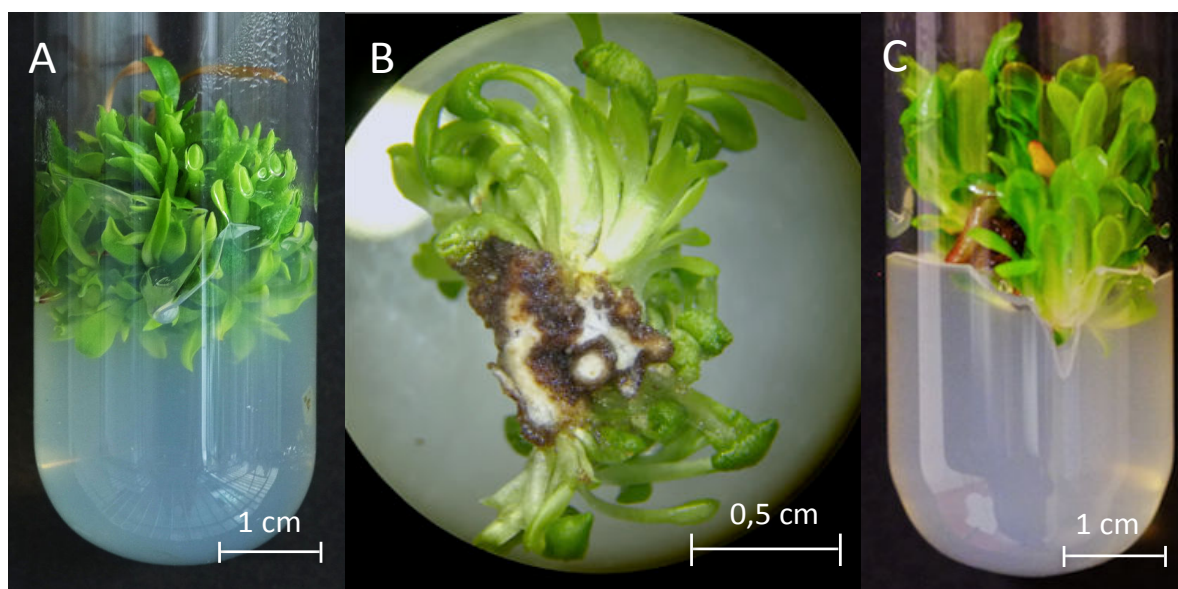


Figure 11 : A : *L. vulgare* après 5 semaines de culture sur milieu BAP 1 mg.L⁻¹ ; B: Coupe de *L. vulgare* après 5 semaines de culture sur BAP 1 mg.L⁻¹ ; C : *L. vulgare* sur milieu BAP 0,5 mg.L⁻¹ .

Lorsque la BAP est présente en moins grande quantité (à 0,1 ou 0,5 mg.L⁻¹), la production de pousses feuillées est moins intense mais elles possèdent de plus grandes feuilles (figure 11 C) et développent parfois un système racinaire, ce qui n'est jamais observé à la concentration de 1 mg.L⁻¹. La séparation des nouveaux explants s'en trouve facilitée, avec un taux de multiplication de l'ordre de 8 après 6 semaines de culture.

Après 8 semaines de culture, les pousses feuillées sont prélevées avec ou sans cal basal (figure 12). Elles sont repiquées sur un milieu MS30, sans régulateurs de croissance. Les pousses repiquées sans base ne s'enracinent pas et sont toutes mortes après 3 semaines, tandis que celles repiquées avec une base développent des racines après une dizaine de jours et en possèdent toutes après 3 semaines de culture, les plus tardives provenant des milieux à plus forte concentration en BAP.

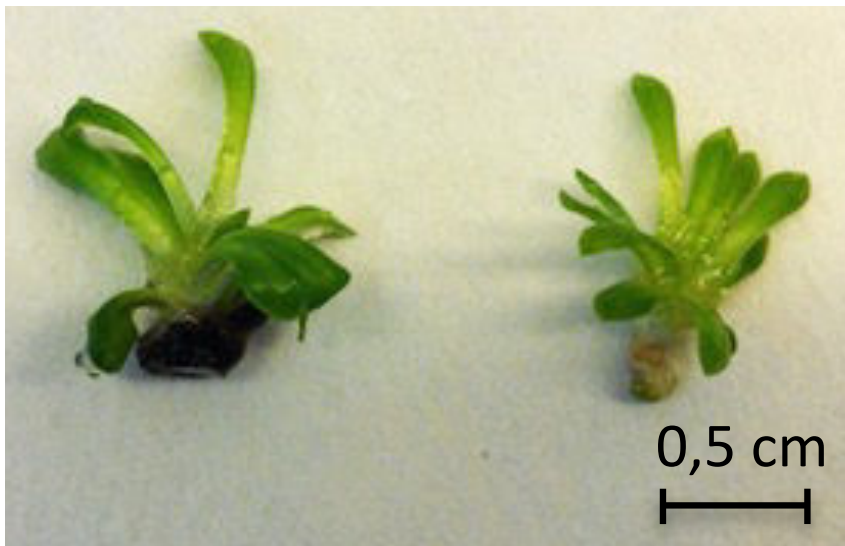


Figure 12 : Explants de *L. vulgare* issus de milieu BAP 1 mg.L^{-1} . A gauche, avec base; à droite, sans base.

Les mêmes concentrations en BAP ont été testées en milieu liquide. Les plants prennent, comme précédemment, la forme de cals sphériques recouverts de pousses feuillées, mais en nombre inférieur (environ 8 pousses feuillées par individu pour 1 mg.L^{-1} de BAP) comparativement au milieu solide. Les cals sont moins compacts que sur milieu liquide, ce qui facilite la séparation des pousses feuillées. Néanmoins, les tissus formés en milieu liquide sont en état d'hyperhydricité : les limbes sont très épais. De la même façon, les explants qui en sont issus sont moins conformes, plus de la moitié présentent un développement très désorganisé (absence de racines, développement de cals). Par ailleurs, des problèmes de contamination ont rendu difficile la multiplication avec cette nature de milieu (cf. p.23).

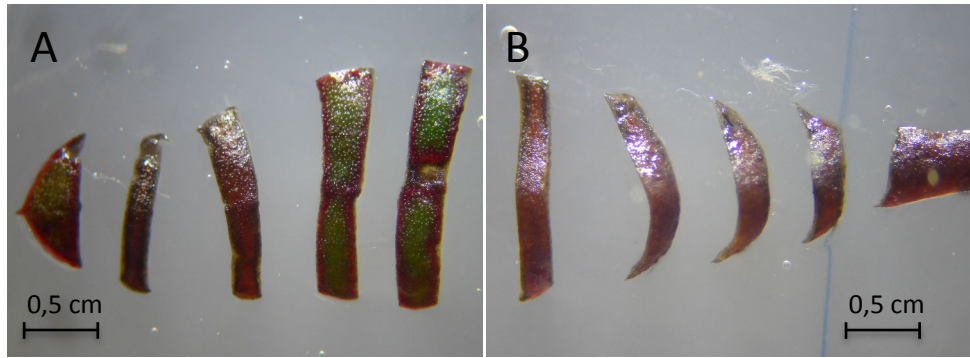


Figure 13 : Limbe découpé transversalement de *L. vulgare* après une semaine.
A : Photopériode de 16h ; B : Obscurité.

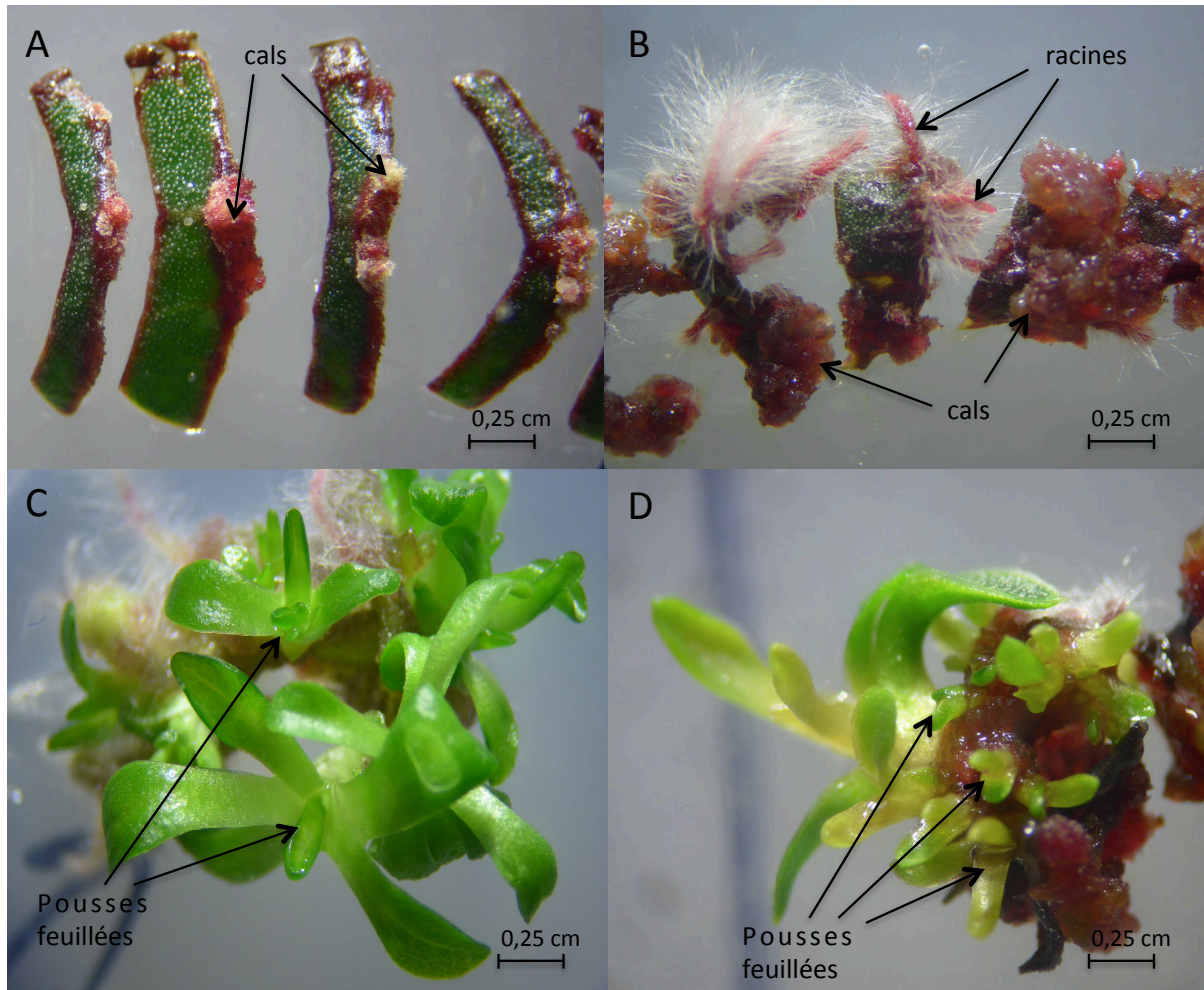


Figure 14 : Limbe découpé transversalement de *L. vulgare*; A : après deux semaines, sur milieu callogène; B : après 30 jours, sur milieu rhizogène ; C : après 30 jours, sur milieu caulogène ; D : Fragment racinaire de *L. vulgare* après 30 jours, sur milieu caulogène

2. Effet de gammes croisées BAP/ANA

Une étude a été menée afin d'établir la sensibilité de *L. vulgare* à des concentrations croisées d'ANA et de BAP. Des fragments de feuilles et de racines de trois clones de *L. vulgare* ont été placés sur des boîtes de Petri contenant du MS30 avec des combinaisons d'ANA et de BAP, à la lumière ou à l'obscurité. Les fragments sont placés de manière à conserver leur ordre d'origine et sont espacés de 5 mm.

Un rougissement intense des parties foliaires est observé pour les boîtes exposées à la lumière (figure 13 A-B). À partir de la deuxième semaine, la formation de cals sur certaines boîtes peut être observée (figure 14 A). Les relevés présentés sur les tableaux 2 à 7 montrent les résultats obtenus après 30 jours.

Une formation de cals proportionnelle à la quantité d'ANA utilisée peut être observée. Au niveau des feuilles (tableau 2), plus la quantité d'ANA est grande, plus la prolifération de cals est forte. Cependant, cette observation n'est valable que lorsque les quantités de BAP utilisées sont faibles : en effet, au delà de 0,5 mg.L⁻¹ de BAP, la prolifération de cals est plus faible quelle que soit la quantité d'ANA. Pour les explants racinaires (tableau 3), la même tendance est visible avec des cals de plus petite taille.

Tableau 2 : Intensité de la callogénèse sur fragments foliaires de trois clones après 30 jours. * : faible callogénèse; **** : callogénèse forte

BAP (mg/L)	ANA (mg/L)	C1	C2	C3
0	0			
	0,1	**		**
	0,5	****	****	***
	1	****	****	
0,1	0			*
	0,1	*	**	*
	0,5	***	***	**
	1	****	****	**
0,5	0			
	0,1	**	**	
	0,5	**	****	
	1	**	*	***
1	0	*	**	*
	0,1		*	*
	0,5	*	*	
	1	**	**	*

Tableau 3 : Intensité de la callogénèse sur fragments racinaires de trois clones après 30 jours. * : faible callogénèse; **** : callogénèse forte

BAP (mg/L)	ANA (mg/L)	C1	C2	C3
0	0			
	0,1	**	**	**
	0,5	****	****	***
	1	****	****	*
0,1	0	*		**
	0,1	***	***	**
	0,5	**	***	***
	1	****	****	***
0,5	0	**	*	****
	0,1	***	***	***
	0,5	**	**	*
	1	***	***	***
1	0	**	**	***
	0,1		**	****
	0,5	**	**	**
	1	***	****	***

Tableau 4 : Intensité de la rhizogénèse sur fragments foliaires après 30 jours. * : Pas de rhizogénèse, poils absorbants; ** : rhizogénèse, poils absorbants

BAP (mg/L)	ANA (mg/L)	C1	C2	C3
0	0			
	0,1	**	*	*
	0,5	*	*	**
	1	*		
0,1	0	*		
	0,1	*	*	*
	0,5	*	*	*
	1	*	*	
0,5	0	*		
	0,1			
	0,5	*	*	*
	1	*	*	
1	0			
	0,1			
	0,5	*	*	*
	1	*	*	

Tableau 5 : Intensité de la rhizogénèse sur fragments racinaires après 30 jours. * : Pas de rhizogénèse, poils absorbants; ** : rhizogénèse, poils absorbants

BAP (mg/L)	ANA (mg/L)	C1	C2	C3
0	0			
	0,1	**	*	**
	0,5		*	*
	1			**
0,1	0	*		*
	0,1	*	*	*
	0,5	*	*	*
	1	*	*	*
0,5	0	*		*
	0,1	*	*	
	0,5	*	*	*
	1	*	*	*
1	0	*		*
	0,1		*	*
	0,5	*	*	*
	1	*	*	*

Tableau 6 : Milieux caulogènes avec fragments foliaires de *L. vulgare* après 30 jours. * : caulogénèse

BAP (mg/L)	ANA (mg/L)	C1	C2	C3
0	0			
	0,1			
	0,5			
	1			
0,1	0			
	0,1	*	*	
	0,5	*	*	*
	1	*	*	
0,5	0			*
	0,1			
	0,5	*	*	
	1	*	*	
1	0			
	0,1			
	0,5		*	
	1	*	*	

Tableau 7 : Milieux caulogènes avec fragments racinaires de *L. vulgare* après 30 jours. * : caulogénèse

BAP (mg/L)	ANA (mg/L)	C1	C2	C3
0	0			
	0,1			
	0,5			
	1			
0,1	0			
	0,1			
	0,5			
	1			
0,5	0			
	0,1			*
	0,5			
	1			
1	0			
	0,1			
	0,5			
	1			

Chez deux des trois clones, l'ANA a permis, seule, une rhizogénèse (figure 14 B) (tableau 4 et 5). La formation de poils absorbants a été, selon les clones, observée sur quasiment chaque milieu contenant des hormones, quel que soit le matériel de départ (feuille ou racine) considéré.

En présence de BAP et d'ANA et chez les trois clones, les feuilles ont développé des pousses feuillées (figure 14 C) (tableau 6). À l'exception d'une boîte, la combinaison des deux hormones est nécessaire à la néoformation. Chaque fragment porte, après 6 semaines de culture, environ 5 pousses feuillées pouvant être repiquées. Pour chaque feuille découpée, le nombre d'explants généré est ainsi proche de la cinquantaine. Avec les racines comme matériel de départ, la néoformation de bourgeons a été observée sur une boîte (figure 14 D) (tableau 7).

3. Préparation à l'acclimatation - Enracinement de *L. vulgare*

Le sevrage nécessite au préalable l'initiation de racines. Afin d'assurer une acclimatation rapide et de limiter les pertes lors de la multiplication de *L. vulgare*, l'effet d'une auxine a été étudié sur les explants sortant de milieu supplémenté en BAP. Les explants de 6 clones avec et sans base sont repiqués sur milieu MS30 avec trois concentrations d'AIB (0,1, 0,5 et 1 mg.L⁻¹) et ont été suivis pendant 8 semaines.

L'ajout d'auxine dans le milieu n'a pas permis l'enracinement ni la survie des explants sans cal basal. Cet apport d'AIB n'a pas non plus accéléré l'apparition des premières racines sur les boutures avec cal basal, qui sont apparues après 2 semaines de culture, toutes conditions confondues. Les clones 2, 4, et 5 présentent autour d'une dizaine de racines après 5 semaines de croissance, sans influence de l'AIB. Le clone 6 en développe moins, autour de 3 indépendamment de la quantité d'auxine.

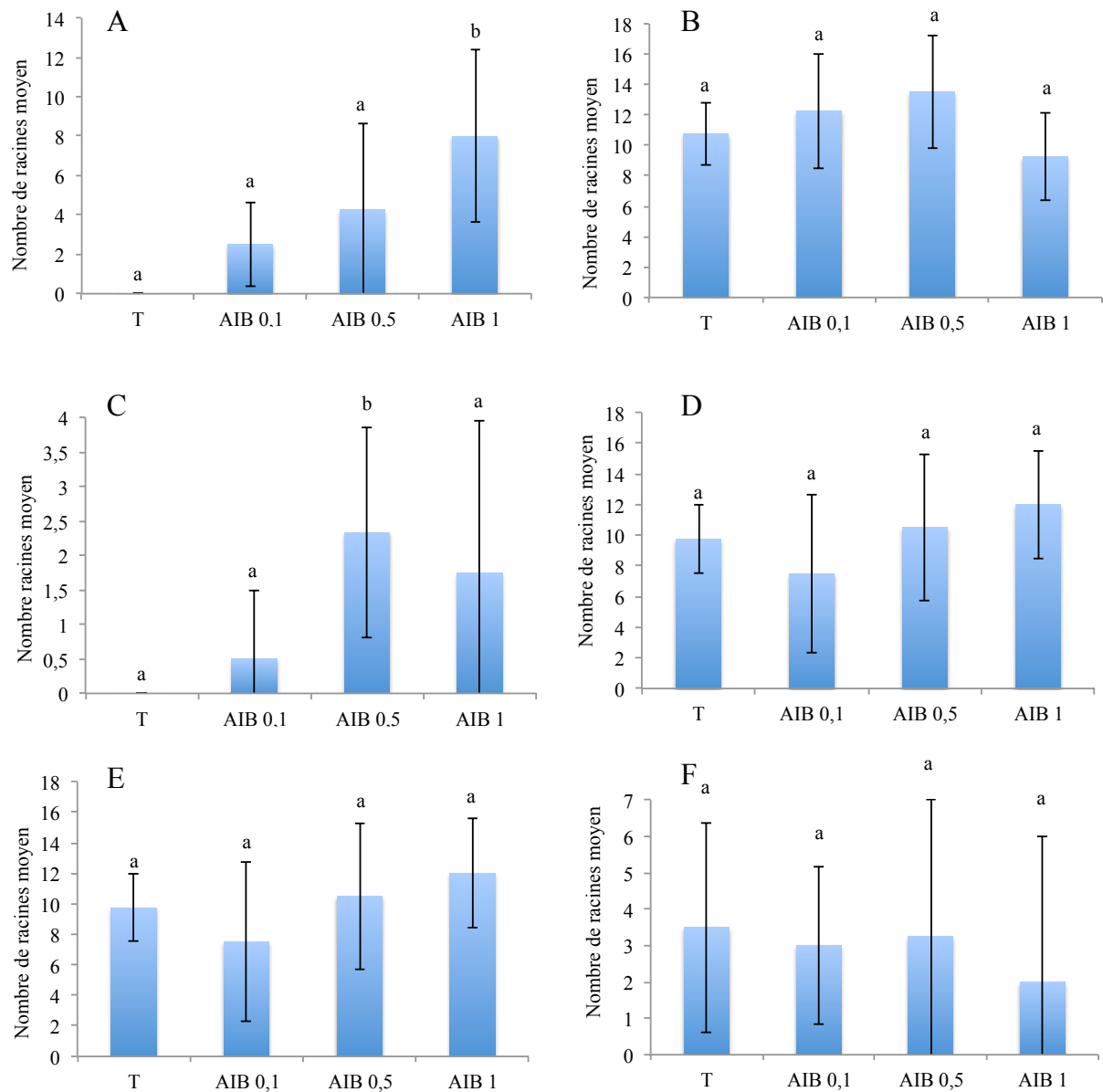


Figure 15 : Nombre de racines chez *L. vulgare* selon différentes concentrations d'AIB, après 5 semaines de croissance. A : Clone 1 ; B : Clone 2 ; C : Clone 3 ; D : Clone 4 ; E : Clone 5 ; F : Clone 6. (P<0,05 ; n = 24)

Après une mise en commun des données, c'est à dire sans prendre en compte l'effet clone, il n'existe statistiquement aucune différence quant au nombre de racines entre les différentes conditions testées. Néanmoins, après 5 semaines de culture, 2 des 6 clones ont vu leur nombre de racines influencé par la quantité d'auxine (figure 15). Sans AIB, ceux-ci ne développent pas de racines avant la 7^e semaine. Le clone c1 développe un nombre de racines augmentant avec la quantité d'AIB, avec un maximum de 8 racines après 5 semaines avec 1 mg.L⁻¹ d'AIB. Le clone c3 développe plus de racines sur un milieu contenant 0,5 mg.L⁻¹ d'AIB, avec en moyenne 2,5 racines.

Cependant, ces résultats sont à nuancer compte tenu de la grande variabilité des résultats.

C. Culture *in vitro* de *Crithmum maritimum*

En culture sur milieu de base, la Criste marine s'enracine et produit 3 nœuds après 6 semaines. La faible distance entre eux rend leur séparation difficile et peut occasionner des blessures au niveau des bourgeons (figure 16 A-B).

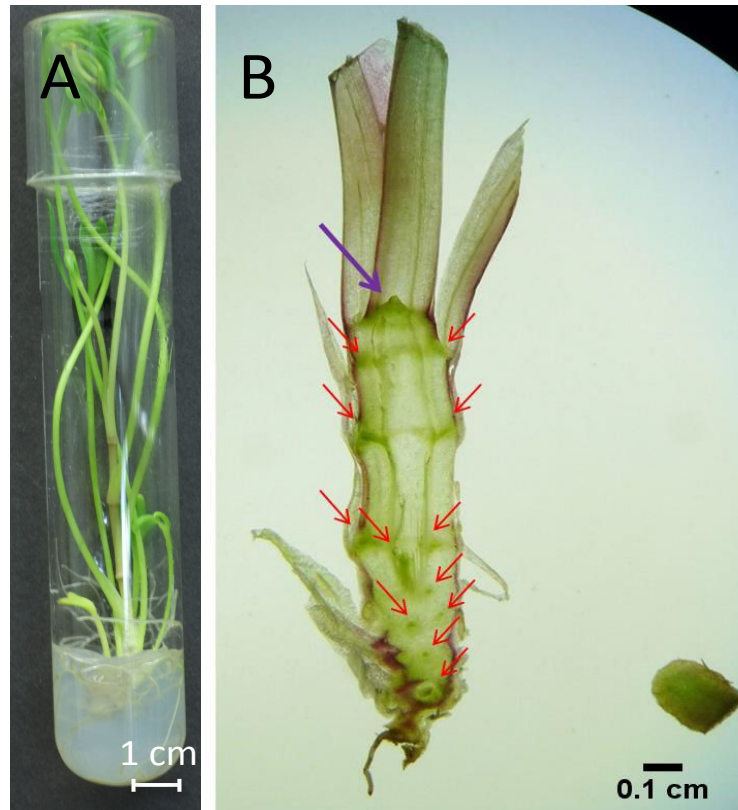


Figure 16 : A : *C. maritimum* en conditions *in vitro*, en tube sur milieu de routine après 5 semaines de culture ; B : Coupe transversale d'un explant de *C. maritimum*. Les flèches rouges indiquent les méristèmes axillaires, la violette le méristème apical.

1. Optimisation de la croissance de *C. maritimum*

a. Influence de la composition du milieu

Afin d'évaluer l'influence du milieu de culture sur la croissance de *C. maritimum*, des explants de plusieurs clones ont été repiqués sur différents milieux : Anderson's Rhododendron, Chée & Pool et Murashige & Skoog. Ce dernier a été supplémenté avec trois concentrations différentes de saccharose : 10, 20 et 30 g.L⁻¹. Les deux autres l'ont été avec 30 g.L⁻¹ de saccharose. Les clones ainsi que l'origine du nœud repiqué (sa position initiale au niveau de la plante mère) ont été suivis. Les explants ont fait l'objet d'observations pendant 5

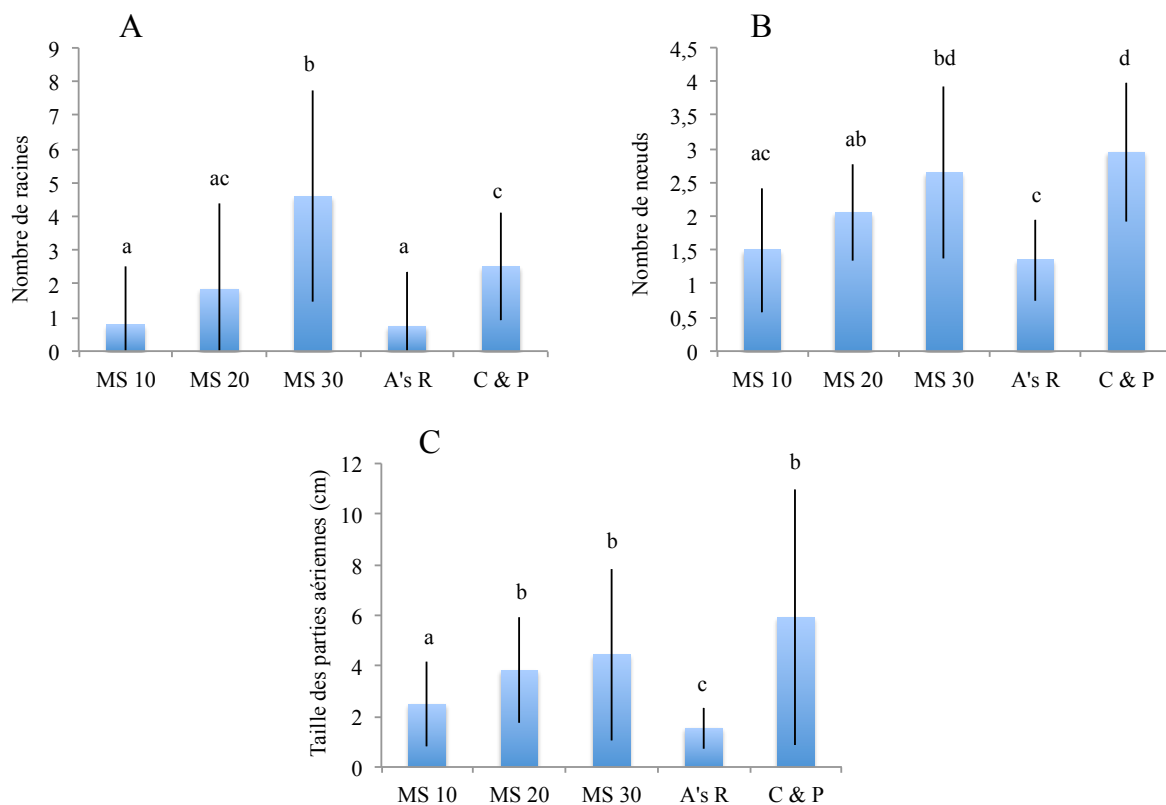


Figure 17 : Développement des vitroplants de *C. maritimum*, sur différents milieux après 5 semaines de croissance. MS 10, 20 et 30 : Murashige et Skoog ; 10, 20 et 30 g.L⁻¹ de saccharose ; A's R : Anderson's Rhododendron ; C & P : Chée & Pool. A : Nombre moyen de racines ; B : Nombre moyen de nœuds ; C : Hauteur. (P<0,05 ; n = 30)

semaines. Plusieurs paramètres ont été mesurés : le nombre de nœuds, de racines, ainsi que la taille des parties aériennes.

La composition du milieu influe sur les trois paramètres mesurés (figure 17). Concernant le nombre de racines, le milieu MS30 est le milieu le plus favorable à la formation racinaire avec une moyenne de 5 racines (figure 17 A), devant les milieux Chée & Pool et MS20, qui permettent le développement de 3 racines en moyenne. Les plants cultivés sur MS10 et Anderson's Rhododendron ont développé en moyenne moins de 2 racines après 5 semaines de culture.

Le nombre de nœuds est aussi influencé par la nature du milieu (figure 17 B). Les plants sur MS30 et Chée & Pool, avec respectivement 2,4 et 2,9 nœuds en moyenne sont ceux qui en possèdent le plus. Sur MS20, les plants en développent en moyenne 2, tandis que ceux sur Anderson's Rhododendron et MS10 sont ceux qui en développent le moins, avec une moyenne autour de 1,5 nœuds par individu après 5 semaines de culture.

La taille des plantes est elle aussi influencée par la composition du milieu de culture (figure 17 C). Les milieux Chée & Pool, MS30 et MS20 sont les milieux favorisant le développement de plus grandes plantes, avec des tailles moyennes respectives de 6, 8, 5,1 et 5,2.

À partir de la mesure de ces mêmes paramètres, un tri des données selon l'origine du nœud repiqué a été effectué. Quel que soit le milieu considéré l'apex forme le plus grand nombre de racines (figure 18 A), le plus grand nombre de feuilles (figure 18 B) et le vitroplant de plus grande taille (figure 18 C). Pour tous les autres nœuds, les résultats sont similaires quel que soit le paramètre pris en considération. Les plants issus des apex présentent par ailleurs un aspect plus robuste, avec une croissance plus rapide, et se développent avec une avance de quelques jours.

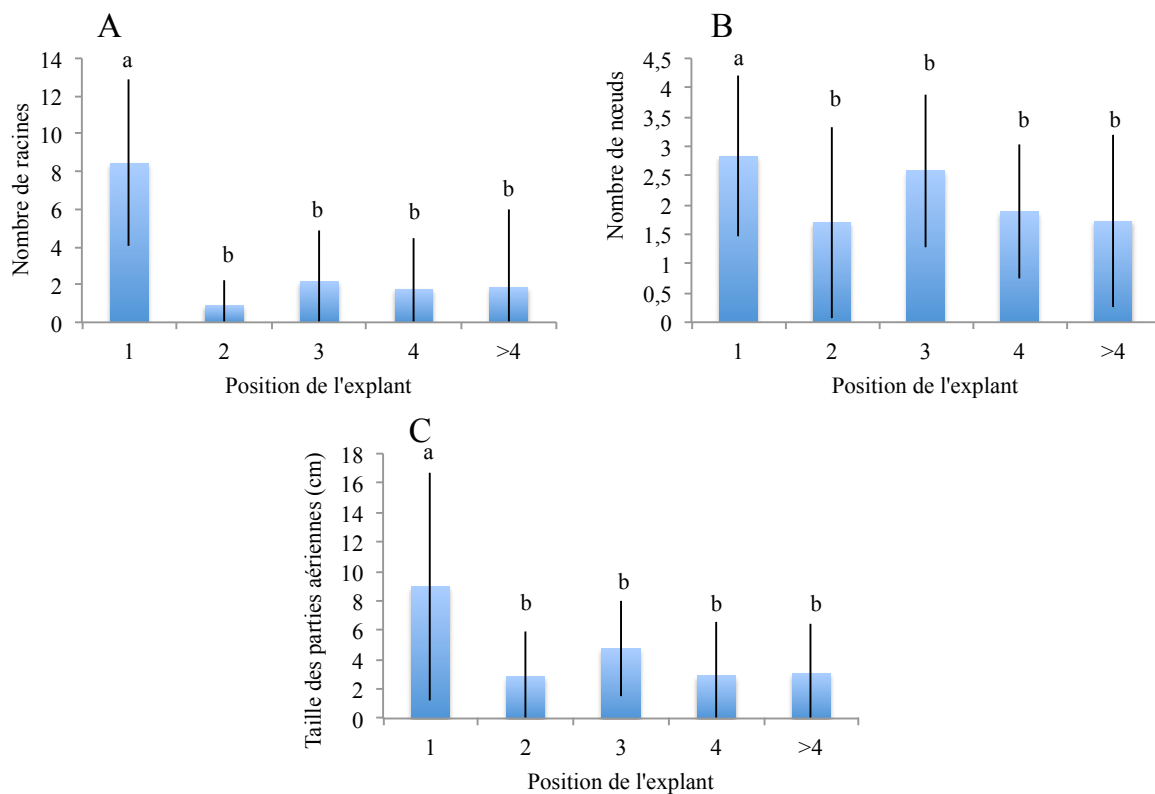


Figure 18 : Développement des vitroplants de *C. maritimum* en fonction de l'origine de l'explant après 5 semaines de croissance. 1 : Apex; 2 : Second nœud; 3 : Troisième nœud; 4 : Quatrième nœud; >4 : Nœuds au delà du quatrième nœud. A : Nombre moyen de racines ; B : Nombre moyen de feuilles ; C : Taille des parties aériennes. ($P < 0,05$)

b. Influence de la nature physique du milieu

L'objectif de cette étude est d'évaluer les potentialités offertes par la culture en milieu liquide. Pour ce faire, des boutures binodales de deux clones différents ont été repiquées sur milieu solide, et en milieu liquide en boîte respirante, à raison de 4 boutures par boîte. Les boîtes de milieu liquide ont ensuite été mises sous agitation (70 rpm) et dans les mêmes conditions d'éclairage et de température que décrites précédemment. Après 4 semaines de culture, le nombre de nœuds et de feuilles a été compté, et les masses fraîche et sèche des racines et des feuilles ont été mesurées.

La nature du milieu n'influe pas sur le nombre de nœuds pour le clone 1, avec environ 6 nœuds produits après 4 semaines de culture (Figure 19). Pour le clone 2, un doublement du nombre de nœuds moyen en milieu liquide est observé, pour arriver à une moyenne de 4,2.

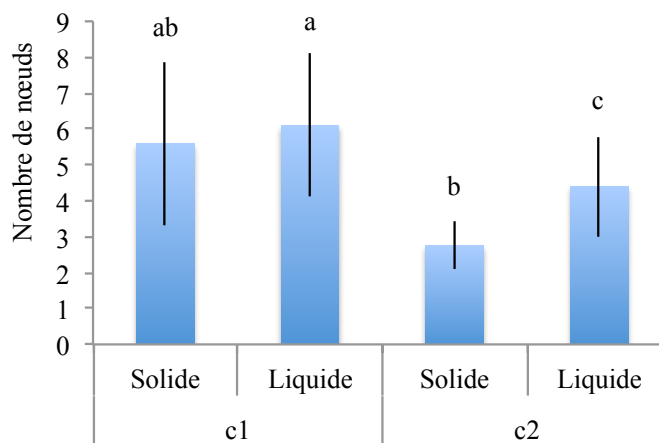


Figure 19 : Nombre moyen de nœuds chez deux clones de *C. maritimum* selon la nature du milieu. ($P < 0,05$; $n = 30$)

Les mesures des masses fraîches des feuilles montrent une grande différence entre les plantes cultivées en milieu liquide et les plantes cultivées en milieu solide (figure 20 A) : en effet, pour le clone 1, une multiplication de la masse des parties aériennes par 1,7 en milieu liquide a été observé. Pour le clone 2, le milieu liquide permet le développement d'une masse fraîche 3,5 fois plus importante comparé au milieu solide.

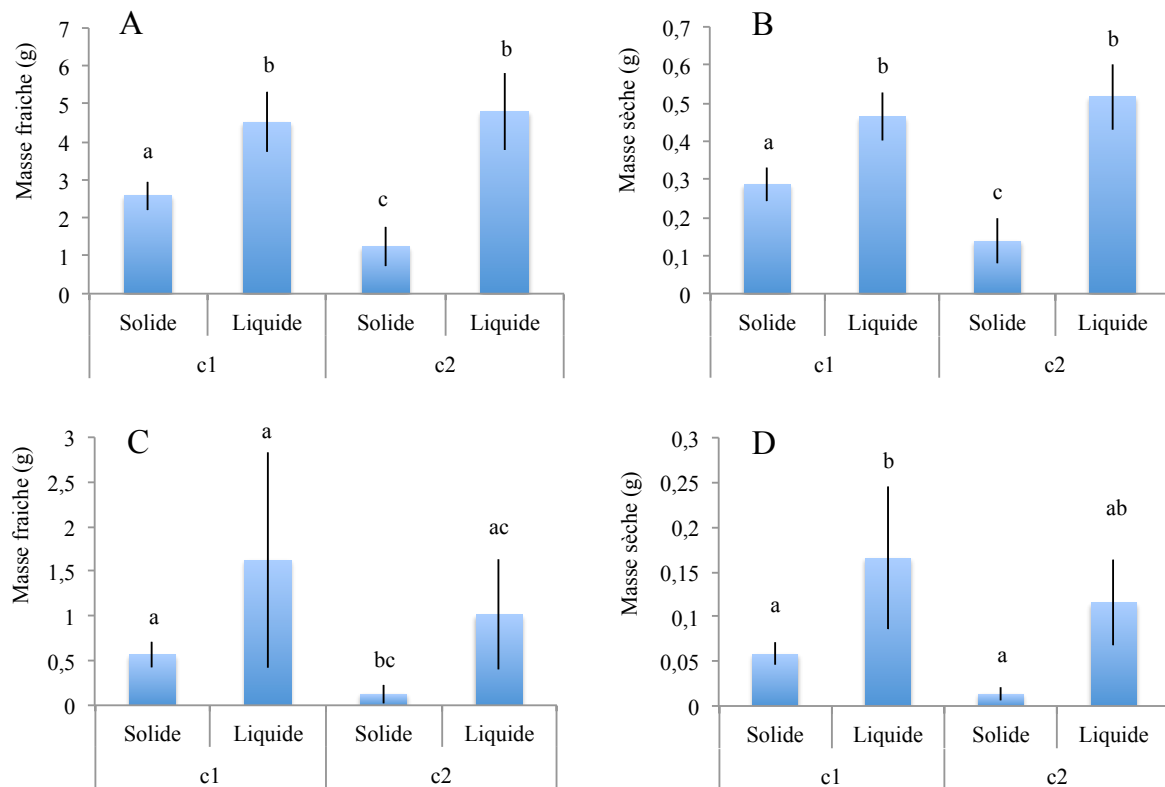


Figure 20 : Masses des parties foliaires et racinaires de *C. maritimum* cultivé sur milieu liquide et solide. A : Masse fraîche moyenne des parties foliaires ; B : Masse sèche moyenne des parties foliaires ; C : Masse fraîche moyenne des parties racinaires ; D : Masse sèche moyenne des parties racinaires. (P<0,05 ; n = 30)

Ce gain de masse se retrouve une fois les échantillons lyophilisés (figure 20 B) : le même gain de masse en faveur du milieu liquide est retrouvé pour les clones 1 et 2 (respectivement 1,6 et 3,7).

Concernant les racines, l'examen des masses fraîche et sèche (figures 20 C et D) révèle que la croissance en milieu liquide entraîne le développement d'une biomasse racinaire plus grande qu'en milieu solide. Cependant, la grande variabilité dans les groupes ne permet pas de voir de différences significatives.

2. Multiplication de *C. maritimum*

c. Effet de la coupe

Les tiges de Criste sont découpées de deux façons, selon l'axe transversal ou l'axe longitudinal, puis sont repiquées en boîte de Petri. Dans le premier cas, les nœuds sont séparés en découpant transversalement l'axe principal (figure 21 A), et chaque fragment placé sur un nouveau milieu solide sur sa face basale. Dans le second cas, la plante est découpée selon le plan longitudinal (figure 21 B), puis les nœuds sont séparés selon le plan transversal. Cette technique prends plus de temps mais permet de séparer plus facilement les nœuds rapprochés.

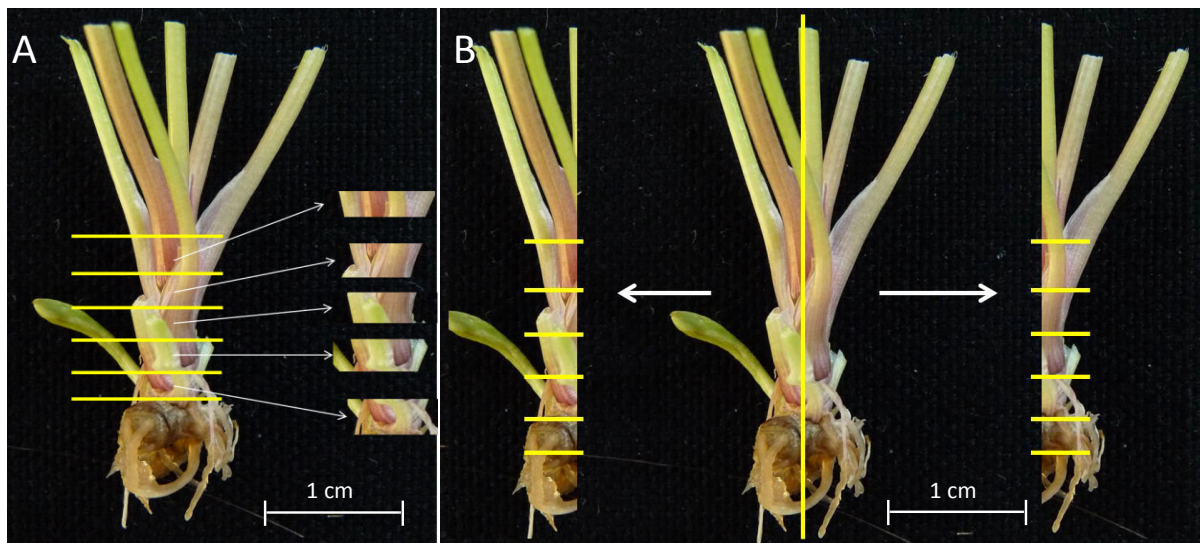


Figure 21 : A: Découpe transversale d'un explant de *C. maritimum*. B : Découpe longitudinale puis transversale d'un explant de *C. maritimum*

Quelle que soit la modalité de découpe, les premières pousses feuillées apparaissent au bout du 6^e-7^e jour. Même si le bourgeon apical se développe plus vite que les autres (cf p.34), l'âge de la plante mère ne semble pas influencer sur la capacité de croissance de ces bourgeons jusqu'à 200 jours. Les plantes obtenues dans ces boîtes de Petri ont des entre-nœuds plus allongés comparativement à ceux obtenus en tube, et jusqu'à 12 après une longue période (figure 22). Lorsque la découpe a été faite selon le plant transversal, après 5 semaines de croissance, 5 ± 1 nœuds pouvant être repiqués sont obtenus. Une coupe selon le plan longitudinal permet de séparer plus aisément les nœuds très rapprochés sur le plant mère. Leur croissance en boîte de Petri permet d'obtenir en moyenne 4 ± 1 nœuds valorisables après 5 semaines de croissance.



Figure 22 : *C. maritimum* en boîte de Petri, après 12 semaines de croissance. Les flèches rouges montrent les nœuds pouvant être repiqués.

d. Effet des régulateurs de croissance

i) Effet croisé de la BAP et de l'ANA.

Des boutures uninodales de Criste ont été repiquées sur MS30 supplémenté d'une combinaison de BAP et d'ANA.

Deux conditions permettent d'améliorer la prolifération de bourgeons, à 1 et 3 mg.L⁻¹ de BAP supplémenté de 0,1 mg.L⁻¹ d'ANA (tableau 8). Dans ces deux cas, l'émergence de 3 pousses feuillées par bouture est observée, contre seulement une sur toutes les autres conditions. Néanmoins dans ces deux conditions les bourgeons se développent plus tard que dans les autres, où les boutures s'enracinent après un mois de culture. Les autres conditions présentent entre 22 et 40% de tronçons qui s'enracinent.

Tableau 8 : Influence de la BAP et de l'ANA sur la production de bourgeons et de racines chez *C. maritimum*

BAP (mg.L ⁻¹)	ANA (mg.L ⁻¹)	Pousses feuillées par tronçon	Bourgeon initié à 10 jours (%)	Enracinement à 14 jours (%)
0	0	1±0	60	35
0,1	0,01	1±0	50	40
0,1	0,1	1±0	60	30
0,1	0	1±0	50	33
0,5	0,5	1±0	70	22
1	0,1	3±1	40	0
3	0,1	3±0	30	0

ii) Effet du thidiazuron

La promotion de la prolifération de bourgeons sur des boutures uninodales de Criste, par l'utilisation de régulateurs de croissance a été étudiée. Des nœuds ont été repiqués en boîte de Petri sur des milieux supplémentés avec différentes concentrations de TDZ, ou sur une gamme croisée de BAP et d'ANA, et ont été suivis pendant 6 semaines. Les concentrations 0,01, 0,05, 0,1 mg.L⁻¹ de TDZ n'ont pas eu d'impact sur le nombre de pousses feuillées développées comparativement aux boîtes témoin sans TDZ. Dans ces conditions,

quelques boutures s'enracinent, et tous présentent une pousse feuillée après 20 jours de croissance. À des concentrations plus fortes, le nombre de pousses feuillées par tronçon augmente mais l'enracinement est inexistant. Avec 1 mg.L^{-1} de TDZ, chaque tronçon développe en moyenne $3,5 \pm 0,5$ pousses feuillées après 20 jours. Celles-ci sont morphologiquement différentes de celles obtenues sur les milieux évoqués précédemment : les feuilles plus charnues, plus blanches, et leur base renflée évoque le fenouil (figure 23). Le maximum de pousses feuillées atteint 5 par tronçon.

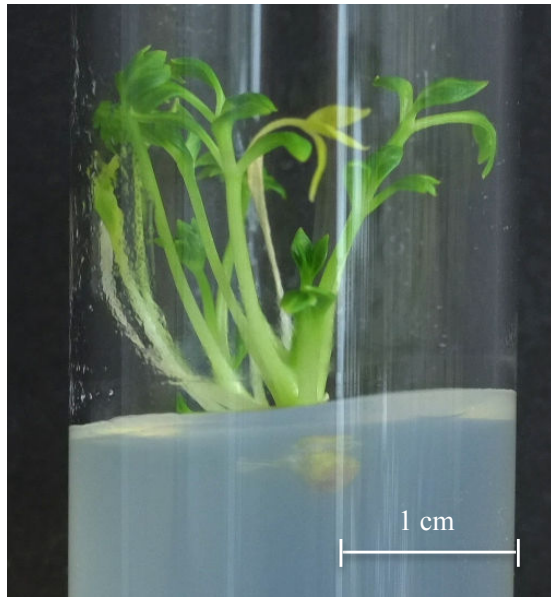


Figure 23 : *C. maritimum* après 30 jours de croissance sur milieu TDZ 1 mg.L^{-1} .

Au delà de 1 mg.L^{-1} , le TDZ ne permet pas d'obtenir plus de pousses feuillées par bouture, et leur base bulbeuse est encore plus marquée. A 2 mg.L^{-1} , en moyenne $3 \pm 0,5$ pousses feuillées par tronçon sont observées.

Aux concentrations de 5 et 10 mg.L^{-1} , il y a apparition de cals dès le dixième jour au niveau des tissus blessés. Ces cals sont de couleur verte, et cessent de se développer après 4 semaines de croissance.

iii) Effet d'une gamme croisée de BAP/2,4-D et de la découpe

Afin d'améliorer les taux de multiplication de la Criste en culture *in vitro* une approche destinée à obtenir des embryons somatiques a été initiée. Les tissus découpés (pétiole, limbe,

collet) au scalpel ou à la lame de rasoir sont placés sur milieux complétés d'une gamme croisée de BAP/2,4-D en boîte de Petri, et la réaction des fragments est suivie pendant 8 semaines. Les trois géotypes testés ont réagi de manière similaire à tous les traitements.

De tous les fragments déposés, les tronçons de collet, de la base des pétioles et de la base des limbes sont les plus réactifs. Il y a une rhizogénèse dès la première semaine sur les milieux avec $0,1 \text{ mg.L}^{-1}$ de 2,4-D seul ou avec $0,1 \text{ mg.L}^{-1}$ de BAP, avec des racines qui mesurent entre 0,5 et 2 cm après 20 jours (figure 24 A-B). Les premières racines sont dépourvues de racines secondaires. Sur les milieux contenant plus de BAP, en revanche, aucun développement racinaire durant les 20 premiers jours n'est observé. Passé 6 semaines, les premières racines émergent sur la plupart des tronçons, mais pas au-delà de $0,5 \text{ mg.L}^{-1}$ de 2,4-D.

De la même façon, les zones les plus callogènes sont les tronçons provenant du collet, ainsi que des bases des pétioles et des limbes. À partir d'une concentration de $0,5 \text{ mg.L}^{-1}$ de 2,4-D, on observe le développement de cals de blancs dès la deuxième semaine (figure 25).

Leur forme et leur cinétique de croissance dépendent de la concentration en 2,4-D, indépendamment de celle de BAP. La seule influence visible de la BAP réside dans l'évolution de la couleur du cal : en absence de celle-ci, les cals jaunissent puis brunissent après 6 semaines, tandis qu'en présence de BAP, les cals restent blancs.

L'outil utilisé pour la découpe a eu une influence sur la cinétique de réaction des tissus, pour la callogénèse comme pour la rhizogénèse : en effet, les phénomènes se déclenchent respectivement une semaine et quelques jours plus tôt sur les tronçons découpés à la lame de rasoir comparé aux échantillons découpés au scalpel.

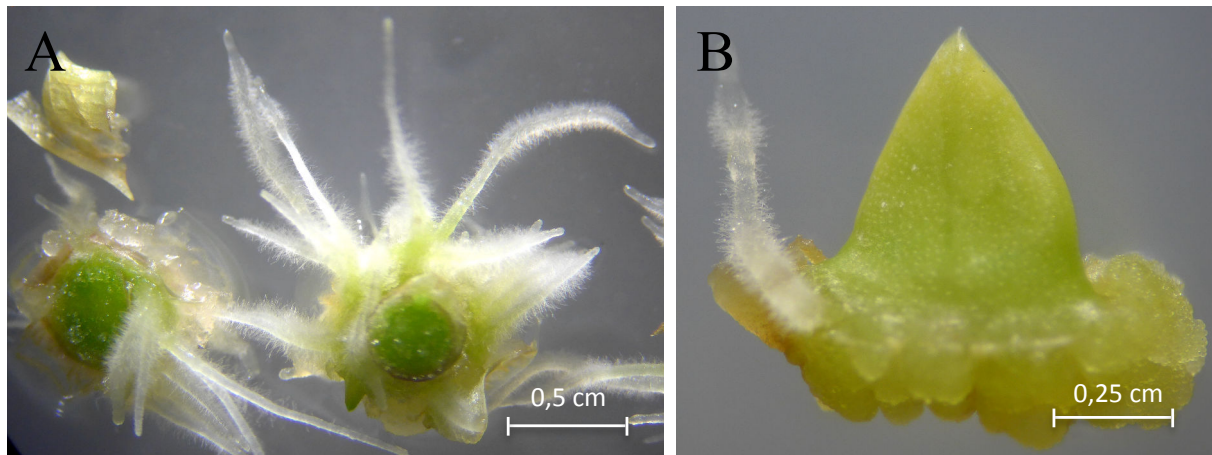


Figure 24 : A : Fragment de collet de *C. maritimum*, après 20 jours de croissance sur milieu rhizogène ; B : Fragment de feuille sur milieu rhizogène après 20 jours de croissance.



Figure 25 : Tronçon de *C. maritimum* en boîte de Petri, après 20 jours de croissance sur milieu BAP $0,1 \text{ mg.L}^{-1}$ et 2,4-D $0,5 \text{ mg.L}^{-1}$.

D. Culture in vitro de *Tripleurospermum maritimum*

La Matricaire maritime (figure 26) présente des taux de multiplication d'environ 12 toutes les 6 semaines de culture, sans régulateurs de croissance. Les plants sont homogènes et conformes au plant mère dans 85% des cas. Laisser les plants croître jusqu'à 12 semaines permet, sans perdre de capacité de croissance pour les nouveaux explants d'obtenir des taux de multiplication jusqu'à 30.

Lors de la découpe, conserver la feuille attenante au nœud permet une meilleure reprise de la bouture. L'enracinement ainsi que la sortie du bourgeon a lieu 6 jours après repiquage, contre 9 jours si les nœuds sont débarrassés de leur feuille.

Cependant, après 4 à 6 semaines de croissance, certains plants forment des capitules et stoppent leur développement végétatif. Afin d'inhiber cette floraison, deux concentrations de STS ont été ajoutées dans les milieux, et les plantes suivies pendant 12 semaines.



Figure 26 : *T. maritimum* en conditions *in vitro*, sur milieu de routine après 4 semaines de culture.

Après 8 semaines de culture, 20% des plantes cultivées en milieu dépourvu de STS entrent en floraison (développement de capitules fermés), stoppant ainsi leur croissance végétative. L'ajout de 10 mM de STS permet d'empêcher toute floraison, le premier et seul capitule (soit 2% de l'effectif total) apparaissant après 10 semaines. Avec 100 mM de STS, aucun capitule n'est observable à 10 semaines. L'ajout de STS dans les milieux de culture n'a pas eu d'effet significatif sur la croissance végétative des vitroplants.

E. Sevrage et culture sous serres

Les plantes sortant de conditions *in vitro* sont fragiles et nécessitent donc un soin particulier lors de leur sortie vers l'extérieur. Des tests préliminaires effectués au laboratoire avaient révélé que les explants présentent une forte sensibilité aux champignons pathogènes, ainsi qu'à la dessiccation. Les essais à échelle industrielle ont donné des taux de survie à l'acclimatation des trois espèces de 100% (test effectué sur 250 individus par espèce).

Pendant la croissance, les plants sont apparus conformes et homogènes. Les premiers capitules chez la Matricaire sont apparus à partir du quatrième mois de croissance, et les premières inflorescences chez la Criste se sont formées après 5 mois de croissance. Chez ces deux espèces, la floraison n'a pas interrompu la croissance et les plantes ont poursuivi leur développement.



Figure 27 : *C. maritimum* en fonction du nombre de mois de culture sous serres. A : 2 mois, B : 4 mois, C : 6 mois, D : 7 mois.

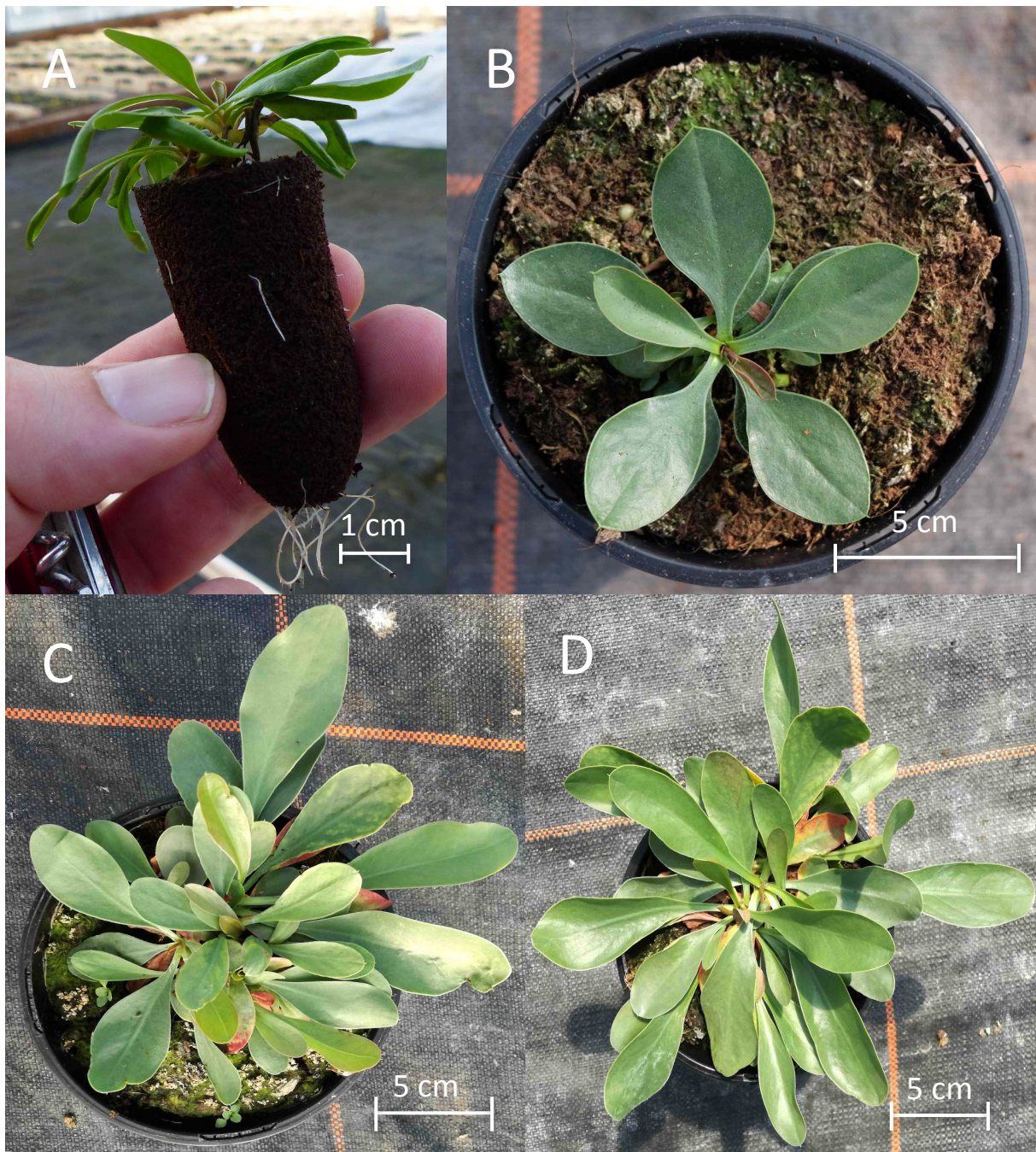


Figure 28 : A : *L. vulgare* en fonction du nombre de mois de culture sous serres. A : 2 mois, B : 4 mois, C : 6 mois, D : 7 mois.

Après 7 mois de culture, les plantes ont été récoltées (figures 27 à 29). Les masses obtenues varient selon les espèces, la Matricaire étant celle qui produit le plus de biomasse (110 ± 17 g frais et 11 ± 2 g sec par individu - 10 %MS), devant la Criste (63 ± 8 g frais et 8 ± 1 g sec par individu - 12 %MS) et la Lavande de mer (13 ± 2 g frais et $3 \pm 0,4$ g sec par individu 22 %MS).



Figure 29 : A : *T. maritimum* en fonction du nombre de mois de culture sous serres. A : 2 mois, B : 4 mois, C : 6 mois, D : 7 mois.

Il est possible de prévoir les rendements de matière sèche à grande échelle, en extrapolant les valeurs obtenues au cours de cette expérimentation. De par les volumes occupés par les plantes au stade adulte, il sera possible de disposer pour la Criste et la Lavande de mer 36 pots par m^2 et pour la Matricaire, 16 pots/ m^2 . En laissant des espaces de passage permettant de mécaniser certaines tâches (figure 32), il est possible de disposer ainsi 155 520 pots par hectare pour la Criste et la Lavande de mer, et 55 890 pots par hectare pour la Matricaire. Ainsi, la Criste devient l'espèce la plus productrice (1,22 T/ha sec), suivie par la Matricaire (0,61 T/ha sec) et la Lavande de mer (0,4 T/ha sec).

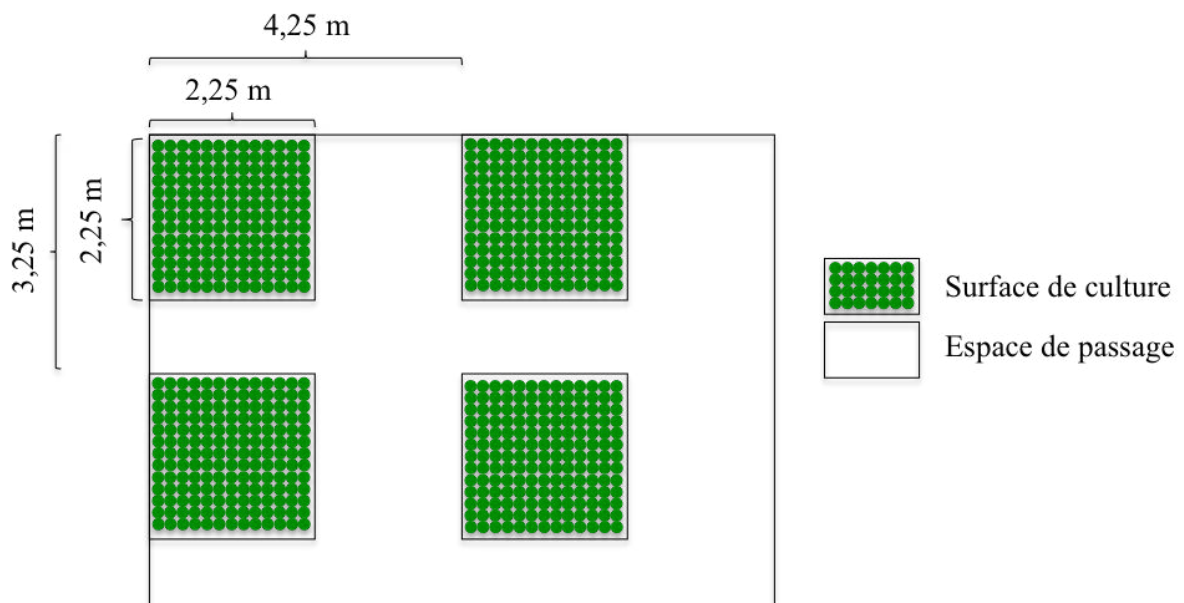


Figure 30 : Disposition des surfaces de culture sous serre.

IV. DISCUSSION

A. Décontamination

La décontamination peut être nécessaire dans deux cas en culture *in vitro* : lors de l'introduction de matériel végétal non stérile ou lors de la contamination de matériel supposément stérile. Le deuxième cas de figure peut être dû, soit à des erreurs de manipulation, soit à des contaminants endogènes libérés par la découpe des tissus.

Lors de l'introduction de matériel végétal comme les graines, le protocole décrit permet d'éliminer les contaminants.

Au cours de cette étude, des contaminations secondaires sont survenues lors de la mise en culture de la Criste marine et de la Lavande de mer en milieux liquides. Suite à cette observation, plusieurs antibiotiques habituellement utilisés dans ce contexte ont été testés. Ils sont utilisés pour leur relative innocuité envers les plantes, et leur efficacité sur certains types de bactéries. Par choix, les tests effectués ont été réduits, le laboratoire ne disposant pas à ce moment de suffisamment de plantes pour en inoculer volontairement au risque de perdre certains génotypes. Les combinaisons testées ont cependant permis de trouver une association efficace, constituée de céfotaxime ($0,3 \text{ g.L}^{-1}$) et de PPM (à 0,4%). Cette solution semble ralentir la croissance des plantes pendant les deux semaines de traitement. Une fois ce dernier terminé, les plantes assainies retrouvent leur capacité de croissance sur le milieu de base. Plusieurs types de colonies bactériennes ont d'ailleurs été observés dans les milieux solides, de façon spontanée et ponctuelle, donnant un aperçu de la diversité des contaminants possibles.

Cependant dans le cadre d'une production à échelle industrielle, les contaminations ponctuelles, hors celles touchant des génotypes rares, seront simplement éliminées.

B. Culture in vitro de *Limonium vulgare*

1. *Micropropagation par microbouturage, effet de la BAP et de la découpe*

L'utilisation de BAP à 1 mg.L^{-1} a produit le plus fort taux de multiplication. Avec ce traitement, il est possible à partir d'une pousse feuillée de générer **15 nouvelles pousses après 6 semaines de culture**. En choisissant avec attention les boutures, et en uniformisant la taille des cals basaux, les plants produits sont tous conformes et le lot homogène.

Les taux de multiplication sont difficilement comparables avec la littérature, la plupart utilisant un matériel de départ différent plus contraignant (hampes florales, fragments foliaires...) et passant par une embryogénèse somatique ou par plusieurs étapes de repiquage (Aly *et al.*, 2002 ; Dam *et al.*, 2017). Comparativement à d'autres méthodes utilisant des pousses feuillées, la méthode proposée ici présente un taux de multiplication dans la fourchette haute qui se trouve entre 5 pour *L. estevei* (Martin & Perez, 1992) et 20 pour *L. calaminare* (Martin & Perez, 1995) après 5 semaines de culture. De plus, les clones testés ici ont réagi de la même façon, présentant les mêmes développements et des taux de multiplication très proches, ce qui est un avantage essentiel pour une production régulière de qualité.

Il a été remarqué que lors du repiquage de *L. vulgare*, les explants **avaient besoin d'un cal basal** pour assurer leur survie. Le nombre de pousses feuillées visibles après 6 semaines de culture sur BAP 1 mg.L⁻¹ est proche de 30, dont la moitié est réellement exploitable, la structure formée ne permettant pas d'isoler une base pour chaque pousse feuillée. Les plus développées sont donc privilégiées, de manière à maximiser le taux de survie des nouveaux plants. Le fait que les explants sans base ne survivent pas est peut être lié à la capacité d'enracinement. L'investigation de ces capacités pourrait permettre d'améliorer la survie des explants multipliés. Tous ceux dotés d'une base se sont cependant enracinés spontanément, même si ceux provenant de milieux BAP 1 mg.L⁻¹ le font plus tardivement. Un passage sur un milieu d'enracinement en présence d'auxines pourrait permettre de réduire ce délai, en vue de leur potentielle acclimatation, mais également permettre aux explants sans base de s'enraciner et donc de les rendre utilisables, en plus de simplifier les repiquages.

2. Multiplication par caulogénèse, effet de la combinaison BAP/ANA

La multiplication de représentants du genre *Limonium* à l'aide d'une combinaison de BAP et d'ANA a déjà été décrite, en utilisant des fragments d'inflorescence chez *L. sinensis* (Dam *et al.*, 2010) ou chez *L. wrightii* (Huang *et al.*, 2000) avec des feuilles. À notre connaissance, aucune n'a porté sur *L. vulgare*.

Selon leurs concentrations, la BAP et l'ANA ont donc des effets variables chez *L. vulgare* sur la formation de nouveaux organes sur des tissus blessés. La grande majorité des cals portaient des parties blessées des feuilles et des racines. Toutes les organogénèses

observées étaient indirectes, les pousses feuillées étant initiées à partir des cals. Par cette technique, les taux de multiplication obtenus sont très élevés. Un individu entier possédant environ 5 feuilles permettrait de produire, à raison de 50 nouvelles pousses par feuilles, 250 nouveaux individus après 30 jours.

Dans le cas présent, cette technique pourrait présenter deux applications : la première serait la multiplication, mais la méthode effectuée en routine sur BAP 1 mg.L⁻¹ en tube est déjà très efficace et demande moins de temps de travail. La deuxième pourrait être, dans le cas de plantes contaminées, de sauver un génotype en ne prélevant que des parties saines de la plante afin de la multiplier, et ainsi s'affranchir de l'utilisation d'antibiotiques ou de techniques de décontamination. Elle pourrait aussi être utilisée comme accélérateur de production, en prévision d'une hausse temporaire de production d'explants. La technique peut aussi être utilisée pour produire des variants et mutants potentiellement hyper-producteurs de métabolites d'intérêts.

Des rhizogénèses se sont produites sur quelques boîtes. L'utilisation d'une autre auxine seule (exemples : AIA, AIB) ou en combinaison permettrait peut-être d'accentuer le phénomène, et d'enraciner les explants sans cals basal.

Enfin, les trois clones utilisés dans cette expérience présentent des cinétiques de croissance et des développements très semblables, cette technique sera donc vraisemblablement applicable à d'autres génotypes.

3. Pré-acclimatation - Enracinement de *L. vulgare*

Il semblerait que chez *L. vulgare* l'AIB n'ait que peu d'effet sur l'enracinement. Les concentrations testées n'ont pas permis de déclencher une forte rhizogénèse. D'autres espèces comme *L. wrightii* (Huang *et al.*, 2000) y sont sensibles, et l'ajout de 0,5 mg.L⁻¹ d'AIB pour la culture de *L. altaica* sur milieu MS permet de tripler le nombre de racines par plantule (Jeong *et al.*, 2001). Plusieurs auxines existent et diffèrent en structure et en efficacité selon l'espèce considérée. *L. vulgare* pourrait être sensible à une autre auxine comme le 2,4-D ou l'acide indole acétique (AIA), l'ANA s'étant déjà révélé peu efficace pour provoquer l'apparition de racines. Celles-ci pourraient aussi permettre l'enracinement d'explants de *L. vulgare* sans avoir besoin d'accompagner chaque pousse feuillée d'une base. Au cours de cette expérience, les lots obtenus ont été assez hétérogènes, avec une forte variabilité des

capacités d'enracinement. De même, l'utilisation d'une auxine efficace permettrait de lisser les différences observées.

C. Culture in vitro de *Crithmum maritimum*

1. Optimisation de la croissance

a. Composition du milieu

La composition du milieu a une influence sur le développement de la Criste dans des conditions *in vitro*. Trois milieux ont ici été testés, dont la différence principale concerne la composition en azote. Les trois présentent environ le même rapport $\text{NO}_3^-/\text{NH}_4^+$, cependant les milieux Chée & Pool et MS contiennent environ 4 fois plus d'azote que le milieu Anderson's Rhododendron. De manière intéressante, tous les paramètres mesurés (nombre de feuilles, taille de la partie aérienne, nombre de racines) sont favorisés par les milieux les plus riches en azote (Chée & Pool et Murashige & Skoog). L'importance de la nutrition azotée dans le développement racinaire est bien connue (Bloom, 1997), ainsi que le rôle régulateur des ions NO_3^- et NH_4^+ (Zhang et Forde, 2000 ; Lima *et al.*, 2010). De plus, le développement racinaire, qui permet une meilleure absorption des nutriments, entraîne *a posteriori* un meilleur développement aérien de la plante. *C. maritimum* s'accommode de fortes concentrations en azote, au moins supérieures à celles présentes dans un milieu comme Anderson's Rhododendron. Grigoriadou & Maloupa (2008) ont montré que le milieu MS était particulièrement adapté pour le développement des parties aériennes de *C. maritimum*, tandis que le milieu Gamborg B5 favorisait son développement racinaire. Le milieu Gamborg B5 contient moins d'azote que le milieu MS, et surtout un rapport $\text{NO}_3^-/\text{NH}_4^+$ très différent (respectivement 12,2 et 1,9), expliquant peut-être les différences observées (Grigoriadou & Maloupa, 2008). Afin d'optimiser la croissance de *C. maritimum*, il serait intéressant de tester différents apports en azote, en termes de quantité et de qualité, indépendamment des autres nutriments.

L'utilisation de milieux MS supplémentés avec du saccharose a permis de montrer un effet de la concentration de cette source de carbone sur le développement. Le milieu MS30 a permis un meilleur développement des plantes.

La capacité de croissance supérieure de l'apex par rapport aux bourgeons axillaires est certainement due à la dormance de ces derniers, dont la levée décale le débourrement et

l'enracinement. Les apex pourraient être utilisés pour la conservation et l'entretien du stock, tandis que les boutures axillaires seraient destinées à la multiplication.

b. Nature physique du milieu

L'utilisation du milieu liquide a montré très nettement un effet positif sur la croissance de *C. maritimum in vitro*. Les biomasses mesurées sont bien supérieures à celles obtenues sur milieu solide pour les deux génotypes testés. Ce gain de biomasse n'est pas le fait d'une hyperhydricité puisque les rapports masse sèche sur masse fraîche sont très similaires. La différence de croissance entre les deux traitements peut s'expliquer par la plus grande disponibilité des nutriments pour les plantes dans le milieu liquide. En effet, les plantes sont en partie immergées dans le milieu et en sont recouvertes de façon périodique grâce à l'agitation constante des boîtes respirantes. Ceci permet une très grande surface de contact et donc une absorption plus efficace des nutriments.

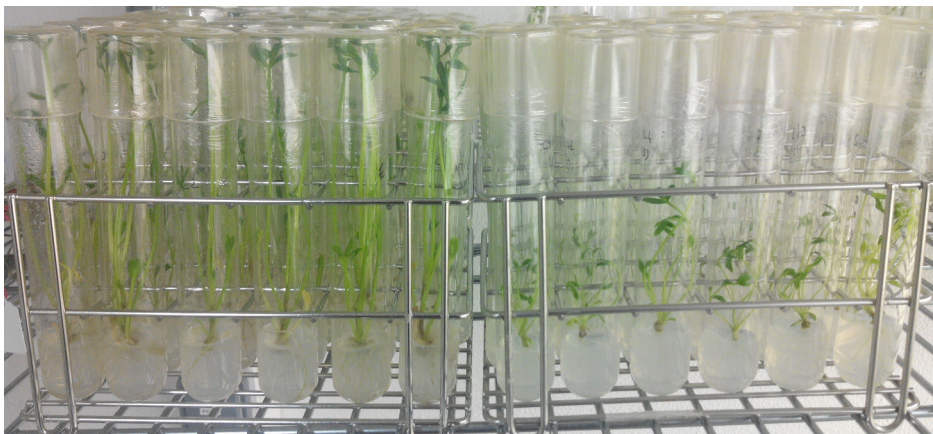


Figure 31 : *C. maritimum* après 2 semaines de culture. A gauche, explants provenant de milieux liquides, à droite, provenant de milieux solides.

D'autres aspects différencient les explants après leur repiquage de milieu solide et de milieu liquide : ces derniers sont moins fragiles, avec des pétioles et des feuilles plus charnus et plus épais. Une autre observation intéressante est que le passage en milieu liquide a permis un regain de vigueur des plants et une homogénéisation des explants ; en effet, une fois les explants sortis de milieu liquide repiqués sur milieu solide, ils conservent leur capacité de croissance et sont plus vigoureux que les explants sortant de milieu solide (figure 31). Ces plants développent beaucoup de racines très vite, et les nouvelles feuilles restent charnues et

épaisses. Une étude permettrait d'évaluer l'intensité et la durée de la conservation de cette « vigueur ».

Cependant, la croissance en milieu liquide ne présente pas que des avantages : au cours de l'expérience, plusieurs boîtes ont été le siège de contaminations bactériennes. Une décontamination a été effectuée, mais même si les antibiotiques utilisés sont connus pour n'avoir aucun effet sur les plantes, le traitement a pu freiner leur croissance. Ce problème illustre le principal désavantage de la culture en milieu liquide : les contaminations sont plus fréquentes et surtout beaucoup plus problématiques, puisqu'elles touchent plusieurs plantes à la fois contrairement à une contamination en tube. De plus, ces plants peuvent difficilement être sevrés directement après leur croissance en milieu liquide. Étant recouverts de milieu nutritif, un nettoyage rigoureux est impératif pour éviter les attaques de pathogènes.

Des systèmes à immersion temporaire, comme les contenants RITA®, pourraient encore améliorer la croissance par rapport à la méthode présentée ici. Le système RITA® permet de recouvrir de façon périodique les explants de liquide nutritif, les laissant à l'air libre le reste du temps. Les nombreux paramètres personnalisables (temps d'immersion, fréquence) a permis d'adapter le système à de nombreuses espèces. Chez *Musa acuminata* le système permet de produire 2,5 fois plus de plantes que sur agar, tandis que chez *Vitis vinifera*, les plants sont plus grands, s'enracinent plus vite et produisent 7 fois plus de nœuds (Etienne et Berthouly, 2002).

2. Facteurs influençant la multiplication de la Criste

c. Effet de la coupe

Le repiquage en boîte de Petri permet une légère amélioration du taux de multiplication chez la Criste, comparativement à un repiquage classique en tube, équivalent à celui obtenu avec BAP par Grigoriadou & Maloupa (2008). De plus les entre-nœuds sont plus allongés en boîte de Petri, ce qui facilite la découpe des boutures. Si les plantes sont laissées pendant une longue période, les entre-nœuds sont très allongés, et le taux de multiplication augmente proportionnellement (jusqu'à 12 après 12 semaines). Le fait de laisser si longtemps les plantes croître peut avoir un avantage, celui de faire baisser les coûts de production, en économisant une séance de repiquage.

D'autres avantages de ce contenant se trouvent dans sa taille très réduite, ainsi que dans la quantité très faible de milieu utilisé par plante, comparativement à un tube classique.

d. Effet des régulateurs de croissance

L'utilisation de BAP et de 2,4-D a permis de provoquer la rhizogénèse et la callogénèse de fragments de *C. maritimum*. Cependant, aucune caulogénèse n'a été observée pendant les 8 semaines d'observation. Les cals primaires obtenus pourraient servir pour une organogénèse indirecte, si les cellules sont compétentes. Transférer le cal du milieu supplémenté en 2,4-D sur un milieu dépourvu d'auxines pourrait permettre aux cellules indifférenciées de s'organiser et de former un tissu structuré.

La gamme de TDZ testée a permis l'augmentation du taux de multiplication. Au delà de $0,1 \text{ mg.L}^{-1}$, il permet de passer d'une pousse par tronçon (correspondant au bourgeon déjà présent) à 3 en moyenne après 20 jours. Dans ce cas, la rhizogénèse est inhibée, même après repiquage sur un nouveau milieu, et ce pour plusieurs semaines (20% d'enracinement après 3 semaines de culture sur milieu sans TDZ). De plus, l'aspect des plants n'est pas conforme à celui obtenu en routine : les plants sont plus courts, ont une capacité de croissance plus faible et sont hyperhydriques au niveau de leur base. Afin de lever l'inhibition de l'enracinement, l'utilisation d'auxines pourrait s'avérer efficace. En deçà de $0,1 \text{ mg.L}^{-1}$, il semblerait que le TDZ ne fasse qu'inhiber la rhizogénèse pendant les 20 premiers jours.

Malgré l'amélioration du taux de multiplication, la non-conformité des plants pourrait s'aggraver avec les repiquages successifs, et fera donc préférer une autre méthode.

Les concentrations testées de BAP et d'ANA ont permis d'augmenter le nombre de pousses feuillées par tronçon chez la Criste. Une forte concentration de BAP permet l'émergence de 3 pousses feuillées par bourgeon, mais la concentration d'ANA testée en combinaison ne permet pas d'obtenir leur enracinement, probablement inhibé par la cytokinine. Cette dernière observation est en contradiction avec les résultats obtenus par Grigoriadou & Maloupa (2008), montrant que l'ANA, même en présence de BAP, a un effet sur la formation de racines chez les vitroplants de Criste. L'origine différente des explants pourrait expliquer que dans le cas présent, les plantules ne soient pas sensibles à l'effet rhizogène de l'ANA. Pour pallier ce problème, il serait possible, une fois les pousses initiées par l'action de la BAP, de repiquer rapidement, sans séparer les bourgeons initiés, les explants sur un milieu contenant du 2,4-D, les clones utilisés ici semblant y être sensibles. L'inverse pourrait aussi être pertinent, mais il serait difficile techniquement de repiquer un explant

possédant déjà des racines sur un milieu solide. Un milieu liquide supplémenté en BAP pourrait être efficace. Néanmoins, cela augmenterait le nombre de manipulations et, par conséquent, le coût en main d'œuvre par explant.

D. Culture in vitro de *Tripleurospermum maritimum*

La Matricaire maritime n'a posé aucun problème majeur en culture *in vitro*. Tant que la méthode de découpe est régulière, la croissance est rapide, son taux de multiplication élevé sur milieu de base (environ 12 toutes les 6 semaines) et les plantules produites homogènes. Néanmoins, après quelques semaines de culture, certains plants entrent en floraison, stoppant leur croissance. L'ajout d'un inhibiteur d'action de l'éthylène, le STS (Veen, 1983 ; Iqbal *et al.* 2017), a permis d'empêcher ce phénomène, sans que cela n'affecte visuellement le développement des plantules. Le STS peut donc être ajouté au milieu de base, si les plantes sont laissées plus de 6 semaines dans le même milieu. Son utilisation semble donc plus adapté à l'entretien du stock qu'à la phase de multiplication.

E. Acclimatation et culture sous serre

La méthode d'acclimatation présentée ici a permis d'obtenir des taux de survie optimaux. Cette période d'acclimation de trois semaines semble incompressible, les plantes étant très sensibles en sortie de condition *in vitro*. Cependant, le temps nécessaire sur le dernier milieu avant sortie peut être réduit. Pour cela, l'utilisation de régulateurs de croissance ou de milieux rhizogènes peut permettre un enracinement plus vigoureux et donc une reprise plus rapide.

Les plants ont été cultivés sous serre du mois de janvier à juillet 2017. *T. maritimum* a fleuri à partir du quatrième mois, mais contrairement à ce qui a été observé *in vitro*, la croissance des individus passé au stade floral n'a pas ralenti par rapport à ceux restés au stade végétatif. Certains plants de Criste ont commencé à fleurir à la fin du sixième mois. Aucune hampe florale n'a été observée pour *L. vulgare*. Ces observations sont en adéquation avec ce qui est connu de la phénologie de ces espèces (cf. p.8-9).

D'après les poids obtenus après 7 mois de culture, *T. maritimum* est l'espèce qui produit le plus de biomasse fraîche par individu, suivi de *C. maritimum* puis de *L. vulgare*. Cependant, le calcul de rendement par surface vient nuancer ces résultats. En effet, les pots

contenant les plants de Matricaire ne peuvent être collés les uns aux autres, le volume occupé par les plantes étant trop important : les cultiver avec une telle proximité augmenterait grandement le risque d'attaques de pathogènes. Ainsi, il est préférable de disposer 16 pots par m^{-2} pour la Matricaire, tandis qu'avec la Criste et la Lavande de mer il est possible de disposer 36 pots par m^{-2} .

V. CONCLUSION ET PERSPECTIVES

À partir de ces résultats, peuvent être proposés un processus de production déjà opérationnels pour chacune de ces trois espèces :

- Pour *L. vulgare* (figure 32), la phase de croissance peut être faite sur milieu MS 30 avec une multiplication sur BAP 1 pour une production de routine, ou sur milieu organogène selon les besoins de production. Des tests d'enracinement avec des combinaisons d'auxines pourront être menés en vue de raccourcir et d'homogénéiser le temps nécessaire pour la pré-acclimatation qui est actuellement de 3 semaines.
- Pour *C. maritimum* (figure 33), la croissance est visiblement beaucoup plus forte en milieu liquide. De plus, une phase de culture dans ce type de milieu semble homogénéiser et conférer une vigueur aux explants pour le repiquage suivant. Dès lors, il faudrait alterner phases de multiplication en boîte de Petri et phase de croissance en milieu liquide, de façon à entretenir cette vigueur et cette homogénéité. La phase de multiplication pourra durer entre 4 et 12 semaines, la période optimale restant à déterminer. La conception d'un milieu caulogène en utilisant des régulateurs de croissance permettrait d'augmenter significativement les taux de multiplication. Après sortie du milieu liquide, l'enracinement et le débourrement sont rapides, ce qui permettrait une acclimatation après une semaine à deux semaines. Cependant, une attention toute particulière devra être portée sur ces explants : sortant de milieu liquide quelques jours auparavant, un rinçage rigoureux des parties aériennes sera nécessaire pour éviter la contamination par des pathogènes opportunistes.
- Pour *T. maritimum* (figure 34), les milieux nécessaires à la multiplication et la croissance sont les mêmes, la production passera donc simplement par la culture de boutures sur milieu de base.

Il est possible d'entretenir des collections de plants homogènes de ces trois espèces. Cet ensemble de techniques pourra servir de modèle pour l'application de stress dans le cadre d'une orientation du métabolisme. De plus, le protocole de néoformation décrit pour la Lavande de mer pourra permettre la génération de variants hyper-producteurs.

La nutrition des plantes lors de leur croissance en serre pourra faire l'objet d'une optimisation, en faisant varier les apports notamment en macro-éléments. Ici une solution standard a été utilisée, correspondant aux besoins de la majorité des plantes, mais beaucoup de possibilités sont offertes avec les systèmes d'engrais retard.

Le suivi de la biomasse en fonction du temps permettra de déterminer, pour chaque espèce, la durée de croissance offrant la plus grande rentabilité. Le couplage de ces mesures avec des tests d'activité permettra de déterminer la meilleure période de récolte.

En suivant les processus de production proposés dans cette étude, remplir une serre de 5 ha pour chaque espèce avec comme matériel de départ un panier (24 plantes) prendrait 5 mois pour la Matricaire, 7 mois pour la Lavande de mer et 12 mois pour la Criste.

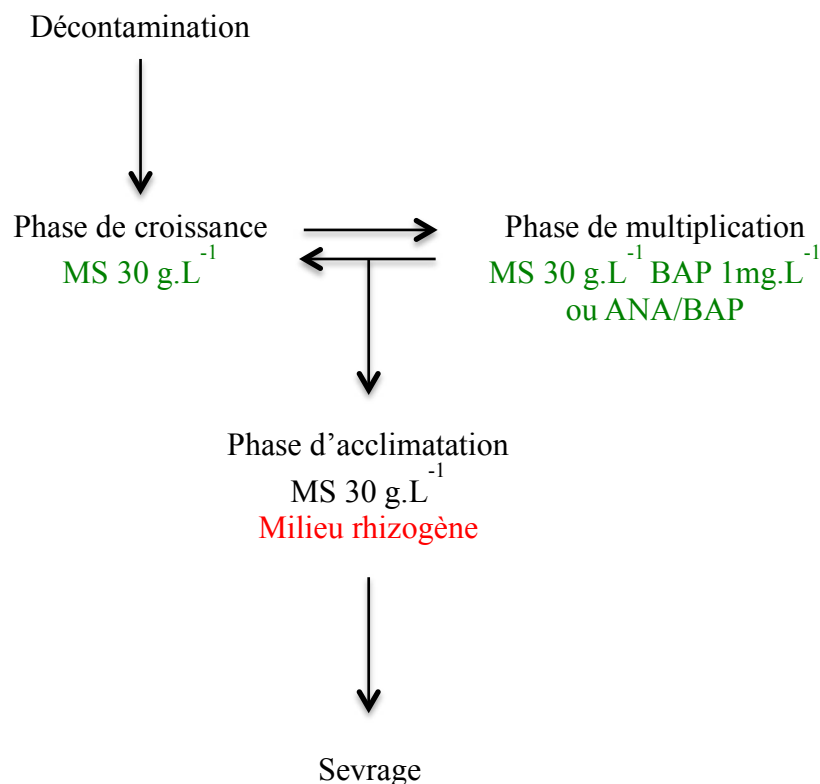


Figure 32 : Itinéraire de culture pour la production *in vitro* de *L. vulgare*. En vert, parties opérationnelles et en rouge, parties pouvant être optimisées.

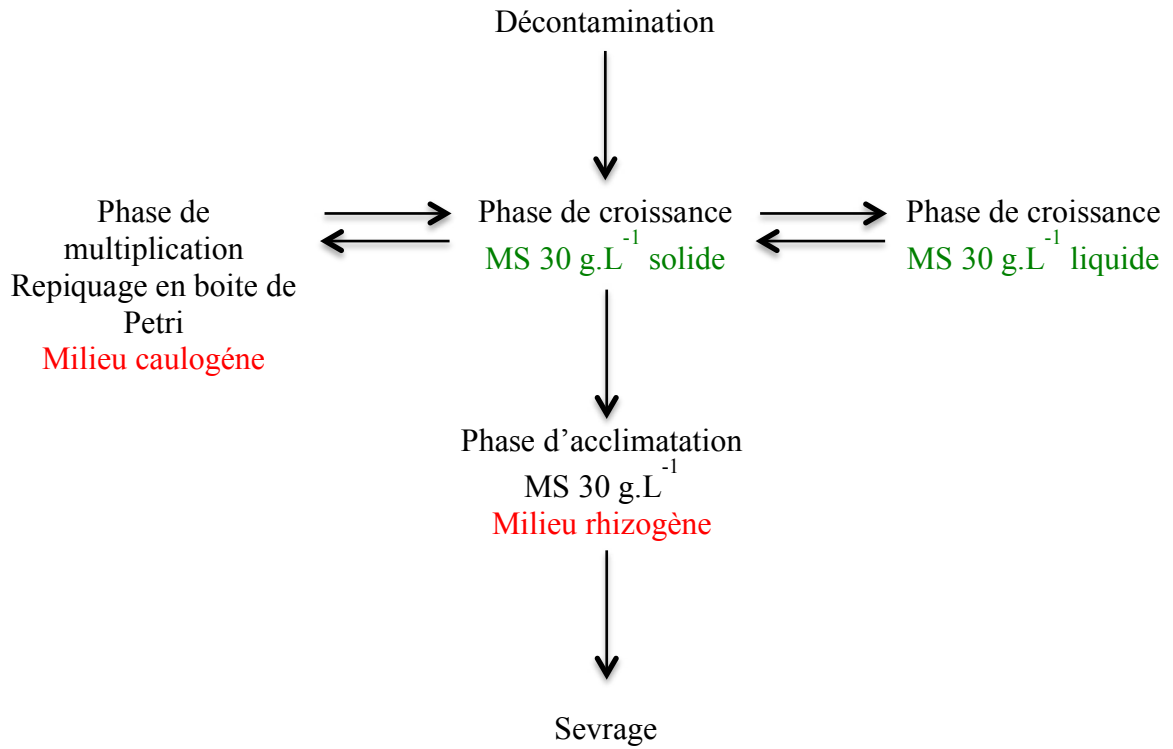


Figure 33 : Itinéraire de culture pour la production *in vitro* de *C. maritimum*.
En vert, parties opérationnelles et en rouge, parties pouvant être optimisées.

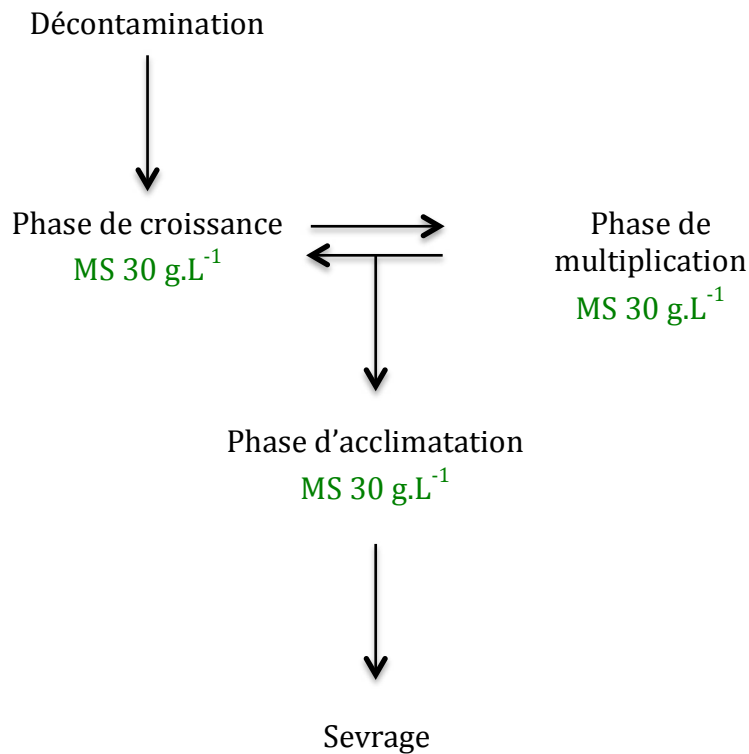


Figure 34 : Itinéraire de culture pour la production *in vitro* de *T. maritimum*.
En vert, parties opérationnelles et en rouge, parties pouvant être optimisées.

CHAPITRE II : ACTIVITES
BIOLOGIQUES ET MOLECULES
ACTIVES

I. INTRODUCTION

A. Les espèces réactives à l'oxygène (ROS)

Les facteurs environnementaux sont des acteurs clés de la limitation de la croissance des plantes. Organismes fixés, celles-ci doivent s'adapter en permanence face aux aléas du milieu. Au cours de l'évolution, elles ont mis en place des défenses diverses pour résister aux stress, dont les plus courants sont les UV, les excès de lumière, la sécheresse, et la salinité. Ces stress, au niveau cellulaire, conduisent directement ou indirectement à la production d'espèces chimiques hautement réactives dont la plupart, les radicaux libres, sont peu stables. Il existe trois types de radicaux libres, selon l'atome qui porte les électrons non appariés : les RNS (Reactive Nitrogen Species), les RSS (Reactive Sulphur Species), et les ROS (Reactive Oxygen Species) (Lu *et al.*, 2010; Gruhlke et Slusarenko 2012 ; del Rio, 2015).

Les radicaux libres sont également produits par des processus cellulaires en conditions normales, notamment les ROS qui sont inhérents au mode de vie aérobie. Différentes formes de ROS sont connues (figure 35) et plusieurs structures cellulaires, de par leur fonctionnement, sont le siège de la production des ROS : les mitochondries (avec la respiration), les chloroplastes (avec la photosynthèse) et les peroxysomes (avec la photorespiration et la β -oxydation des acides gras) (Gill & Tuteja, 2010). Le degré d'implication de ces structures est variable, et dépend en partie de facteurs environnementaux (Gill & Tuteja, 2010).

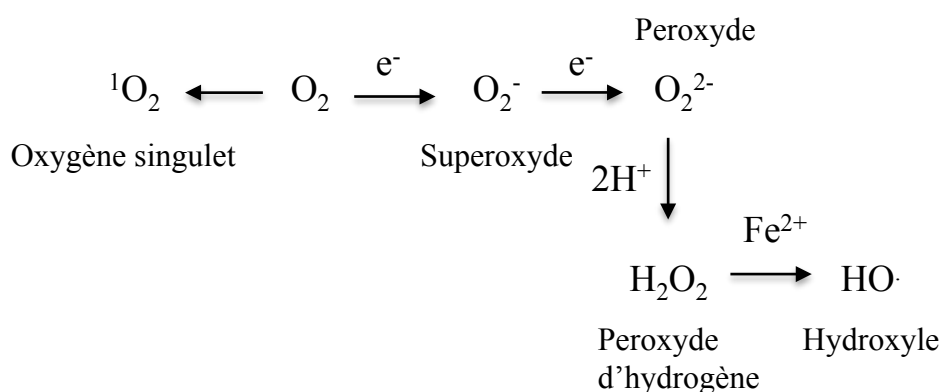


Figure 35 : Biosynthèse de différentes formes de ROS (modifié d'après Mittler, 2016).

Ces espèces réactives, une fois générées, peuvent interagir avec de très nombreux constituants cellulaires tels que les membranes, les acides nucléiques ou les protéines (Foyer & Noctor, 2003). Les acides gras polyinsaturés des membranes sont ainsi attaqués, entraînant une réaction en chaîne appelée peroxydation des lipides. Celle-ci aboutit à la synthèse d'aldéhydes qui propagent l'attaque à d'autres sites (Nimse *et al.*, 2015). L'oxydation de l'ADN touche la partie osidique ainsi que la partie nucléique, entraînant l'instabilité voire la destruction de la structure en double hélice (Dizdaroglu *et al.*, 2002). L'oxydation des protéines se fait *via* l'action combinée des ROS et d'ions métalliques tels que Fe²⁺ ou Cu²⁺. Certains acides aminés y sont très sensibles, et entraîne une perturbation de la conformation spatiale de la protéine, modifiant ainsi son activité (Stadtman, 1990).

Jusqu'à récemment, les ROS étaient cantonnées à ce rôle de co-produits néfastes aux structures cellulaires. Il semblerait cependant qu'ils soient aussi des agents essentiels du réseau de signalisation permettant aux plantes de s'adapter à leur environnement. Il a ainsi été montré que les ROS sont impliqués dans la croissance et le développement des plantes (Swanson & Gilrog, 2010), dans leur réponse aux facteurs biotiques et abiotiques (Jalmi & Sinha, 2015) ainsi que dans l'apoptose (Simon *et al.*, 2000). Comme souvent, il semblerait que tout soit question d'équilibre dans ce système (figure 36 ; Gill & Tuteja, 2010) où les conditions environnementales peuvent venir perturber et entraîner des conséquences néfastes si l'organisme ne réagit pas convenablement (del Rio, 2015).

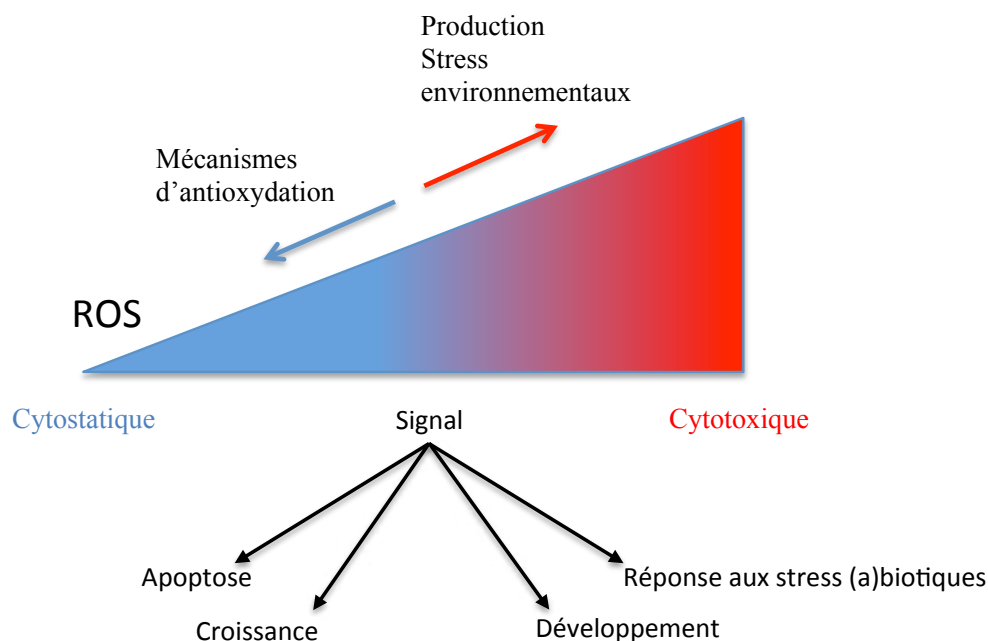


Figure 36 : Equilibre et exemples de rôles physiologiques des ROS (modifié d'après Mittler, 2016).

B. Les défenses antioxydantes chez les plantes

Face à ces espèces chimiques hautement réactives qui peuvent compromettre les équilibres internes, les plantes disposent de deux types de système antioxydant assurant leur défense : les systèmes enzymatique et non enzymatique. Le premier repose en grande partie sur plusieurs enzymes comme les SuperOxide Dismutase (SOD), les thiol oxydoreductases (thioredoxines, glutaredoxines), les catalases (CAT) ou encore les peroxydases (POD) (del Rio, 2015). Chacune transforme spécifiquement une espèce réactive : la SOD neutralise le radical superoxide, la catalase le peroxyde d'hydrogène, la glutathion peroxydase le peroxyde d'hydrogène et les hyperoxydes lipidiques (tableau 9). Chacune permet ainsi à la cellule de faire face à l'accumulation de l'une ou l'autre de ces ROS en particulier.

Tableau 9: Enzymes antioxydantes et réactions catalysées

Enzyme	Réaction catalysée
SOD	$2O_2^- + 2H^+ \rightarrow H_2O_2 + O_2$
Catalase	$2H_2O_2 \rightarrow 2H_2O + O_2$
Gluthation Peroxydase	$H_2O_2 + 2GSH \rightarrow 2H_2O + GSSG$

Le second système se base principalement sur de plus petites molécules, dont la grande majorité possède un ou plusieurs noyaux aromatiques (figure 37 ; del Rio, 2015). Ces molécules, comme les composés phénoliques (flavonoïdes, acides phénoliques, tannins...), les vitamines ou les terpènes sont particulièrement efficaces dans la neutralisation des radicaux libres. Le phénomène antioxydant est explicable par plusieurs mécanismes chimiques différents, dont on peut discerner trois grands types: le mécanisme anti-radicalaire, celui de la chélation des ions métalliques et celui de la réduction (Loftsson, 2014).

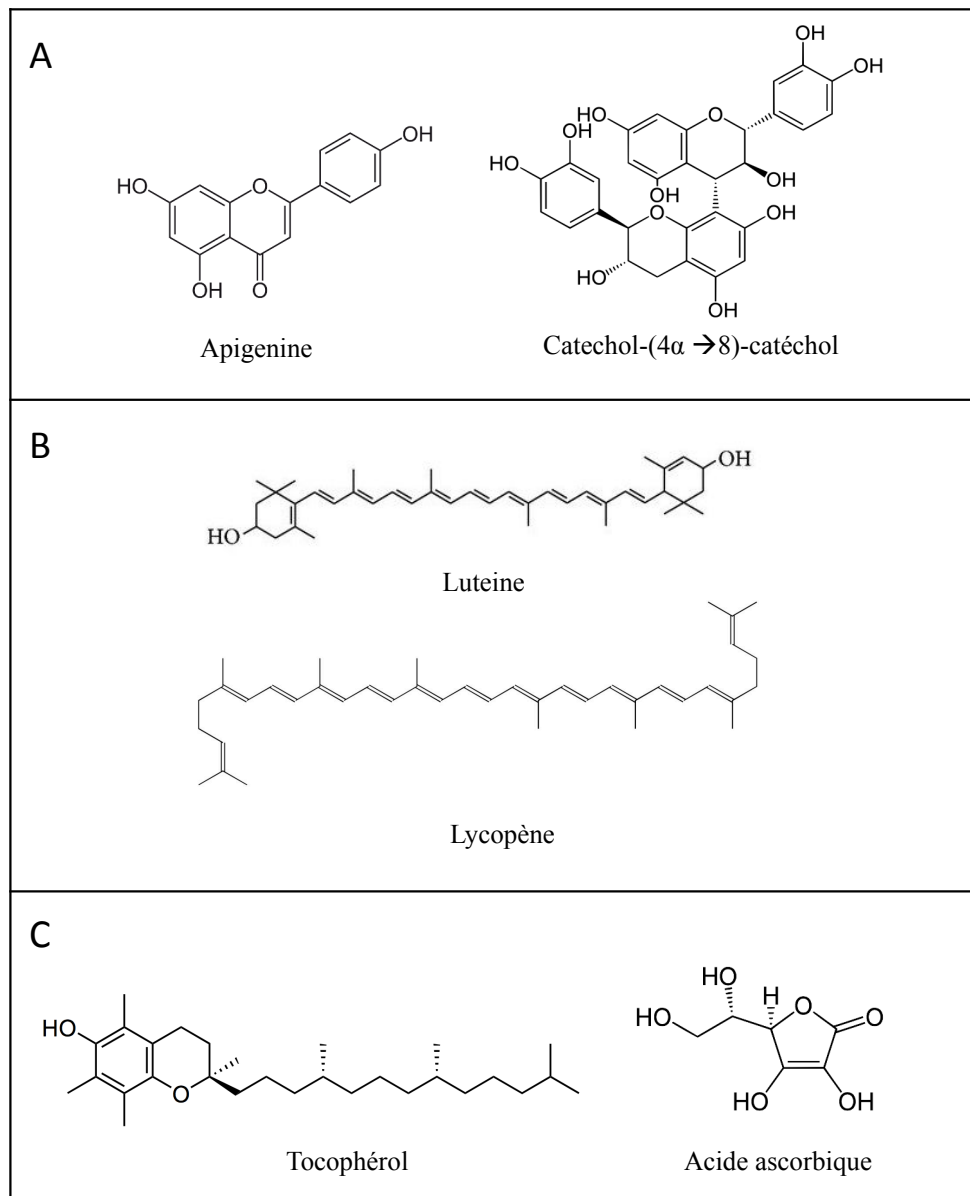


Figure 37 : Exemples de molécules antioxydantes. A : Polyphénols; B : Terpènes et terpénoïdes ; C : Vitamines.

C. Les mécanismes d'antioxydation

On parle de mécanisme anti-radicalaire lorsqu'il y a don de proton ou d'électron à l'espèce oxydante (ROS). Ce phénomène permet de saturer les couches externes déficitaires en électrons, et ainsi d'inactiver les radicaux libres. Il existe deux types de piégeage, selon la nature de la réaction : le SET (Single Electron Transfert) et le HAT (Hydrogen Atom Transfer). Le SET se produit en deux étapes : d'abord un don d'électron au radical, puis un don de proton H^+ . Le HAT, en une seule étape, consiste en un transfert direct d'un atome d'hydrogène. Le résultat final est le même, quel que soit le mécanisme (figure 38 ; Liang et Kitts, 2014).

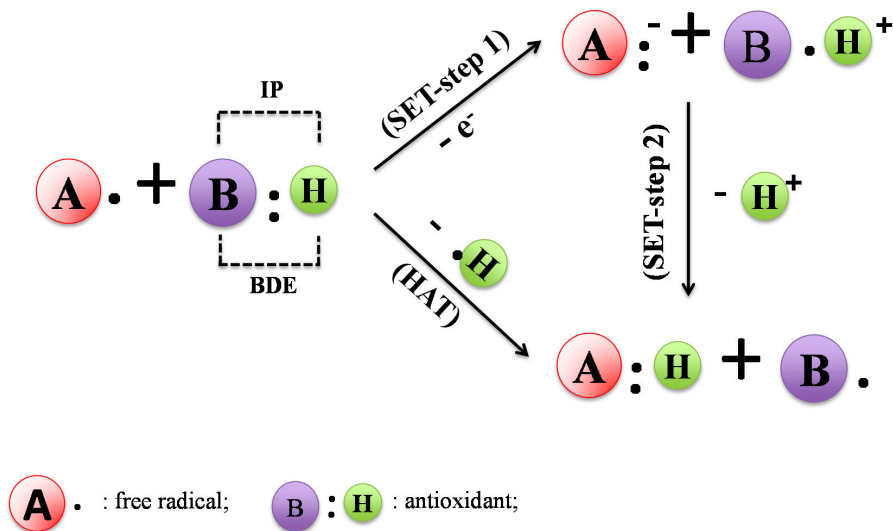


Figure 38 : Les différents mécanismes anti-radicalaires, SET et HAT. IP : potentiel d'ionisation ; BDE : Energie de dissociation de liaison (Liang et Kitts, 2014)

Pour le mécanisme SET, c'est la capacité de la molécule antioxydante à donner un électron, ou potentiel d'ionisation, qui est primordiale. Pour le mécanisme HAT, c'est la capacité de la molécule antioxydante à donner un hydrogène, c'est à dire l'enthalpie de la dissociation de sa liaison, qui est un des principaux facteurs d'efficacité. Dans les deux cas, la présence de plusieurs groupements hydroxyles facilement transférables est un des facteurs principaux de l'activité antioxydante (Liang et Kitts, 2014). Les molécules donneuses voient leur structure modifiée, et la stabilité de leur structure à basse énergie permet de stopper la chaîne d'oxydation. Les molécules possédant des groupes hydroxylés, comme les composés phénoliques, sont donc particulièrement efficaces.

Les agents chélateurs des ions métalliques ne sont pas des molécules antioxydantes *stricto sensu*. Cependant, ils capturent les ions métalliques (figure 39), les rendant indisponibles pour une réaction avec le peroxyde d'hydrogène, empêchant ainsi la formation d'espèces très réactives.

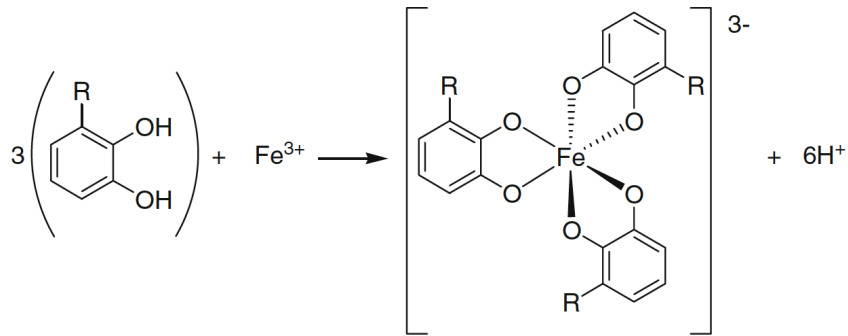


Figure 39 : Conformation attendue d'un complexe ion métallique – phénol. Gallols, R = OH; Catéchols, R = H. (Perron & Brumaghim, 2009)

Les ions métalliques jouent un rôle important dans la formation des radicaux hydroxyles et OH^- , *via* la réaction de Fenton (figure 40).



Figure 40 : Réaction de Fenton

Cette réaction permet la formation, à partir d'un ion métallique (Fe^{2+} ou Cu^+) et d' H_2O_2 , de son équivalent oxydé (Fe^{3+} ou Cu^{2+}) ainsi que d'un ion OH^- et du radical hydroxyle $\text{HO}\cdot$, l'un des oxydants les plus puissants présent à l'état naturel (Cherrak *et al.*, 2016 ; Perron & Brumaghim, 2009). Les excès en ions métalliques mettent donc indirectement en danger les structures cellulaires. Les composés phénoliques, possédant de nombreux groupements hydroxyles, sont des chélateurs efficaces. Une fois déprotonées, les molécules chélatrices forment un complexe plus ou moins stable avec l'atome métallique selon leur structure (Perron & Brumaghim, 2009).

Les agents réducteurs sont des molécules à faible potentiel redox. Ils sont donc oxydés en priorité par l'oxygène du milieu, épargnant par la même occasion d'autres molécules ou structures sensibles. Ce sont généralement de petits composés, comme le glutathion ou les acides ascorbique et malique (Loftsson, 2014).

D. Les tests antioxydants

Plusieurs tests permettent de mesurer la capacité antioxydante d'une molécule ou d'un mélange. La polarité de l'échantillon à tester et la nature du mécanisme à mesurer vont déterminer le choix du test, chacun mettant en lumière avec plus ou moins de sélectivité les différents types de mécanisme. Avant de passer à un modèle plus complexe ou lors d'une phase de screening d'extraits ou de molécules, les tests *in tubo* sont très souvent utilisés, ceux-ci étant simples à mettre en place, reproductibles et peu coûteux. La plupart utilisent des radicaux stables changeant de couleur selon leur état d'oxydation, ce qui permet de suivre l'activité par spectrophotométrie. Dans cette étude, le choix s'est porté sur trois tests : deux permettant d'évaluer l'activité anti-radicalaire et un troisième permettant de mesurer l'activité réductrice.

Le DPPH[•] (2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl) est un radical libre, de couleur violette en solution, possédant un électron non apparié en son centre (figure 41).

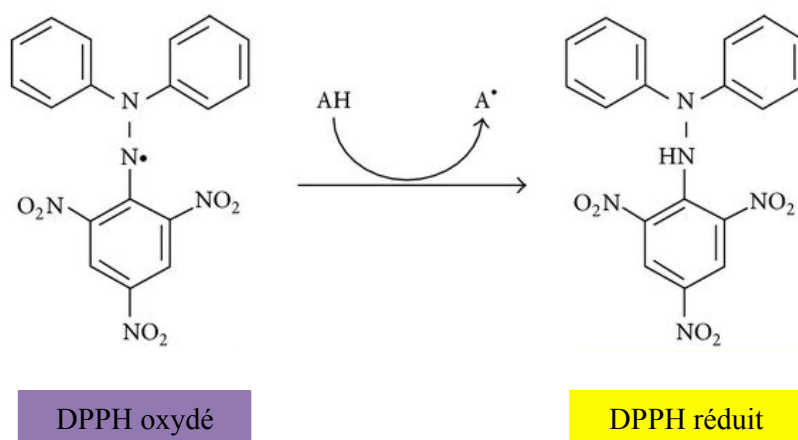


Figure 41 : Réduction du radical DPPH par un antioxydant AH (modifié d'après Teixeira *et al.*, 2013)

Une fois l'atome d'azote réduit, la molécule change de conformation et la solution devient jaune. Sous forme réduite, l'oxydation du DPPH devient alors très difficile (Kedare & Singh, 2011). Les deux mécanismes anti-radicalaires (SET et HAT) permettent de réduire le DPPH[•]. Ainsi, ce test permet d'avoir une vue globale de l'activité anti-radicalaire de l'échantillon. Le DPPH[•] est soluble dans une grande variété de solvants, le rendant pertinent pour une large gamme d'échantillons (Kedare & Singh, 2011). L'utilisation du DPPH pour

déterminer la capacité antioxydante est connue de longue date (Blois, 1958). Étant économique, facile à mettre en œuvre, et hautement reproductible (Liang et Kitts, 2014), la technique a été déclinée de nombreuses manières (Kedare & Singh, 2011). Seulement, toutes ces itérations entraînent une difficulté à comparer les résultats entre les laboratoires et les méthodologies. Plusieurs facteurs étant parfois modifiés, de grandes différences peuvent être observées entre les études et ce, même pour l'activité de standards (Sharma et Bhat, 2009). Néanmoins, malgré sa sensibilité à la lumière, à l'oxygène et à la température (Ozcelik *et al.*, 2003), le test anti-radicalaire DPPH reste très reproductible dans des conditions contrôlées.

Autre radical souvent utilisé pour déterminer la capacité antioxydante d'échantillon, l'ABTS⁺ sous forme réduite ABTS, est incolore et nécessite avant utilisation d'être oxydé par voie chimique ou enzymatique (figure 42) (Karadag *et al.*, 2009). L'oxydation change sa couleur en un vert profond. Ce test est adapté à une gamme de polarité encore plus large que le DPPH, allant du lipophile à l'hydrophile (Prior *et al.*, 2005). Le radical ABTS⁺ peut être neutralisé par les deux mécanismes SET et HAT (Prior *et al.*, 2005). Ce test peut donc se montrer très pertinent pour renforcer les résultats obtenus par le test DPPH.

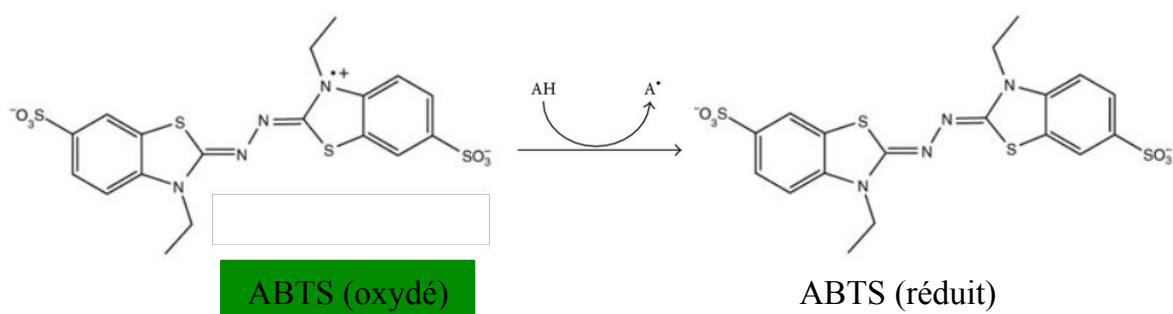


Figure 42 : Réduction du radical ABTS⁺ par un antioxydant (modifié d'après Watkins *et al.*, 2017)

Enfin, dernier test, celui du pouvoir réducteur du fer, ou test FRAP, correspond à la capacité d'un échantillon à réduire les ions ferriques (Fe³⁺) en ions ferreux (Fe²⁺). Chaque ion ferrique est associé à deux molécules de TPTZ (2,4,6-Tris(2-pyridyl)-s-triazine). Au contact d'un agent réducteur, le Fe³⁺ est réduit en Fe²⁺ et une coloration bleue très intense apparaît (Benzie & Strain, 1996). Contrairement aux deux précédents tests DPPH et ABTS, le test FRAP ne mesure pas la capacité anti-radicalaire de l'échantillon, mais son pouvoir réducteur. Même si, seule la première moitié du mécanisme SET est prise en compte, ce test est

considéré comme un intéressant révélateur de celui-ci (Prior *et al.*, 2005 ; Liang et Kitts, 2014).

E. Utilisation des antioxydants dans l'industrie

Dans l'industrie agro-alimentaire, le marché des additifs était estimé en 2017 à 49 milliards de dollars (PR Newswire). Plusieurs acteurs financiers prévoient une forte croissance dans les prochaines années menée par la volonté du secteur et des consommateurs de remplacer les principes actifs synthétiques par des composés naturels. Parmi les additifs, certains servent à modifier les qualités organoleptiques comme le goût (édulcorants), la texture (émulsifiants, stabilisants, gélifiants) ou la couleur (colorants). D'autres servent à maintenir dans le temps ces caractéristiques, comme les conservateurs dont le but est d'empêcher le développement de moisissures et de bactéries, ou les antioxydants qui ralentissent l'oxydation des produits. L'oxydation des produits alimentaires modifie les qualités organoleptiques, la texture et peuvent réduire la qualité nutritionnelle, voire créer des composés toxiques compromettant la sécurité alimentaire (Carocho *et al.*, 2018).

Dans le cas des produits alimentaires riches en matières grasses (huiles, beurre, viandes,...), l'oxydation se manifeste principalement par le rancissement, tandis que pour les produits frais (fruits, crustacés), elle se manifeste par un changement de couleur vers le marron (ou *browning*), à cause entre autres de l'activité de la polyphénol oxydase (Garcia-Garcia & Searl, 2016) et de la tyrosinase. L'oxydation peut être due à plusieurs phénomènes. La réaction la plus importante est l'auto-oxydation, lorsque l' 1O_2 et l' O_2 réagissent avec des radicaux présents ou directement avec les chaînes carbonées insaturées des matières grasses. Ce phénomène peut être catalysé par la lumière ainsi que les hautes températures. Ces deux facteurs physiques peuvent aussi initier l'oxydation, soit par photo-oxydation, soit par oxydation thermique (Thorat, 2013).

Aujourd'hui encore, la majorité des antioxydants utilisés sont d'origine synthétique. Plusieurs familles de composés, selon la nature de la matrice à protéger, sont utilisées :

- L'acide ascorbique (figure 43 A) est parmi les plus utilisés. Grâce à sa solubilité dans l'eau, il est tout particulièrement indiqué pour conserver les boissons (bières, jus de fruits, boissons sucrées) et les fruits frais préparés. Plusieurs dérivés de l'acide ascorbique existent (ascorbate de sodium, acides gras estérifiés d'acide ascorbique) qui permettent de couvrir une large polarité et variété de matrices à protéger.

- Le tocophérol (figure 43 B), avec ses 4 isoformes, fait aussi partie des antioxydants synthétiques les plus utilisés. Ses isoformes se distinguent par le nombre de groupements méthyles sur le noyau chromanol, ainsi que par leur capacité antioxydante, la forme α étant la plus active, suivie par la β , γ et δ . Ils sont utilisés pour des produits contenant de grandes quantités de matières grasses (viandes, produits laitiers, etc).
- La famille des butylates, avec ses représentants les plus utilisés : le BHT (hydroxytoluène butylé), le BHA (hydroxyanisole butylé) et le TBHQ (tert-butylhydroquinone) (figure 43 C). Ces derniers, non solubles dans l'eau, sont utilisés pour conserver les huiles. Le TBHQ est davantage indiqué pour la conservation des huiles végétales, tandis que le BHT et le BHA sont plus efficaces pour les huiles animales (Garcia-Garcia & Searle, 2016).

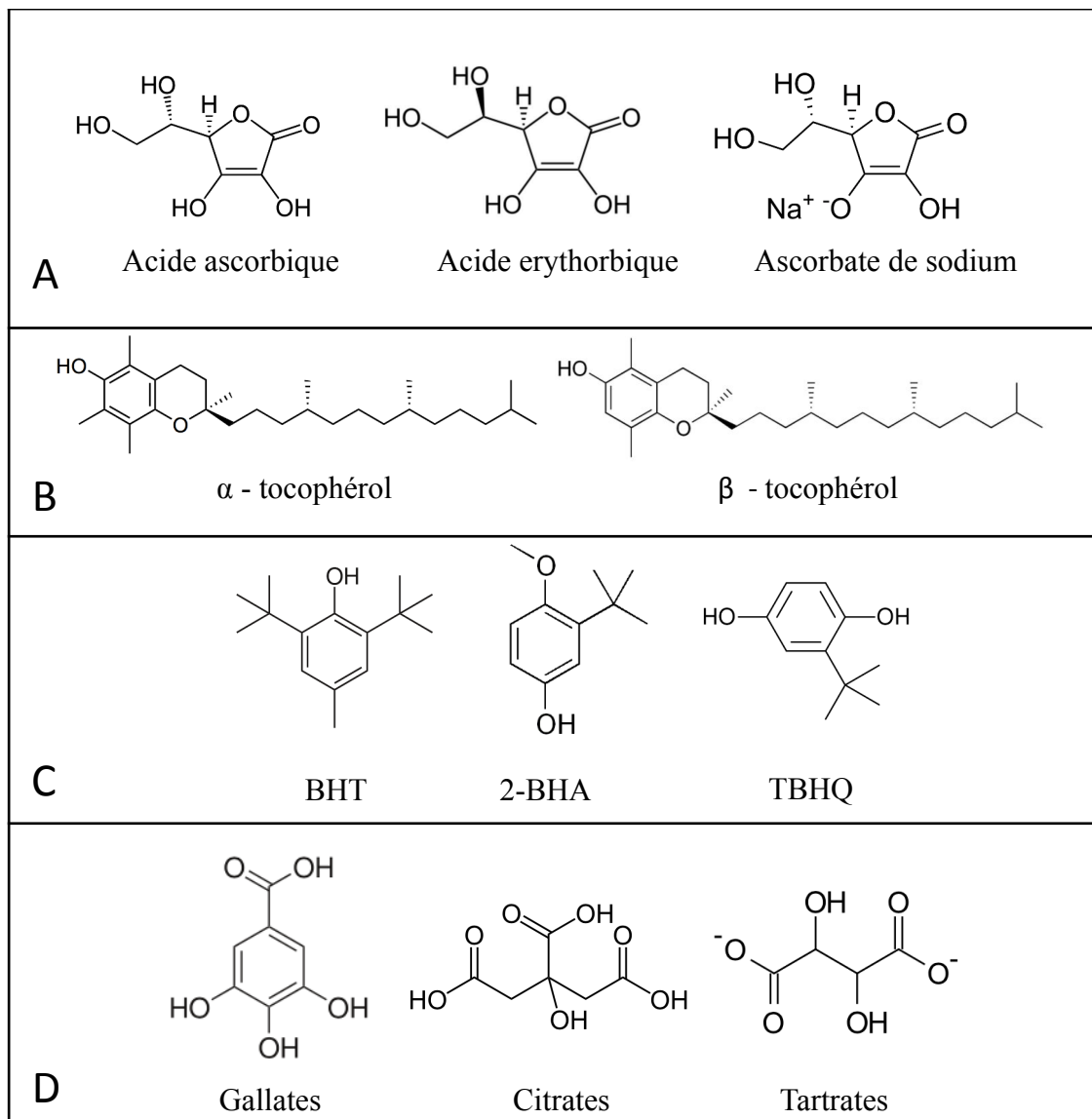


Figure 43 : Exemples d'antioxydants synthétiques utilisés dans l'industrie agro-alimentaire. A : Famille des ascorbates ; B : Famille des tocophérols ; C : Famille des butylates ; D : Autres familles.

Les familles des gallates, des citrates, des tartrates, des lactates (figure 43 D), etc. Tous possèdent un code identifiable dans la liste des ingrédients et sont, comme tous les additifs, testés par l'EFSA (European Food Safety Authority ou Agence européenne de sécurité des aliments) avant mise sur le marché.

Malgré des données contradictoires, les suspicions sur la dangerosité de certains antioxydants synthétiques ont poussé les acteurs du secteur à leur privilégier des antioxydants d'origine naturelle (Garcia Garcia & Searle, 2016). En Europe, sur la période 2000-2009, le marché total des antioxydants a connu une croissance de 1,7%, tandis que celui des antioxydants naturels bondissait de 35% (Thorat, 2013).

Les antioxydants d'origine naturelle peuvent être des molécules purifiées, des fractions, voire des extraits bruts (Garcia Garcia & Searle, 2016). Seul extrait présent sur la liste des additifs alimentaires, l'extrait de romarin est très utilisé comme antioxydant pour l'alimentation humaine et animale. Il est composé de nombreux polyphénols, dont les acides rosmarinique et carnosique. Malgré son insolubilité dans l'eau, il est utilisé dans un très grand nombre d'applications, ses propriétés étant connues depuis les années 50 (Carocho *et al.*, 2018). Ces caractéristiques organoleptiques (goût et odeur) étaient un frein à son utilisation dans certains produits, mais depuis l'inscription de l'extrait désodorisé de romarin sur la liste des antioxydants alimentaires, son utilisation s'est encore élargie (Directives 2010/67/UE et 2010/69/UE).

D'autres espèces végétales sont utilisées comme source de fractions purifiées enrichies en antioxydants naturels. C'est le cas de la sauge (*Salvia officinalis*) et de l'origan (*Origanum vulgare*) pour leurs fractions riches en polyphénols, de la tomate pour le lycopène (Ciriminna *et al.*, 2016), ou encore de l'œillet (*Tagetes erecta*) pour la lutéine (Li *et al.*, 2014). À l'exception des tocophérols et des caroténoïdes, la majorité des antioxydants naturels est plus polaire que les synthétiques, limitant leur efficacité par rapport à ces derniers dans les matrices à fort taux de matières grasses (Pokorny, 2007).

La même dynamique de recherche d'actifs naturels est à l'œuvre dans l'industrie cosmétique. Des composés antioxydants et des anti-âges naturels efficaces sont recherchés de manière à remplacer les synthétiques utilisés jusqu'aujourd'hui.

F. Les activités anti-âge

Les actifs anti-âge regroupent un ensemble de molécules permettant de maintenir les caractéristiques physiques et esthétiques de la peau.

Les rides trahissent le vieillissement de la peau. Elles sont le fruit de l'altération du derme, dont la structure est assurée principalement par deux protéines : le collagène et l'élastine. La première est présente en grande quantité, représentant chez l'Homme jusqu'à 80% du poids sec de la peau (Thring *et al.*, 2009). Elle lui confère sa résistance à l'étirement ainsi que sa structure globale. L'élastine, quant à elle, est présente en moins grande quantité, et permet de maintenir l'élasticité de la peau et sa résilience face aux déformations mécaniques (Bravo *et al.*, 2016). Naturellement, la dégradation de ces protéines est assurée respectivement par la collagénase (Matrix MetalloProteinase 1) et l'élastase qui, permettent leur renouvellement. En situation de stress oxydatif et en présence de ROS, la biosynthèse de ces enzymes augmente, entraînant un vieillissement accéléré de la peau (Mukherjee *et al.*, 2011). Les facteurs exogènes connus responsables de la production de ROS au niveau de la peau sont essentiellement les UV et les polluants.

Dès lors, deux manières de lutter contre le vieillissement de la peau sont possibles : empêcher les ROS de nuire ou inhiber ces enzymes. De nombreux inhibiteurs de la collagénase, issus d'extraits de plantes, ont été rapportés dans la littérature. Parmi eux, des flavonoïdes (ex : des catéchines), des polyphénols (Thring *et al.*, 2009) ou encore des stéroïdes (Hartmann *et al.*, 2015) sont retrouvés. De la même manière, certains tannins condensés (Piwowarski *et al.*, 2011), flavonoïdes, sesquiterpènes et lactones (Kanashiro *et al.*, 2007) sont connus pour inhiber l'action de l'élastase *in vitro*. Il en est de même pour certains extraits végétaux et huiles essentielles (Baylac & Racine, 2004).

Un autre problème esthétique de premier ordre pour le secteur de la cosmétique est l'hyperpigmentation. Les causes endogènes sont majoritairement liées au vieillissement, et les facteurs aggravants sont essentiellement les UV et la pollution (Parvez *et al.*, 2007). En réaction à ces agressions, de la mélanine est produite pour protéger la peau des UV et neutraliser les ROS (Liyanaarachchi *et al.*, 2018). Cependant, une trop grande quantité de mélanine dans les tissus peut entraîner une hyperpigmentation, voire être génotoxique et mener à la formation de mélanomes (Liyanaarachchi *et al.*, 2018). La biosynthèse de la mélanine à partir de la tyrosine se fait selon plusieurs réactions où la tyrosinase est impliquée (figure 45). Dans un premier temps, la tyrosine est hydroxylée en L-DOPA (L-dihydroxyphenylalanine), qui est elle-même oxydée en dopaquinone. Cette dernière,

polymérisée en association avec le glutathion ou la cystéine donne un premier type de mélanine, la phéomélanine. Le second type, l'eumélanine, nécessite quelques étapes supplémentaires, où la tyrosinase est aussi impliquée. Cette enzyme est donc un acteur clé de la biosynthèse des mélanines, et son inhibition permettrait de réduire les risques d'hyperpigmentation.

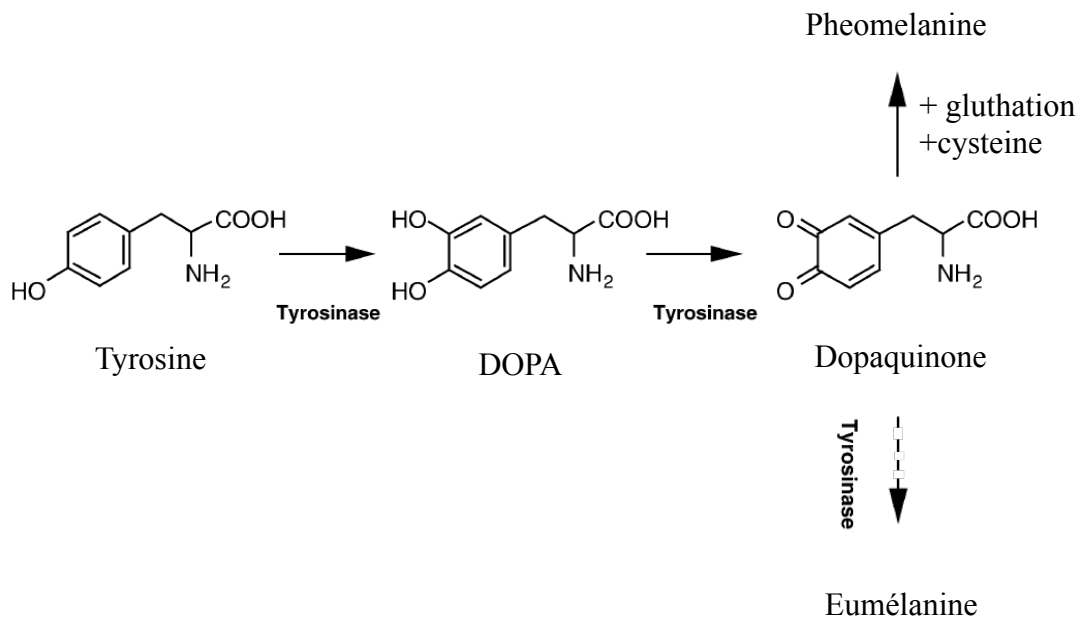


Figure 45 : Voie de biosynthèse simplifiée des mélanines (modifié d'après Parvez *et al.*, 2007).

Le composé de synthèse le plus utilisé dans l'industrie pour inhiber la tyrosinase est l'hydroquinone. Mais celle-ci, pouvant entraîner des effets secondaires très indésirables comme une perte irréversible de pigmentation (Solimine *et al.*, 2016), est progressivement remplacée sur le marché. Des composés extraits de plusieurs espèces végétales et fongiques se sont révélés efficaces contre la tyrosinase, comme de nombreux polyphénols et aldéhydes. Parmi eux, l'arbutine, l'aloésine, et l'acide kojique, isolés respectivement d'*Arctostaphylos uva-ursi*, d'*Aloe vera* et de *Aspergillus oryzae*, sont utilisés dans l'industrie cosmétique comme anti-tâches (Parvez *et al.*, 2007). Cependant, eux aussi sont associés à de nombreux effets secondaires indésirables, comme l'apparition d'érythème et d'eczéma (Solimine *et al.*, 2016).

G. Les plantes halophiles, source abondante de molécules actives

Les plantes halophiles ont développé plusieurs mécanismes physiologiques afin de faire face aux stress qu'elles subissent dans leur habitat naturel, et notamment face au stress oxydatif qui en est la conséquence. Parmi ces mécanismes, la synthèse de nombreux métabolites secondaires, capables de contrer les effets des ROS, est connue (del Rio, 2015). Ces métabolites secondaires, de par leur structure, peuvent avoir une ou plusieurs activités biologiques, et leur mélange dans les plantes et les extraits leur confère des propriétés diverses (Yang *et al.*, 2018).

La Criste marine est une plante dont l'utilisation est connue de longue date, sa première trace datant d'Hippocrate. Ce dernier recommandait son utilisation en infusion afin de lutter contre les douleurs menstruelles (Dechambre, 1886). Dans de nombreux pays, la plante a été consommée fraîche, en sauce ou confite dans du vinaigre, notamment pour ses qualités gustatives (Renna & Gonnella, 2012). Elle a aussi été utilisée en médecine traditionnelle pour ses propriétés diurétiques, carminatives et digestives et pour son action contre les infections urinaires et prostatiques (Méot Duros *et al.*, 2008 ; Cornara *et al.*, 2009a ; Cornara *et al.*, 2009b). Les marins l'ont aussi utilisée jusqu'au XIX^e siècle pendant les longs voyages, en tant qu'anti-scorbutique (Cunsolo & Ruberto, 1993), l'espèce étant riche en vitamine C (Franke, 1982). Plus récemment, des extraits apolaires et les huiles essentielles de Criste marine ont montré des activités anti-bactériennes et anti-fongiques (Flamini *et al.*, 1999 ; Houta *et al.*, 2015 ; Kumarasamy *et al.*, 2002 ; Méot-Duros *et al.*, 2010). Les huiles essentielles de Criste ont fait l'objet de nombreuses publications, concernant leur composition (Flamini *et al.*, 1999 ; Pateira *et al.*, 1999 ; Houta *et al.*, 2015 ; Özcan *et al.*, 2006 ; Pavela *et al.*, 2017) et leurs activités antioxydantes, notamment en protégeant les lipides de la peroxydation (Ruberto *et al.*, 2001 ; Kulisic-Bilusic *et al.*, 2010 ; Jallali *et al.*, 2014). Il semblerait qu'il existe sur le pourtour méditerranéen plusieurs chémotypes de Criste, renvoyant à plusieurs populations distinctes dont les huiles essentielles présentent des compositions et activités variables (Tsoukatou *et al.*, 2001 ; Pateira *et al.*, 1999 ; Pavela *et al.*, 2017).

Les extraits hydroalcooliques de Criste présentent aussi des activités antioxydantes intéressantes (Méot-Duros & Magné, 2009 ; Jallali *et al.*, 2014), apportant des informations sur les molécules bioactives chez cette espèce. Il est établi que *C. maritimum* est riche en composés phénoliques, notamment en acide chlorogénique et en dérivés d'acides

caffeoylquiniques (Siracusa *et al.*, 2011). Cependant, peu nombreuses sont ces études et il reste encore de nombreux composés à identifier dans ces extraits polaires.

Le nom de la famille de la Lavande de mer, les *Plumbaginaceae*, provient de la plumbagine (5-hydroxy-2-méthyl-1,4-naphtoquinone), molécule qui est retrouvée dans les racines et qui servait de colorant pour les tatouages tribaux en Afrique (Liebezeit *et al.*, 1999). Les racines et les feuilles de plusieurs espèces étaient aussi utilisées en médecine traditionnelle, notamment *L. sinense* en Asie du sud-est (Murray *et al.*, 2004), ou *L. brasiliense* en Amérique du Sud (Tang *et al.*, 2014) pour traiter les diarrhées, la dysenterie, l'hépatite ou la fièvre (Aniy *et al.*, 2002). À notre connaissance, l'espèce n'a cependant pas fait l'objet d'études concernant des activités biologiques. Chez plusieurs autres espèces du genre, des activités anti-tumorales (Medini *et al.*, 2015 ; Tang *et al.*, 2012), anti-virales contre l'herpès (Kuo *et al.*, 2002 ; Medini *et al.*, 2016), anti-fongiques et bactériennes (Gadetskaya *et al.* 2015), hépatoprotectives (Lee *et al.*, 2017 ; Yang *et al.*, 2014) et antioxydantes (Medini *et al.*, 2015 ; Geng *et al.*, 2015 ; Rodrigues *et al.*, 2015) ont été décrites. Parmi les molécules responsables de ces activités, des polysaccharides, des alcaloïdes, des terpènes, des flavonoïdes, ou encore des tannins (Tang *et al.*, 2014 ; Gadetskaya *et al.*, 2017) ont été identifiés. En outre, il est connu que l'espèce accumule des polyamines, de la β -alanine bêtaïne et de la choline-O-sulfate en réponse à la contrainte saline (Lahrer & Hamelin, 1975 ; Bouchereau *et al.*, 1999).

Plusieurs espèces du genre *Tripleurospermum* ont été utilisées en médecine traditionnelle, comme *T. disciforme* pour ses propriétés anti-inflammatoires, anti-spasmodiques, antiseptiques (Tofighi *et al.*, 2015), ou *T. parviflorum* pour ses propriétés antipyrétiques, son action contre les maux de ventre ou la toux (Altundag & Öztürk, 2011). Toutefois, aucune utilisation de l'espèce *T. maritimum* en médecine traditionnelle n'a été documentée (Kay, 1994), et aucune activité biologique n'a été rapportée chez cette espèce. Chez *T. disciforme*, une espèce proche, des activités anti-inflammatoires, anti-ulcères, analgésiques, antioxydantes, antibactériennes et anti-fongiques ont été publiées (Öztürk *et al.*, 2010 ; Tofighi *et al.*, 2015). Peu d'études phytochimiques ont porté sur les représentants du genre *Tripleurospermum*, comparativement aux genres proches *Chamomilla* et *Matricaria*. Ces genres contiennent des espèces déjà très utilisées dans les industries cosmétique et agro-alimentaire (Petronilho *et al.*, 2012), et de nombreuses études ont porté sur leurs activités biologiques (Singh *et al.*, 2011) comme la camomille allemande (*Matricaria recutita*). La

composition de leurs huiles essentielles ainsi que des extraits apolaires de quelques espèces ont été étudiés de façon approfondie.

H. Contexte de l'étude

L'objectif de ce projet de recherche est la valorisation de plantes du littoral dans les secteurs de la cosmétique et de l'agro-alimentaire. Dans un premier temps, et pour les actifs anti-oxydant et anti-âge, il est prévu de commercialiser des extraits bruts ou semi-purifiés.

La stratégie adoptée est différente selon le secteur. Pour la partie cosmétique, l'entreprise partenaire du projet souhaite commercialiser directement au consommateur les actifs inclus dans des produits semi-finis. En revanche, concernant le secteur agro-alimentaire, elle s'adressait aux industriels déjà installés, afin de commercialiser des produits moins purifiés. Cette organisation en pyramide doit rentabiliser chaque étape d'une production et occuper différentes gammes permettant à terme une base commerciale solide.

La variété des applications étant large, le projet de recherche doit porter à la fois sur des fractions polaires et des fractions apolaires. Le solvant choisi doit être de polarité moyenne, pour permettre de balayer une large palette de composés. Les plus apolaires pourront être intégrés dans la partie huileuse des produits cosmétiques, ou pourra aider à conserver les produits alimentaires lipophiles, majoritaires dans le secteur alimentaire. Les produits hydrophiles, en revanche, pourront être intégrés à la partie aqueuse de la préparation cosmétique ou aux boissons pour l'agro-alimentaire.

Jusqu'à présent, la grande majorité des conservateurs étaient issus de la chimie de synthèse (BHT, BHA, tocophérol). Des soupçons d'effets nocifs pour la santé humaine sont apparus, encourageant l'effort de recherche vers des conservateurs naturels. Les freins de l'utilisation de ces derniers sont essentiellement financiers, les coûts et délais de culture, d'extraction et de purification n'étant pas compétitifs face à la synthèse chimique. Néanmoins, ces dernières années ont vu la forte croissance des conservateurs naturels, ou issus de sources naturelles. Il est très probable que ce phénomène s'amplifiera pour se pérenniser, s'inscrivant dans un mouvement plus large. L'utilisation des conservateurs naturels est déjà devenue un argument marketing, et leur utilisation est obligatoire dans le cas des produits certifiés issus de l'agriculture biologique.

Les plantes sont considérées comme un vivier de molécules actives et sont à l'origine de la grande majorité des produits pharmaceutiques, cosmétiques et des additifs agro-

alimentaires, mais en regard assez peu utilisées comme source. La recherche de nouvelles plantes pour de nouvelles fonctionnalités est un impératif, d'autant que les acteurs des secteurs concernés sont de plus en plus sensibles à l'origine des molécules actives utilisées comme additifs surtout si cette origine peut être transformée en argument commercial.

Brièvement, la valorisation commerciale d'extraits de plantes passe par plusieurs étapes : (i) l'évaluation des activités biologiques des extraits (ii) l'objectivation des extraits par la caractérisation des molécules responsables de l'activité, (iii) l'évaluation de la cytotoxicité de ces extraits, avant une autorisation de mise sur le marché. Pour cette étude, une démarche de bioguidage a donc été appliquée. Celle-ci couple l'analyse des activités, le fractionnement des mélanges de molécules en ensembles de moins en moins complexes et l'identification des molécules en présence. Cette méthode permet d'évaluer l'implication des différentes parties dans l'activité de l'extrait (figure 46) tout en identifiant les molécules

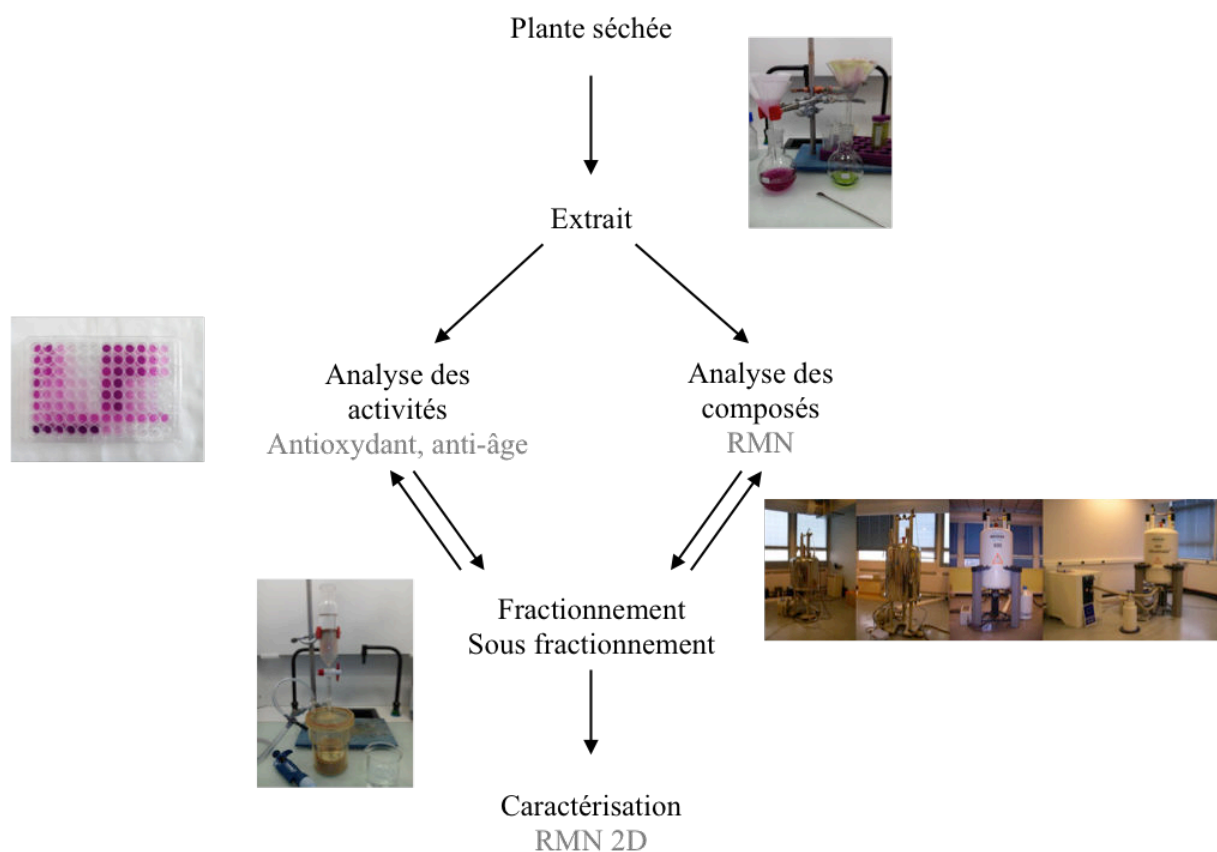


Figure 46 : Démarche de bioguidage. Les fractionnements successifs permettent de simplifier les spectres RMN, et de concentrer l'activité dans quelques fractions. Parfois des sous-fractionnements sont nécessaires lorsque les profils métaboliques sont trop complexes. responsables des activités.

Pour la caractérisation des molécules, l'utilisation de la RMN dans notre cas est toute indiquée, pour plusieurs raisons. Tout d'abord, cette technique permet d'analyser la composition d'un échantillon sans *a priori*, sans besoin de standards pour comparer. Les trois espèces présentant des profils métaboliques très différents, il faudrait pour d'autres techniques un grand nombre de standards. De plus, un spectre de RMN du ^1H permet d'avoir une bonne idée globale des types moléculaires présents dans un échantillon complexe. Enfin, les analyses sont non-invasives, rapides (en général quelques minutes par échantillon), et d'accès facilité par la proximité d'une plateforme spécialisée (service commun de spectroscopie de l'UBO).

II. MATERIEL ET METHODES

A. Récolte et stabilisation du matériel végétal

Les plantes ont été prélevées en Juillet 2015 sur la côte bretonne. La Criste marine a été échantillonnée au niveau de la pointe Saint Mathieu, la Matricaire maritime au Blanc-Sablon et la Lavande de mer à Fouesnant. Après un lavage rapide, elles sont essorées puis conservées pendant 48 h au congélateur à -20°C pour ensuite être lyophilisées, broyées et conservées sous forme de poudre jusqu'à l'extraction.

B. Extraction à l'éthanol 50%

Les extractions se déroulent de la même manière sur tous les échantillons déshydratés de plantes prélevées dans leur habitat naturel. Le solvant utilisé est une solution éthanol/eau 50:50 (v/v) et l'extraction est réalisée à raison de 1 mL de solvant pour 100 mg de matière sèche. Le mélange est agité pendant 20 minutes puis centrifugé à 4000 g à 4°C (Jouan CR 4-22) pendant 5 minutes. Cette étape est répétée 3 fois de suite, en reprenant à chaque fois le culot avec le volume initial de solvant. Les surnageants sont recueillis à chacune des étapes, filtrés et rassemblés pour être évaporés sous vide à 45°C. Le résidu final est pesé, repris dans de l'eau distillée, puis placé au congélateur à -20°C avant les analyses.

C. Fractionnement par chromatographie d'adsorption sur silice C18

Les colonnes de silice greffée en C18 ou en phase inverse, apolaire, sont le plus souvent employées pour fractionner les extraits polaires (de type hydro-alcooliques). Leurs constituants sont décrochés sélectivement en éluant la colonne avec un solvant selon un gradient de polarité décroissante. Le fractionnement des extraits hydro-alcooliques est réalisé sur colonne de gel de silice C18 en phase inverse (RP-18, 60Å, 35-70µm, DAVISIL®, GRACE) Après avoir déterminé la quantité d'extrait, la silice est coulée dans le premier solvant d'éluion (à raison de 30 g de silice par gramme d'extrait). Après dépôt de l'extrait, le gradient d'éluion suivant est appliqué : eau distillée, MeOH 20%, MeOH 40%, MeOH 60%, MeOH 80%, MeOH 100% et acétate d'éthyle 100% (le volume de solvant utilisé à chaque éluion correspondant au double du volume de la phase stationnaire). Dans la suite du document, les fractions seront désignées par FrXX, XX étant le pourcentage de méthanol qui

a servi à leur élution. Dans certains cas, un sous-fractionnement est réalisé, de la même façon, en diminuant l'incrément de MeOH de 5%. Les sous-fractions qui en résultent sont désignées par sFRXX. Chaque fraction est récupérée dans un ballon et amenée à sec au moyen d'un évaporateur rotatif à 45°C.

D. Hydrolyse acide

Afin de déterminer la structure de dérivés glycosylés de métabolites secondaires, les fractions les contenant ont été soumises à une hydrolyse acide. L'échantillon est mélangé avec une solution d'acide chlorhydrique à 1 N, puis le mélange est chauffé à 100°C pendant une heure. Le mélange est ensuite séché à l'évaporateur rotatif, et le résidu sec repris dans un solvant deutéré adapté.

E. Contenu en polyphénols totaux

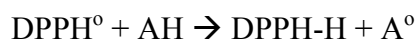
La méthode utilisée est celle de Wong-Paz *et al.* (2014) adaptée en microplaques. En milieu alcalin, les polyphénols réduisent le réactif de Folin-Ciocalteu (mélange d'acide phosphotungstique et d'acide phosphomolybdique) de couleur jaune en oxyde de tungstène et de molybdène, de couleur bleue. L'intensité de la couleur bleue formée est mesurée à 700 nm. Utilisé pour réaliser la droite d'étalonnage, l'acide gallique est préparé à des concentrations de 0 à 500 mg.L⁻¹.

A 20 µL d'échantillon dilué ou d'acide gallique sont ajoutés 125 µL d'eau distillée, 20 µL de réactif de Folin-Ciocalteu et 20 µL de carbonate de sodium (Na₂CO₃) à 0,01 M. Le mélange est placé à température ambiante pendant 5 minutes, puis la densité optique est mesurée à 700 nm. Les résultats sont exprimés en mg d'équivalent acide gallique par gramme de matière sèche (mg Eq AG/g MS).

F. Tests antioxydants

1. Capacité de piégeage du DPPH

La méthode utilisée est celle de Chen *et al.* (1999) modifiée par Marwah *et al.* (2007). La réaction de piégeage du radical DPPH (2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl) est la suivante :





où AH correspond à un composé antioxydant.

Le radical DPPH, de couleur violette en solution, absorbe à 517 nm. Une diminution de la densité optique est donc observée lors du piégeage de ce radical. Le réactif utilisé est une solution de radical DPPH 100 μM dans du méthanol 90%, qui doit avant utilisation être agitée 12 h à 4°C à l'obscurité. Le témoin positif, composé ayant une activité antioxydante et antiradicalaire connue, est le BHT (hydroxytoluène butylé). Un mL de réactif est ajouté à 1 mL d'extrait dilué à différentes concentrations (pour les témoins, 1 mL de solution de BHT ou 1 mL de méthanol 95%). Après agitation, les tubes sont mis à incuber une heure à l'obscurité, à température ambiante. La lecture de la densité optique se fait ensuite à 517 nm. Cette méthode a été miniaturisée afin d'être appliquée en microplaque 96 puits (100 μL de l'échantillon dilué ajoutés à 100 μL de réactif) et la densité optique lue à 517 nm au lecteur de microplaque (Multiskan FC, Thermo Scientific Technologies®). Le pourcentage d'inhibition (piégeage) des radicaux libres est ensuite calculé selon la formule suivante (1) :

$$\%I = [(DO_T - DO_E) / DO_T] * 100 \quad (1)$$

où %I correspond au pourcentage d'inhibition, DO_T à la densité optique du témoin négatif (avec le réactif DPPH seul, qui présente une inhibition de 0%) et DO_E la densité optique de l'échantillon. Les résultats sont ensuite exprimés en concentration inhibitrice CI_{50} qui est la concentration d'extrait nécessaire pour piéger 50% des radicaux libres, en traçant la courbe $DO = f(\text{concentration de l'extrait})$. La CI_{50} est exprimée en mg.mL^{-1} .

2. Pouvoir réducteur du fer (FRAP)

La méthode utilisée est celle d'Oyaizu (1986), légèrement modifiée et adaptée en microplaque. Elle évalue la réaction de réduction des ions Fe^{3+} (jaune-brun en solution) en Fe^{2+} (vert), par les échantillons. Pour ce faire, 20 μL d'échantillon sont mélangés à 50 μL de tampon phosphate à 0,2 M (pH 6,6) et 50 μL de $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ à 1% (m/v). L'ensemble est incubé pendant 20 minutes à 50°C, puis 50 μL de TCA à 10%, 50 μL d'eau distillée et 10 μL de FeCl_3 à 0,1% (m/v) sont ajoutés. Un témoin négatif est réalisé où l'extrait est remplacé par son solvant. Le témoin positif est une solution d'acide gallique. Après incubation pendant 30 minutes à l'obscurité et à température ambiante, la DO du produit vert formé dans les puits est lue à 630 nm. Le pourcentage de réduction est ensuite calculé selon la formule suivante (2):

$$\%R = [(DO_E - DO_T) / DO_T] * 100 \quad (2)$$

où %R correspond au pourcentage de réduction, DO_E la densité optique de l'échantillon et DO_T la densité optique du témoin.

L'activité antiradicalaire mesurée est exprimée en concentration efficace EC_{50} ($mg \cdot mL^{-1}$) en traçant la courbe $\%R = f(\text{concentration de l'extrait})$.

3. Capacité de piégeage du radical ABTS

La méthode utilisée est celle de Re *et al.* (1999), modifiée et adaptée en microplaques. Elle mesure l'activité anti-radicalaire contre le radical $ABTS^+$. Une solution d'ABTS (7 mM) est mélangée avec du persulfate de potassium (2,45 mM) puis diluée dans l'éthanol 100% jusqu'à obtenir une DO à 734 nm de 0,7. Le Trolox, utilisé comme témoin positif, est préparé dans de l'eau distillée et testé à 0,1, 0,2, 0,3, 0,4 et 0,5 $g \cdot L^{-1}$. Puis 180 μL de solution $ABTS^+$ sont ajoutés à 20 μL d'échantillon ou de trolox, l'ensemble est agité pendant 4 minutes puis la DO est lue à 734 nm. Les résultats sont exprimés en mg d'équivalents trolox / g d'extrait sec.

G. Activité anti-âge

1. Activité anti-collagénase

L'inhibition de l'activité de la collagénase des échantillons est mesurée à l'aide du kit ENZO MMP-1 (Colorimetric Drug Discovery Kit). Brièvement, 50 μL d'extrait sont mélangés avec 50 μL de tampon (50 mM HEPES, 10 mM $CaCl_2$, 0,05% Brij-35, 1 mM DTNB, pH = 7,5), et 20 μL d'enzyme MMP-1 (Matrix MetalloProteinase-1) (765 mU/ μL). Pour le témoin négatif, l'échantillon est remplacé par 50 μL de tampon et, pour le témoin positif, par 50 μL d'inhibiteur spécifique NNGH-9 [N-Isobutyl-N-(4-methoxyphenylsulfonyl) glycy l hydroxamique]. La réaction est initiée par l'ajout de 10 μL de substrat (substrat peptidique chromogénique) (1mM), et la DO à 412 nm est enregistrée toutes les minutes entre 10 et 20 minutes après le début de la réaction. L'activité d'inhibition est calculée par la formule suivante :

$$\%I = (V_E / V_T) * 100$$

où %I est le pourcentage d'inhibition, V_E le coefficient directeur de la régression linéaire de l'inhibition de l'échantillon en fonction du temps, et V_T le coefficient directeur de la régression linéaire de l'inhibition du témoin en fonction du temps.

2. *Activité anti-élastase*

L'inhibition de l'élastase est déterminée en microplaques, en utilisant le SANA (N-Succinyl-Ala-Ala-Ala-p-nitroanilide) comme substrat, d'après la méthode décrite par Kalyana Sundaram *et al.* (2018). La réaction a lieu dans du tampon Tris-HCl (0,2 M, pH = 8). Avant ajout de 25 μ L de substrat (1 mg.mL⁻¹), 25 μ L d'extrait, 25 μ L d'enzyme (10 μ g.mL⁻¹) et 175 μ L de tampon sont incubés pendant 20 minutes à 37°C. Le sulfate de cuivre à 100 mM est utilisé comme témoin inhibiteur. Après 20 minutes de réaction, l'absorbance est mesurée à 410 nm, et l'inhibition calculée selon la formule :

$$\%I = (A_T - A_E) / A_T * 100$$

où %I est le pourcentage d'inhibition, A_T l'absorbance du témoin et A_E l'absorbance de l'échantillon.

3. *Activité anti-tyrosinase*

L'inhibition de la tyrosinase est déterminée en utilisant la L-DOPA comme substrat (Masuda *et al.*, 2005). Les tests sont effectués en microplaques de 96 puits, et l'absorbance lue à 475 nm. Les échantillons sont dilués dans le DMSO 50%. Chaque puits contient 40 μ L d'échantillon, 80 μ L de tampon phosphate (0,1 M, pH = 6,8), 40 μ L de tyrosinase (31 unités/mL) et 40 μ L de L-DOPA (2,5 mM). Le témoin positif est une gamme d'acide kojique. Un blanc est réalisé sans L-DOPA, et les résultats sont comparés à un témoin négatif composé de DMSO 50% à la place de l'échantillon. Les résultats sont exprimés en mg d'équivalents acide kojique / g d'extrait sec.

H. Résonance Magnétique Nucléaire

La résonance magnétique nucléaire est une technique non destructive permettant l'étude structurale de composés chimiques en solution. Cette technique se fonde sur les propriétés cinétiques et magnétiques de nombreux noyaux atomiques possédant un spin nucléaire (^1H , ^{13}C , ^{31}P ,...) et la possibilité de les faire résonner dans un champ magnétique. La réaction des noyaux à cette excitation est mesurée par une sonde qui permettra d'obtenir l'environnement chimique du noyau considéré. L'ensemble des analyses a été réalisé au sein du service commun de RMN-RPE de l'Université de Bretagne Occidentale (Resp. Dr. S. Cérantola). Plusieurs séquences ont été utilisées pour cette étude, avec en premier lieu les séquences à une dimension :

- La séquence la plus simple et la plus rapide est la RMN à une dimension du proton (^1H) (RMN ^1H). Celui-ci est très sensible en RMN et très abondant dans toutes les molécules organiques. Il est par conséquent facilement détecté, et est représenté sous forme de pics sur le spectre. La multiplicité du signal du proton renseigne sur son environnement chimique : en plus d'être sensible au champ magnétique appliqué, ces noyaux sont également exposés aux champs magnétiques locaux issus des noyaux voisins. Il en résulte un couplage spin-spin qui a pour effet de scinder le signal de chaque noyau en plusieurs raies, selon la règle de multiplicité suivante : $2nI + 1$ raies où n est le nombre de noyaux voisins de celui considéré et I le spin du noyau étudié (pour le proton, $I = \frac{1}{2}$).

- L'autre séquence à une dimension utilisée ici est celle du carbone 13 (^{13}C). Le carbone 12 présentant un spin nul, il ne répond donc pas aux excitations magnétiques et ne peut donc être détecté en RMN. La caractérisation des atomes de carbone d'une molécule peut donc se faire uniquement sur la base du carbone 13 qui présente un spin égal à $\frac{1}{2}$. Le carbone 13 étant beaucoup moins sensible que le proton par RMN, les temps d'analyse nécessaires sont plus longs. Le signal de résonance du ^{13}C se présente sous la forme de singulets, et le déplacement chimique du signal dépend de la nature des groupements substituant le carbone. La séquence utilisée dans cette étude est une séquence « d'écho de spin J-modulée » ou J-mod, qui permet de distinguer les résonances des carbones quaternaires et des groupements CH_2 , CH et CH_3 .

En complément de ces séquences à une dimension, des séquences à deux dimensions ont été réalisées. Elles permettent de caractériser les couplages entre des noyaux différents : la

RMN 2D constitue donc un outil puissant pour la détermination des structures moléculaires, et se révèle souvent indispensable lorsque les séquences à une dimension ne suffisent pas. Plusieurs types de séquences 2D ont été utilisées au cours de cette étude :

- La séquence 2D homonucléaire ^1H - ^1H , ou COSY (COrrélation SpectroscopY). Ce type permet de mettre en évidence la présence des couplages scalaires (entre des noyaux séparés par deux ou trois liaisons, notés respectivement J_2 et J_3) entre deux noyaux de même nature. En absence de couplage, le spectre 2D se réduit à une diagonale. Un couplage entre deux noyaux de même nature se traduit par une tache dite de corrélation sur le spectre.

- La séquence 2D hétéronucléaire ^1H - ^{13}C , ou HMQC (Heteronuclear Multiple Quantum Coherence). Cette séquence permet de mettre en évidence la corrélation entre un proton et un carbone 13. On peut ainsi déterminer les corrélations directes $^1J_{\text{C-H}}$ et le ^{13}C d'un proton donné.

- La séquence 2D hétéronucléaire ^1H - ^{13}C , ou HMBC (Heteronuclear Multiple Bond Coherence). Elle permet de mettre en évidence les corrélations hétéronucléaires entre des noyaux séparés par 2 ou 3 liaisons (corrélations $^2J_{\text{CH}}$ et $^3J_{\text{CH}}$), et permet ainsi d'identifier l'enchaînement des carbones présents dans la molécule, ainsi que la présence de carbones quaternaires. Lors de ce travail, des séquences HMBC avec des temps de relaxation différents ont été réalisées.

L'ensemble des analyses a été effectué sur deux appareils : un spectromètre DRX 500 Avance (Brüker[®]) équipé d'une cryosonde inverse triple résonance TBI $^1\text{H}/\{\text{BB}\}/^{13}\text{C}$ avec gradient Z (500,13 MHz pour le ^1H et 125,75 MHz pour le ^{13}C), et un spectromètre Avance 400 (Brüker) qui possède une sonde de 5 mm dual $^1\text{H}/^{13}\text{C}$ (400,31 MHz pour le ^1H et 100,13 MHz pour le ^{13}C).

Les analyses homo et hétéronucléaires sont réalisées à 25°C. Les déplacements chimiques δ sont exprimés en parties par million (ppm). Le TSP (Trimethyl Silyl Propionate, sous forme de sel de sodium) en solution dans de l'eau deutérée est utilisé comme étalon interne. Les échantillons, qu'ils soient des extraits bruts ou des fractions purifiées, sont traités

de la façon qui suit : les résidus, après avoir été amenés à sec à l'évaporateur rotatif sous vide à 45°C, sont repris dans un volume de 700 µL d'eau lourde (D₂O) ou de méthanol deutéré selon la polarité du résidu sec. Les solutions sont ensuite transférées dans des tubes de 5 mm de diamètre interne afin d'être analysés par RMN. L'identification des composés révélés par RMN est réalisée soit par superposition de spectres témoins ayant subi des analyses RMN au préalable grâce au logiciel TopSpin 3.5 (Bruker), soit par l'analyse des spectres des différentes séquences à deux dimensions réalisées sur les échantillons. Les interprétations ont été effectuées en collaboration avec le personnel du service commun de RMN-RPE de l'UBO (N. Kervarec, G. Simon, et S. Cérantola).

I. Analyse qualitative des extraits par spectrométrie de masse (MALDI-TOF)

La spectrométrie de masse est une technique d'analyse destructive de composés secs. Cette technique permet la détection et l'identification de molécules par la mesure de leur masse couplée à celle de leur charge. Les résidus secs sont repris dans un mélange solvant :eau (v:v 50:50) avec une matrice en excès pour atteindre un ratio molaire de 1 :100 à 1 :5000, dont la nature dépend du type de composé à analyser. Cette solution est déposée sur une plaque MTP 384 et après séchage, la plaque est introduite dans un spectromètre Bruker Autoflex. Les cristaux formés sont observables grâce à une caméra (de grossissement x30) et peuvent être ciblés spécifiquement. Le spectromètre est composé de trois parties :

- La source d'ionisation (MALDI pour Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionisation) : cette partie permettra la vaporisation et l'ionisation des molécules présentes sur la plaque. La matrice absorbera la grande majorité du faisceau laser (laser à N₂, 337nm) et restituera l'énergie reçue à l'échantillon sous forme de protons H⁺. Sous l'impulsion de ce faisceau, le tout se vaporise, et se concentre à l'entrée de l'analyseur.
- L'analyseur (TOF) est un tube amené à vide d'une longueur d'un mètre et 50 cm. Dans ce tube, les ions concentrés à l'entrée seront propulsés par une impulsion électromagnétique, d'énergie égale pour tous les ions. Ils vont traverser le tube libre de tout champ selon une certaine vitesse, dépendante de leur masse : les plus petits ions arrivent en premier, tandis que les plus gros arrivent après. Cette séparation peut être affinée par enclenchement du mode reflectron, qui modifie la trajectoire des ions grâce à un miroir électrostatique, et permet d'augmenter significativement la distance

parcourue et d'obtenir ainsi une bien meilleure séparation des ions, et donc une meilleure résolution.

- Le détecteur note à chaque impact le temps effectué par l'ion pour effectuer la distance, et sous la forme d'une fonction temps/intensité, en déduit le rapport m/z .

J. Traitement statistique

Les variances n'étant pas homogènes, les activités ont été comparées à l'aide d'un test de Kruskal-Wallis.

III. RESULTATS

A. Activités biologiques et composition des extraits bruts

1. Activités biologiques

Les activités antioxydantes des extraits bruts des trois espèces sont présentées en figure 47. Concernant l'activité anti-radicalaire contre le radical DPPH (figure 47 A), l'extrait de *L. vulgare* est le plus actif, avec une CI_{50} de $0,04 \text{ mg.mL}^{-1}$. L'extrait de *C. maritimum* est trois fois moins actif, avec une CI_{50} de $0,12 \text{ mg.mL}^{-1}$, tandis que l'extrait de *T. maritimum* présente une plus faible activité ($CI_{50} = 0,22 \text{ mg.mL}^{-1}$).

Pour l'activité de neutralisation du radical $ABTS^+$, l'extrait brut de *L. vulgare* présente là aussi la plus forte activité, de $233,7 \text{ mg Trolox / g MS}$ (figure 47 B), tandis que les extraits de *T. maritimum* et *C. maritimum* sont moins actifs, avec des valeurs respectives de $87,6$ et $55,3 \text{ mg eq Trolox / g MS}$.

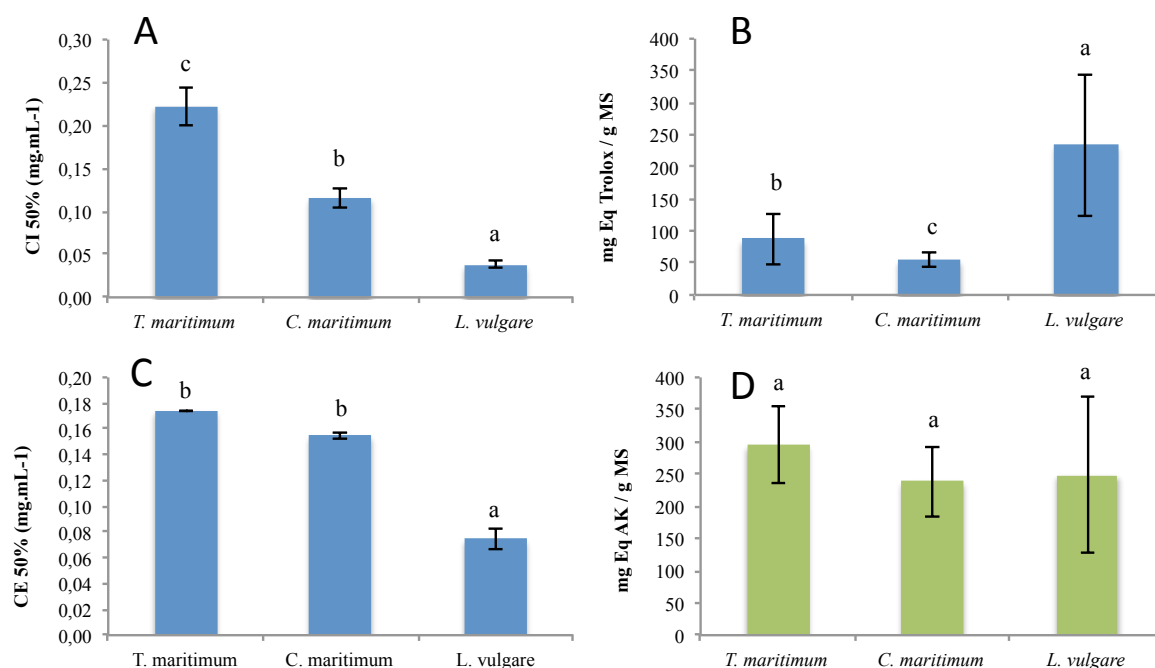


Figure 47: Activités antioxydantes et anti-tyrosinase des extraits bruts de *Tripleurospermum maritimum*, *Crithmum maritimum* et *Limonium vulgare*. A : Capacité de piégeage des radicaux DPPH, exprimé en CI_{50} ; B : Activité anti-radicalaire ABTS, exprimé en mg Eq Trolox/g MS ; C : réduction des ions ferreux FRAP, exprimé en CE50% ; D : Activité anti-tyrosinase, exprimé en mg Eq AK/g MS. ($P < 0,05$; $n = 3$)

L'extrait de *L. vulgare* présente la meilleure activité réductrice (figure 47 C), avec une CE_{50} de $0,07 \text{ mg.mL}^{-1}$, suivi de *T. maritimum* et *C. maritimum*, avec des CE_{50} respectives de $0,17$ et $0,15 \text{ mg.mL}^{-1}$.

Les extraits bruts des trois espèces présentent des activités anti-tyrosinase équivalentes (figure 47 D). Ainsi, les extraits de *T. maritimum*, *L. vulgare* et *C. maritimum* inhibe la tyrosinase à respectivement 294 , 248 et $238 \text{ mg eq AK / g MS}$.

Aucun extrait brut ne montre d'activité contre l'élastase ou la collagénase aux concentrations testées, jusqu'à $0,5 \text{ g.L}^{-1}$.

2. Composition

Le dosage des polyphénols totaux effectué sur les extraits bruts des 3 espèces d'halophytes est présenté en figure 48. Il apparaît que l'extrait de *L. vulgare* présente une quantité de polyphénols 3 fois supérieure à celle de *T. maritimum*, avec une valeur de $76,9 \text{ mg eq AG / g MS}$. *C. maritimum* possède quant à lui une quantité de $31,8 \text{ mg eq AG / g MS}$, proche de celle de *T. maritimum*.

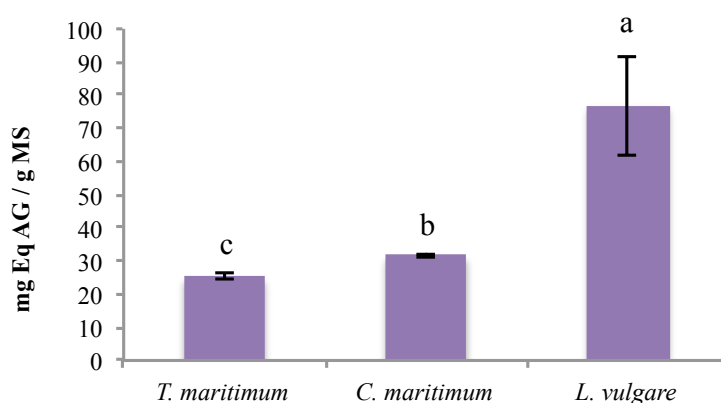


Figure 48 : Dosage des polyphénols totaux des extraits bruts de *T. maritimum*, *C. maritimum* et *L. vulgare*, exprimé en mg Eq AG/g MS ($P < 0,05$; $n = 3$).

Lors de ce travail, l'ensemble des extraits et fractions obtenues ont été analysées afin de caractériser la composition chimique. Ainsi, l'analyse RMN ^1H de l'extrait brut de *L. vulgare*, révèle plusieurs composés pouvant être identifiés (figure 49). L'extrait est majoritairement dominé par les oses. Parmi eux, le saccharose, ainsi que les formes α et β du glucose, sont présents avec les signaux caractéristiques des protons des carbones anomériques, respectivement à 4,65, 5,25 et 5,45 ppm. Les acides aminés comme l'alanine et la proline sont visibles par leurs raies caractéristiques, respectivement à 1,5 et 2,1-2,4 ppm. Les osmolytes tel la choline-O-sulfate et la β -alanine bêtaïne, sont aussi présents (singulets caractéristique respectivement à 3,1 et 3,2 ppm) (Catalfomo *et al.*, 1973 ; Bouchereau *et al.*, 1999). Des signaux sont observables dans la zone des protons aromatiques, entre 6 et 8 ppm, mais ils ne permettent pas de caractériser sans ambiguïté les molécules. La forme de l'enveloppe, dans cette zone, suggère la présence de petits composés phénoliques.

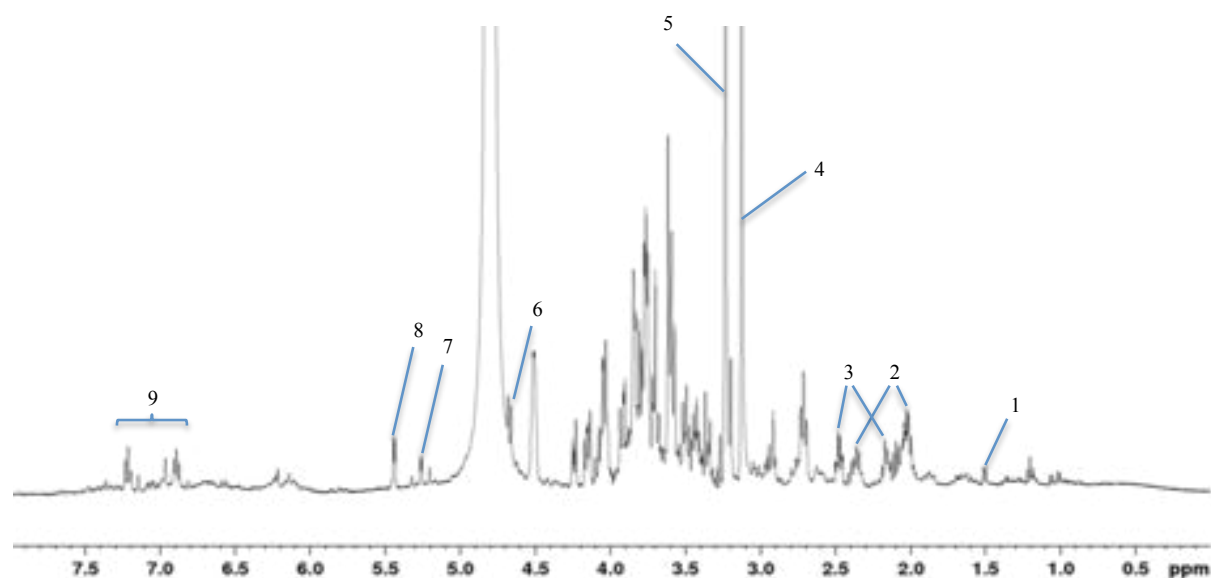


Figure 49 : Spectre du proton ^1H de l'extrait brut de *L. vulgare*. 1 : Alanine; 2 : Proline; 3 : Glutamine; 4 : Choline-O-sulfate; 5 : β -Alanine bêtaïne; 6 : β -glucose; 7 : α -glucose; 8 : Saccharose; 9 : Protons aromatiques.

Le profil RMN ^1H de l'extrait hydro-alcoolique de *C. maritimum* est dominé par les signaux des oses (figure 50). Le mannitol à 3,25 et 3,45 ppm est aussi visible. Enfin, la présence de signaux dans la zone des protons aromatiques, à 6,4, 6,95, 7,1, 7,2 et 7,65 ppm suggérerait la présence d'un groupement cafféoyl associé à une molécule d'acide quinique (signaux entre 1,8 et 2,2 ppm). Ces signaux permettent de confirmer la présence de l'acide chlorogénique (Meot-Duros & Magné, 2009).

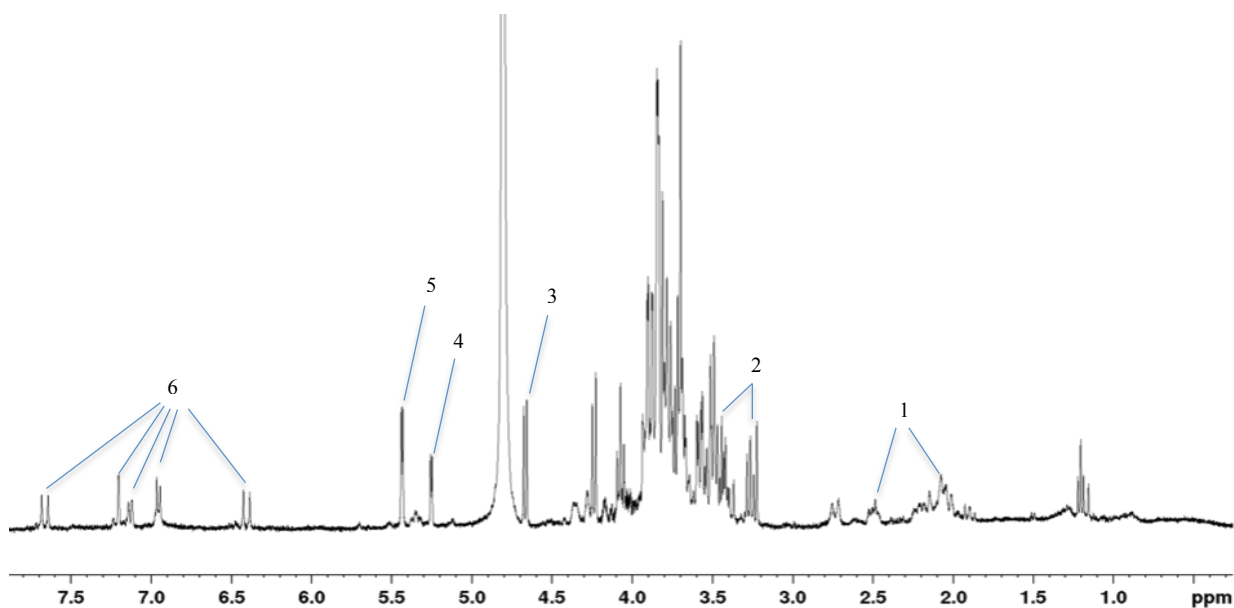


Figure 50 : Spectre du proton ^1H de l'extract brut de *C. maritimum*. 1 : Quinate libre et lié ; 2 : Maninitol; 3 : β -Glucose; 4 : α -glucose; 5 : Saccharose; 6 : Acide chlorogénique.

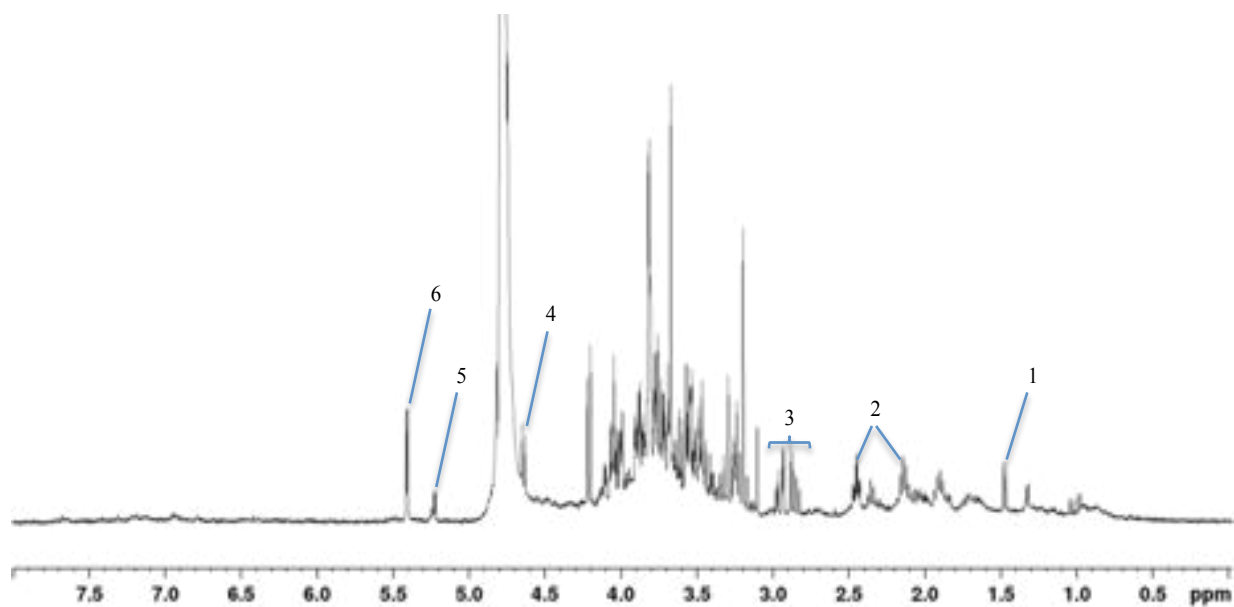


Figure 51 : Spectre du proton ^1H de l'extract brut de *T. maritimum*. 1 : Alanine ; 2 : Glutamine; 3 : Asparagine; 4 : β -Glucose; 5 : α -glucose; 6 : Saccharose.

L'extract hydro-alcoolique brut de *T. maritimum* est lui aussi principalement constitué d'oses, parmi lesquels le saccharose, ainsi que les formes α et β du glucose (figure 51). Des acides aminés sont aussi visibles, comme l'alanine à 1,45 ppm, la glutamine 2,1 et 2,45 ppm, et l'asparagine entre 2,8 et 3 ppm. Cependant, ici, aucune raie significative n'est visible dans la zone des protons aromatiques.

B. Activités biologiques et composition des fractions

1. *L. vulgare*

a. Activités biologiques

Les résultats de l'activité anti-DPPH des fractions de *L. vulgare* sont présentés en figure 52 A. L'activité anti-radicalaire de l'extrait brut se concentre essentiellement dans 3 fractions : les fractions Fr20 avec une CI_{50} très basse de $0,006 \text{ mg.mL}^{-1}$, Fr60 avec une valeur de $0,007 \text{ mg.mL}^{-1}$, et Fr40 avec $0,012 \text{ mg.mL}^{-1}$. La fraction acétate d'éthyle présente une activité faible, tandis que l'effluent (fraction H_2O) n'est pas actif aux concentrations testées.

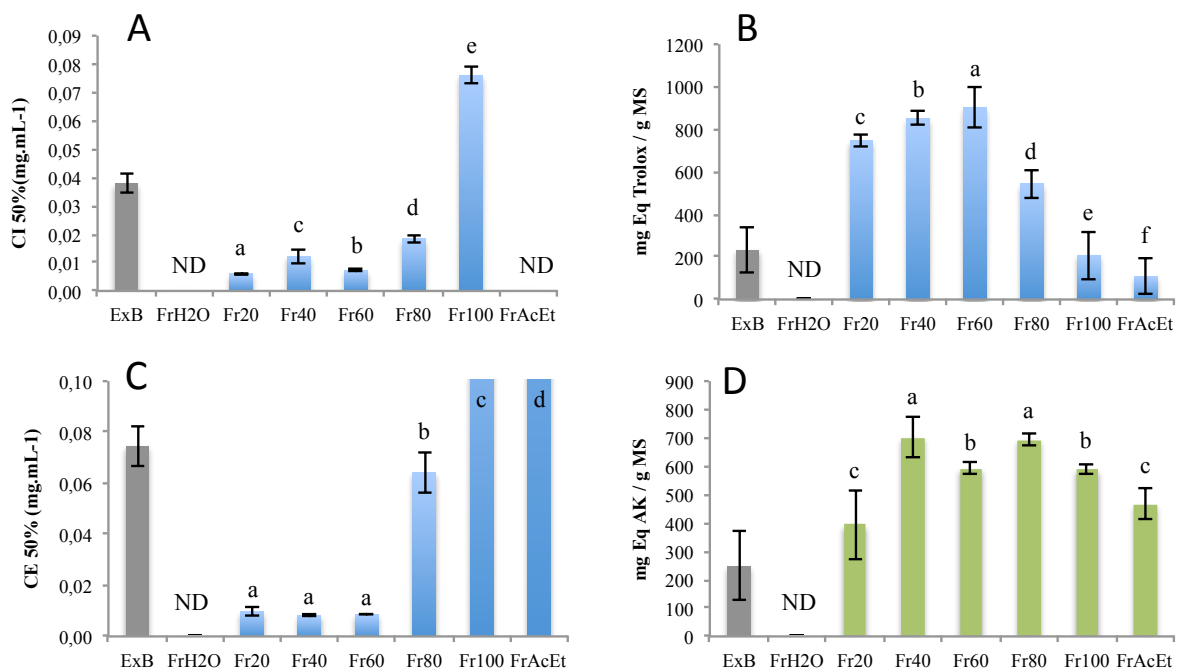


Figure 52 : Activités antioxydantes et anti-tyrosinase des fractions de *L. vulgare*. A : Capacité de piégeage des radicaux DPPH, exprimé en $CI_{50}\%$; B : Activité anti-radicalaire ABTS, exprimé en mg Eq Trolox/g MS ; C : réduction des ions ferreux FRAP, exprimé en $CE_{50}\%$; D : Activité anti-tyrosinase, exprimé en mg Eq AK/g MS. ND = Aucune activité biologique détectée. ($P < 0,05$; $n = 3$)

Les résultats de l'activité anti-ABTS des fractions de *L. vulgare* sont présentés en figure 52 B. De très fortes activités sont trouvées dans les fractions Fr20, Fr40 et Fr60 avec des valeurs respectives de 745,44, 852,32 et 903,78 mg eq Trolox / g MS. La fraction Fr80 présente une activité moindre mais encore importante avec 543,32 mg eq Trolox / g MS, tandis que les autres fractions présentent une activité égale ou inférieure à celle de l'extrait brut.

L'activité réductrice des fractions de *L. vulgare* est présentée en figure 52 C. L'activité initiale mesurée dans l'extrait brut est répartie dans 3 fractions qui possèdent une très forte activité : les fractions Fr20, Fr40 et Fr60, avec des CE₅₀ respectives de 0,010, 0,008 et 0,009 mg.mL⁻¹. La fraction Fr80 présente, elle, une activité équivalente à celle de l'extrait brut. Enfin, les fractions Fr100, acétate d'éthyle et H₂O ont des activités beaucoup plus faibles, voire non détectables pour cette dernière.

A l'exception de l'effluent (fraction FrH₂O), toutes les fractions de *L. vulgare* présentent une activité anti-tyrosinase supérieure à celle de l'extrait brut (figure 52 D). Les fractions intermédiaires Fr40 et Fr80 ont les activités les plus hautes, autour de 700 mg eq AK / g MS, tandis que Fr60 et Fr100 présentent des activités légèrement moins fortes, juste en dessous de 600 mg Eq AK / g MS. Les fractions Fr20 et FrAcEt sont les moins actives, avec des valeurs respectives de 394 et 465 mg Eq AK / g MS.

Aucune fraction de *L. vulgare* n'a montré d'activité contre l'élastase ou la collagénase aux concentrations testées.

b. Composition

Les polyphénols de *L. vulgare* sont principalement répartis dans les fractions intermédiaires : Fr20, Fr40 et Fr60. Ces trois fractions sont très riches en composés phénoliques avec respectivement 248, 308 et 218 mg eq AG / g MS (figure 53).

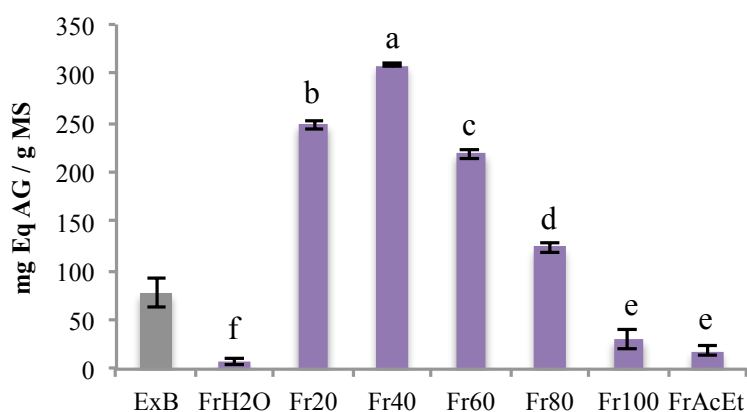


Figure 53 : Dosage des polyphénols totaux des fractions de *L. vulgare* exprimé en mg Eq AG/g MS. (P<0,05)

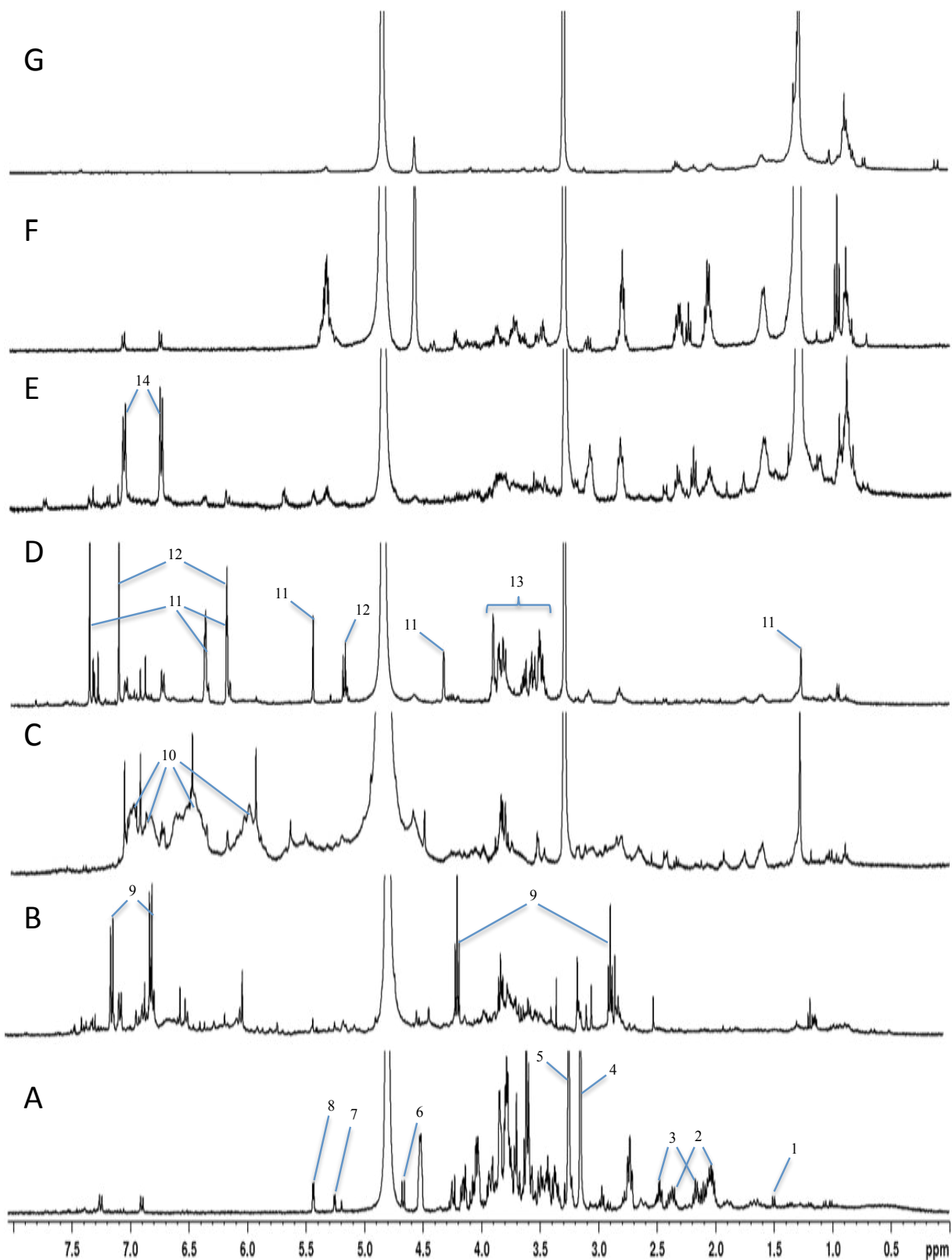


Figure 54 : Fractions issues de l'extrait brut de *L. vulgare*. A : FrH₂O ; B : Fr20 ; C : Fr40 ; D : Fr60 ; E : Fr80 ; F : Fr100 ; G : FrAcEt. 1 : Alanine ; 2 : Proline ; 3 : Glutamine ; 4 : Choline-O-sulfate ; 5 : β -Alanine betaïne ; 6 : β -glucose ; 7 : α -glucose ; 8 : Saccharose ; 9 : Composé (1) ; 10 : Enveloppe ; 11 : Myricetine 3-O-rhamnopyranoside ; 12 : myricetine 3-O- β -D-galactopyranoside ; 13 : Parties osidiques de (11) et (12) ; 14 : Composé (2).

Les fractions issues de l'extrait brut ont une composition nettement simplifiée, comme l'attestent leurs spectres de RMN du proton (figure 54). La fraction FrH₂O contient les molécules les plus polaires, dont les oses, les osmolytes et quelques acides aminés cités précédemment (figure 54 A).

Dans la fraction Fr20, de nombreux signaux sont visibles dans la zone des protons aromatiques, notamment deux doublets à 6,79 et 7,13 ppm appartenant à un produit majoritaire, nommé pour l'instant composé 1 (figure 54 B). De plus, la présence de signaux dans la zone des oses peut faire penser à un ou plusieurs composés phénoliques glycosylés. Sous les signaux majoritaires, un grand nombre de petits signaux sont visibles, montrant la richesse en composés présentant des groupements aromatiques de cette fraction.

La fraction Fr40 présente un très grand nombre de signaux dans la zone des protons aromatiques (figure 54 C). Des enveloppes sont visibles, qui peuvent correspondre soit à un très gros composé phénolique, de type tannin, soit à une multitude de composés phénoliques. Malgré plusieurs sous fractionnements sur différentes colonnes (C18 - C18 60A, Silice phase inverse, NH₂), les signaux correspondant aux enveloppes sont restés dans la même fraction (figure 55 A). Cependant, d'autres molécules ont pu être séparées, notamment l'éthyl gallate (figure 55 C), ainsi que de nombreux autres composés phénoliques non identifiés (figure 55 B).

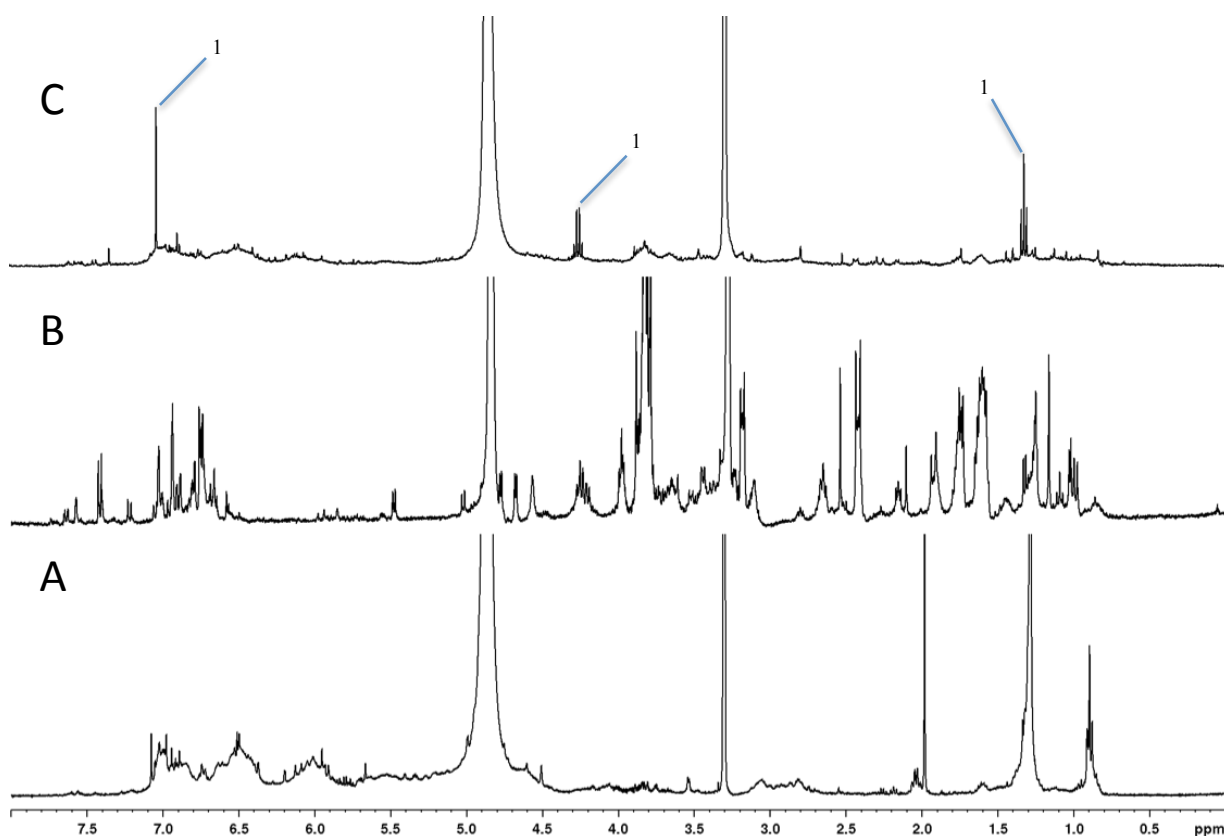


Figure 55: Sous fractions issues de la fraction Fr40 de *L. vulgare*. A : ssFr20; B : ssFr30; C : ssFr35.
1 : Ethyl gallate

La fraction Fr60 est composée de deux molécules majoritaires très proches structurellement. Sur les spectres ^1H , des signaux majoritaires sont visibles, dont un premier groupe entre 3,3 et 4 ppm, un second groupe dans la zone des aromatiques entre 6,1 et 7,4 ppm, et quelques signaux dans la zone des anomériques (figure 54 D). Ceci suggère la présence d'un résidu osidique. Enfin, un signal d'intensité comparable est présent dans la zone des aliphatiques.

Les analyses 2-D COSY ont permis de mettre en évidence 2 systèmes de spins : le premier est composé d'un signal à 0,95 ppm ($\text{H6}''$, d), lié d'après les analyses HMQC à un carbone à 17,6 ppm ($\text{C6}''$) et de signaux à 3,35 ($\text{H4}''$, m), 3,52 ($\text{H5}''$, m), 3,78 ($\text{H3}''$, dd) et 4,2 ppm ($\text{H2}''$, t). Les analyses HMQC ont permis de déterminer les carbones correspondants, respectivement à 73,5 ($\text{C4}''$), 72,1 ($\text{C5}''$), 70 ($\text{C3}''$) et 72,07 ppm ($\text{C2}''$). Le second système de spin comprend les signaux à 6,94 ($\text{H2}'$, s), 6,94 ($\text{H6}'$, s), 6,38 (H8 , d) et 6,19 (H6 , d). Ces protons sont liés, d'après l'HMQC, aux carbones à 109,8 ($\text{C2}'$), 110 ($\text{C6}'$), 95 (C8) et 99,5 ppm (C6). Ces deux systèmes de spins sont reliés par une tâche de corrélation visible sur l'HMBC entre 5,31 ($\text{H1}''$, d) et 136 ppm (C3).

Ces informations couplées aux données bibliographiques, ont permis d'identifier la myricetine-3-O- α -L-rhamnopyranoside (figure 56 A), une molécule qui a déjà été décrite chez le genre *Limonium*, notamment chez *L. tetragonum* (Lee *et al.*, 2011).

Une seconde molécule majoritaire est visible dans cette sous fraction, possédant aussi une partie aromatique et une partie osidique. Sur les spectres HMQC, deux systèmes de spin sont visibles, le premier étant caractérisé par les signaux à 3,49 ($\text{H5}''$, dd), 3,5 ($\text{H6}''$, dd), 3,65 ($\text{H3}''$, m), 3,82 ($\text{H2}''$, dd) et 3,85 ($\text{H4}''$, dd). Les analyses HMQC ont permis d'attribuer les carbones associés à 77,6 ($\text{C5}''$), 62 ($\text{C6}''$), 75 ($\text{H3}''$), 72,5 (C2), et 70 ppm ($\text{C4}''$). Le second système de spin est composé des protons à 6,18 (H6 , d), 6,4 (H8 , d) et 7,37 ppm ($\text{H2}'$ et $\text{H6}'$, d). Les carbones associés ont été déterminés par une analyse HMQC, à 99,8 (C6), 94,6 (C8) et 109,5 ppm ($\text{C2}'$ et $\text{C6}'$). La liaison entre ces deux systèmes est visible par une tâche de corrélation sur l'HMBC entre 5,18 ppm ($\text{H1}''$) et 105,5 ppm ($\text{C1}''$).

La structure correspond à la myricetine-3-O- β -D-galactopyranoside, elle aussi décrite chez *L. tetragonum* (figure 56 B). La présence des deux structures a été confirmée par spectrométrie de masse, avec un poids moléculaire $[\text{M}] = 503$ Da, correspondant à la

myricetine-3-O- β -D-galactopyranoside ([M]= 480 Da) supplémentée en ion sodium ([M]= 23 Da) et à la myricetine-3-O- α -L-rhamnopyranoside ([M]= 464 Da) supplémenté en ion potassium ([M]= 39 Da). Sous ces signaux majoritaires du spectre RMN ^1H , d'autres composés phénoliques sont présents mais n'ont pas pu être caractérisés pour le moment.

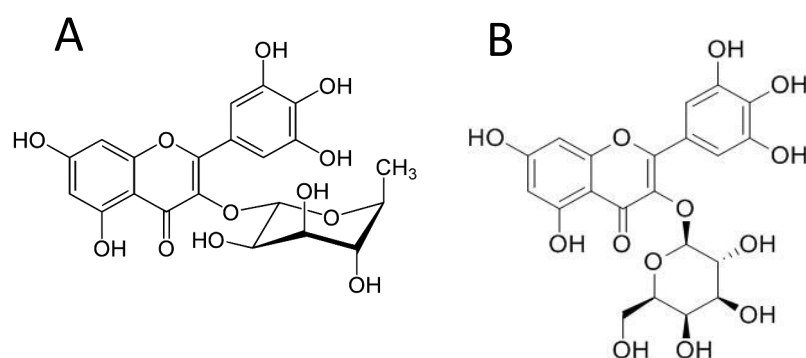


Figure 56 : Structure chimique de la Myricetine 3-O-rhamnopyranoside (A) et ; myricetine 3-O- β -D-galactopyranoside (B)

La fraction Fr80 présente deux doublets à 6,75 et 7,07 ppm ce qui suggère la présence d'un groupement aromatique. Ce groupement semble lié à une ou plusieurs chaînes aliphatiques (entre 1 et 2 ppm) présentant *a priori* des hydroxylations caractérisés par les signaux entre 2,5 et 3 ppm (composé (2)) (figure 54 E).

Le fraction Fr100 est caractérisée par la présence d'un ou plusieurs composés aliphatiques présentant des insaturations (caractérisées par les signaux entre 5 et 5,5 ppm) ce qui suggère la présence de composés très apolaires, possiblement des terpènes ou des stéroïdes végétaux (figure 54 F).

Enfin, la fraction FrAcEt est probablement caractérisée par un composé aliphatique (figures 54 G).

2. *C. maritimum*

a. Activité biologiques

Les activités anti-radicalaires des fractions de *C. maritimum* sont présentées en figure 57 A. Là encore, l'activité se concentre dans les fractions Fr20 à Fr80 (CI₅₀ de 0,02 à 0,04 mg.mL⁻¹). L'effluent (fraction H₂O) et les fractions les plus apolaires (Fr100 et FrAcEt) présentent des activités plus faibles que celle de l'extrait brut.

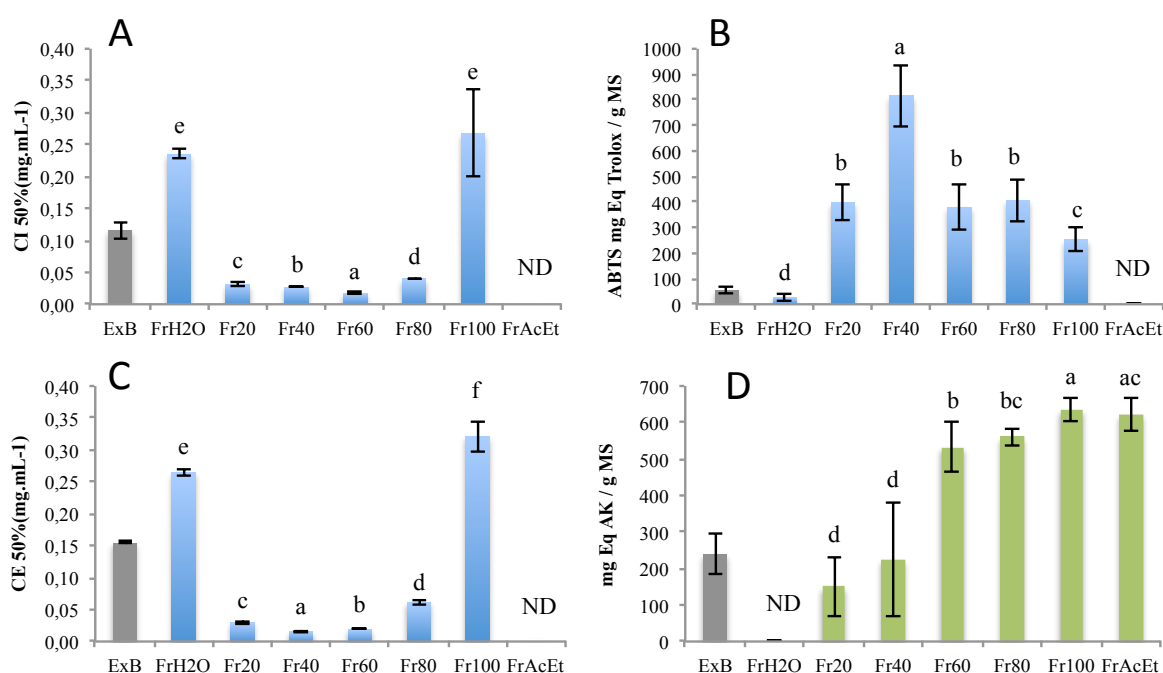


Figure 57 : Activités antioxydantes et activité anti-tyrosinase des fractions de *C. maritimum*. A : Capacité de piégeage des radicaux DPPH, exprimé en CI₅₀% ; B : Activité anti-radicalaire ABTS, exprimé en mg Eq Trolox/g MS ; C : réduction des ions ferreux FRAP, exprimé en CE₅₀% ; D : Activité anti-tyrosinase, exprimé en mg Eq AK/g MS. (P<0,05 ; n =3)

Les résultats de l'activité anti-ABTS des fractions de *C. maritimum* sont présentés en figure 57 B. Une grande partie de l'activité de l'extrait est expliquée par la fraction Fr40, qui possède une activité bien supérieure aux autres (816,5 mg eq Trolox / g MS). Viennent ensuite trois fractions possédant une bonne activité (fractions Fr20, Fr60 et Fr80), et enfin la fraction Fr100 qui présente une activité moyenne (252,6 mg eq Trolox / g MS). La fraction H₂O présente une activité limitée, inférieure à celle de l'extrait brut, et la fraction acétate d'éthyle est inactive aux concentrations testées.

Les activités réductrices des fractions de *C. maritimum* sont présentées en figure 57 C. L'activité est ici répartie dans 5 fractions, dont 3 très actives : les fractions Fr20, Fr40 et Fr60,

avec des CE_{50} de 0,02 à 0,03 $mg.mL^{-1}$. Les fractions H₂O et Fr80 présentent des activités moins fortes, bien que supérieures à celle de l'extrait brut. La fraction acétate d'éthyle n'a en revanche pas révélé d'activité aux concentrations testées.

L'activité d'inhibition de la tyrosinase de l'extrait de *C. maritimum* est concentrée dans les fractions les plus apolaires (figure 57 D). Les fractions Fr100 et FrAcEt ont en effet des activités supérieures à 600 mg eq AK / g MS. Les fractions Fr60 et Fr80 présentent des activités encore assez fortes, autour de 550 mg eq AK / g MS, tandis que les fractions les plus polaires ont des activités faibles, inférieures à celles de l'extrait brut.

Aucune fraction de *C. maritimum* n'a montré d'activité contre l'élastase ou la collagénase aux concentrations testées.

b. Composition des fractions

Les polyphénols mesurés dans l'extrait brut de *C. maritimum* sont concentrés principalement dans les fractions Fr20, Fr40 et Fr60 avec une concentration respective de 112, 164, et 75,84 mg eq AG / g MS (figure 58). La fraction acétate d'éthyle possède la plus faible concentration en composés phénoliques, quasiment négligeable.

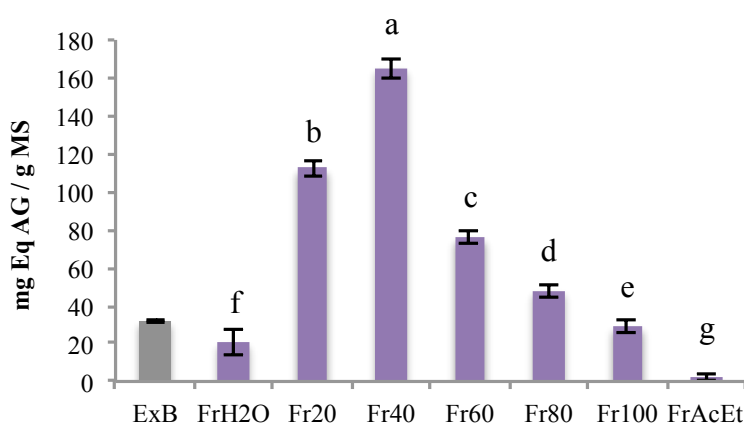


Figure 58 : Dosage des polyphénols totaux des fractions de *L. vulgare* exprimé en mg Eq AG/g MS. ($P < 0,05$; $n = 3$)

L'effluent (fraction FrH₂O) contient principalement les oses et de l'acide quinique libre, précédemment décrits dans l'extrait brut (figure 59 A).

La fraction Fr20 est très majoritairement composée d'acide chlorogénique. La caractérisation a été confirmée avec les données bibliographiques et l'ajout d'un standard (Meot-Duros & Magné, 2009). De faibles signaux suggèrent la présence d'autres petits composés phénoliques mais en très faible proportion par rapport à l'acide chlorogénique (figure 59 B).

La fraction Fr40 présente de nombreuses raies dans la zone des aromatiques (figure 59 C). La forme et l'intégration de ces signaux suggéraient la présence de deux groupements cafféoyls appartenant à la même molécule.

Les analyses RMN 2D COSY montrent la présence de deux systèmes de spins, le premier regroupant les signaux à 2,08 (H6a, dd), 2,16 (H2a, dd), 2,22 (H6b, dd) et 2,3 (H2b, dd). A l'aide de l'HMQC, les carbones correspondants ont été identifiés. Leurs déplacements chimiques respectifs sont 41,1 (C6), 38,6 (C2). Le second système de spin se compose des signaux à 7,68 (H7', d) et 7,71 (H7'', d), 7,22 (H2', dd) et 7,25 (H2'', dd), 7,15 (H6', dd) et 7,18 (H6'', dd), 6,96 (H5', dd) et 6,97 (H5'', dd), 6,43 (H8', d) et 6,5 ppm (H8'', d). Une expérience HMQC a permis de déterminer les carbones associés, avec des déplacements chimiques de 148,9 (CH), 117,7 (CH), 125,5 (CH), 118,9 (CH) et 117,4 ppm (CH). Ce second système correspond à deux structures de type cafféoyl. Les taches de corrélation visibles sur l'analyse HMBC, entre 5,5 ppm (H3, H5) et 171 ppm (C9', C9'') indiquent que celles-ci sont reliées ensemble par un acide quinique en position 3 et 5. Le composé principal de cette fraction est l'acide 3,5-dicafféoylquinique (figure 60) (Hong *et al.*, 2015). D'autres signaux visibles dans la zone des protons des carbones anomériques, entre 4,9 et 5,5 ppm, suggèrent la présence de composés phénoliques glycosylés ou d'autre dérivés de l'acide chlorogénique.

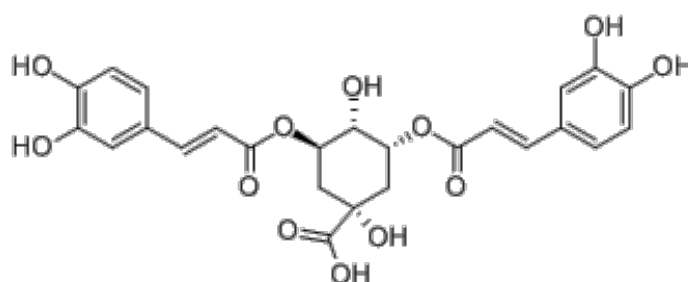


Figure 60 : Acide 3,5 dicafféoylquinique

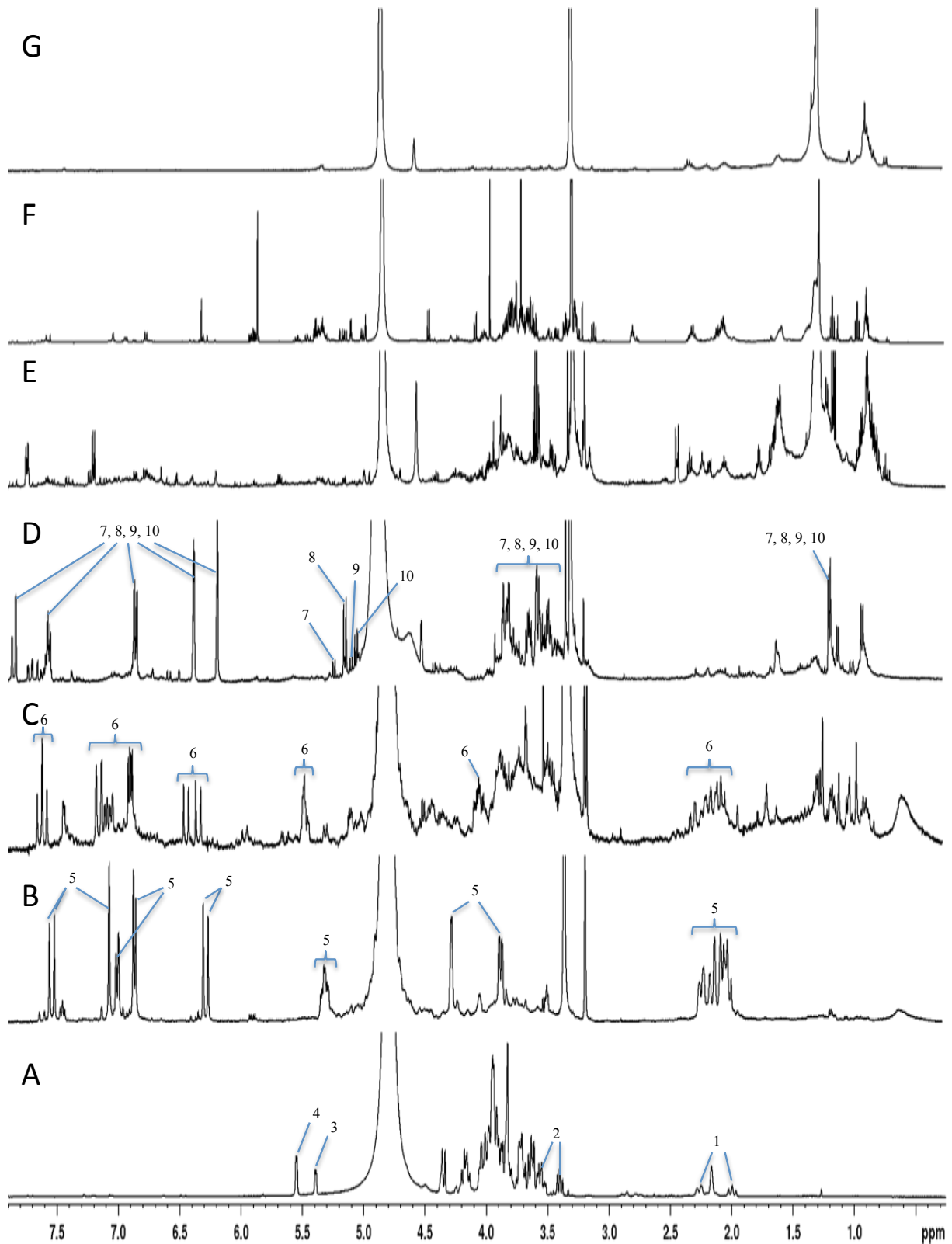


Figure 59 : Fractions issues de l'extrait brut de *C. maritimum*. A : FrH₂O ; B : Fr20 ; C : Fr40 ; D : Fr60 ; E : Fr80 ; F : Fr100 ; G : FrAcEt. 1 : Quinate libre et lié ; 2 : Mannitol ; 3 : α -glucose ; 4 : Saccharose ; 5 : Acide chlorogénique ; 6 : Acide 3,5-dicaffeoylquinique ; 7 : quercetine 3-O-glucoside; 8 : Quercetine 3-O-galactoside ; 9 : Quercetine 3-O-rutinoside ; 10 : Quercetine 3-O-robinobioside.

La fraction Fr60 est caractérisée notamment par (i) des signaux aux niveaux des protons aromatiques, qui suggèrent la présence de dérivé de la quercétine, (ii) des doublets dans la zone des anomériques suggérant la présence de liaisons ester avec des oses (iii) caractérisés par les signaux entre 3 et 4,2 ppm. À la suite d'une hydrolyse acide, la partie chloroformique était effectivement principalement composée de quercétine (figure 61 A), visible avec ses raies caractéristiques à 6,17 (H6, d), 6,38 (H8, d), 6,87 (H5'), 7,62 (H2') et 7,72 ppm (H6'). Dans la partie aqueuse de l'hydrolyse acide, plusieurs oses sont visibles, de par leurs signaux caractéristiques dans la zone des anomériques (4,5-5,3 ppm). Trois sucres sont présents : le glucose, le rhamnose et le galactose, dans leurs configurations α et β (figure 61 B) (Bubb, 2003 ; De Bruyn & Anteunis, 1976). La comparaison des intégrations de cet échantillon et de la sous-fraction de départ a permis de déterminer la présence de 4 quercétines glycosylées dans l'échantillon d'origine : la quercétine 3-O-robinobioside, la quercétine 3-O-galactoside, la quercétine 3-O-glucoside et la quercétine 3-O-rutinoside (Figure 62). Parmi ces composés, seules la quercétine 3-O-rutinoside et la quercétine 3-O-glucoside étaient décrites chez la Criste (Jallali *et al.*, 2012 ; Saleh *et al.*, 1983). De par leur proximité structurale, une grande partie de leurs raies sont communes ou très proches, à

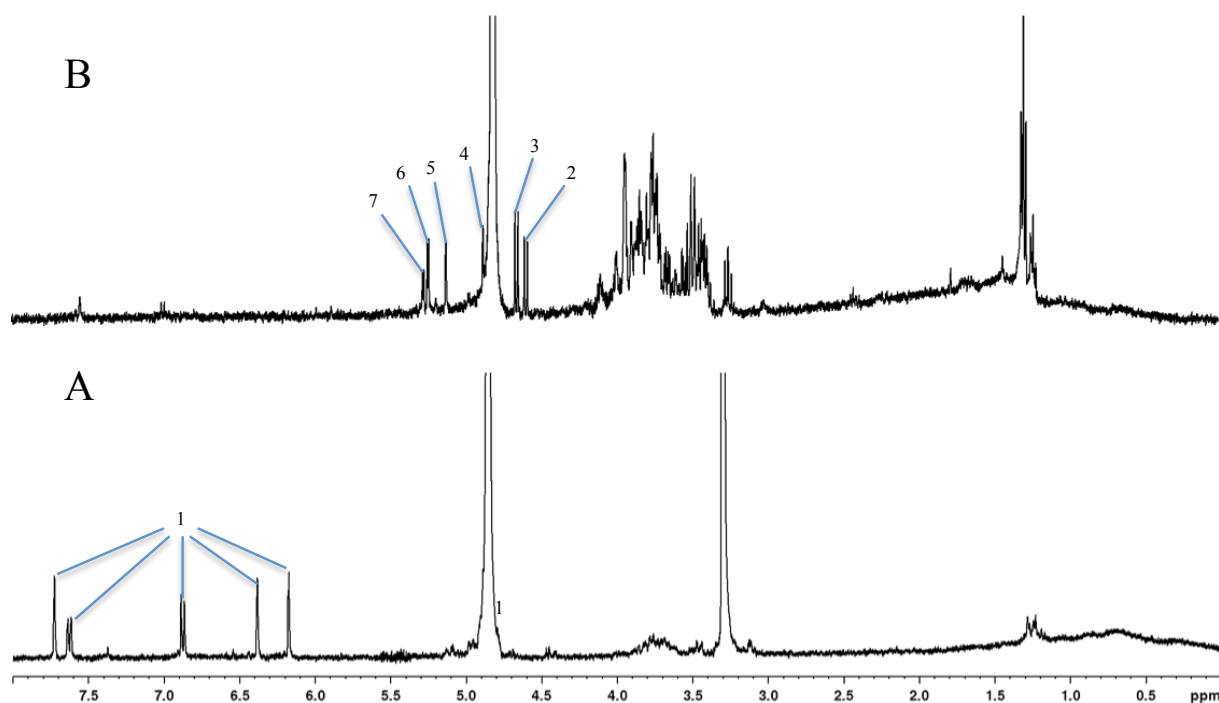


Figure 61 : Hydrolyse acide de la Fr60 de *C. maritimum*. A : Partie chloroformique ; B : Partie aqueuse. 1 : Quercétine ; 2 : β -glucose ; 3 : β -rhamnose ; 4 : β -galactose ; 5 : α -galactose ; 6 : α -rhamnose ; 7 : α -glucose.

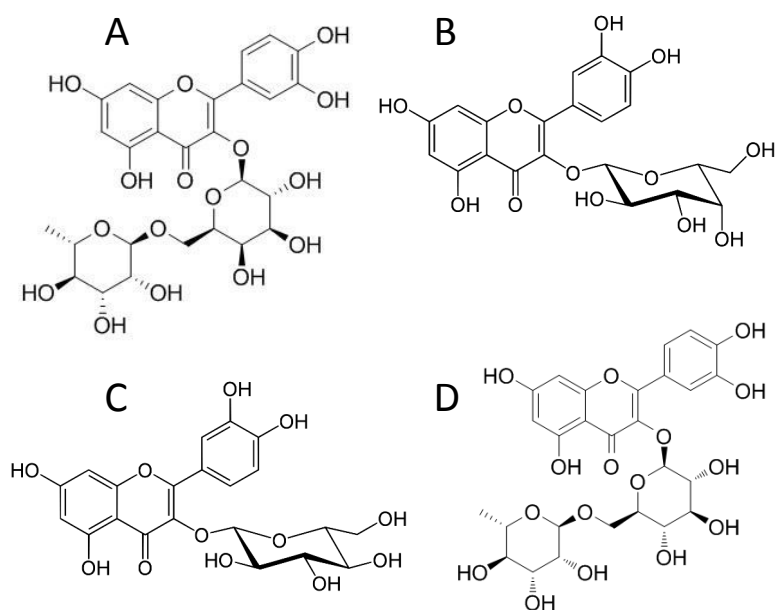


Figure 62 : A : Quercétine 3-O-robinobioside ; B : Quercétine 3-O-galactoside ; C : Quercétine 3-O-glucoside ; D : Quercétine 3-O-rutinoside

l'exception de celles des protons des carbones anomériques des oses. D'autres composés phénoliques minoritaires sont discernables dans cette fraction mais en trop faible quantité pour être identifiables pour le moment.

La Fr80 comporte des signaux intenses dans la zone des protons aliphatiques, de nombreux autres dans la zone des oses, ainsi que de très nombreux signaux de faible intensité dans la zone des protons aromatiques (figure 59 E).

Le spectre de la Fr100 présente de nombreux signaux bien définis essentiellement dans la zone des protons hydroxylés (entre 3,3 et 4,2 ppm) et anomériques (5 à 6 ppm) (figure 59 F). Ces derniers suggèrent soit la présence de dérivés glycosylés, soit la présence d'insaturations isolées sur une chaîne aliphatique relativement courte.

La fraction la plus apolaire (FrAcEt) présente surtout des signaux dans la zone des protons aliphatiques (figure 59 G), pouvant suggérer la présence de terpènes.

3. *T. maritimum*

a. Activités biologiques

L'activité antiradicalaire, contre le DPPH, des fractions de *T. maritimum* est présentée en figure 63 A. La fraction la plus active est la fraction Fr80, avec une CI_{50} de $0,02 \text{ mg.mL}^{-1}$, suivie des fractions Fr 20 et Fr 60 ($CI_{50}=0,05 \text{ mg.mL}^{-1}$), et Fr 40 ($CI_{50}=0,07 \text{ mg.mL}^{-1}$). Ces 4 fractions concentrent quasiment toute l'activité de l'extrait brut et l'expliquent en majorité. La fraction Fr100 ne possède pas d'activité antioxydante (aux concentrations testées) et celle de la fraction acétate d'éthyle est négligeable.

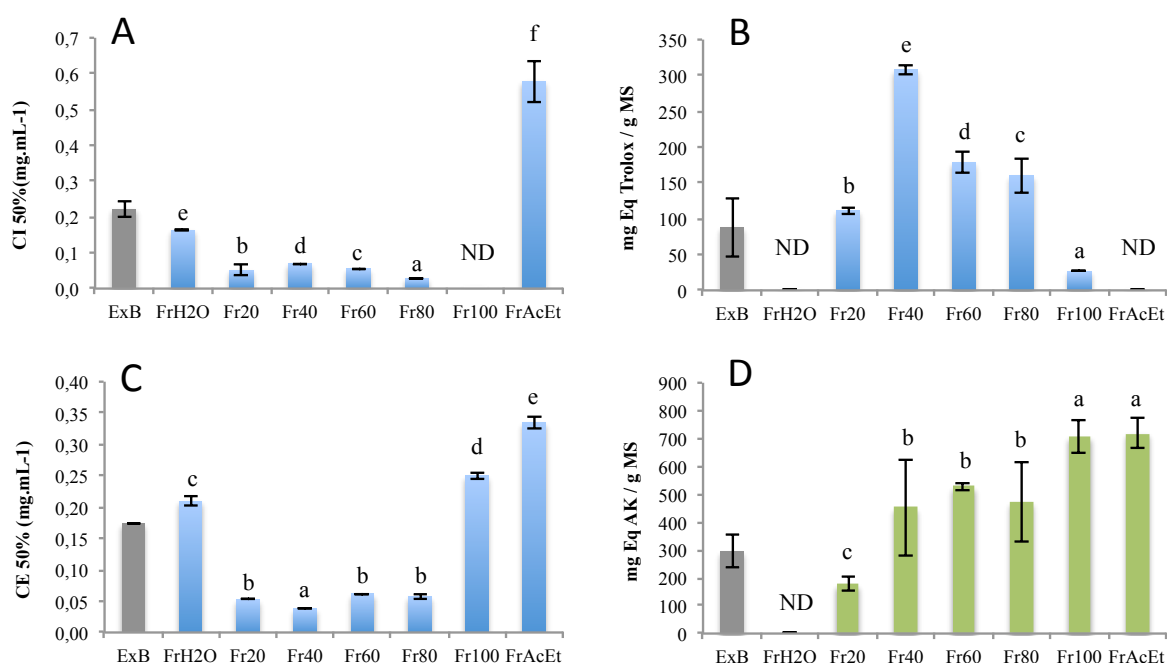


Figure 63 : Activités antioxydantes, dosage des polyphénols totaux et activité anti-tyrosinase des fractions de *T. maritimum*. A : Capacité de piégeage des radicaux DPPH, exprimé en $CI_{50}\%$; B : Activité anti-radicalaire ABTS, exprimé en mg Eq Trolox/g MS ; C : réduction des ions ferreux FRAP, exprimé en $CE_{50}\%$; D : Activité anti-tyrosinase, exprimé en mg Eq AK/g MS. ($P < 0,05$; $n = 3$)

L'activité antiradicalaire, contre l'ABTS, des fractions de *T. maritimum* est présentée en figure 63 B. C'est ici la fraction Fr40 qui présente l'activité la plus forte, avec $308,23 \text{ mg eq Trolox / g MS}$. Puis viennent les fractions Fr60 et Fr80 (environ $170 \text{ mg eq Trolox / g MS}$) et la fraction Fr20 ($111,6 \text{ mg eq Trolox / g MS}$), tandis que les autres fractions présentent une activité négligeable (fraction Fr 100) ou non détectée (les fractions H₂O et acétate d'éthyle).

L'activité réductrice des fractions de *T. maritimum* est présentée en figure 63 C. Cette activité est retrouvée dans 4 fractions : Fr20, Fr40, Fr60 et Fr80, avec des CE_{50} entre 0,04 et 0,06 $mg \cdot mL^{-1}$. Les autres fractions présentent des activités inférieures à celle de l'extrait brut.

Le fractionnement de l'extrait brut de *T. maritimum* a permis de concentrer l'activité anti-tyrosinase dans quelques fractions (figure 63 D). Les fractions les plus apolaires, Fr100 et FrAcEt présentent en effet les activités les plus fortes, avec des valeurs supérieures à 700 mg Eq AK / g MS. Les fractions intermédiaires Fr40, Fr60 et Fr80 présentent des activités fortes, entre 450 et 530 mg Eq AK / g MS, tandis que les fractions les plus polaires sont pratiquement inactives.

Aucune fraction de *T. maritima* n'a montré d'activité contre l'élastase ou la collagénase aux concentrations testées.

b. Composition des fractions

Le dosage des polyphénols totaux des fractions de *T. maritimum* est présenté en figure 64. Les fractions possèdent des quantités de polyphénols assez limitées, en dessous de 100 mg eq AG / g MS. Les plus concentrées sont les fractions acétate d'éthyle et Fr40, avec respectivement 97,7 et 92,4 mg eq AG / g MS. Trois autres fractions possèdent une concentration moyenne et proche, autour de 45 mg eq AG / g MS, les fractions Fr60, Fr80 et Fr100.

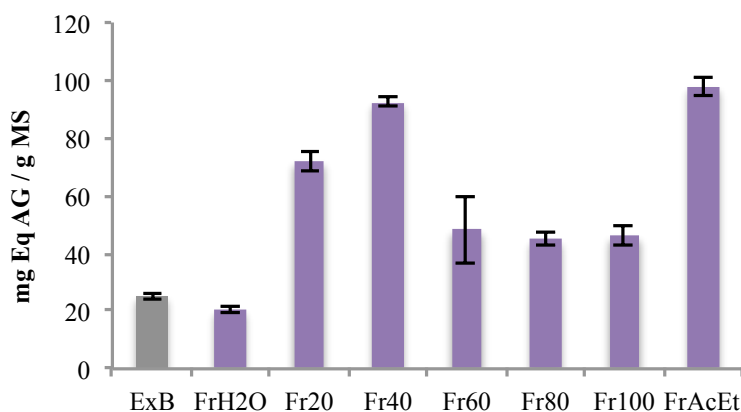


Figure 64 : Dosage des polyphénols totaux des fractions de *T. maritimum* exprimé en mg Eq AG/g MS. ($P < 0,05$; $n = 3$)

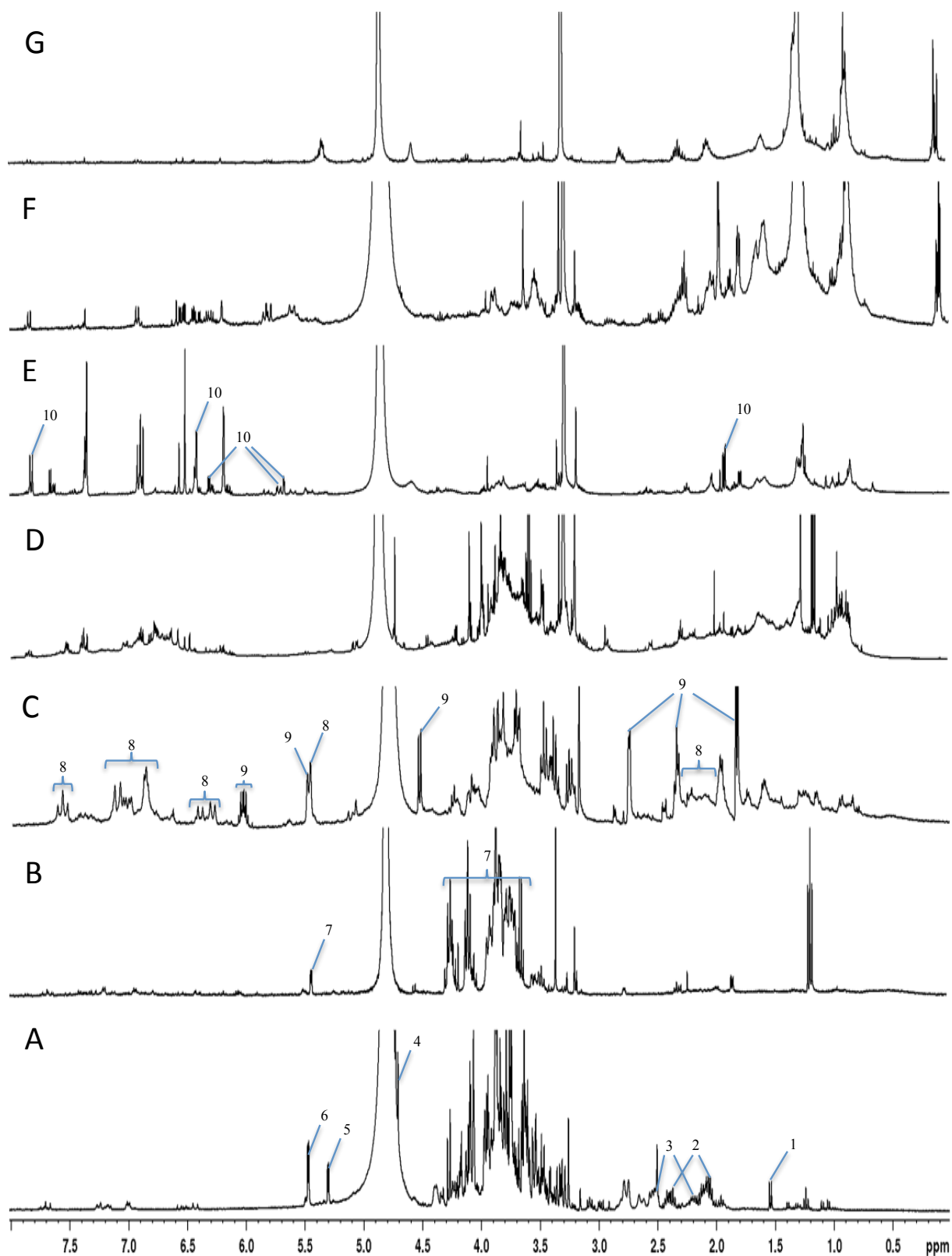


Figure 65 : Fractions issues de l'extrait brut de *T. maritimum*. A : FrH₂O; B : Fr20; C : Fr40; D : Fr60; E : Fr80; F : Fr100; G: FrAcEt. 1 : Alanine; 2 : Proline; 3 : Glutamine; 4 : β -glucose; 5 : α -glucose; 6 : Saccharose; 7 : Inuline; 8 : Acide 3,5 dicaffeoylquinique; 9 : Tripleurospermine; 10 : 2(5H)-furanone, 5-(4-hexen-2-yn-1-ylidene).

La fraction FrH₂O de la Matricaire contient essentiellement les oses et composés précédemment décrits dans l'extrait brut (figure 55 A).

La fraction Fr20 renferme un oligofructane, l' α -D-Glcp-(1 \rightarrow 2)-[β -D-Fruf-(2 \rightarrow 1)- β -D-Fruc]_n-(2 \rightarrow 1)- β -D-Fruf (Cérantola *et al.*, 2004). Ce composé est très majoritaire dans cette fraction, même si de faibles signaux dans la zone des protons aromatiques sont visibles, pouvant correspondre à des composés phénoliques (figure 65 B).

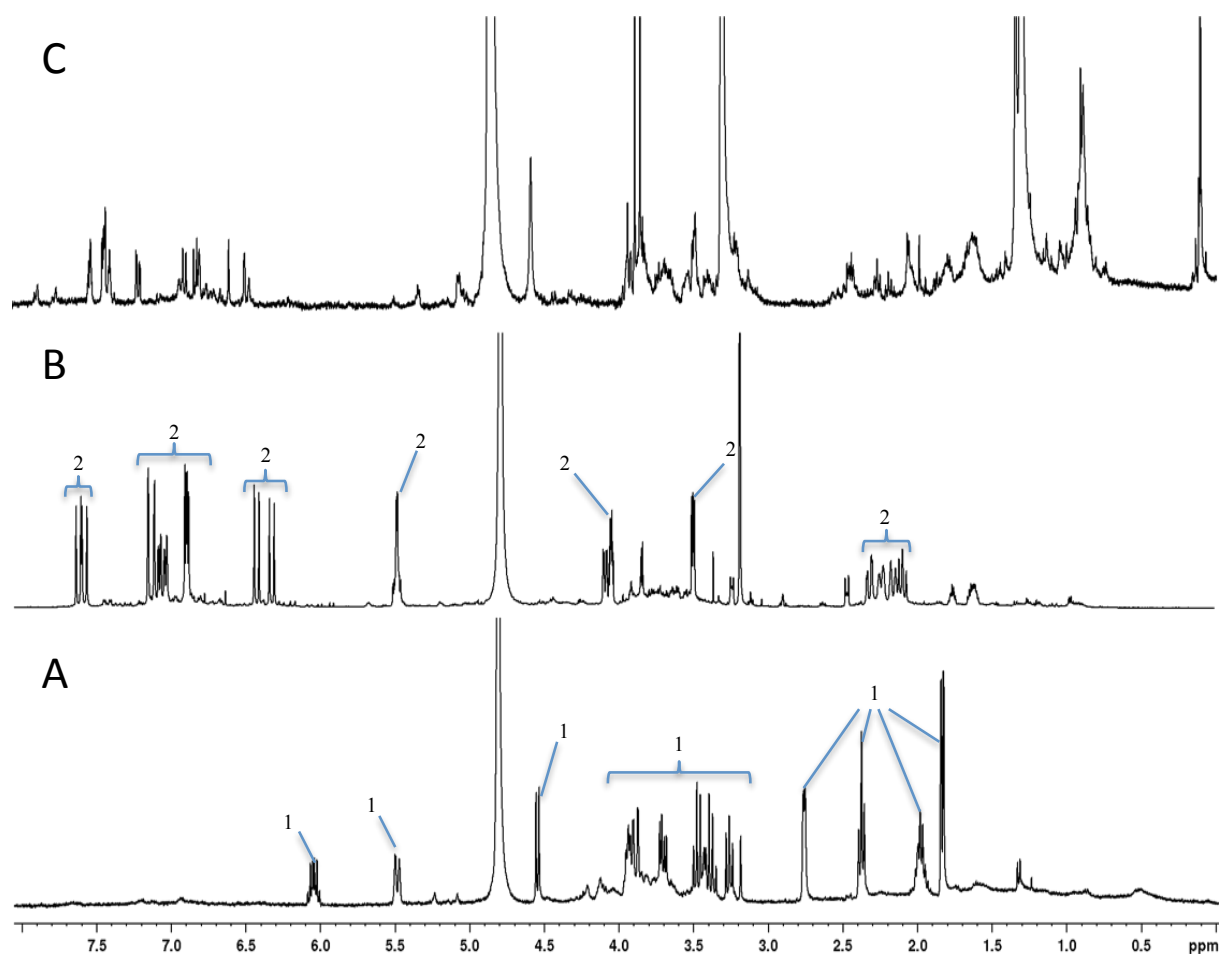


Figure 66 : Sous fractions issues de la fraction Fr40 de *T. maritimum*. A : ssFr20; B : ssFr25; C : ssFr40. 1 : Tripleuropermine; 2 : Acide 3,5 dicaffeoylquinique.

La Fr40 semble aussi comporter plusieurs composés phénoliques, avec entre autres des signaux caractéristiques de motifs dicaffeoyls (figure 65 C). Après un second fractionnement sur colonne C18 utilisant des incréments de 5% en méthanol (figure 66), plusieurs composés ont pu être séparés et deux identifiés. L'acide 3-5-dicaffeoylquinique a été trouvé quasiment pur dans la sous fraction 25% de MeOH (figure 66 B). Dans la sous-fraction MeOH20, une nouvelle molécule jamais décrite a été identifiée (figure 66 A). L'examen du spectre RMN ¹H a permis de mettre en évidence des signaux majoritaires susceptibles d'appartenir à une même

molécule. Le spectre RMN ^1H se caractérise par la présence d'un groupe de signaux entre 3,3 et 4,3 ppm, qui associé à la présence d'un signal supplémentaire d'égale intensité dans la zone caractéristique des protons anomériques (un doublet à 4,5 ppm), suggère la présence d'un résidu osidique. La constante de couplage du doublet correspond à celle normalement observée chez les oses (Bock *et al.*, 1973). En outre, des signaux caractéristiques des protons aliphatiques (de 1,8 à 3 ppm) ainsi que des signaux susceptibles de correspondre à des protons portés par des carbones insaturés (5,5 et 6,05 ppm) ont pu être observés. Les analyses RMN 2D COSY et TOSCY ont permis de mettre en évidence deux systèmes de spin distincts. Le premier système de spin se caractérise par une série de signaux à 4,56 (H1, d), 3,29 (H2, dd), 3,47 (H3, d), 3,39 (H4), 3,4 (H5, m), 3,7 (H6a) et 3,9 (H6b) (Figure 67).

Les ^{13}C correspondants à chaque proton de ce premier système de spin ont été attribués à

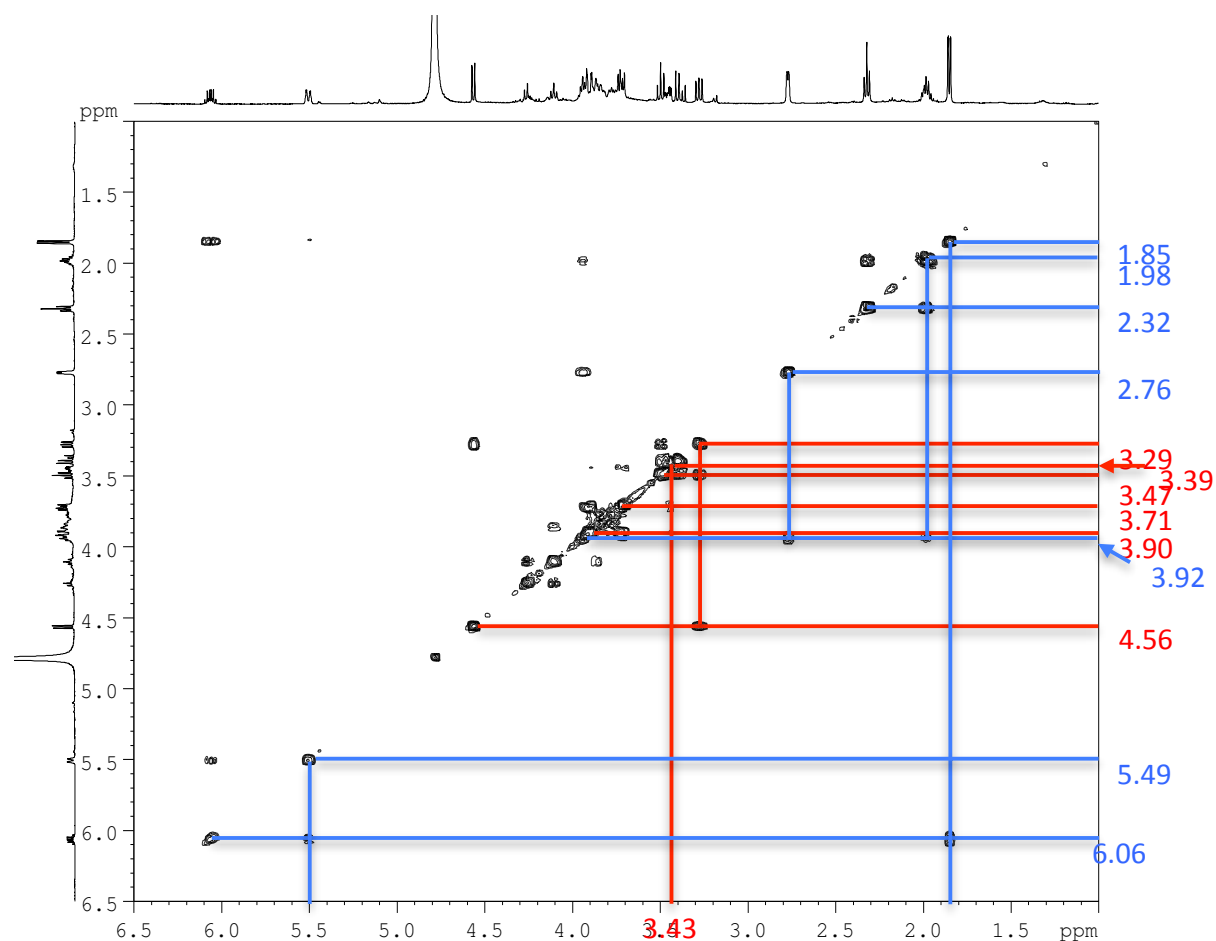


Figure 67 : Analyse COSY de la Fr40 ssFr20 de *T. maritimum*. En rouge, le premier système de spin et en bleu, le second.

l'aide de l'HMQC (Figure 68). Les déplacements chimiques des carbones correspondant à cette première série de protons sont à 105,42 (C1), 76,1 (C2), 78,5 (C3), 72,4 (C4), 79 (C5) et

63,7 ppm (C6). Le second système de spin mis en évidence par la COSY et la TOCSY est caractérisé par la série de signaux à 1,85 (H1', d), 6,06 (H2a', m), 5,49 (H3', d) t 2,76 (H6', dd), 3,92 ppm (H7'), 1,98 (H8', m), 2,32 (H9', t) (Figure 67). Les carbones correspondants à chaque proton de la série présentent des déplacements chimiques à 18,1 (C1'), 142 (C2'), 111 (C3') et 28,4 (C6'), 82 (C7'), 32,9 (C8), 36,16 (C9) (Figure 68).

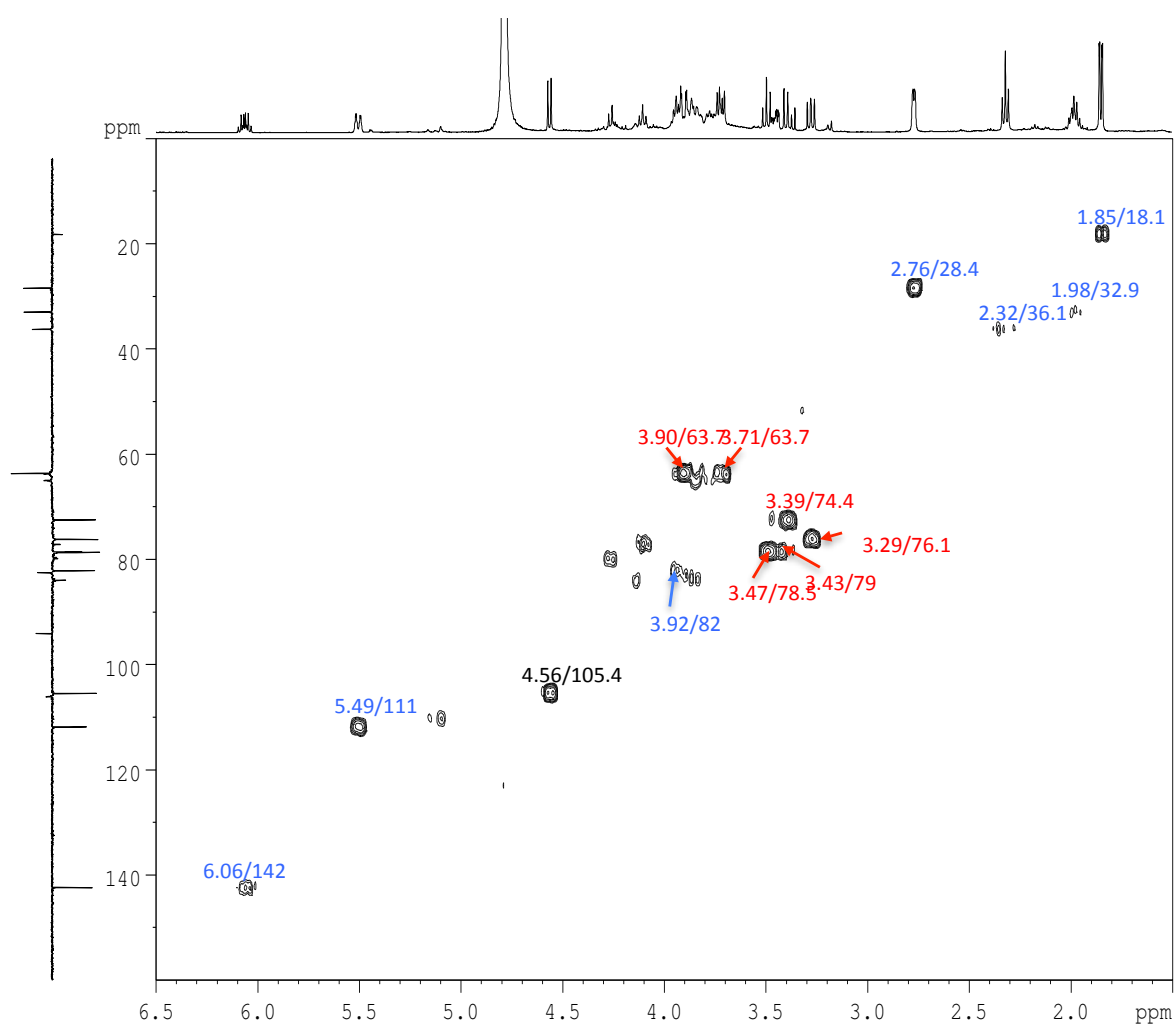


Figure 68 : Analyse HMQC de la Fr40 ssFr20 de *T. maritimum*.

Sur la base des déplacements chimiques et par l'examen du spectre de la J-MOD, la multiplicité des carbones du premier système de spin a été déterminée. La présence de cinq groupements méthines (CH) et d'un groupement méthylène (CH₂) a été observée. Les déplacements chimiques des ¹H et des ¹³C et la multiplicité des carbones laissaient penser à un résidu de nature osidique. L'examen du spectre HMBC laissait par ailleurs apparaître la présence d'une corrélation entre un signal ¹³C à 82 ppm et le H1 du premier système de spin mais aussi avec les signaux du second système de spin (H6', H8', H9'). Ces corrélations indiquaient que ces signaux appartiennent au même composé (Figure 69), ce qui a conduit à émettre l'hypothèse de la présence d'un résidu supposé de nature osidique probablement lié à la chaîne correspondant au second système de spin.

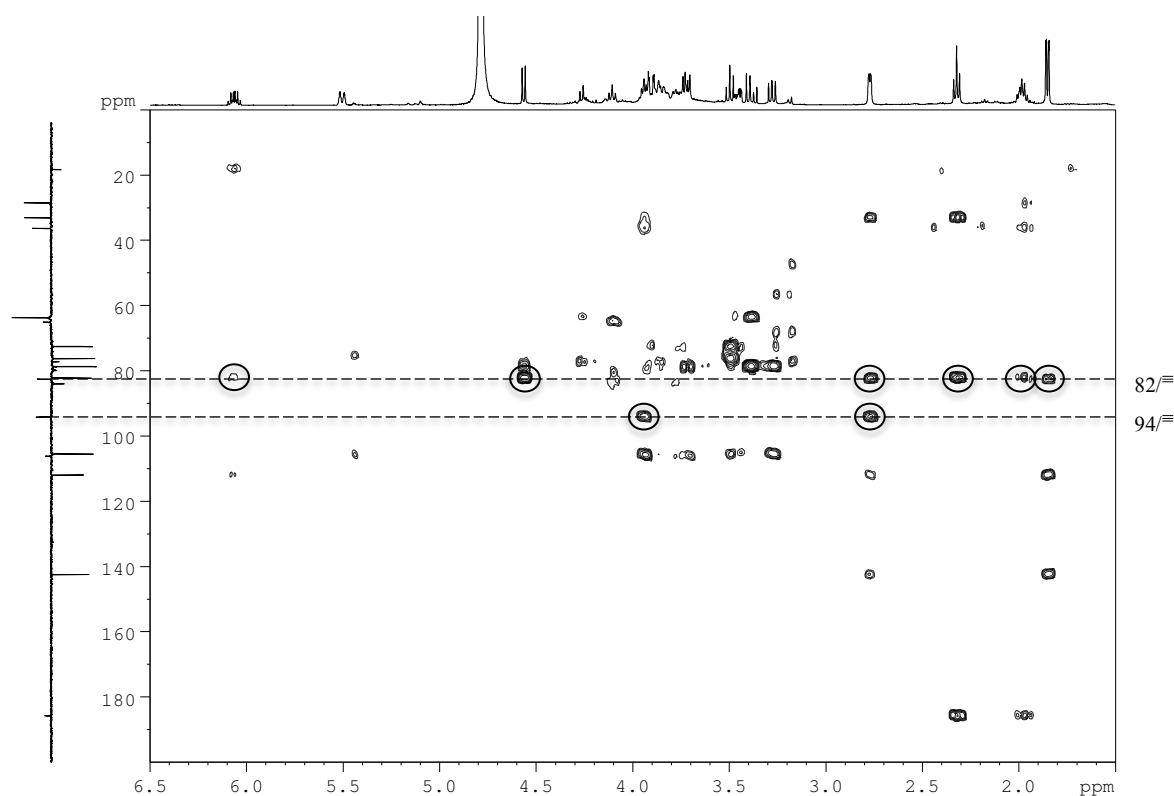


Figure 69 : Analyse HMBC de la Fr40 ssFr20 de *T. maritimum*.

Le spectre RMN ¹H de l'hydrolysats se caractérise par la disparition du doublet à 4,6 ppm et par l'apparition de nouveaux signaux anomériques à 5,23 ppm (J=3,5 Hz) et 4,65 ppm (J=7,6 Hz) spécifiant la présence d'un résidu glycosyle libre, sous forme de deux anomères. En ce basant sur les déplacements chimiques, les constantes de couplage (Jansson et al., 1989) et par comparaison avec un standard, ce résidu a été identifié comme étant du glucose. Les constantes de couplages de la molécule native du proton H1 (J=9,75

Hz) suggère une configuration anomérique de type β de ce glucose (Bock et al., 1973). Dans un second temps la caractérisation de la chaîne latérale a été réalisée. Les données de la J-mod et de la HMQC ont montré que cette chaîne latérale était constituée d'un groupement méthyle (CH_3 , $\text{C}1'$), trois groupements méthine (CH , les $\text{C}2'$, $\text{C}3'$ et $\text{C}7'$) et trois groupements méthylène (CH_2 , les $\text{C}6'$, $\text{C}8'$ et $\text{C}9'$). L'analyse de l'HMBC et de la J-mod suggérait aussi la présence d'une fonction alcyne. Ainsi, au regard de la J-mod et de l'HMBC, l'hypothèse de 2 carbones $\text{C}4$ (82 ppm) et $\text{C}5$ (94 ppm) lié par une triple liaison a été suggérée. Au regard des corrélations observées à partir des spectres COSY et HMBC (Figure 67 et 68), il a été établi que la chaîne latérale (R) de ce composé correspondant à l'acide dec-8-ène-6-ynoïque. Pour confirmer cette hypothèse, une analyse par spectroscopie de masse haute résolution en mode ms/ms de la sous fraction MeOH20 a été entreprise (Figure 70).

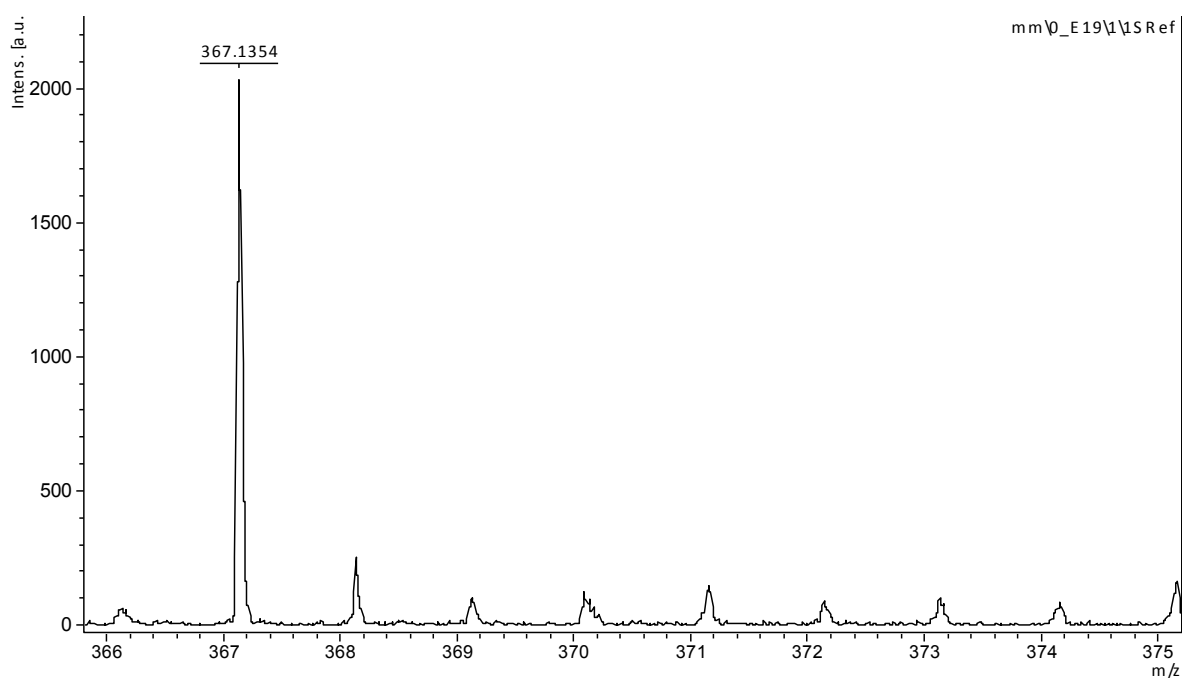


Figure 70 : Spectre de masse de la Fr40 ssFr20 de *T. maritimum*.

Les résultats obtenus confirment cette hypothèse puisque l'ion moléculaire détecté $[\text{M}+\text{Na}]$ de masse observée 367,1663 (m/z 367 : $\text{C}_6 \text{H}_{12} \text{O}_6 \text{Na}_2 \text{C}_{10} \text{H}_{12} \text{O}_2$, m/z théorique : 367,1354, m/z observée : 367,1663) est en adéquation avec la masse supposée.

La combinaison des données de spectroscopie de masse, de RMN (Tableau 10) a permis d'identifier l'acide dec-8-ène-6-ynoïque-4-O- β -glucose, composé encore non décrit

dans la littérature. En attente de publication et de validation officielle du nom, il a été proposé de nommer ce composé la Tripleurospermine (figure 71).

Tableau 10 : Table des déplacements chimiques de la Tripleurospermine.

N°	¹ H-NMR	¹³ C-NMR, type	TOCSY	HMBC
> Aglycone				
1	-	185.7, qC	-	-
2	2.32 (t;7.6)	36.1, CH ₂	H-3 ; 4 ; 5	C-1 ; 3 ; 4
3	1.98 m	32.9, CH ₂	H-2 ; 4 ; 5	C-1 ; 2 ; 5 ; 6
4	3.94	82.1, CH	H-2 ; 3 ; 5 ; H-1'	C-1
5	2.76 (d ;3.8)	28.4 CH ₂	H-2 ; 3 ; 4 ; 8 ; 10	C-3 ; 4 ; 6 ; 8 ; 9 ; 10
6	-	94,1, qC	-	-
7	-	82,4, qC	-	-
8	5.5 (dd ;11 .1)	112, CH	H-4 ; 5 ; 9 ; 10	C-6 ; 10
9	6,06 (m, 7.1)	142.5, CH	H-5 ; 8 ; 10	C-7 ; 8 ; 10
10	1.85 (dd, 7.1)	18.5, CH ₃	H	C-7 ; 8 ; 9
> O-β-D-Glucopyranoside				
1'	4.56 (d ; 7.9)	105.4, CH	H-2' ; 3' ; 4' ; 5' ; 6'	C-2' ; C-4
2'	3.27 (dd ; 9.25)	76.1, CH	H-1' ; 3' ; 4' ; 5' ; 6'	C-1' ; 3'
3'	3.47 m	78.6, CH	H-1' ; 2' ; 4' ; 5' ; 6'	C-1' ; 2' ; 4'
4'	3.39 m	72.5, CH	H-1' ; 2' ; 3' ; 5' ; 6'	C-3' ; 5' ; 6'
5'	3.44 m	78.5, CH	H-1' ; 2' ; 3' ; 4' ; 6'	C-1' ; 2' ; 4' ; 6'
6'	3.90 m ; 3.71 m	63.8, CH ₂	H-1' ; 2' ; 3' ; 4' ; 5'	C-1' ; 2' ; 5'

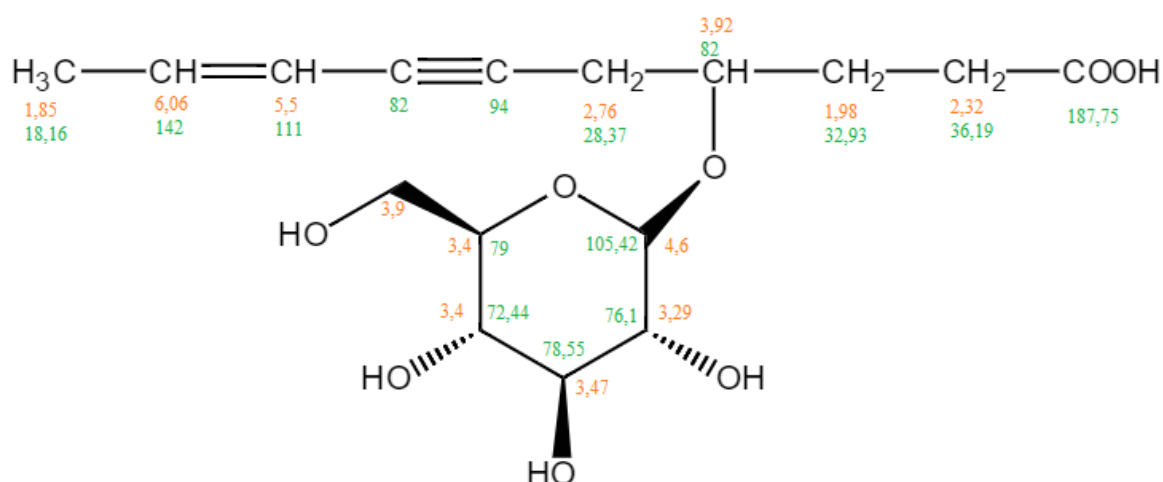


Figure 71: Structure de la Tripleurospermine.

D'autres composés, phénoliques, dans les autres sous-fractions de la Fr40 ont été isolés, sans pour l'instant être identifiés (figure 66 C).

Les deux molécules pures présentent des activités anti-radicalaires intéressantes, supérieures à celle de l'extrait brut. L'acide 3,5-dicaffeoylquinique, notamment, possède une activité antioxydante supérieure à celle du BHT, avec une CI50% à 0,003 mg.mL⁻¹ tandis que la tripleurospermine présente une activité moindre mais néanmoins plus de trois fois supérieure à celle de la fraction Fr40, avec une CI50% de 0,019 mg.mL⁻¹. Cependant, les deux molécules isolées présentent des activités anti-tyrosinase inférieures à celle de la fraction Fr40. La tripleurospermine présente une activité 30% inférieure à celle de la fraction Fr40, mais est 1,7 fois plus actif que l'acide 3,5-dicaffeoylquinique.

La fraction Fr60 est très riche en composés phénoliques non encore identifiés, dont une partie est vraisemblablement glycosylée compte tenu des signaux présents dans la zone des oses, des protons des carbones anomériques et de la polarité de la fraction (figure 65 D).

La fraction Fr80 présente de nombreux signaux dans la zone des protons aromatiques, ainsi que dans la zone des protons aliphatiques (figure 65 E). Après un fractionnement avec un incrément de 5%, des sous-fractions beaucoup plus simplifiées ont été obtenues (figure 72). Parmi elles, la ssFr65 semblait composée d'une molécule majoritaire.

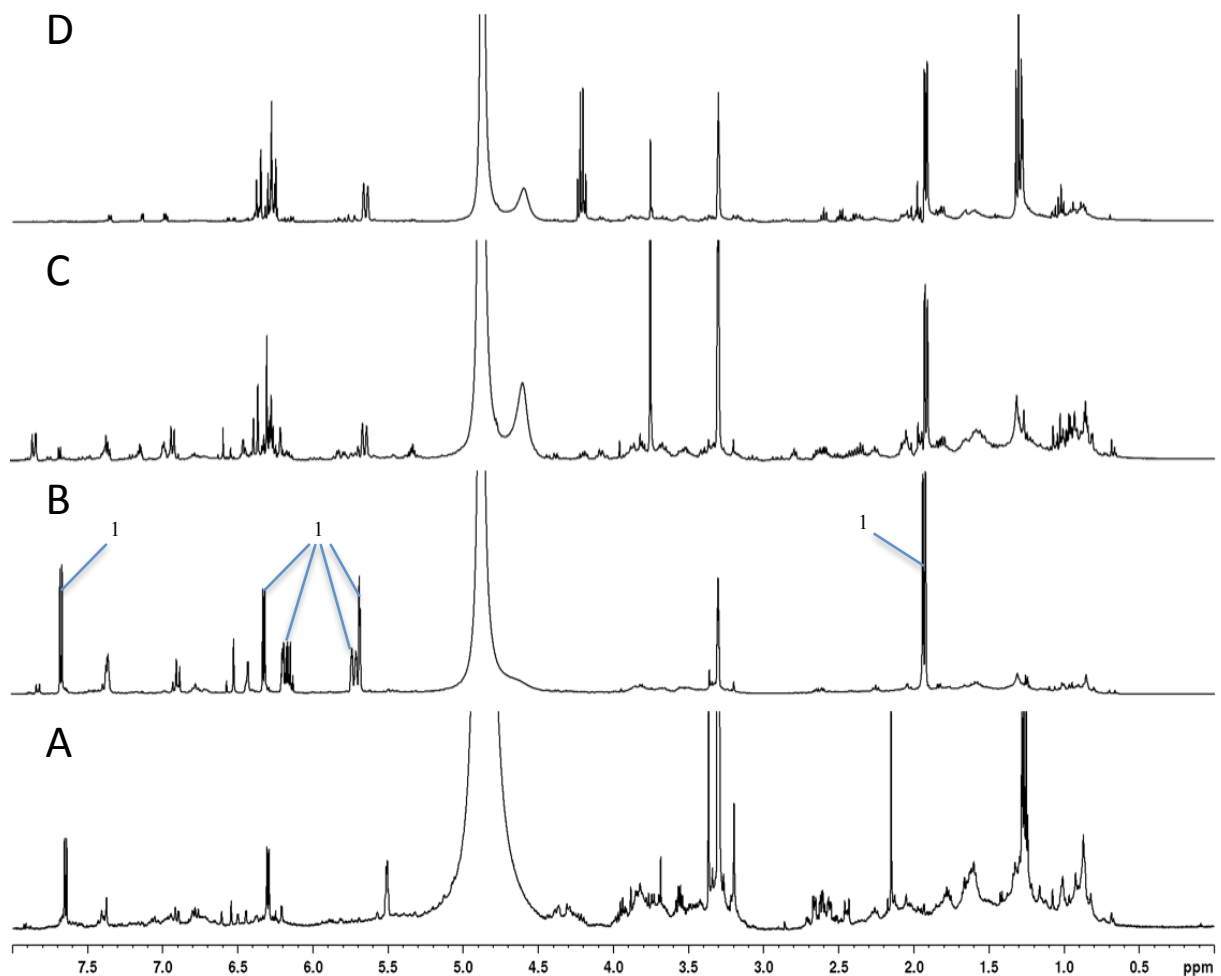


Figure 72 : Sous fractions issues de la fraction Fr80 de *T. maritimum*. A : ssFr60; B : ssFr65; C : ssFr70; D : ssFr80. 1 : 2(5H)-furanone, 5-(4-hexen-2-yn-1-ylidene).

Sur le spectre RMN ^1H de la ssFr65 les signaux d'intensité comparables à 7,66, 6,31, et 6,1 suggère la présence d'un cycle, associés à des protons de carbones insaturés à 5,72 et 5,69 ppm. D'une intensité équivalente, un doublet à 1,9 ppm suggère la présence d'une partie aliphatique. Les analyses RMN 2D COSY ont permis de mettre en évidence deux systèmes de spins, le premier composé des protons à 1,9 (H6, d), 5,72 (H4, d) et 6,1 ppm (H3, m) (figure 73). L'HMQC a permis d'attribuer les carbones correspondants à 16,6 (C6), 110,7 (C4) et 100,11 ppm (C3) (figure 75). Le second système de spin mis en évidence par la COSY comporte les protons à 7,66 (H1, d) et 6,31 ppm (H2, d) (figure 73). Les analyses HMQC permettent d'attribuer ces protons aux carbones à 144,7 (C1) et 120,9 (C2) (figure 75). L'expérience d'HMBC permet de mettre en évidence une corrélation entre H5 et C1 (figure 75). Cet ensemble de corrélations indique que ces signaux proviennent d'une seule molécule. Les données de la COSY et de l'HMBC ont montré que le premier système de spin était une chaîne hexène comprenant un groupement méthyle (CH_3 , C6), de deux alcènes (CH les C3 et

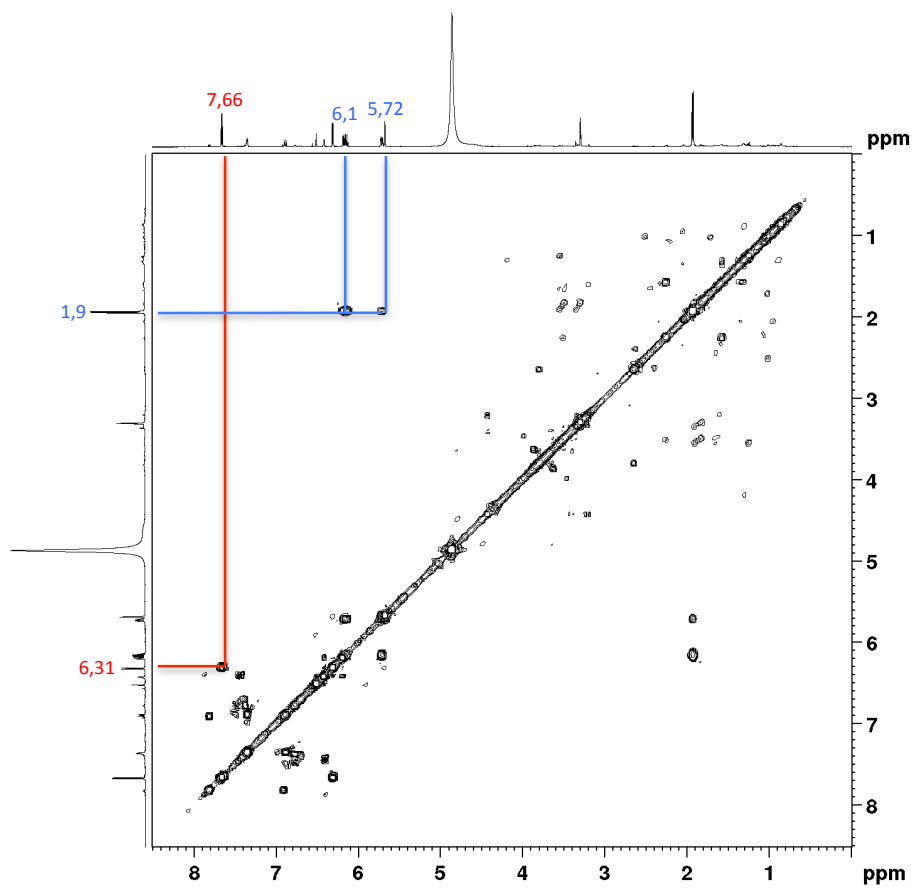


Figure 73 : Spectre COSY de la Fr80 ssFr65 de *T. maritimum*. En, bleu, le premier système de spin et en rouge, le second.

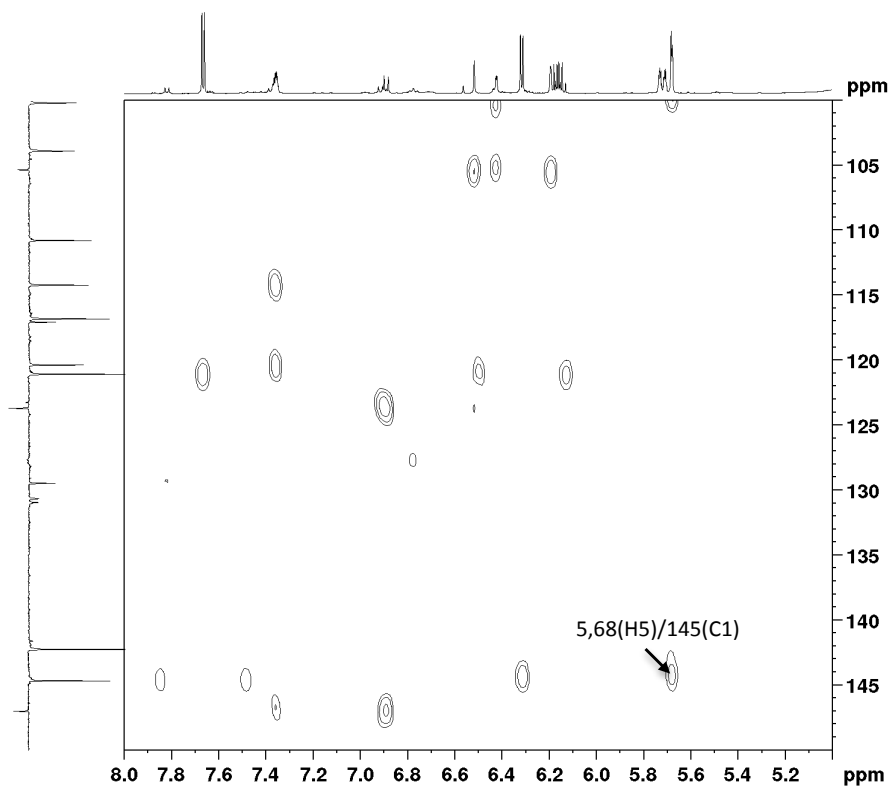


Figure 74 : Spectre HMBC de la Fr80 ssFr65 de *T. maritimum*

C4 et C5 et C9), ainsi qu'un alcyne (C, les C9 et C11). La partie cyclique correspond elle à une 2-furanone, avec une fonction ester (COO, C8), un groupement alcène (CH, C1 et C2) et un groupement (CO, C7) faisant la liaison avec l'hexène. Cette furanone majoritaire a été identifiée comme la 2(5H)-furanone, 5-(4-hexen-2-yn-1-ylidene) ou matricaria lactone (figure 76). Les autres sous-fractions restent complexes, avec des composés semblant similaires structurellement (figure 72).

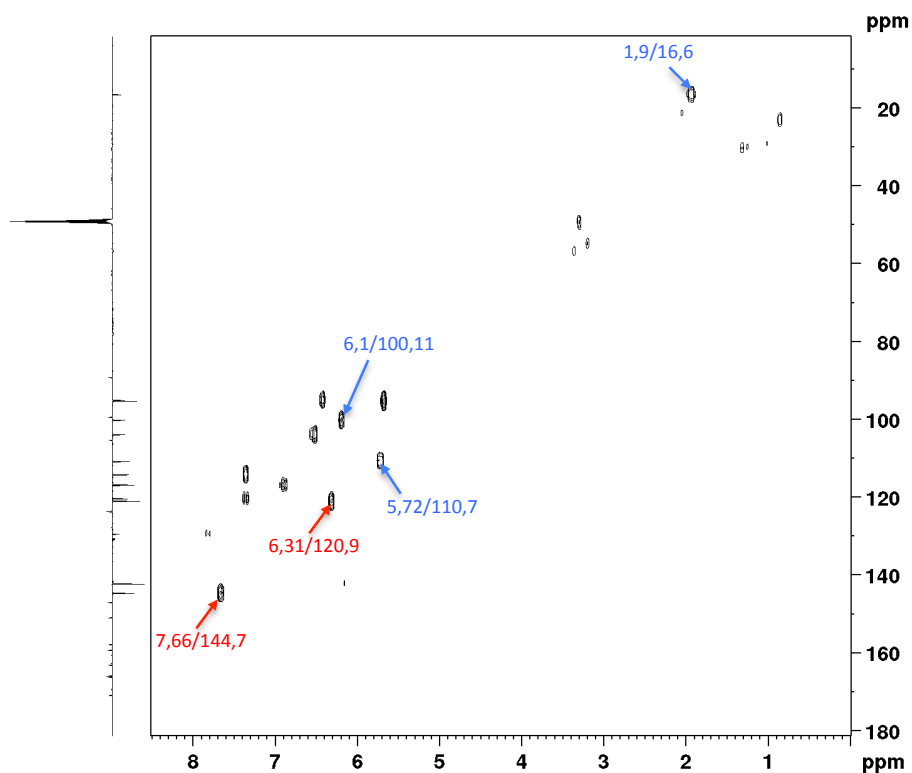


Figure 75 : Spectre HMQC de la Fr80 ssFr65 de *T. maritimum*

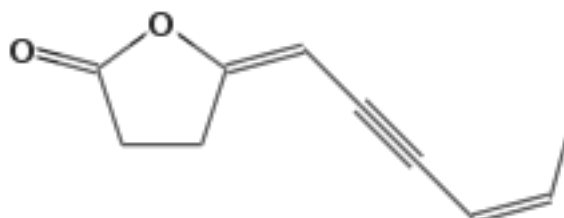


Figure 76 : Matricaria lactone

Les fractions Fr100 et FrAcEt comportent majoritairement des signaux dans la zone des protons aliphatiques, pouvant correspondre à des phytostérols ou des terpènes (figure 65 F-G).

IV. DISCUSSION

Des activités biologiques ont été mises en évidence chez les 3 espèces. Le fractionnement sur résine de silice greffée C18 a permis pour chaque extrait de détecter de nouveaux signaux sur les spectres de RMN du proton, ainsi que d'isoler des composés et de concentrer des activités dans certaines fractions.

Plusieurs tendances se dégagent, indépendamment de l'espèce considérée :

1. Tout d'abord, l'activité antioxydante est essentiellement exprimée dans les fractions de polarité intermédiaire Fr20, Fr40, Fr60 et Fr80. Ces fractions sont celles qui contiennent en grande majorité les composés phénoliques tels que les flavonoïdes. Ces composés sont responsables d'un grand nombre d'activités biologiques. Les flavonoïdes ont été décrits comme étant antibactériens, anti-cancerigènes, anti-inflammatoires, anti-viraux, anti-allergènes et surtout antioxydants (Rice-Evans *et al.*, 1996). Cette activité antioxydante a en particulier été montrée chez des halophytes comme la Criste marine (Méot-Duros *et al.*, 2009) et *Limonium algarvense* (Rodrigues *et al.*, 2015).

2. L'activité anti-tyrosinase de ces trois espèces est étudiée ici pour la première fois à notre connaissance. Certaines fractions présentent des activités très remarquables, proches de celle de l'acide kojique, puissant inhibiteur utilisé dans l'industrie. Les fractions les plus actives sont les plus apolaires. Il ne semble donc pas y avoir de corrélation évidente entre l'activité antioxydante et l'activité anti-tyrosinase (pourtant liée à une enzyme catalysant une double réaction d'oxydation).

3. Aucune activité anti-élastase ni anti-collagénase n'a été détectée parmi les extraits bruts et fractions aux concentrations testées. Les plantes présentant une activité anti-élastase intéressante sont rares (Lee & Cho, 1999). Les polyphénols, abondants dans les extraits de nos 3 plantes à l'étude, sont pourtant connus pour inhiber l'activité de ces deux enzymes (Thring *et al.*, 2009). L'extrait aqueux d'une espèce très proche de *T. maritima*, *Matricaria recutita*, n'a pas non plus présenté d'activité anti-élastase ni d'activité anti-collagénase (Thring *et al.*, 2009).

Quel que soit le test antioxydant considéré, l'extrait de Lavande de mer (*L. vulgare*) s'est avéré le plus puissant des 3 étudiés ici. De très fortes activités réductrices et anti-radicalaires ont été rapportées chez d'autres membres de la famille des Plumbaginacées, comme *L. aureum*, *L. delicatulum* ou *L. pruinatum* (Geng *et al.*, 2015 ; Kenouche *et al.*, 2016 ; Medini *et al.*, 2014). L'extrait brut de *L. vulgare* est aussi actif que l'extrait commercial de romarin, mais reste moins actif que des molécules pures utilisées dans l'industrie comme le BHT ou le tocophérol (respectivement 8 et 2,5 fois moins). Néanmoins, les fractions intermédiaires Fr20 et Fr60, très impliquées dans cette activité, présentent des activités anti-radicalaires contre le DPPH équivalentes à celles du BHT ou du resvératrol. La fraction Fr20, qui possède la meilleure activité anti-radicalaire contre le DPPH de cette étude, contient un composé phénolique majoritaire encore non identifié (Composé 1). La fraction Fr40, qui possède un niveau d'activité très proche, renferme une grande quantité de composés phénoliques, au regard des signaux visibles dans la zone de noyaux aromatiques et de la valeur révélée par le test des polyphénols totaux, la plus forte de cette étude. L'enveloppe décrite précédemment pourrait correspondre à un ou plusieurs très gros composés phénoliques de type tannin, comme la samarangénine B déjà décrite chez *L. sinense* (Kuo *et al.*, 2002). De plus, la présence de l'éthyl gallate, composé déjà identifié chez *L. axillare* (Ahmed *et al.*, 1999), pourrait expliquer en partie l'activité antioxydante de cette fraction.

La fraction Fr60 possède, elle aussi, une très forte activité antioxydante. Deux molécules majoritaires, des flavonoïdes glycosylées, y ont été identifiées : la myricétine 3-O- α -rhamnopyranoside et la myricétine 3-O- β -galactopyranoside. Ces composés sont connus pour avoir un fort pouvoir antioxydant, et ont déjà été décrits chez 2 autres espèces du genre *Limonium* : *L. brasiliense* et *L. tetragonum* (Murray *et al.*, 2004 ; Lee *et al.*, 2011).

La fraction Fr80 présente des activités antioxydantes inférieures mais néanmoins intéressantes. De plus, cette fraction a une activité anti-tyrosinase relativement importante. Des travaux complémentaires de purification sont nécessaires afin d'identifier le composé (2), majoritaire dans cette fraction.

L'activité anti-tyrosinase de *L. vulgare* a été décrite dans cette étude pour la première fois. Celle-ci est distribuée dans toutes les fractions à l'exception de la FrH₂O. Du fait que toutes les fractions présentent une activité intéressante, cela ne peut donc pas être dû aux mêmes types de structures moléculaires. Il est possible que les différentes fractions n'inhibent pas la tyrosinase de la même façon, inhibition dont il existe différents modes d'action. L'inhibiteur peut : (i) réduire la dopaquinone, empêchant ainsi la formation de dopachrome, (ii) neutraliser le radical de la dopaquinone, (iii) entrer en compétition avec le substrat, en se

fixant sur le site actif avec une liaison covalente irréversible, (iv) se fixer à l'enzyme avec une liaison réversible. Cependant, seuls (iii) et (iv) sont considérés comme de vrais mécanismes d'inhibition spécifiques (Chang, 2009). L'activité anti-tyrosinase peut donc être liée à la présence de composés phénoliques, mais ceux-ci peuvent simplement avoir un effet antioxydant, mimant l'inhibition de l'enzyme. L'activité anti-tyrosinase des fractions Fr20, Fr40, Fr60 et Fr80 n'est donc peut-être pas due à une inhibition spécifique. Par exemple, l'activité anti-tyrosinase de la myricétine 3-O- β -galactopyranoside (Fr60) a récemment été montrée, mais sans précisions sur les mécanismes de cette inhibition (Lee *et al.*, 2016).

En revanche, la très faible présence de composés phénoliques dans les deux fractions les plus apolaires de *L. vulgare*, Fr100 et FrAcEt, ainsi que leur faible activité antioxydante, semble indiquer que leur activité anti-tyrosinase est bien due à une inhibition spécifique. Des tests supplémentaires sont nécessaires, afin de séparer et identifier les molécules responsables de l'activité de ces fractions.

Même si la majorité des études sur la Criste marine a porté sur les huiles essentielles, l'activité antioxydante d'extraits hydroalcooliques a déjà été rapportée chez cette espèce. Cependant, l'implication des différentes molécules dans l'activité des extraits hydroalcooliques n'avait jusqu'alors jamais été étudiée en détail. Les activités antioxydantes chez *C. maritimum* sont concentrées dans les fractions intermédiaires Fr20, Fr40, Fr60 et Fr80. L'activité de la Fr20 est grandement expliquée par l'acide chlorogénique, composé principal de cette fraction et connu pour son fort pouvoir antioxydant (Xiang et Ning, 2008). La présence d'acide chlorogénique chez *C. maritimum* a été décrite pour la première fois par Méot-Duros *et al.* (2009), et était déjà connue chez de nombreuses Apiacées (Generalic Mekinic *et al.*, 2016). La fraction Fr40 est majoritairement composée d'acide 3,5-dicaffeoylquinique. Ce composé a lui aussi déjà été décrit chez la Criste marine (Siracusa *et al.*, 2011), et son activité antioxydante a été rapportée chez une autre halophyte, *Salicornia herbacea* (Kim *et al.*, 2011). La Fr60 est riche de quatre dérivés glycosylés de la quercétine : la quercétine 3-O-robinobioside, la quercétine 3-O-galactoside, la quercétine 3-O-rutinoside et la quercétine 3-O-glucoside. Les deux derniers flavonoïdes ont déjà été décrits chez la Criste (Jallali *et al.*, 2012 ; Saleh *et al.*, 1983). En revanche, la quercétine 3-O-galactoside y est trouvée pour la première fois, élargissant sa présence au sein des Apiacées (Harborne & Boardley, 1984 ; Parejo, 2004). Quant à la quercétine 3-O-robinobioside, elle n'avait jamais encore été décrite chez une Apiacée. Sa présence a cependant été rapportée chez d'autres familles telles que les Fabacées, les Rosacées et les Lamiacées (Joubert & de Beer, 2014 ;

Ozga *et al.*, 2007 ; Cong *et al.*, 2009). L'activité antioxydante de cette fraction Fr60 est très vraisemblablement due à ces 4 flavonoïdes glycosylées, la quercétine étant bien connue pour avoir cette propriété. Une étude complémentaire sera néanmoins nécessaire pour évaluer le degré de contribution de chacune de ces 4 formes à l'activité antioxydante globale de la fraction. Il en va de même pour l'explication de l'activité anti-tyrosinase de cette fraction, sachant que celle de la quercétine 3-O-galactoside a déjà été démontrée et évaluée chez *L. tetragonum* (Lee *et al.*, 2017).

Dans la mesure où les fractions de polarité intermédiaire (Fr20, Fr40, Fr60 et Fr80) possèdent une activité anti-tyrosinase supérieure à celle de l'extrait brut, il semble donc à ce stade qu'il y ait un lien entre cette activité et l'activité antioxydante, ce qui est logique puisque la tyrosinase catalyse une double réaction d'oxydation (de la tyrosine). Pourtant, il est à noter que les fractions les plus apolaires Fr100 et FrAcEt présentent les activités anti-tyrosinase les plus fortes. Or ces fractions ne comportent quasiment pas de composés phénoliques et ont une activité antioxydante faible. Si le lien, déjà largement décrit dans la littérature, entre la présence de composés phénoliques et l'activité antioxydante des fractions est, confirmé, il faut alors rechercher ici une autre explication pour rendre compte de l'activité anti-tyrosinase. Il semblerait que les fractions les moins polaires dans notre étude, assez hétérogènes du point de vue de leur composition, possèdent une activité d'inhibition spécifique vis-à-vis de la tyrosinase. Afin de vérifier cette hypothèse, une étude complémentaire sera nécessaire sur ces 2 fractions, permettant de séparer, tester et identifier les composés responsables. Il sera alors intéressant de mesurer la part d'inhibition spécifique et la part d'inhibition non-spécifique de ces fractions.

La Matricaire maritime présente les activités antioxydantes les moins fortes de cette étude. Néanmoins, l'activité reste intéressante et, comme chez les deux autres espèces, est concentrée dans les fractions intermédiaires Fr20, Fr40, Fr60 et Fr80. La fraction Fr20 contient très majoritairement un oligofructane, l' α -D-Glcp-(1 \rightarrow 2)-[β -D-Fruf-(2 \rightarrow 1)- β -D-Frucf]_n-(2 \rightarrow 1)- β -D-Fruf, déjà décrit chez cette espèce (Cérantola *et al.*, 2004). Cependant, cet oligosaccharide n'est probablement pas à l'origine des activités antioxydantes mesurées dans cette fraction. Sur le spectre de RMN du proton, de petits composés phénoliques sont écrasés par les signaux de ce fructane, mais le test des polyphénols totaux atteste bien de leur présence. Ces derniers seraient donc plus vraisemblablement à l'origine de l'activité

antioxydante, ainsi que de l'activité anti-tyrosinase observée. Pour confirmer cette hypothèse, il sera au préalable nécessaire de séparer l'oligofructane de ces composés.

La fraction Fr40 est une des fractions les plus antioxydantes de *T. maritima*, en particulier contre le radical ABTS. Elle contient deux molécules majoritaires, l'acide 3,5-dicaffeoylquinique, et une molécule jamais décrite dans la littérature, nommée Tripleurospermine. Un fractionnement plus poussé de cette Fr40 a permis d'obtenir deux sous-fractions contenant chacune une de ces molécules quasiment pure. L'acide 3,5-dicaffeoylquinique a alors été testé et a montré une activité antioxydante très forte. La Tripleurospermine, elle, révèle une activité moins forte mais néanmoins intéressante. Quoiqu'il en soit, ces deux molécules suffisent à expliquer à elles seules l'activité antioxydante importante de la fraction Fr40. Les dérivés caffeoyls sont connus pour contribuer fortement à l'activité antioxydante des Astéracées (Fraisse *et al.*, 2011). Au sein de cette famille, l'acide 3,5-dicaffeoylquinique a été identifié chez de nombreuses espèces, notamment une très proche de la Matricaire maritime, *Matricaria perforata* (Fraisse *et al.*, 2011). L'activité antioxydante de ce composé a déjà été rapportée, et les résultats obtenus dans notre étude confirment sa très forte activité anti-radicalaire. Par ailleurs, nous avons montré que la fraction Fr40 inhibe également l'activité monophénolase de la tyrosinase. Cependant, aucune des deux molécules majoritaires identifiées qui en sont issues, ne présentent individuellement une activité supérieure à celle de la fraction d'origine. Dès lors, deux possibilités sont envisageables : soit ces deux composés fonctionnent en synergie, soit des composés ont également une activité anti-tyrosinase dans les autres sous-fractions de la fraction Fr40. Tester ces sous-fractions sera nécessaire afin de vérifier ces hypothèses.

La fraction Fr60 contient de nombreux composés qui n'ont pas été identifiés au cours de cette étude. Ceux-ci présentent des activités antioxydantes et anti-tyrosinase intéressantes, et doivent faire l'objet d'études plus poussées afin de caractériser les structures responsables de ces activités.

Tout comme la fraction précédente, la fraction Fr80 présente des activités antioxydantes et anti-tyrosinases importantes. Après sous-fractionnement, une molécule majoritaire a pu être identifiée, la 2(5H)-furanone, 5-(4-hexen-2-yn-1-ylidene) ou matricaria lactone. Celle-ci est présente chez d'autres espèces d'Astéracées, et a déjà été décrite chez

Matricaria perforata (Raal *et al.*, 2011). Des travaux complémentaires d'accumulation seront nécessaires pour la tester seule et ainsi évaluer ses éventuelles activités biologiques.

Comme pour les deux autres espèces, les deux fractions de l'extrait brut de *T. maritima* les plus actives contre la tyrosinase sont les fractions les moins polaires, Fr100 et FrAcEt. Dans cette étude, ces fractions ne présentent pas d'activité antioxydante mais contiennent des composés possédant des noyaux aromatiques. Il sera intéressant de vérifier le type d'inhibition à l'œuvre ainsi que de séparer et identifier les molécules responsables, dont on peut d'ores et déjà penser qu'il s'agit de dérivés terpéniques.

V. CONCLUSION

Les trois espèces étudiées ont présenté des activités antioxydantes et anti-tyrosinase intéressantes. Les molécules majoritaires responsables de l'activité antioxydante pour chaque espèce ont été en grande partie caractérisées. Quelques fractions comme les Fr20 et Fr40 de *L. vulgare* mériteraient des études complémentaires, notamment un sous-fractionnement avec des méthodes différentes (échange d'ions, HPLC ou UPLC) afin de simplifier les profils des spectres RMN ¹H et de permettre les identifications par des séquences de RMN 2D et/ou spectrométrie de masse. Les extraits bruts ainsi que les fractions les plus actives pourraient être évaluées selon de nouveaux tests, très utilisés et reconnus dans le domaine industriel, comme le Rancimat ou l'Oxipress. Ces tests permettraient d'en savoir plus sur la pertinence de leur utilisation dans des produits industriels à destination des secteurs de l'agroalimentaire ou de la cosmétique, et de confirmer leur fort potentiel antioxydant.

Concernant l'activité anti-tyrosinase, l'étude plus poussée des fractions les moins polaires de chaque extrait présenterait un grand intérêt, compte tenu de leur fort niveau d'activité et du fait que cette activité inhibitrice semble spécifique. Les profils de ces fractions peuvent correspondre à des stéroïdes dont certains sont connus pour inhiber fortement la tyrosinase (Lee *et al.*, 2015), ou à des terpènes, dont quelques-uns ont montré une activité anti-tyrosinase modérée (Magid *et al.*, 2008). En complément de l'étude de l'inhibition de l'activité monophénolase de la tyrosinase, et avant tout test sur cellule ou préclinique, il sera également nécessaire de tester l'activité inhibitrice sur l'autre activité de la tyrosinase, à savoir l'activité diphénolase.

Enfin, dans le cadre de ce projet, les trois espèces étudiées ne semblent pas avoir de propriétés anti-élastase ni anti-collagénase. Leur utilisation en cosmétique comme source d'agents anti-rides ou de renouvellement de la peau ne peut de fait pas être envisagée. La recherche chez ces espèces se poursuivra donc sur d'autres activités d'intérêt, comme les activités hydratante (en relation avec leur composition en osmolytes) ou photoprotectrices (écran anti-UV).

CHAPITRE III : CARACTERISATION
DES ACTIVITES BIOLOGIQUES EN
CONDITIONS NATURELLES

I. INTRODUCTION

La quantité et la qualité des métabolites secondaires présents dans les tissus végétaux sont en partie dépendantes des conditions environnementales. Ces métabolites sont le reflet des interactions entre les plantes et leur environnement. L'ensoleillement, les précipitations et la sécheresse, le vent, les températures, facteurs changeant d'une saison à l'autre, vont faire varier la composition chimique des plantes au cours de l'année. Il a été montré à de nombreuses reprises que les saisons avaient une influence sur la composition en métabolites secondaires, notamment sur les glucosinolates (Bhandari & Kwak, 2014), les alcaloïdes (Li *et al.*, 2014), les composés phénoliques et les terpènes (Alqahtani *et al.*, 2015). Ces modifications influent ainsi sur les activités biologiques, qu'elles soient anti-bactériennes (Chokoe *et al.*, 2008), antioxydantes ou anti-inflammatoires (Bhandari & Kwak, 2014 ; Li *et al.*, 2014).

De nombreuses études ont porté sur le suivi de la composition et des activités biologiques d'espèces halophiles en fonction des saisons. Il a été montré que chez *C. maritimum* (Méot-Duros et Magné, 2009 ; Generalić Mekinac *et al.*, 2018), la quantité de composés phénoliques, l'activité antioxydante et l'activité anti-cholinestérase dépendent de la saison de récolte. De nombreuses espèces du genre *Limonium* ont fait l'objet d'études similaires. *L. delicatulum* présente des variations saisonnières d'activités anti-oxydantes et de quantités de polyphénols, flavonoïdes et flavonols (Souid *et al.*, 2018 ; Medini *et al.*, 2014). De même, *L. iconicum*, *L. lilacinum* et *L. anatolicum* présentent de plus grandes quantités de sucres pendant l'été, et leurs teneurs en proline et en bétaines varient en fonction de la saison (Baysal *et al.*, 2013).

En plus de ces facteurs saisonniers, d'autres facteurs environnementaux liés au type de milieu ont une influence sur la composition chimique des plantes. Les milieux à contrainte saline sont variés, et en fonction de leur nature, présentent des sources de stress de différentes natures et intensités.

Pour *C. maritimum*, les sites de prélèvements ayant entre autres des pluviométries différentes ont un fort impact sur la composition chimique des plantes, et ainsi leurs extraits présentent des activités antioxydantes différentes (Jallali *et al.*, 2014)

Les trois espèces étudiées ici ont fait l'objet d'un suivi de leur activité antioxydante ainsi que de leur composition phytochimique par RMN au cours de l'été 2017 (mois de Mai, Juillet et Septembre). Les lieux de prélèvement sont visibles figure 77. Afin de les décrire au mieux, ces habitats ont fait l'objet d'une caractérisation phytosociologique. Cette étude a été réalisée avec l'aide de X. Dauvergne en Juin 2017.

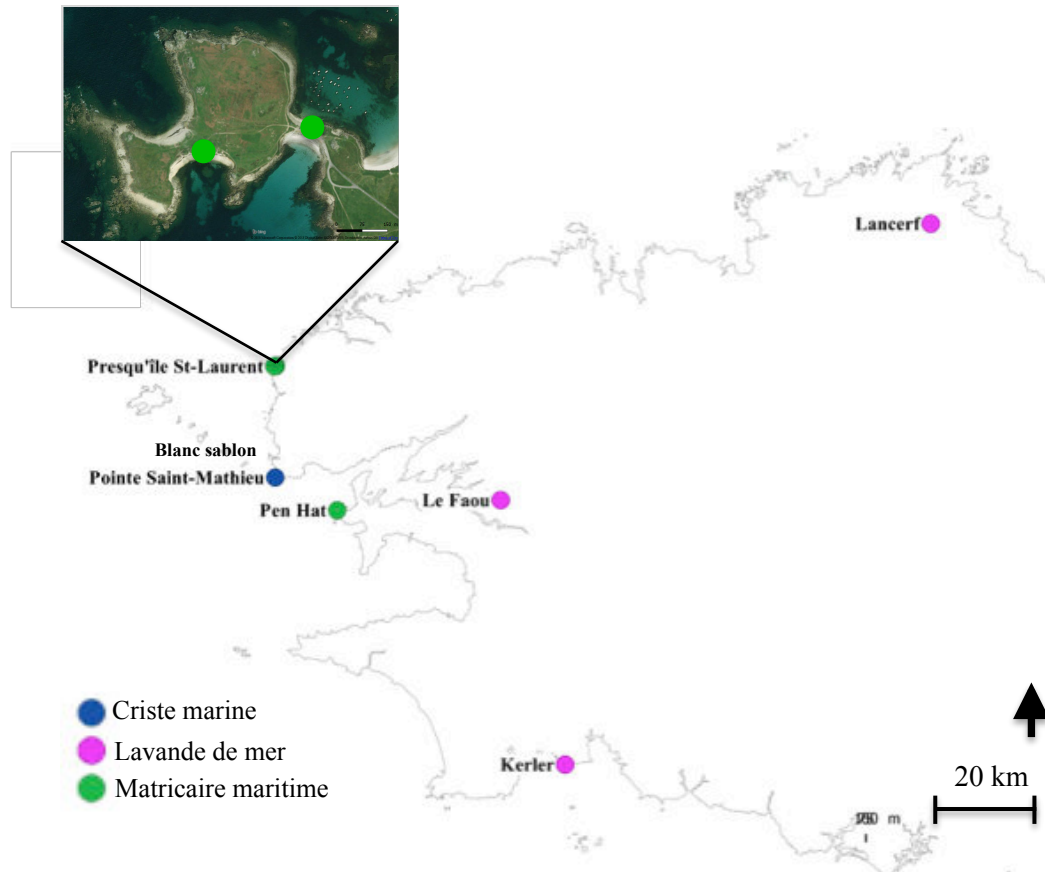


Figure 77 : Carte représentant les différents sites de prélèvement des plantes.

II. MATERIEL ET METHODES

A. Méthode phytosociologique

La végétation des sites de prélèvements a été analysée selon la méthode phytosociologique sigmatiste (Lahondère, 1997). Les relevés phytosociologiques ont été réalisés sur des surfaces homogènes au regard de la physionomie, de la flore et de l'écologie. Chaque relevé correspond à un individu d'association. Pour chaque individu d'association, il existe une surface, dite aire minimale, au-delà de laquelle le nombre d'espèces rencontrées n'augmente plus de manière significative. Le relevé phytosociologique proprement dit est constitué de données diverses sur les conditions stationnelles (date, lieu, exposition, localité, altitude, inclinaison...), d'une description structurale de l'individu d'association (hauteur, stratification...), d'un inventaire floristique le plus exhaustif possible, avec l'attribution pour chaque espèce, d'un coefficient d'abondance-dominance (CAD) basé sur le recouvrement au sein de l'individu d'association (Tableau 11) (Lahondère, 1997). L'abondance correspond au nombre d'individus occupant la surface du relevé. La dominance correspond, quant à elle, au recouvrement total de l'espèce ; c'est donc un caractère physionomique qui exprime la part qu'occupe une espèce dans le volume de la végétation, ce volume étant projeté au sol.

Dans le cas du coefficient d'abondance dominance, les valeurs les plus faibles mettent l'accent sur l'abondance, tandis que les valeurs supérieures correspondent à la dominance. Suite au relevé, des classes de présence sont affectées à chaque espèce. Ces classes correspondent à la fréquence de présence de l'espèce dans l'ensemble des relevés (Tableau 11).

Tableau 11 : Coefficient d'abondance-dominance (CAD) basé sur le recouvrement au sein de l'individu d'association.

CAD	Recouvrement (en %)
5	>75 %
4	50 à 75 %
3	25 à 50 %
2	5 à 25 %
1	<5 %
+	très peu abondant

Pour chaque population étudiée, un relevé phytosociologique a été effectué afin de les comparer aux associations végétales décrites dans la littérature. L'association permet de préciser l'habitat naturel de chaque taxon étudié dans la mesure où elle représente une

combinaison originale d'espèces dont certaines, dites « caractéristiques », lui sont plus particulièrement liées, les autres étant qualifiées de « compagnes ». Les espèces caractéristiques révèlent par leur présence une écologie particulière, et leur association végétale répond à des conditions stationnelles bien définies.

B. Prélèvement

Les plantes sont prélevées à raison de 5 individus par site. Les trois feuilles les plus apicales de chaque individu est conservé dans la glace, sont lavés puis congelées. Après lyophilisation, elles sont broyées et conservées sous forme de poudre en attendant l'extraction.

C. Analyses biochimiques

Les extractions sont effectuées selon le protocole décrit précédemment (cf p.). Pour la mesure de la capacité anti-radicalaire contre le DPPPH, la méthode utilisée est celle de Chen *et al.* (1999) modifiée par Marwah *et al.* (2007), utilisée précédemment (cf p.).

D. Dosage de l'acide chlorogénique par RMN

L'analyse quantitative de l'acide chlorogénique a également été réalisée par RMN. Une quantité connue d'extrait brut sec est solubilisée dans 700 μL de D_2O , puis 600 μL de l'extrait solubilisé sont transférés dans un tube RMN. 5 μL d'une solution de TSP-d4 (acide triméthyl 2,2',3,3'-tétra deutéropropionique) de concentration connue sont introduits.

Les signaux correspondant à un proton de l'acide chlorogénique ainsi que le singulet correspondant aux 9 protons du TSP sont intégrés. Pour les signaux de l'acide chlorogénique, l'intégration est réalisée à condition que leur base ne soit pas modifiée par la présence de signaux parasites à proximité. L'acquisition est réalisée avec un pulse à 30° et un délai entre chaque scan de 10 s afin de rétablir la relaxation T_1 de chaque signal du spectre. Cette précaution est prise pour permettre d'intégrer les signaux intéressants. Le pic du TSP correspondant à 9 protons, la valeur de 9 est donnée à l'aire du signal du TSP. Les intégrations des autres signaux seront proportionnelles à cet étalon. La quantité de molécule dosée, dans l'échantillon, est donc proportionnelle à la valeur d'intégration obtenue.

Ces dosages ont été réalisés avec un spectromètre Brüker DRX 500 Avance équipé d'une sonde de 5 mm inverse triple résonance TBI $^1\text{H}/\{\text{BB}\}/^{13}\text{C}$ avec gradient Z (500,13 Mhz pour le ^1H).

E. Traitement statistique

Les variances n'étant pas homogènes et les échantillons fortement appariés, les activités ont été comparées à l'aide d'un test de Friedman.

1. Sites de la Criste marine

a. Trévignon

Le site de Trévignon se situe sur la commune de Trégunc entre la plage et l'étang de « Loc'h couziou ». Sur ce site, 3 prélèvements ont été réalisés en fonction de l'éloignement à la mer. La dune y est caractérisée par un sable coquillé. Le premier prélèvement a été réalisé au niveau de la dune embryonnaire caractérisée par la présence de laisse de mer (figure 78 A). Elle correspond à une pelouse dunaire à *Euphorbia paralias* et *Elymus farctus* (association phytosociologique correspondant est l'*Euphorbio paraliae-Agropyretum junceiformis*) (Tüxen, 1945). Cette association des dunes embryonnaires cantrabro-atlantiques est caractérisée par des débris coquillés et des lasses organiques et peut être atteinte par les marées hautes de vives eaux (Delassus *et al.*, 2014).

La seconde zone échantillonnée est au niveau de la dune vive (figure 78 B). Cette zone est caractérisée par un apport rare de laisse de mer et un placage de sable. La végétation associée (Tableau 12) permet de définir l'habitat comme une «pelouse dunaire à *Euphorbia paralias* et *Ammophila arenaria* (*Euphorbio paraliae-Ammophiletum arenariae*) (Tüxen, 1945). Cette association nord à eu-atlantique dominée par l'oyat est caractéristique des dunes mobiles enrichies en calcaire (Delassus *et al.*, 2014).



Figure 78 : Site de Trévignon. A : Dune embryonnaire ; B : Dune vive

Enfin, la troisième zone est située en arrière-dune au niveau de la dune fixée. Cette pelouse arrière dunaire, rase, perturbée par la présence de lapins (nombreux terriers et crottoirs observés), appartient à l'ordre *Artemisio lloydii-Koelerietalia albenscentis* (Sissingh, 1974) et à la classe du *Koelerion albenscentis* (Tüxen, 1937) qui représente des pelouses vivaces riches en espèces annuelles et en bryophytes des arrières-dunes littorales plus ou moins fixées et enrichies en calcaire, caractérisées notamment par la présence de *Carex arenaria* et *Vulpia bromoides*.

b. Pen hat

Le site de Pen hat se trouve au niveau de la presqu'île de Crozon sur la commune de Camaret. Ce système dunaire est localisé entre la Pointe de Pen hir au sud et la pointe du Toulinguet à l'ouest. Sur ce site, 2 zones ont été échantillonnées. Le premier prélèvement a été réalisé au niveau d'un cordon de galets et blocs de grès armoricain (figure 79 A). Ce groupement végétal peut être rattaché à l'association d'affinité atlantique *Crithmo maritimi-Crambetum maritimae* (Géhu et Géhu, 1969 ; Delassus *et al.*, 2014) qui correspond à une végétation halo-nitrophile des hauts de plage de galets enrichis en laisse de mer.

La seconde zone échantillonnée correspond à la dune mobile. La végétation peut être rattachée à la sous-alliance *Ammophilenion arenariae* (Géhu, 1988), qui est caractérisée notamment par la présence de *Convolvulus soldanella*, *Eryngium maritimum* et *Galium arenarium* (figure 79 B).

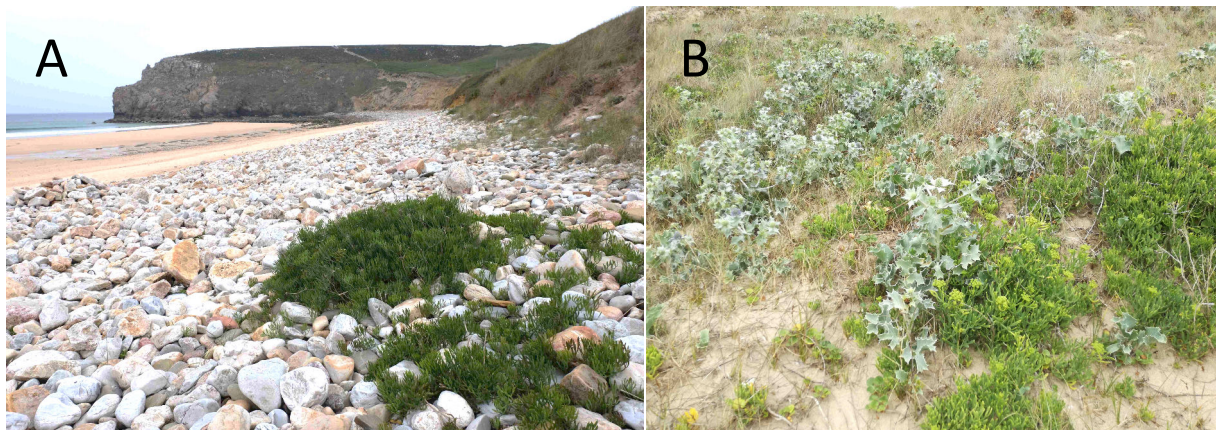


Figure 79 : Site de Pen Hat. A : Cordon de galets ; B : Dune mobile

c. Blancs sablons

La station de prélèvement se trouve au niveau du haut de la dune mobile (figure 80). La végétation associée correspond à une pelouse dunaire à *Euphorbia paralias* et *Ammophila arenaria* (*Euphorbio paraliae-Ammophiletum arenariae*) (Tüxen, 1945) qui répond aux mêmes caractéristiques que la seconde zone échantillonnée de Trévignon.



Figure 80 : Site des Blancs Sablons, dune mobile

d. Pointe Saint Mathieu

Le site de la pointe St Mathieu se situe à l'extrême ouest du Finistère sur la commune de Plougonvelin. La population de *Criste* se trouve au niveau des fissures des falaises exposées aux embruns (figure 81). La végétation peut être rattachée à l'alliance de *Crithmo maritimi-Armerion maritimae* (Géhu, 1968) correspondant à une pelouse aérohaline chasmophytique medio à cantabrio atlantique et la sous alliance *Crithmo maritimi-Limonienion binervosi* (Géhu et Géhu, 1984) correspondant aux pelouses pionnières de la base de l'étage aérohalin des falaises.



Figure 81 : Site de la Pointe Saint Mathieu

Tableau 13 : Relevés phytosociologiques des différentes stations de *T. maritimum* (CDG= Cordon de Galets)

Sites Milieux	Pen Hat	St Laurent	
	Dune mobile	CDG	CDG sur dune
Recouvrement (en %)	40	30	75
Surface (en m ²)	4	4	6
Nombre d'espèces	11	2	11
<i>Tripleurospermum maritimum</i>	1	3	3
<i>Beta maritima</i>		2	2
<i>Holcus lanatus</i>			2
<i>Euphorbia portlandica</i>	1		2
<i>Agrostis capillaris</i>			2
<i>Trifolium repens</i>			+
<i>Armeria maritima</i>			+
<i>Silene maritima</i>			+
<i>Atriplex hastata</i>			+
<i>Lotus angustissimus</i>	1		1
<i>Halimione portulacoides</i>	+		
<i>Cakile maritima</i>	+		
<i>Eryngium maritimum</i>	1		
<i>Crithmum maritimum</i>	2		
<i>Euphorbia paralias</i>	1		
<i>Festuca rubra</i>	2		
<i>Hypochaeris radicata</i>	1		
<i>Plantago lanceolata</i>	+		



Figure 82 : Site de Plougrescant. A : Cordon de galets ; B : Cuvette

e. Plougrescant

Le site de Plougrescant se trouve au niveau d'un cordon de galets. L'échantillonnage a été réalisé sur deux zones *a priori* écologiquement différentes. Dans un premier temps l'échantillonnage s'est concentré sur le cordon de galets proprement dit (figure 82 A). Ainsi, la végétation a été rattachée sans ambiguïté à l'association *Crithmo maritimi-Crambetum*

maritimae (Géhu et Géhu, 1969) décrite précédemment (Delassus *et al.*, 2014). La seconde zone échantillonnée correspond à une communauté située dans une cuvette sur le cordon de galets (figure 82 B). Ce groupement végétal est caractérisé par la présence abondante de betterave maritime et de chient dents des sable. La présence de ces deux espèces suggère un apport de laisse de mer régulier. Ce groupement végétal ne peut pas pour le moment être rattaché à un syntaxon phytosociologique.

2. Sites de la Matricaire maritime

a. Pen Hat

La population de Crozon a été échantillonnée au même endroit que le second prélèvement de Criste, au niveau de la dune mobile de Pen Hat. Comme indiqué précédemment, la végétation est rattachée à la sous-alliance *Ammophilenion arenariae* (Géhu, 1988).

b. Presqu'île Saint Laurent

Deux habitats ont été échantillonnés sur la presqu'île Saint-Laurent dans la commune de Porspoder. La première zone échantillonnée se situe au niveau d'un isthme au niveau de la jonction entre un cordon de galets et une pelouse rudérale halonitrophile (figure 83 A). Cette communauté linéaire est caractérisée par la présence de deux espèces (*T. maritimum* et *B. maritima*). La seconde station se trouve sur une dune perchée sur un cordon de galets (figure 83 B). La végétation correspond à une pelouse aérohaline sur dune,

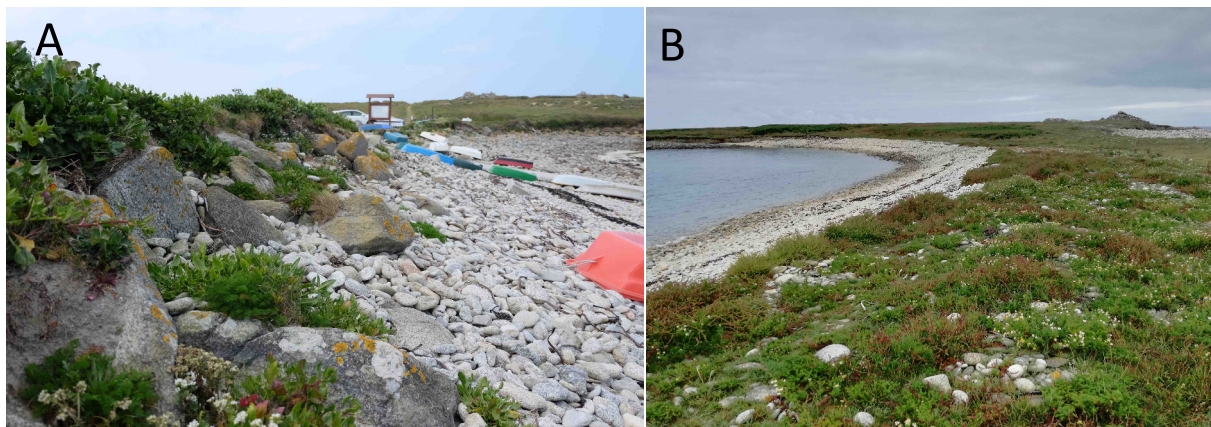


Figure 83 : Site de la presqu'île Saint Laurent. A : Cordon de galets ; B : Isthme maritime.

régulièrement piétinée et enrichie par les fèces de lapin et les déjections canines. La communauté végétale est dominée par des espèces à affinités écologiques différentes. Ainsi des espèces plus rudérales comme la Houlque laineuse et le Trèfle rampant sont en sympatrie avec des espèces nettement halophiles comme l'Euphorbe de Portland et la Betterave maritime (tableau 13).

Tableau 14 : Relevés phytosociologiques des différentes stations de *L. vulgare*

Sites	Keller		Le Faou	Lancerf		Lancerf Gare
	Haut Schorre	marge de chenal	Slikke	Bas Schorre	Haut Schorre	Haut schorre
Recouvrement (en %)	95	90	50	60	100	90
Surface (en m ²)	16	4	9	4	4	4
Nombre d'espèces	7	6	7	6	6	11
<i>Limonium vulgare</i>	3	2	2	3	2	3
<i>Plantago maritima</i>	3	3	1			2
<i>Cochlearia anglica</i>	1		1			+
<i>Tripolium pannonicum</i>	1		2		2	1
<i>Halimione portulacoides</i>	1	3	1	1		1
<i>Triglochin maritima</i>	2	1			4	3
<i>Salicornia sp.</i>	1		3	2		3
<i>Juncus maritimus</i>	+					
<i>Suaeda maritima</i>		1		2		
<i>Festuca rubra</i>		1			1	1
<i>Spergularia marina</i>				2		+
<i>Spartina alterniflora</i>			+			
<i>Spartina anglica</i>				1		
<i>Armeria maritima</i>					1	2
<i>Puccinellia maritima</i>					+	+

3. Sites de la Lavande de mer

a. Kerler

Le site de Kerler, sur la commune de Fouesnant, est à l'Est d'un cordon dunaire protégeant une lagune. Au niveau de ce site, 2 zones ont été échantillonnées. La première se trouve au niveau supérieur du schorre (figure 84 A). La végétation peut être rattachée à l'association *Plantagini maritimae-Limonietum vulgaris* (Westhoff & Segal, 1961) (tableau 14). Cet dernière est caractéristique d'un pré salé de subcuvette plate et sablonneuse des hauts

schorres armoricains. La seconde station est positionnée au niveau de la marge d'un cours d'eau douce (figure 84 B). La végétation de cette zone peut aussi être rattachée à la même association. Néanmoins, la présence plus marquée d'*Obione* suggère un caractère plus

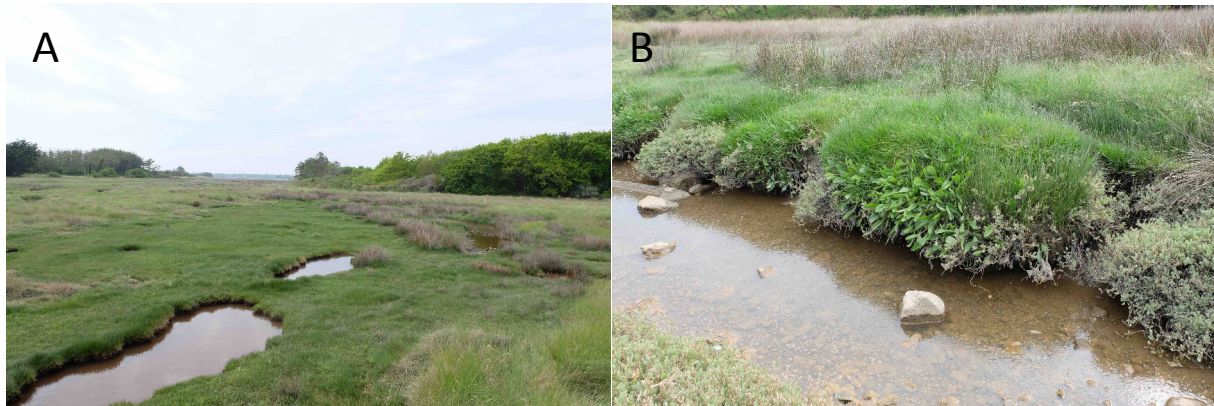


Figure 84 : Site de Kerler. A : Niveau supérieur du schorre ; B : Chenal halophile.

b. Le Faou

Le site est implanté en haut d'un estran schisteux. Des fragments de schiste de plusieurs centimètres dominent le substrat. La population de *Limonium* se développe au sein d'une Salicorniaie (de Salicorne annuelle) au niveau de la slikke supérieure (figure 85). Il s'agit d'une végétation herbacée rase et ouverte avec des espèces typiques de schorre atlantique telles *Pannonicum triploium*. Ce groupe est aussi caractérisé par la présence de laisse de mer abondante. Néanmoins aucun rattachement phytosociologique n'a pu être réalisé.



Figure 85 : Site du Faou, slikke supérieure

c. Lancerf

La commune de Plourivo habrite les sites de Lancerf et Lancerf-gare. Trois zones ont été échantillonnées. La première zone correspond à une végétation de bas schorre (figure 86 A). Le peuplement y est caractérisé par une végétation typique des bas-schorres atlantiques (tableau 14). Dans un second temps, un échantillonnage a été réalisé au niveau du haut-schorre (figure 86 B). La végétation était largement recouverte d'une épaisse couche de laisse de mer composée essentiellement d'algues vertes. Au regard de sa composition floristique, cette végétation est caractéristique d'un prés salé de haut-schorre (tableau 14) appartenant à la sous alliance *Limonio vulgaris-Plantagenion maritimae* (Géhu et Géhu, 1984). Enfin, le troisième site « Lancerf-gare » appartient à la même sous alliance ; néanmoins, la diversité spécifique y est largement supérieure.

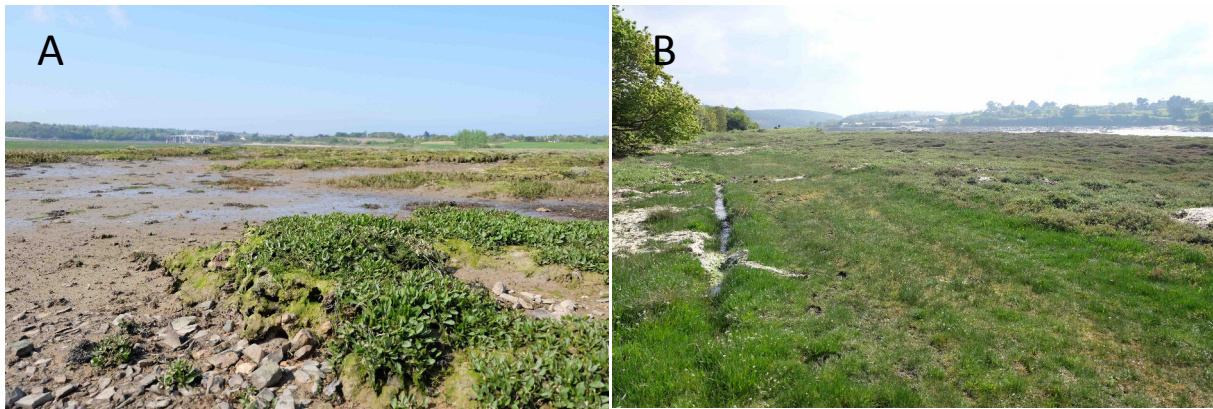


Figure 86 : Site de Lancerf. A : Bas schorre ; B : Gare (Haut schorre)

B. Activités anti-radicalaire et dosage

En fonction de la période de prélèvement, indépendamment du milieu, l'activité anti-radicalaire des extraits de *C. maritimum* fluctue (figure 87 A). Au mois de mai, les plantes présentent des activités significativement inférieures à celles des mois suivants. Au mois de juillet et septembre, les activités sont 60% plus élevées qu'au mois de mai.

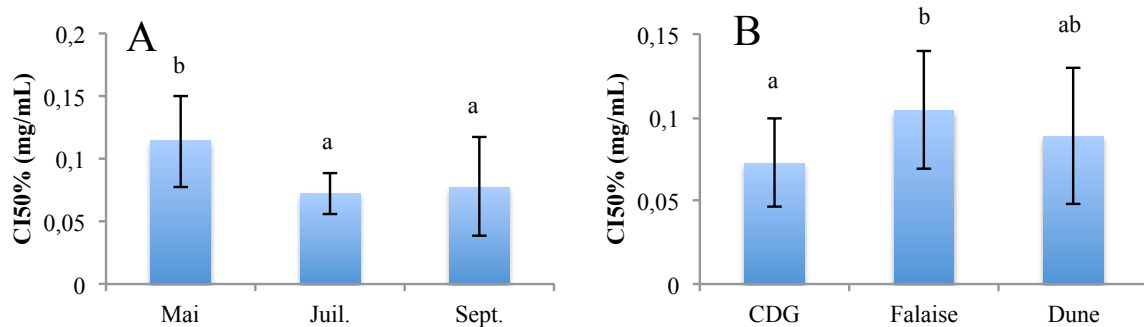


Figure 87 : Activité anti-radicalaire (DPPH) des plants de *C. maritimum*, exprimé en mg/mL. A : Activité anti-radicalaire en fonction du mois de prélèvement ; B : Activité anti-radicalaire en fonction du type de milieu.

Le type de milieu est aussi un paramètre faisant varier l'activité anti-radicalaire de la Criste. Indépendamment de la période de prélèvement, les échantillons provenant de cordons de galets présentent des activités 55% supérieures à ceux provenant des falaises (figure 87 B). En revanche, aucune différence significative n'a été trouvée entre les échantillons provenant des dunes et ceux de falaises et de cordons de galets.

Il n'a pas non plus été trouvé de différences d'activité anti-radicalaire significatives en fonction des sites d'échantillonnage (figure 88).

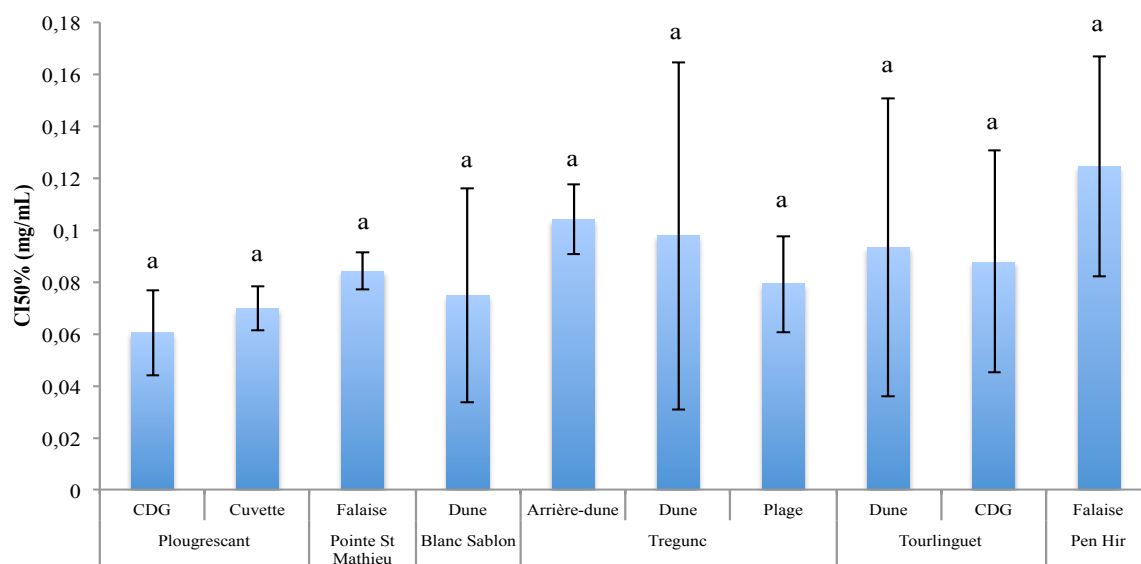


Figure 88 : Activité anti-radicalaire (DPPH) des plants de *C. maritimum* exprimée en mg/mL, en fonction des sites et milieux échantillonnés. ($P < 0,05$)

Afin d'expliquer l'activité anti-radicalaire, un dosage par RMN de l'acide chlorogénique a été réalisé. La concentration d'acide chlorogénique varie de façon significative en fonction des sites d'échantillonnage (figure 89). Les plantes provenant du Toulinguet (plage de Pen Hat) et de Trégunc contiennent moins d'acide chlorogénique que celles de Plougrescant. Quel que soit le type de milieu, cette localité est celle dont proviennent les plants les plus riches en acide chlorogénique, avec une quantité de 28 mg/g MS pour le milieu cordon de galets. Les plants échantillonnés en falaise à Pen Hir sont celles qui en renferment le moins, avec 13 mg/g MS.

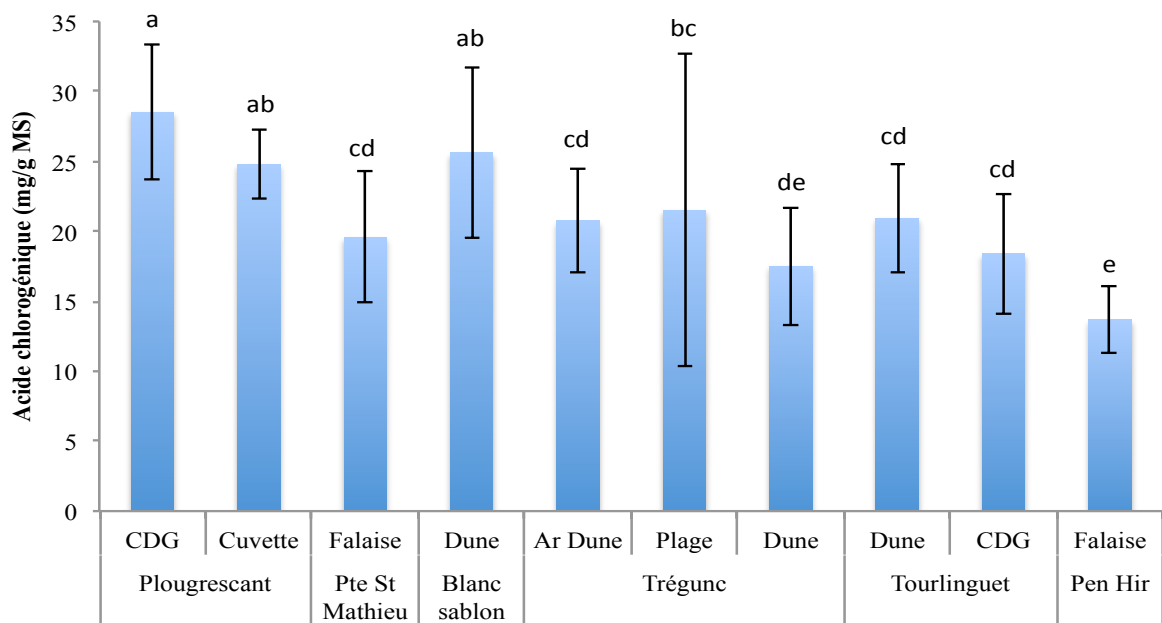


Figure 89 : Concentration d'acide chlorogénique dans les feuilles de *C. maritimum*, exprimé en mg/g de MS, en fonction du site et du milieu de prélèvement. CDG = Cordon De Galets

La concentration d'acide chlorogénique dans les tissus de la Criste n'a en revanche pas varié en fonction du mois de prélèvement, restant autour de 20 mg/g de matière sèche (figure 90).

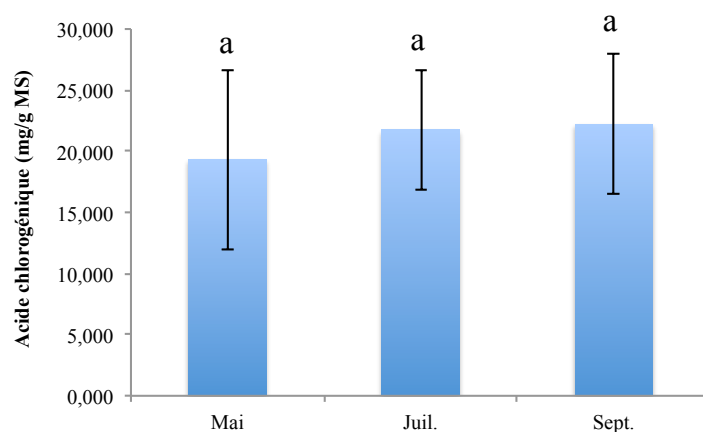


Figure 90 : Concentration d'acide chlorogénique dans les feuilles de *C. maritimum*, exprimé en mg/g de MS, en fonction du mois de prélèvement. CDG = Cordon De Galets

Les extraits de Lavande de mer ne présentent pas de variations d'activité anti-radicalaire en fonction du mois de prélèvement (figure 91). Néanmoins, une légère tendance, non significative, semble montrer une activité légèrement plus forte pendant les mois de juillet et septembre.

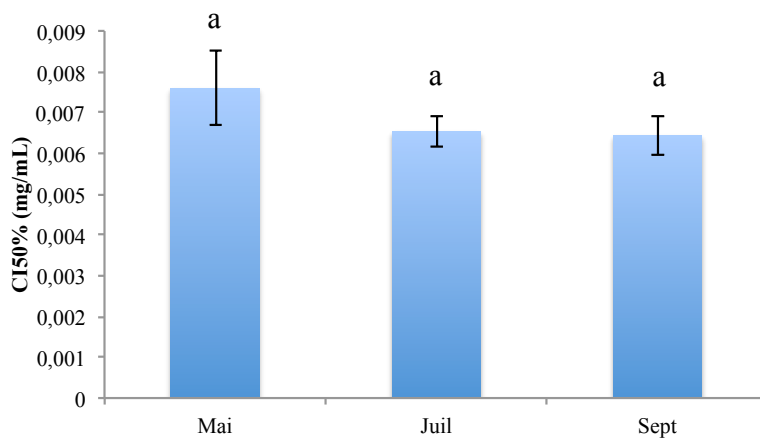


Figure 91 : Activité anti-radicalaire (DPPH) des plantes de *L. vulgare* exprimée en mg/mL, en fonction du mois de prélèvement.

Les sites de prélèvement n'ont pas non plus influé sur l'activité anti-radicalaire (figure 92). Les activités mesurées sont très fortes, avec des CI_{50} autour de $0,006 \text{ mg.mL}^{-1}$.

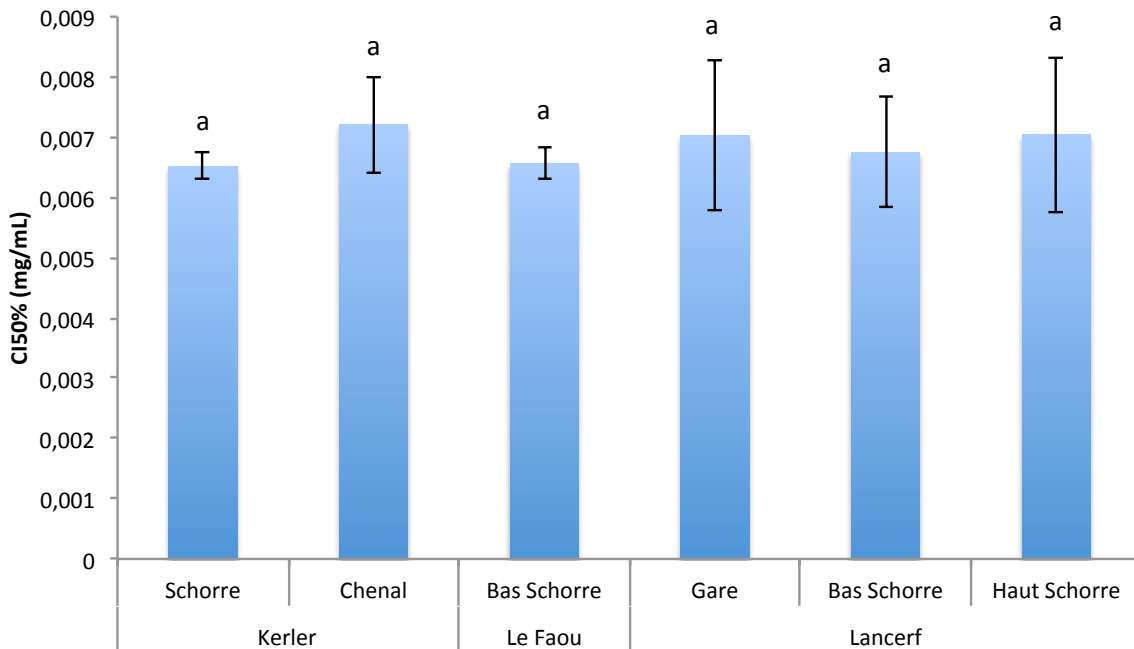


Figure 92 : Activité anti-radicalaire des plantes de *L. vulgare* en fonction des sites et milieux de prélèvement. ($P < 0,05$)

La période de prélèvement n'influe pas significativement sur l'activité anti-radicalaire de la Matricaire maritime (figure 93). De façon non significative, il semblerait cependant que l'activité baisse légèrement au mois de septembre.

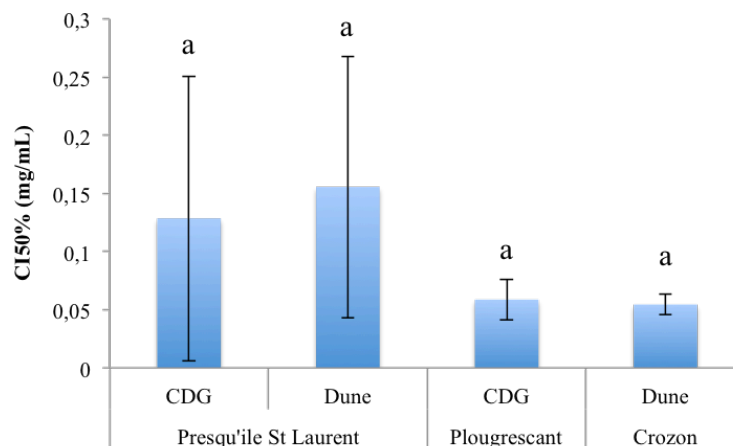


Figure 93 : Activité anti-radicalaire (DPPH) des plantes de *T. maritimum*, exprimée en mg/mL, en fonction des sites et milieux de prélèvement. ($P < 0,05$)

Il n'existe pas non plus de différence dans les activités anti-radicalaires entre les plantes prélevées sur cordon de galets et celles sur dunes, ni en fonction des sites de prélèvement (figure 94).

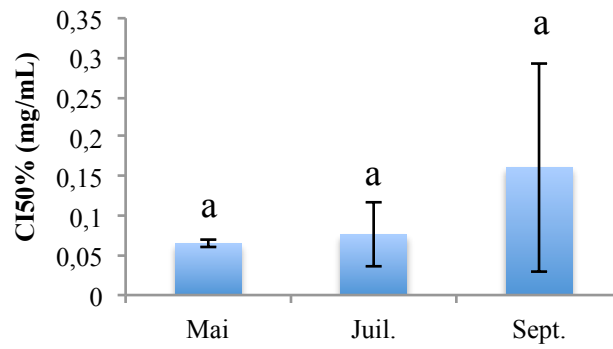


Figure 94 : Activité anti-radicalaire (DPPH) des plantes de *T. maritimum*, exprimée en mg/mL, en fonction du mois de prélèvement ($P < 0,05$)

IV. DISCUSSION

L'activité anti-radicalaire de la Lavande de mer n'est pas influencée par le mois ou les sites de prélèvement. Cependant, il a été constaté récemment dans d'autres milieux, que l'activité anti-radicalaire de *L. delicatulum* augmente quasiment de 50% entre le mois de mai et les mois de juillet et septembre (Souid *et al.*, 2018). Les activités constatées au cours de cette étude, quelles que soient les conditions, sont très fortes. Celles-ci font partie des plus fortes constatées dans le genre pour des processus d'extraction similaires, aussi importantes que celles rapportées pour les extraits méthanoliques de *L. delicatulum* ou *L. aureum* (Medini *et al.*, 2014 ; Geng *et al.*, 2015), les plus puissants observés pour ce genre à notre connaissance.

De la même façon, les extraits de Criste se sont montrés très actifs contre le radical DPPH. Dans l'ensemble, l'activité détectée est deux fois supérieure à l'activité la plus forte rapportée par Méot-Duros et Magné (2009). Cette dernière étude a montré une forte variation de l'activité anti-radicalaire entre les plantes de dunes et celles de falaises, ainsi qu'en fonction de la saison de récolte. En prenant en compte ces deux facteurs, les activités constatées sont comprises entre 0,146 mg.mL⁻¹ pour une plante sur dune en été, et 1,211 mg.mL⁻¹ pour un individu sur falaise au printemps. Ces différences sont expliquées par la quantité de composés phénoliques et notamment d'acide chlorogénique. Les quantités d'acide chlorogénique n'ont pas varié en fonction des mois, mais sont différentes selon le site de prélèvement, indépendamment du type de milieu. Cette différence peut s'expliquer par l'existence probable de plusieurs populations, qui diffèrent notamment par leur composition phytochimique. Plusieurs chémotypes ont d'ailleurs été décrits en Europe (Pateira *et al.*, 1999 ; Pavela *et al.*, 2017). Les conditions climatiques en Bretagne ont été ensoleillées entre avril et août, avec peu de précipitations entre juin et septembre. Ces conditions sont stressantes pour les plantes, et expliqueraient les fortes activités constatées.

La Matricaire maritime n'a montré aucune différence significative d'activité anti-radicalaire en fonction du mois, des sites ou des milieux de prélèvement. La composition phytochimique et les activités biologiques sont pourtant variables en fonction des saisons dans le genre proche *Matricaria* (Sharifi-Rad *et al.*, 2018) ainsi qu'en fonction de l'âge de la plante

(Mohammad *et al.*, 2010). Pour la Matricaire maritime aussi, les activités anti-radicalaires se sont révélées fortes, globalement supérieures à celles précédemment mesurées (cf p.)

Le test DPPH offre une bonne idée de l'activité anti-radicalaire mais ne permet pas de mesurer d'autres types de mécanismes d'antioxydation. De plus, les plantes disposent pour faire face au stress oxydatif d'un système enzymatique, non étudié ici. Il a par exemple été démontré que chez *L. delicatulum*, les enzymes comme la SOD sont plus impliquées dans la réaction et résistance au stress salin que les composés phénoliques (Souid *et al.*, 2016). Les tests antioxydants de type anti-radicalaire ou réducteurs ne permettraient donc pas de suivre l'évolution des défenses que certaines espèces mettent en place.

Comparativement à des expériences en conditions contrôlées, l'étude des halophytes dans leur milieu naturel permet d'être plus proche des conditions réelles. Cependant, dans ces milieux, les plantes sont soumises à plusieurs stress simultanément, et les réactions à ceux-ci peuvent s'entrecroiser. De plus, l'intensité de ces stress est irrégulière au cours d'une saison ou d'une année, rendant l'analyse de résultats difficile. Ces raisons expliquent le faible nombre d'études de ce genre comparé à celles menées en laboratoire (Gil *et al.*, 2014).

V. CONCLUSION

L'étude menée ici aura permis de mettre en avant une différence d'activité anti-radicalaire pour la Criste, en fonction de la période de récolte et du type de milieu. De plus, il semblerait que les différentes populations échantillonnées n'aient pas les mêmes capacités antioxydantes, quel que soit le type de milieu considéré. D'autres tests d'activités biologiques pourraient permettre de mettre en évidence des effets de saisonnalité et de provenance pour la Lavande de mer et la Matricaire maritime. De plus, des échantillonnages plus réguliers et sur toute l'année pourraient permettre de suivre avec plus de précision l'évolution des activités biologiques des extraits de ces plantes entre des saisons aux paramètres environnementaux très différents.

CHAPITRE IV : ORIENTATION METABOLIQUE

I. INTRODUCTION

Les plantes, notamment celles à haute valeur ajoutée utilisées dans l'industrie, ont des compositions phytochimiques pouvant être variables et complexes. La quantité et la qualité des métabolites secondaires varient en fonction du patrimoine génétique (famille, genre, espèce, cultivar...), de l'état physiologique de la plante (âge, maturité, stade de développement) ainsi que des facteurs environnementaux (Baenas *et al.*, 2014).

Parmi ces derniers, peuvent être discernés, des facteurs biotiques, résultants de l'interaction des plantes avec d'autres organismes, des facteurs abiotiques, des paramètres physiques et chimiques de l'environnement ayant un impact sur la physiologie de la plante.

Dans les environnements naturels, les stress abiotiques principaux sont la sécheresse, la salinité, la lumière, les rayons ultra-violets, les températures extrêmes, les carences et excès en nutriments, le vent et la pollution (Calatayud *et al.*, 2013), ainsi que le pH du sol et les stress dû aux ions métalliques (Jia *et al.*, 2015). Chez la majorité des espèces végétales, ces conditions environnementales vont affecter les capacités de croissance, de développement, et la synthèse des métabolites secondaires (Yang *et al.*, 2018).

Lors de la culture industrielle de plantes dont la valeur ajoutée réside spécifiquement dans leur composition phytochimique, ces conditions environnementales doivent être finement contrôlées de manière à assurer une production efficace et constante de molécules d'intérêt (Yang *et al.*, 2018).

Cependant, certaines substances d'intérêt étant synthétisés à la suite d'un stress ou même à la perception du stress, il est possible de se servir de ces mécanismes afin d'améliorer la qualité des plantes obtenues. Pour cela les éliciteurs peuvent être utilisés, dont la définition large comprend l'ensemble des substances et phénomènes physiques induisant des changements physiologiques chez les plantes. Mais les métabolites primaires et secondaires sont liés, l'allocation du carbone étant déterminée par sa disponibilité, dépendants de la lumière, du CO₂, des nutriments et des réserves (Lavola *et al.*, 2001). Il est donc nécessaire de trouver le juste milieu, entre un stress suffisamment fort pour déclencher une réaction et une synthèse de métabolites secondaires d'intérêt, qui correspond à un ajustement de l'état physiologique, mais pas plus que nécessaire pour ne pas réduire les rendements en biomasse en entraînant des conséquences irréversibles pour la croissance et le développement (Boestfleisch *et al.*, 2014 ; Schreiner *et al.*, 2012).

Beaucoup d'études se sont concentrées sur la recherche d'espèces à forts rendements, et sur l'optimisation de leurs conditions de culture, mais peu sur l'utilisation des stimulations environnementales, ou éliciteurs, pour améliorer les rendements en métabolites (Yang *et al.*, 2018).

Dans le cadre de ce projet, plusieurs stress ont été envisagés. Il a été décidé de n'appliquer ces stress qu'en fin de croissance, une fois la biomasse suffisante, de façon à ne pas entraver le développement. Sur des critères techniques et de pertinence, quatre modalités de stress ont été retenues : le stress salin, le stress lumineux, le stress UV-B et les éliciteurs chimiques.

La salinisation des sols est un des facteurs limitant majeurs des cultures. Celle-ci touche 20% des surfaces cultivées (Vicente *et al.*, 2004) et risque d'affecter une surface équivalente à moyen terme (Legros, 2009).

Au niveau de la plante, une forte présence de sels dans les sols entraîne de nombreux dysfonctionnements physiologiques. Les ions chlorure et sodium vont perturber le potentiel osmotique du sol, rendant plus difficile l'absorption d'eau. Le premier effet de la présence de sel dans les sols est donc un stress de type osmotique (Mahmood *et al.*, 2009). Ces sels, une fois absorbés par la plante, vont s'accumuler dans les tissus et induire une toxicité, entraînant des dysfonctionnements au niveau de nombreuses structures cellulaires et mécanismes physiologiques: fonction des enzymes, structure des membranes, photosynthèse (Flowers et Yeo, 1986 ; Munns & Passioura, 1984). Cette toxicité créera *in fine* des ROS, qui amplifieront les dégâts et les propageront à d'autres structures.

En réponse à ce stress, les plantes halophytes ont développé de nombreuses adaptations évoquées précédemment, dont la synthèse de composés antioxydants (voir Introduction Générale).

Chez *L. bicolor* a été observé une augmentation des composés phénoliques comme la myricétine, les tannins et les phénylpropanoïdes en réponse à une exposition au sel (Wang *et al.*, 2016) ainsi qu'une plus forte activité de la SOD, de la POD (et de la CAT (Li *et al.*, 2018). Chez *C. maritimum*, le stress salin entraîne la production de glucolipides, sulfolipides et phospholipides (Ben Hamed *et al.*, 2005), une augmentation des activité de la SOD, de la CAT et de la POD (Ben Amor *et al.*, 2005), ainsi qu'une forte augmentation de la quantité de proline, et une légère augmentation de la capacité antioxydante et des flavonoïdes (Boestfleisch et Papenbrock, 2017).

De la même façon, les enzymes antioxydantes POD et APX (ascorbate peroxidase) sont synthétisées par *T. maritimum* lors de l'exposition à des concentrations en sel modérées (Ben Hamed *et al.*, 2014).

Dans le cadre de cette étude, plusieurs concentrations de solutions salées ont été ajoutés au substrats de culture de la Lavande de mer, la Criste et *T. maritimum* afin d'améliorer les activités biologiques de leurs extraits.

La lumière est une source d'énergie indispensable à la croissance des végétaux. Elle est caractérisable par plusieurs facteurs : l'intensité (quantité), la photopériode (durée et alternance des cycles) et la qualité (longueur d'onde) (Szopa *et al.*, 2012). Le stress lumineux peut résulter de deux phénomènes : la baisse de la capacité photosynthétique à cause la chaleur ou de la sécheresse, ou l'exposition d'une espèce peu adaptée à un fort ensoleillement (Robinson, 2001). Dès lors, le nombre de photons arrivant au niveau des photosystèmes excède la capacité photosynthétique et l'excès d'énergie d'excitation génère des ROS, tout en entraînant un stress thermique et de sécheresse (Brunetti *et al.*, 2015).

Pour lutter contre ce stress, de nombreuses stratégies peuvent être mises en place. En amont des dommages biochimiques, afin de réfléchir et disperser le maximum de photons, réduire la surface foliaire et chloroplastique permet de limiter l'exposition au rayonnement. Après l'absorption des photons excédentaires, il est possible de limiter la formation des ROS par le cycle de la xanthophylle et de les neutraliser par la synthèse de composés antioxydants (Niyogi *et al.*, 1997).

Les études portant sur la modulation de la composition phytochimique par la photopériode, la quantité et la qualité de lumière sont nombreuses. Par exemple, l'augmentation des catéchines et de l'acide chlorogénique en réponse à une augmentation de la durée du jour ont été mis en évidence respectivement chez *Ipomoea batatas* et *Vaccinium myrtillus* (Carvalho *et al.*, 2010 ; Uleberg *et al.*, 2012). L'acide chlorogénique et le kaempferol sont préférentiellement synthétisés lors des fortes irradiances chez *Centella asiatica* (Alqahtani *et al.*, 2015), de même que les isoprénoïdes et les phénylpropanoïdes chez la majorité de espèces végétales (Brunetti *et al.*, 2015).

Un supplément de lumière bleue permet d'augmenter la capacité antioxydante et la teneur en flavonoïdes de *Bryophyllum pinnatum* (Nascimento *et al.*, 2015), ainsi que la quantité d'anthocyanes chez la fraise (Xu *et al.*, 2014). La lumière rouge, elle, permet de stimuler la production de glycyrrhizine chez *Gycyrrhiza uralensis* (Afreen *et al.*, 2005) et d'acide chlorogénique chez *Haplopappus gracilis* (Szopa *et al.*, 2012).

Ces différents exemples montrent que la lumière est un éliciteur de choix permettant de provoquer une grande variété de réactions par la synthèse de différents composés pouvant être d'intérêt industriel. Dans cette étude, c'est la photopériode qui a fait l'objet de tests, ce paramètre étant dans notre cas le plus facilement maîtrisable.

Un rayonnement proche de la lumière visible a fait l'objet de nombreuses études en tant qu'éliciteur de par sa haute énergie : les ultraviolets (UV). Une fraction de ce rayonnement, les UV-B, causent des dommages élevés aux protéines, à l'ADN, aux lipides membranaires, détruisent les pigments chloroplastiques et produisent un grand nombre d'espèces réactives à l'oxygène et à l'azote (Rozema *et al.*, 1997). Dans les écosystèmes naturels, ce stress n'est que très rarement rencontré, à l'exception des hautes altitudes (Hideg *et al.*, 2013). En conditions naturelles, les quantités d'UV-B reçues par les plantes ont peu d'impact connu sur la photosynthèse, la croissance et le développement (Hideg *et al.*, 2013). Face à de fortes radiations, le métabolisme d'*Arabidopsis thaliana* est redirigé vers la production de dérivés d'acides aminés aromatiques de type phenylpropanoïde. De même, les niveaux d'ascorbate et de glutathion augmentent dans un premier temps pour contenir l'oxydation. Puis ce sont les flavonoïdes et le sinapoyl-malate qui sont accumulés, les premiers étant connus pour être particulièrement antioxydants (Bernal *et al.*, 2015) tandis que le second est connu pour être photoprotecteur (Baker *et al.*, 2016 ; Kusano *et al.*, 2011).

Sakalauskaitė *et al.* (2013) ont décrit les conditions d'application permettant d'améliorer l'activité anti-radicalaire du basilic, de même qu'une amélioration des rendements en terme de biomasse grâce à une supplémentation en UV-B. Cependant, l'utilisation des UV-B pour améliorer la qualité des plantes à haute valeur ajoutée reste peu courante, du fait de la complexité des mécanismes de réaction, dépendant de l'espèce, de l'individu, de la dose et des autres paramètres environnementaux (Jansen *et al.*, 2008). Par exemple, le taux de caroténoïdes a été mesuré en augmentation (Bandurska *et al.*, 2013), en baisse (Zu *et al.*, 2010) ou en stagnation (Sakalauskaitė *et al.*, 2013) face à une stimulation aux UV-B, alors que ces composés sont reconnus comme étant protecteurs face à ce stress (Lavola *et al.*, 1997). Cependant, l'augmentation suite à une exposition aux UV-B du ratio entre les antioxydants dits « efficaces » (quercétines, luteolines glycosides,...) et les antioxydants dits « inefficaces » (kaempferol, apigenines glycosides,...) semble la réponse la plus commune (Agati et Tattini, 2010).

Dans cette étude, il a été décidé d'exposer les plantes à une forte dose d'UV-B en fin de croissance, afin d'améliorer la capacité antioxydante des extraits.

Parmi les éliciteurs, les agents biotiques et les phytohormones regroupent les métabolites présents à l'état naturel induisant après perception des changements physiologiques chez les plantes. Ces composés peuvent être endogènes, produits par la plante elle-même, ou exogènes, produit par d'autres plantes, des champignons, des bactéries ou des herbivores (Baenas *et al.*, 2014). Certains composés permettent d'agir à distance à de très faibles concentrations : ce sont les phytohormones. Parmi elles, l'éthylène, l'acide jasmonique, et l'acide salicylique sont connues pour induire l'activation de nombreuses voies de signalisation menant à la synthèse de nombreux métabolites d'intérêt (Baenas *et al.*, 2014). L'acide salicylique joue un rôle important dans la germination, la floraison, la croissance et la défense contre les agents pathogènes (Arbona *et al.*, 2013). Il semblerait que son mode d'action consiste à provoquer un *burst* d' H_2O_2 , entraînant un léger stress oxydatif qui va induire la synthèse de composés antioxydants. Ce mécanisme permet d'améliorer la résistance au stress par acclimatation (Arbona *et al.*, 2013). L'effet de l'application d'acide salicylique sur *Matricaria chamomilla* a été décrit par Dučaiová *et al.* (2013). Proportionnellement à la dose appliquée, l'acide salicylique induit une baisse de concentration d'acide chlorogénique et l'augmentation de celles de l'herniarine, de l'umbelliféronne et d'autres dérivés coumariniques. Chez *Salvia miltiorrhiza*, la réponse à l'acide salicylique se déroule en deux temps : tout d'abord, la synthèse et l'accumulation d'acide cafféique, puis d'acide salvionique (Dong *et al.*, 2010 ; Giri & Zaheer, 2016). Enfin, chez les légumineuses, l'application d'acide salicylique provoque la plupart du temps une réaction similaire à celle provoquée par une attaque pathogène : la synthèse de phytoalexines et d'isoflavonoïdes (Kundu *et al.*, 2011).

Dans cette étude, la réponse de l'activité antioxydante à l'application d'acide salicylique a été mesurée chez *L. vulgare*, *C. maritimum* et *T. maritimum*.

Afin de mesurer l'effet de ces différents éliciteurs sur les plantes, l'activité anti-radicalaire de leurs extraits a été mesurée. Le radical DPPH a été choisi pour sa facilité de mise en place, sa rapidité et sa reproductibilité. Ce test antioxydant permettra de révéler si les éliciteurs testés entraînent des modifications physiologiques.

Des vitroplants et des plantes cultivées en serre des trois espèces ont fait l'objet de tests, avec les mêmes éliciteurs quand cela était possible. Les doses d'éliciteurs ont été adaptées au modèle, les vitroplants étant plus fragiles que les plantes en serre. Les tests ont été accomplis en parallèle de manière à évaluer la pertinence du modèle *in vitro* pour la recherche

d'éliciteurs efficaces. En effet, les tests sur vitroplants nécessitent moins de surface, les plantes sont générées plus rapidement et leur production est plus aisée.

II. MATERIEL ET METHODES

A. Analyses biochimiques

Les extractions sont effectuées selon le protocole décrit précédemment (cf p.). La méthode utilisée pour mesurer la capacité anti-radicalaire des extraits contre le DPPH est celle de Chen *et al.* (1999) modifiée par Marwah *et al.* (2007), utilisée précédemment (cf p.).

B. Conditions de culture

Les conditions de culture sont, pour les expérimentations de l'année 2016, les mêmes que celles présentées dans le chapitre I (cf p.). Pour l'année 2017, il n'y a pas eu d'éclairage complémentaire, et la température de la serre n'était pas régulée, entraînant de plus grandes variations de températures.

C. Stress in vitro

1. Matériel végétal

Pour chaque espèce, l'étude a porté sur 3 clones. Pour chaque clone et par condition, les parties aériennes de 5 individus sont prélevées. Un clone sur les trois a été analysé. Les individus ont été cultivés sur milieu de routine (MS 30) pendant 2 mois, avant d'être exposés au stress. Ils ont ensuite été prélevés, congelés dans de l'azote liquide et conservés au congélateur avant d'être lyophilisés, broyés et conservés sous forme de poudre sèche en attendant l'extraction et les analyses.

2. Stress salin

Les plantes ont été soumises à un stress salin par l'ajout d'un millilitre d'une solution saline NaCl à différentes concentrations (5, 10, 20, et 35 g.L⁻¹) par tube en conditions stériles. Les plantes sont ensuite remises en culture et prélevées à la même heure après 1, 2, 3, 5 et 8 jours.

3. Stress lumineux

Les plantes ont été soumises à un stress lumineux par exposition continue à une source lumineuse, avec une ampoule au sodium à haute pression (HPS) dans un cas et des tubes

fluorescents (58W BRL/840 ; INC/830) dans l'autre. Dans les deux cas, l'intensité lumineuse est égale à $160 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$. Les plantes sont placées dans un environnement hermétique. La chaleur dégagée par les lampes est dissipée par un système d'extraction permettant de maintenir la température à $25\pm 2^\circ\text{C}$. Une surface effective de 60 cm x 60 cm avec une répartition aléatoire des plants permet de traiter 288 vitroplants (12 paniers) simultanément. Les plantes ont été prélevées à la même heure après 1, 2, 3 et 5 jours de photopériode continue.

4. *Stress UV*

Les vitroplants sont exposées à un rayonnement UV-B (Vilber T15-M) d'une intensité de $0,35 \text{ W.m}^{-2}$ dans un système d'irradiation UV (BioLink Crosslinker BLX-312), supplémenté d'un système de ventilation de façon à maintenir la température à $25^\circ\text{C}\pm 2$. L'exposition dure 10, 20 et 30 minutes et les vitroplants sont ensuite replacés sous éclairage de routine (tubes fluorescents 58W BRL/840 ; INC/830). Elles sont ensuite prélevées après 4, 6, et 8 heures.

D. Stress en serre

1. *Matériel végétal*

Pour chaque espèce, l'étude a porté sur 3 clones, chacun ayant été traité séparément. Les individus ont été cultivés 6 mois sous serre, en pots selon les conditions énoncés dans le chapitre I (cf p.). Après exposition aux stress, les parties aériennes de 3 individus par clone sont prélevées (pour la Lavande de mer, les 5 feuilles les plus jeunes et pour la Criste et la Matricaire maritime les 3 feuilles les plus jeunes). Les échantillons sont conservés dans la glace, avant d'être congelées. Après lyophilisation, elles sont broyées et conservées sous forme de poudre sèche en attendant l'extraction et les analyses.

2. *Stress salin*

Pour *L. vulgare* et *C. maritimum*, les plants sont arrosés manuellement avec une solution de NaCl à différentes concentrations (10, 20 et 30 g.L^{-1}) à raison de 200 mL par pot trois fois par semaine, pendant deux semaines. Les échantillons sont prélevés une, deux et six semaines après le premier arrosage à l'eau salée.

Pour *T. maritimum*, les plants sont arrosés 3 fois en 7 jours à raison de 200 mL par pot, avec des solutions concentrées à 15 et 30 g.L⁻¹. Les parties aériennes sont prélevées après 1, 2, 4 et 7 jours.

3. Stress lumineux

Les plants de *L. vulgare* et *T. maritimum* sont placés en photopériode continue dans une salle servant à l'acclimatation (cf p.) sous un éclairage LED (Master Son T Green Power 400 W - Phillips), avec une intensité lumineuse égale à 130 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$. Les plantes sont prélevées à la même heure après 1, 2, 4 et 7 jours de photopériode continue.

4. Stress UV

Les plantes sont exposées à un rayonnement UV-B (Vilber T40-M) d'une intensité de 0,6 W.m⁻². Les plantes sont placées dans une OptiRoom[®] hermétique à la lumière. La chaleur dégagée par les tubes fluorescents est dissipée par un système d'extraction permettant de maintenir la température à 25±2°C. La taille des tubes fluorescents permet une surface effective de 1 m² avec une répartition aléatoire des plants permet de traiter 36 plants simultanément. Les plants sont exposés pendant 30, 45 et 60 minutes puis sont prélevés 2, 4, 6 et 8 h après l'exposition. Au moment où l'intégralité du matériel était disponible (tubes fluorescents UV-B), les plants de Matricaire occupaient un volume trop important pour entrer dans l'OptiRoom[®], elles n'ont donc pas pu être intégrées à l'étude.

5. Stress acide salicylique

Une solution d'acide salicylique à 0,5 M a été pulvérisée au niveau des feuilles de *L. vulgare* et *T. maritimum*, à raison d'une fois tous les deux jours pendant 7 jours, et prélevées à la même heure après 1, 2 et 4 jours. Au moment des expérimentations, le nombre de plants de Cristes disponible n'était pas suffisant pour les inclure dans l'étude.

E. Tests statistiques.

Les variances n'étant pas homogènes et les échantillons fortement appariés, les activités ont été comparées avec le test non-paramétrique de Friedman. Pour les données *in vitro*, aucune analyse statistique a été réalisée. En effet, seulement un clone par expérimentation, a été traité

compte tenu du dispositif technique mis en œuvre et du temps imparti pour réaliser ces expériences ainsi que des priorités de l'entreprise partenaire.

III. RESULTATS

A. Orientation métabolique de *L. vulgare*

1. Stress en conditions *in vitro*

a. Stress lumineux

Il semblerait que la photopériode continue sous éclairage HPS ait un effet sur l'activité anti-radicalaire de l'extrait de *L. vulgare* (figure 95 A). L'activité semble baisser dès le premier jour, de 0,059 mg.mL⁻¹ pour être divisée par 3 à 0,222 mg.mL⁻¹ après 3 jours. Le 5^e jour, l'activité augmenterait légèrement pour arriver à une CI50% de 0,141 mg.mL⁻¹, mais reste très inférieure à celle du témoin. Sous les tubes fluorescents, la photopériode continue fait aussi chuter l'activité anti-radicalaire dès le premier jour, pour se stabiliser autour de 0,12 mg.mL⁻¹ jusqu'au 5^e jour (figure 95 B).

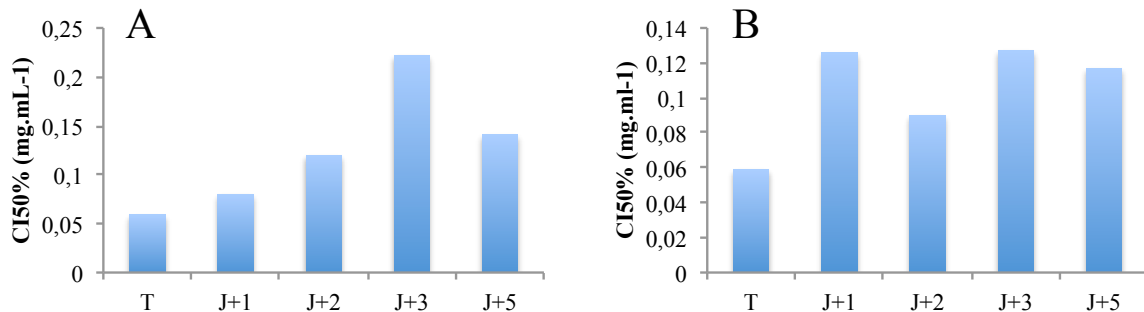


Figure 95 : Activité anti-radicalaire (DPPH) exprimée en CI50% (mg.mL⁻¹), d'extraits de vitroplants de *L. vulgare* exposées à une photopériode continue, en jours. A: Eclairage HPS; B: Eclairage tubes fluorescents. (n = 5)

b. Stress salin

L'ajout d'une solution salée au milieu de culture a eu un effet sur l'activité anti-radicalaire des extraits de *L. vulgare* à toutes les concentrations testées (figure 96). A 5 g.L^{-1} , l'activité est divisée par trois dès le premier jour puis reste stable jusqu'au 3^e jour, avant de baisser encore de 60% (figure 96 A). Après 8 jours de culture, l'extrait de *L. vulgare* est en revanche très actif, avec une activité trois fois supérieure à celle observée en conditions témoin avec une CI50% de $0,018 \text{ mg.mL}^{-1}$. A 10 g.L^{-1} , l'activité est légèrement améliorée par rapport à la

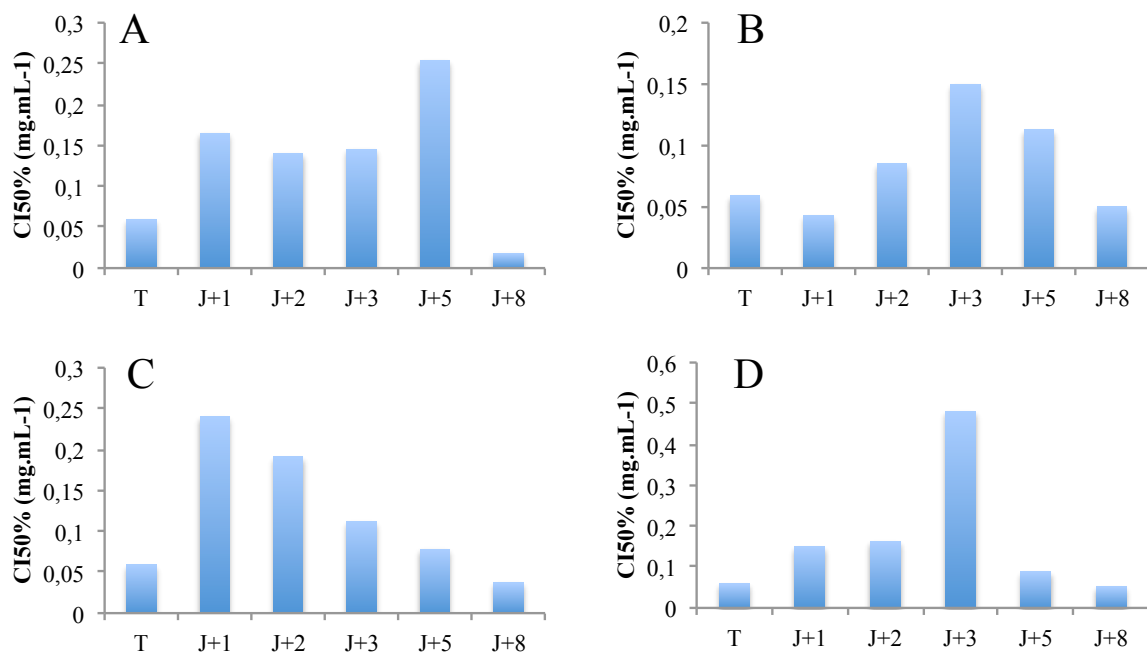


Figure 96 : Activité anti-radicalaire (DPPH) exprimée en CI50% (mg.mL^{-1}), d'extraits de vitroplants de *L. vulgare* exposés à un stress salin, en jours. A: 5g/L ; B: 10g/L ; C: 20g/L ; D: 35g/L . (n = 5)

condition témoin au premier jour, puis l'activité baisse jusqu'au 3^e jour pour être divisée environ par 3 (figure 96 B). Puis l'activité revient progressivement au niveau du témoin au 8^e jour. A 20 g.L^{-1} , l'activité anti-radicalaire chute lourdement dès le premier jour, en étant divisée par 4 (figure 96 C). Puis dès le 2^e jour, l'activité revient progressivement à son niveau de départ, pour être supérieure de 60% à celle du témoin le 8^e jour. A 35 g.L^{-1} , l'activité est divisée par 3 dès le premier jour jusqu'au second (figure 96 D). Le troisième jour, l'activité chute, divisée par 8, avant de revenir au niveau de celui du témoin après 5 jours, jusqu'au 8^e.

c. Stress UV

L'exposition aux UV-B a eu une influence sur l'activité anti-radicalaire des extraits de *L. vulgare* (figure 97). Suite à une exposition de 10 minutes aux UV-B, l'activité anti-radicalaire baisse de moitié après 4 heures, puis revient progressivement au niveau du témoin pour y être égal 8 heures après exposition. Pour 20 minutes d'exposition, l'activité de l'extrait baisse de 25% après 4 heures, est divisée par deux après 6 heures, et enfin est très faible après 8 heures. Après 30 minutes d'exposition, l'activité est 2,5 fois plus faible après 4 heures et 6 heures, puis augmente à 8 heures pour être 25% inférieure à celle du témoin.

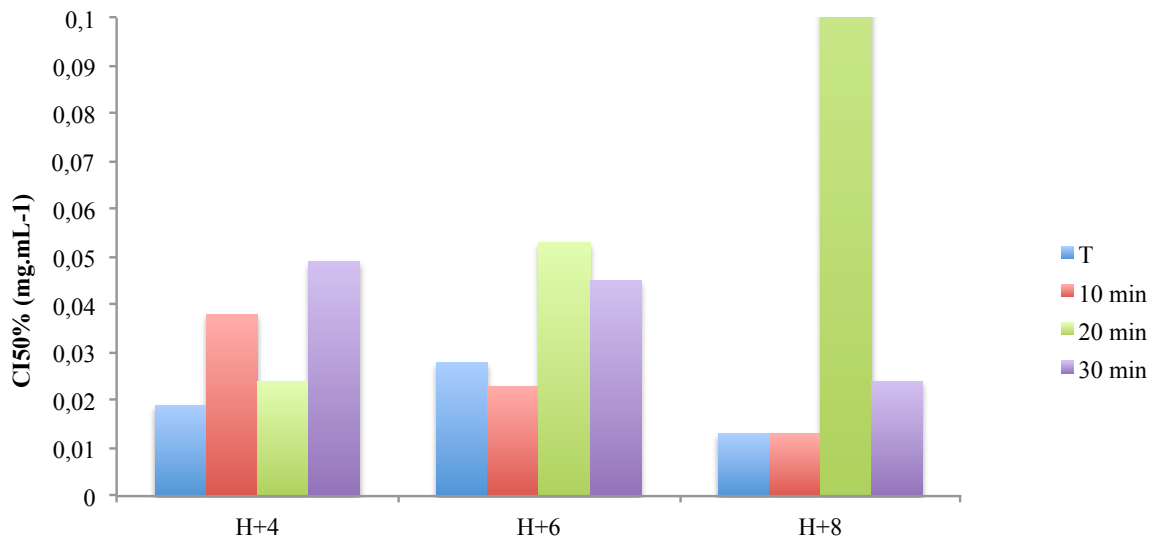


Figure 97 : Activité anti-radicalaire (DPPH) exprimée en CI50% (mg.mL⁻¹), de vitroplants de *L. vulgare* après différentes durées d'exposition (10, 20, 30 minutes) aux UV-B après 4, 6 et 8h. (n = 5)

2. Stress en serre

a. Stress Lumineux

La photopériode continue sous LED a eu un impact sur l'activité anti-radicalaire de *L. vulgare* (figure 97). Les 4 premiers jours, l'activité se maintient au niveau du témoin, autour de 0,006 mg.mL⁻¹. Au 7^e jour, l'activité est en forte chute, avec une CI50% 3 fois supérieure à celle du témoin.

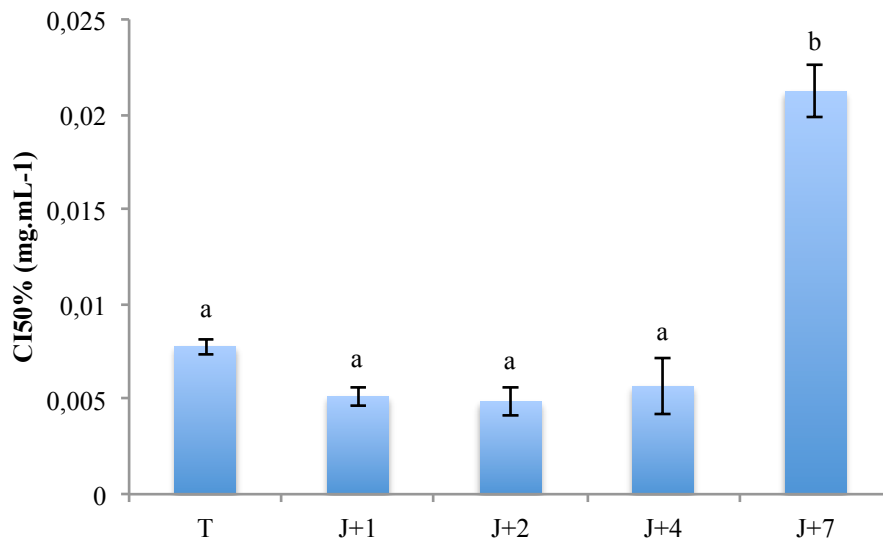


Figure 97 : Activité anti-radicalaire (DPPH) exprimée en CI50% (mg.mL⁻¹), de plants de *L. vulgare* cultivés en serre exposés à une photopériode continue, en jours. (n = 9)

b. Stress salin

L'arrosage des plantes avec une solution saline n'aura pas permis de faire varier l'activité des extraits des plants cultivés en serre de *L. vulgare* (figure 98). Les solutions de NaCl à 10 g.L⁻¹ (figure 98 A), 20 g.L⁻¹ (figure 98 B) et 30 g.L⁻¹ (figure 98 C) n'ont pas permis de faire varier l'activité anti-radicalaire de la Lavande de mer après une, deux et six semaines.

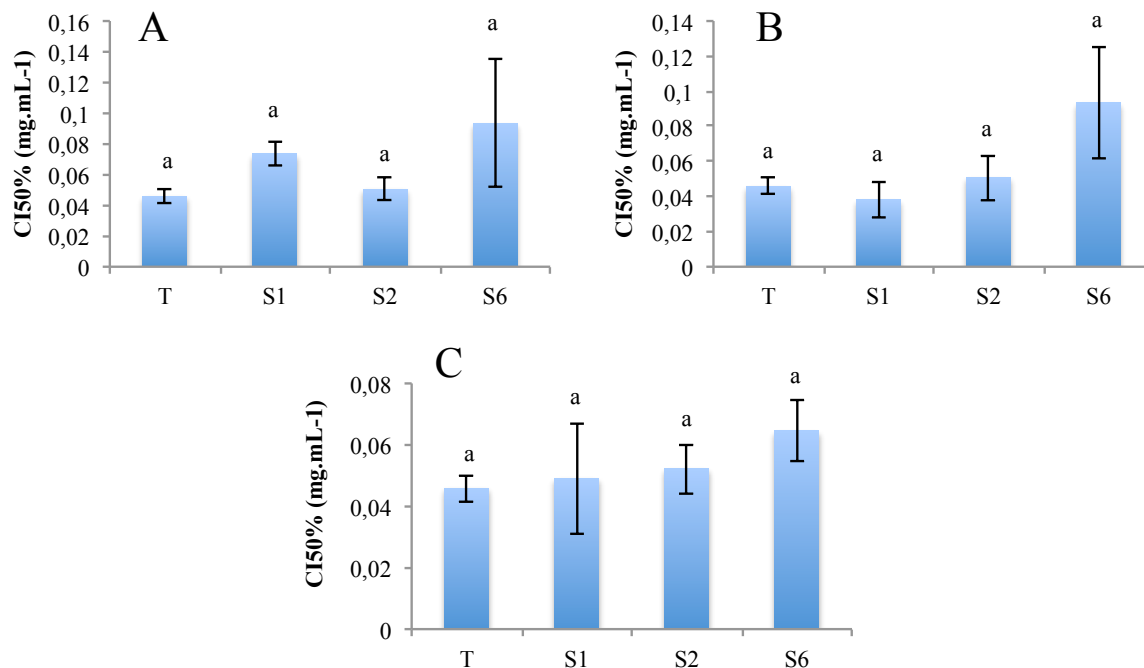


Figure 98 : Activité anti-radicalaire (DPPH) exprimée en CI50% (mg.mL⁻¹), de plants cultivés en serre de *L. vulgare* après arrosage avec une solution saline. A: 10g/L ; B: 20g/L ; C: 35g/L. (n = 9)

c. Stress UV-B (juillet 2017)

L'activité anti-radicalaire des extraits de *L. vulgare* après exposition aux UV est présentée en figure 99. Après 30, 45 ou 60 minutes d'exposition (figure 99), l'activité anti-radicalaire de la Lavande de mer ne varie pas significativement les 8 heures suivant l'exposition.

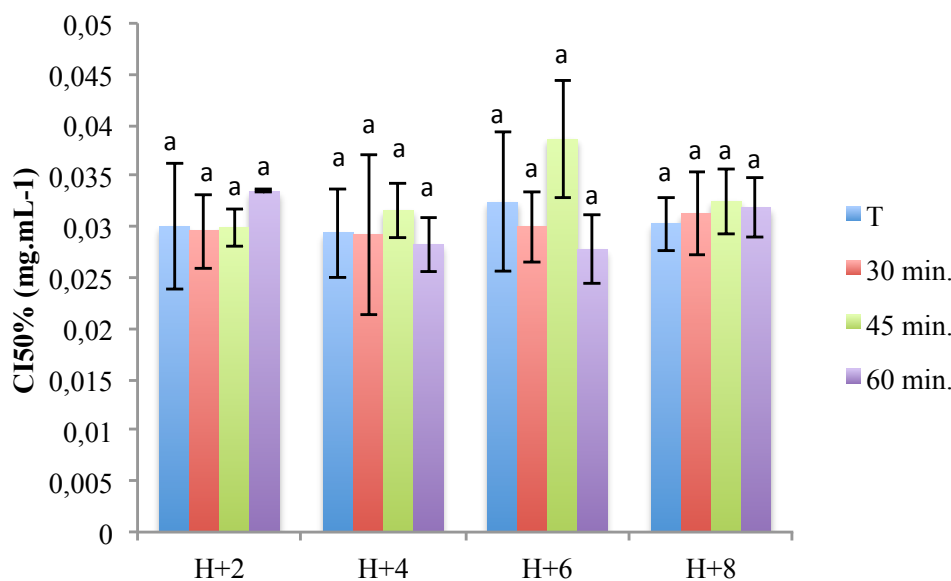


Figure 99 : Activité anti-radicalaire (DPPH) exprimée en CI50% (mg.mL⁻¹), d'extraits de plants de *L. vulgare* 4, 6 et 8h après exposition à différentes durées d'UV-B (30, 45 et 60 minutes) (n = 9).

d. Stress Acide salicylique (juillet 2016)

La pulvérisation d'acide salicylique sur les parties aériennes de *L. vulgare* n'a pas eu d'effet visible sur l'activité anti-radicalaire les 4 premiers jours (figure 100).

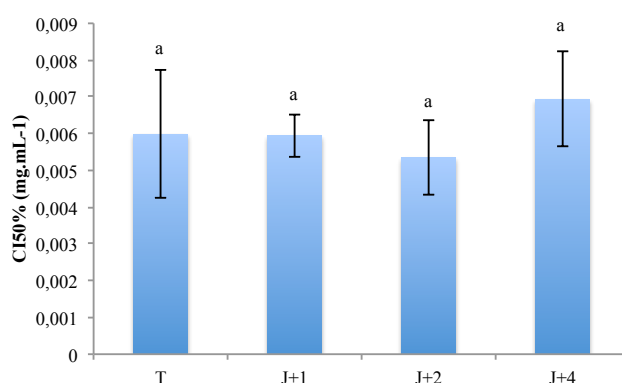


Figure 100 : Activité anti-radicalaire (DPPH) exprimée en CI50% (mg.mL⁻¹) des extraits de plants de *L. vulgare* après des pulvérisations foliaires d'acide salicylique. (n = 9)

B. Optimisation métabolique de *C. maritimum*

1. Stress en conditions *in vitro*

a. Stress lumineux

La photopériode continue sous HPS a un impact sur l'activité anti-radicalaire des extraits de *C. maritimum* (figure 101 A). L'activité est légèrement plus forte le premier jour, puis est divisée par 5 au 3^e jour, avant de revenir au niveau du témoin au 5^e jour, autour de 0,4 mg.mL⁻¹. Sous un éclairage de tubes fluorescents, l'activité se maintient au niveau de celle du témoin pendant les 2 premiers jours, autour de 0,4 mg.mL⁻¹ (figure 101 B). A partir du 3^e jour, l'activité est divisée par 2 par rapport au témoin puis par 5 le 5^e jour.

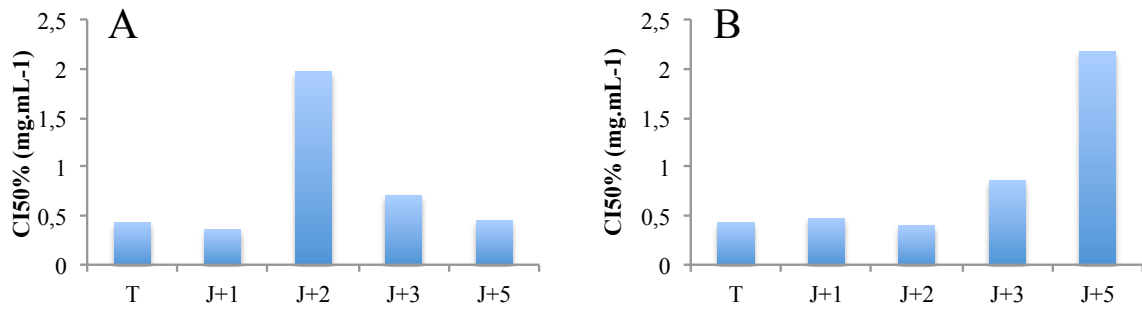


Figure 101 : Activité anti-radicalaire (DPPH) exprimée en CI50% (mg.mL^{-1}), d'extraits de vitroplants de *C. maritimum* exposés à une photopériode continue, en jours. A: Eclairage HPS; B: Eclairage tubes fluorescents ($n = 5$).

b. Stress salin

L'ajout d'eau salée dans le milieu de *C. maritimum* a eu un impact sur l'activité anti-radicalaire des extraits (figure 102). A 5 g.L^{-1} , l'activité anti-radicalaire est divisée par deux les deux premiers jours, puis se maintient au delà de 1 mg.mL^{-1} (figure 102 A). Avec une concentration à 10 g.L^{-1} , l'activité de l'extrait chute et est supérieure à 1 mg.mL^{-1} les trois premiers jours, puis augmente le 5^e jour pour être 20% supérieure à celle du témoin (figure 102 B). Au 8^e jour, l'extrait ne présente quasiment plus d'activité, avec un CI50% à $3,7 \text{ mg.mL}^{-1}$. Avec une solution à 20 g.L^{-1} , l'activité anti-radicalaire est maintenue au même niveau le premier jour, puis elle baisse à partir du second au delà de 1 mg.mL^{-1} jusqu'au 8^e

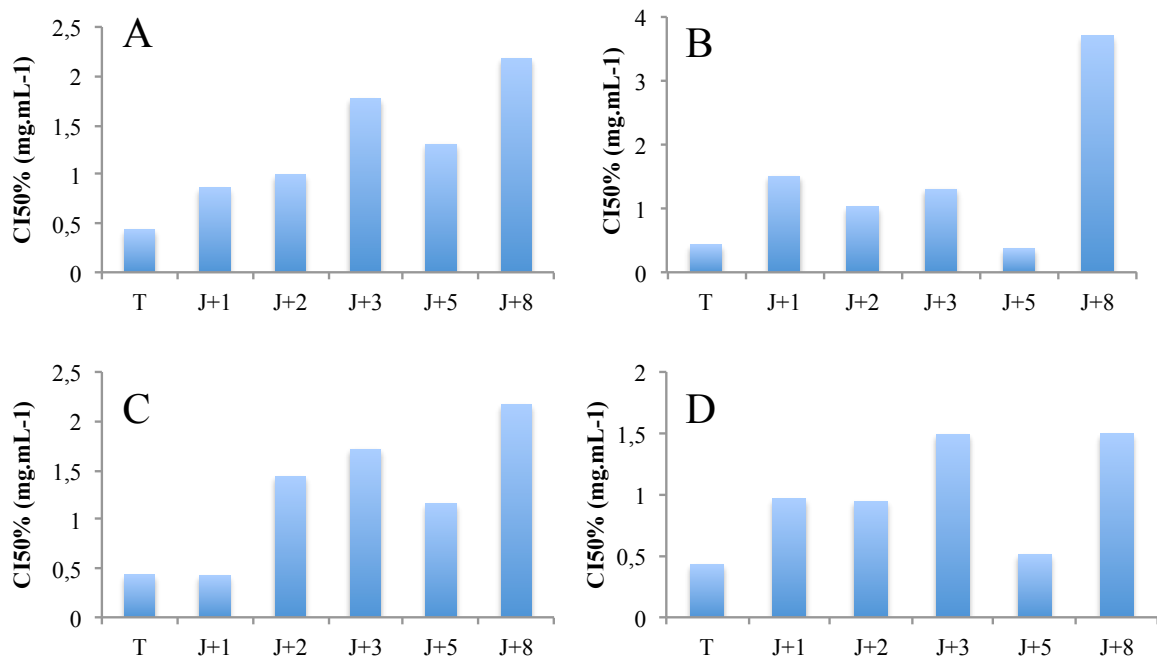


Figure 102 : Activité anti-radicalaire (DPPH) exprimée en CI50% (mg.mL^{-1}), d'extraits de vitroplants de *C. maritimum* exposés à un stress salin, en jours. A: 5 g.L^{-1} ; B: 10 g.L^{-1} ; C: 20 g.L^{-1} ; D: 35 g.L^{-1} ($n = 5$).

jour (figure 102 C). A 35 g.L⁻¹, l'activité anti-radicalaire chute jusqu'au troisième jour pour arriver à 1,5 mg.mL⁻¹, puis augmente jusqu'au 5^e jour pour revenir au niveau du témoin (figure 9D). A 8 jours, l'activité de l'extrait chute de nouveau à une CI50% de 1,5 mg.mL⁻¹.

c. Stress UV

Il semblerait que l'exposition aux UV-B a eu une influence sur l'activité anti-radicalaire des extraits, de même que l'heure de prélèvement (figure 103). Suite à 10 minutes d'exposition, l'activité semble être beaucoup plus forte que celle du témoin, avec une multiplication par 10. Cependant dès la 6^e heure, l'activité chute pour être 2,5 fois moins active que celle du témoin, avant de retrouver le niveau de ce dernier 8 heures après l'exposition. Après 20 minutes d'exposition, une cinétique comparable mais plus amplifiée est visible : l'activité après 4 heures est multipliée par 25, puis chute pour être divisée par 4,7 après 6h, pour revenir à un niveau proche d'activité du témoin. L'exposition à 30 minutes d'UV-B a vraisemblablement permis d'améliorer l'activité sur toute la période mesurée. A 4 heures, l'activité est deux fois plus active que celle du témoin, puis se maintient approximativement autour de 0,25 mg.mL⁻¹ jusqu'à 8 heures après l'exposition.

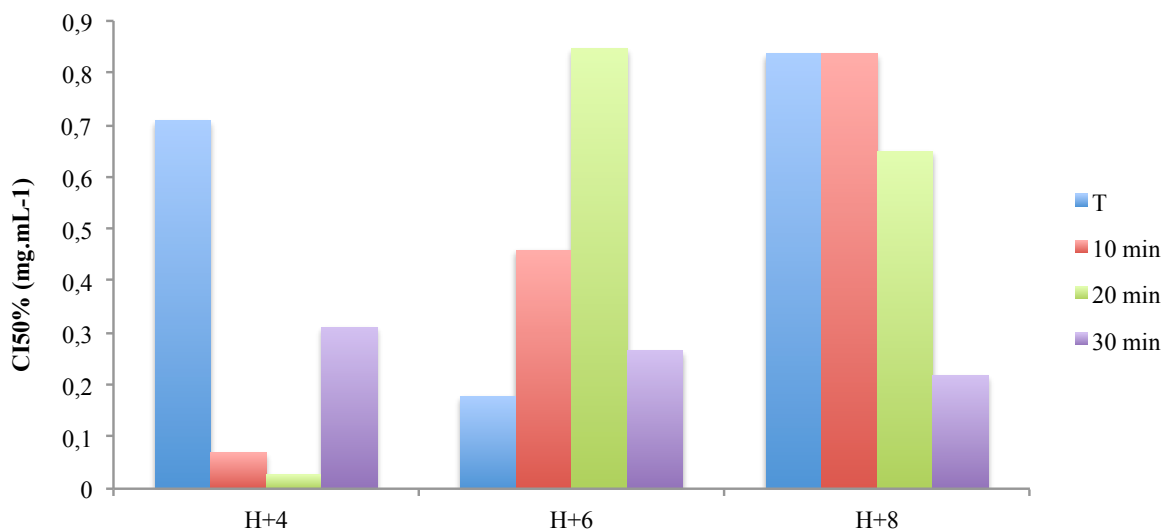


Figure 103 : Activité anti-radicalaire (DPPH) exprimée en CI50% (mg.mL⁻¹), de plants Effet de différentes durées d'exposition (10, 20, 30 minutes) aux UV-B après 4, 6 et 8h sur l'activité anti-radicalaire (DPPH) des extraits de vitroplants de *C. maritimum* (n = 5).

2. Stress en serre

a. Stress salin (juillet 2017)

L'arrosage des plants de *C. maritimum* avec une eau salée n'a pas eu d'impact sur leur activité anti-radicalaire (figure 104). Avec l'utilisation d'une solution à 10 g.L⁻¹ (figure 104 A), 20 g.L⁻¹, (figure 104 B) et 30 g.L⁻¹, l'activité anti-radicalaire après une, deux et six

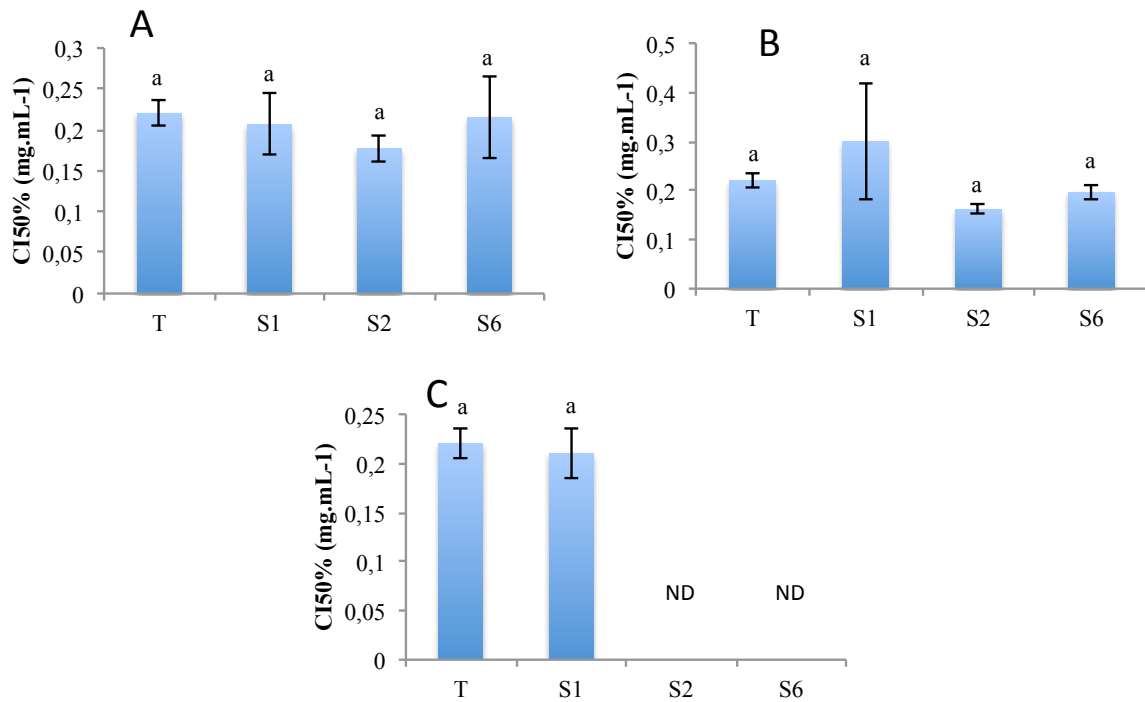


Figure 104 : Activité anti-radicalaire (DPPH) exprimée en CI50% (mg.mL⁻¹), de plants cultivés en serre de *C. maritimum* après arrosage avec une solution saline, en semaines. A: 10 g.L⁻¹ ; B: 20 g.L⁻¹ ; C: 35 g.L⁻¹ (n = 9).

semaines ne varie pas (figure 104 C), mais les plantes meurent après pour la condition la plus concentrée en sel. Une intense chlorose est visible dès la fin de la première semaine, et les plantes sont toutes mortes avant la fin de la deuxième semaine.

b. Stress UV (juillet 2017)

Dans les conditions testées, 30, 45 et 60 minutes d'UV-B n'ont pas eu d'effet significatif sur l'activité anti-radicalaire de *C. maritimum* contre le DPPH jusqu'à 8 heures après l'exposition (figure 105).

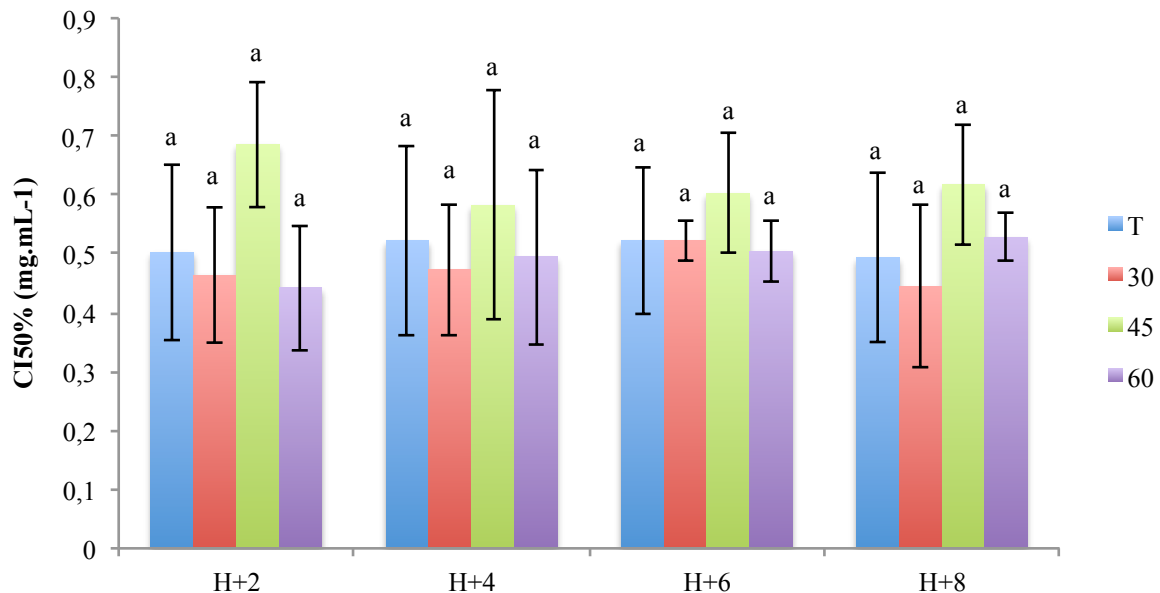


Figure 105 : Activité anti-radicalaire (DPPH) exprimée en CI50% (mg.mL⁻¹), d'extraits de plants de *C. maritimum* 4, 6 et 8h après exposition à différentes durées d'UV-B (30, 45 et 60 minutes) (n = 9).

C. Optimisation métabolique de *T. maritimum*

1. Stress en conditions in vitro

a. Stress lumineux

L'exposition à une photopériode continue semble avoir une influence sur l'activité anti-radicalaire de *T. maritimum* (figure 106). Avec un éclairage HPS, l'activité est légèrement plus élevée, d'approximativement 15% les deux premiers jours, avant de chuter le troisième jour à une CI50% deux fois supérieure (figure 106 A). Le cinquième jour, l'activité est beaucoup plus forte, 2,4 fois plus élevée que celle du témoin. Avec un éclairage à base de tubes fluorescents, l'activité se maintient au niveau de celle du témoin les deux premiers jours, avant d'augmenter de 25% le 3^e jour (figure 106 B). Au cinquième jour, l'activité chute de 36%.

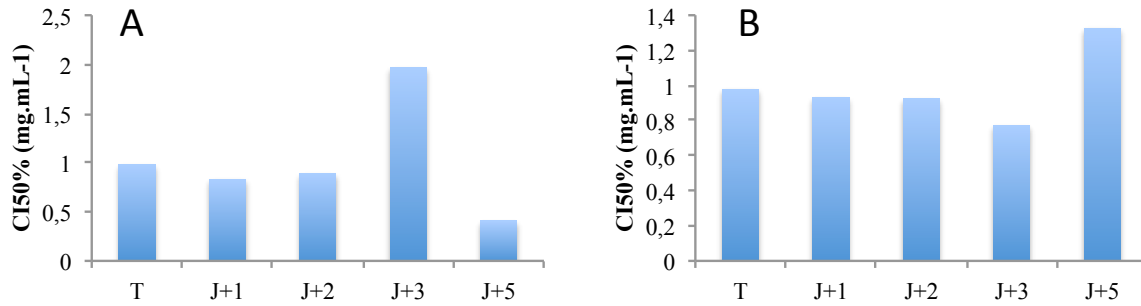


Figure 106 : Activité anti-radicalaire (DPPH) exprimée en CI50% (mg.mL⁻¹), d'extraits de vitroplants de *T. maritimum* exposés à une photopériode continue, en jours. A: Eclairage HPS; B: Eclairage tubes fluorescents (n = 5)

b. Stress salin

L'ajout de NaCl dans le milieu de culture de vitroplants de *T. maritimum* a un effet sur l'activité anti-radicalaire des extraits (figure 107). Avec une solution à 5 g.L⁻¹, l'activité anti-radicalaire est très fortement améliorée dès le premier jour, avec une multiplication par 6 de la CI50%, puis chute les deux et troisième jour pour une activité 2 fois moins forte (figure 107 A). A partir du 5^e jour et jusqu'au 8^e jour, l'activité anti-radicalaire est améliorée, avec une CI50% multipliée par deux. A 10 g.L⁻¹, l'activité semble osciller avec une forte baisse de 60% le premier jour, puis une augmentation de 20% le second jour, avant de baisser à nouveau de 60% le troisième jour (figure 107 B). Les 5^e et 8^e jours, l'activité est respectivement de 150 et

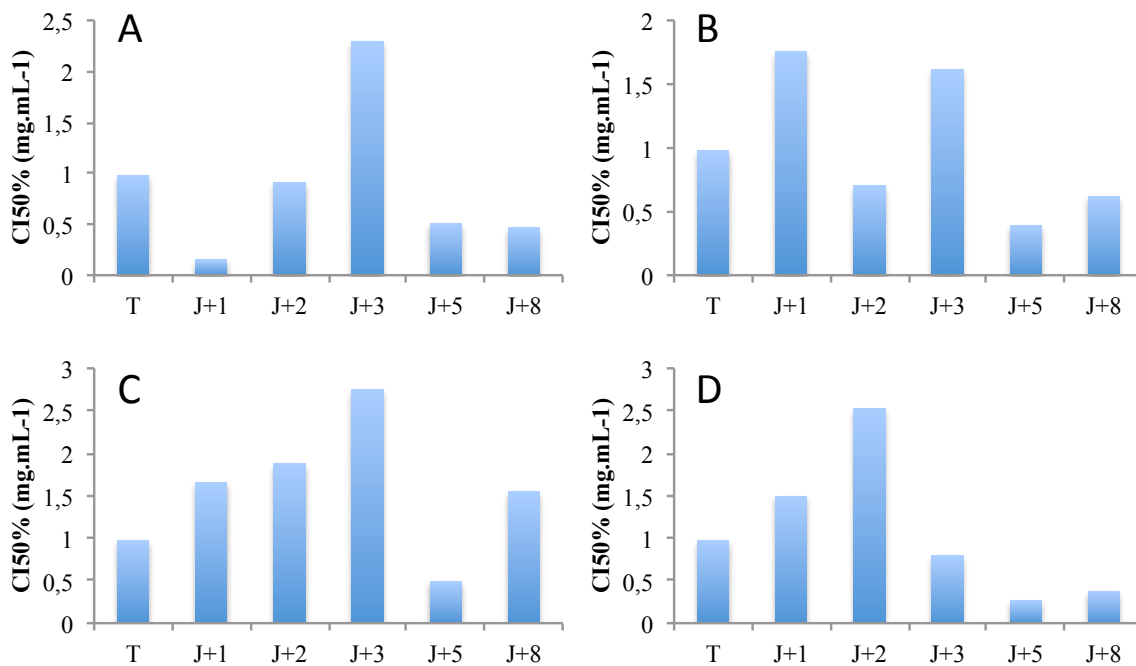


Figure 107 : Activité anti-radicalaire (DPPH) exprimée en CI50% (mg.mL⁻¹), d'extraits de vitroplants de *T. maritimum* exposés à un stress salin, en jours. A: 5g/L ; B: 10g/L ; C: 20g/L; D: 35g/L (n = 5).

de 60% supérieure à celle du témoin. A 20 g.L⁻¹, l'activité semble baisser graduellement jusqu'au 3^e jour, jusqu'au tiers de l'activité du témoin (figure 107 C). Puis l'activité semble très fortement augmenter au 5^e jour, avec une CI50% deux fois inférieure à celle du témoin, avant de chuter de nouveau de 30% au 8^e jour. A 30 g.L⁻¹, une cinétique comparable est observable : l'activité semble baisser progressivement jusqu'à être 2,5 fois inférieure au 2^e jour, avant de d'augmenter jusqu'au 5^e jour, où l'activité est multipliée par 4 par rapport au témoin (figure 107 D). Cette activité reste forte jusqu'au 8^e jour.

c. Stress UV

L'exposition des vitroplants aux UV-B a fait varier l'activité anti-radicalaire (figure 108). Pour une exposition de 10 minutes, l'activité est augmentée de 50% après 4 heures et est multipliée par 2,7 après 6 heures, pour revenir au même niveau que celle du témoin après 8 heures. Après 20 minutes d'exposition, l'activité anti-radicalaire est multipliée par 2,7 4 heures après l'exposition, puis chute 6 heures après avec une activité 2,4 fois moins importante. Enfin, 8 heures après l'exposition, l'activité est de nouveau plus forte que celle du témoin, d'environ 50%. Les 30 minutes d'application aux UV-B ont fait baisser l'activité, qui revient au niveau du témoin 8 heures après l'exposition.

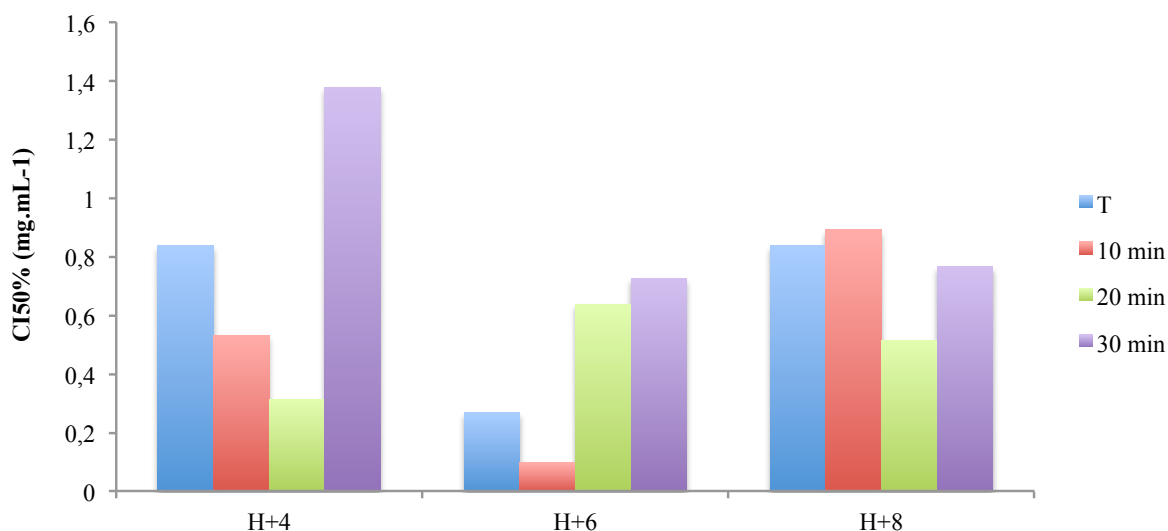


Figure 108 : Activité anti-radicalaire (DPPH) exprimée en CI50% (mg.mL⁻¹), de plants Effet de différentes durées d'exposition (10, 20, 30 minutes) aux UV-B après 4, 6 et 8h sur l'activité anti-radicalaire (DPPH) des extraits de vitroplants de *T. maritimum* (n = 5).

2. Stress en serre

a. Stress lumineux (juillet 2017)

La photopériode continue sous LED n'a pas eu un impact sur l'activité antioxydante chez *T. maritimum* (figure 109). Les deux premiers jours, l'activité est légèrement plus faible que celle du témoin, avant de revenir à son niveau à partir du 4^e jour et jusqu'au 7^e jour.

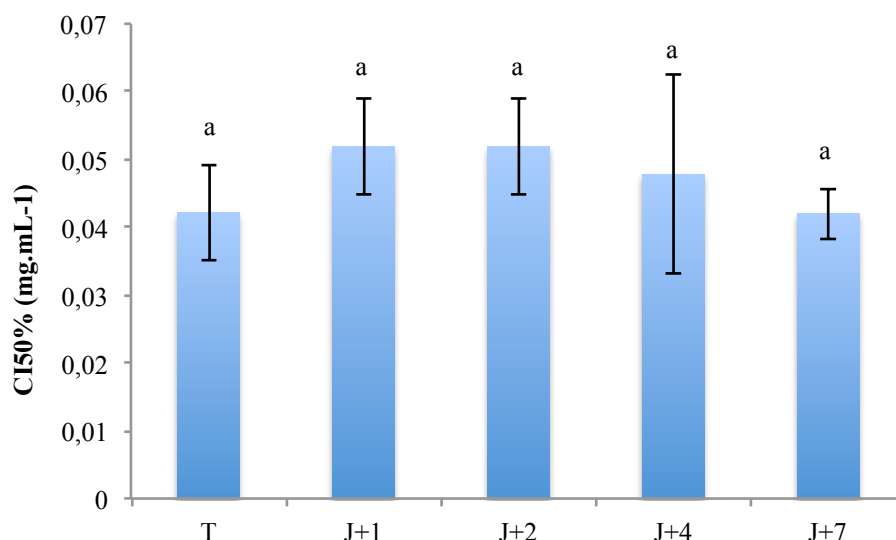


Figure 109 : Activité anti-radicalaire (DPPH) exprimée en CI50% (mg.mL⁻¹), de plants de *T. maritimum* cultivés en serre exposés à une photopériode continue, en jours (n = 9).

b. Stress salin (juillet 2016)

L'arrosage des plants de *T. maritimum* avec une solution de NaCl n'a pas eu d'impact sur leur activité anti-radicalaire (figure 17). Avec une solution à 15 g.L⁻¹(figure 110 A) ou 30 g.L⁻¹ (figure 110 B), l'activité anti-radicalaire ne varie pas pendant les 7 premiers jours de traitement.

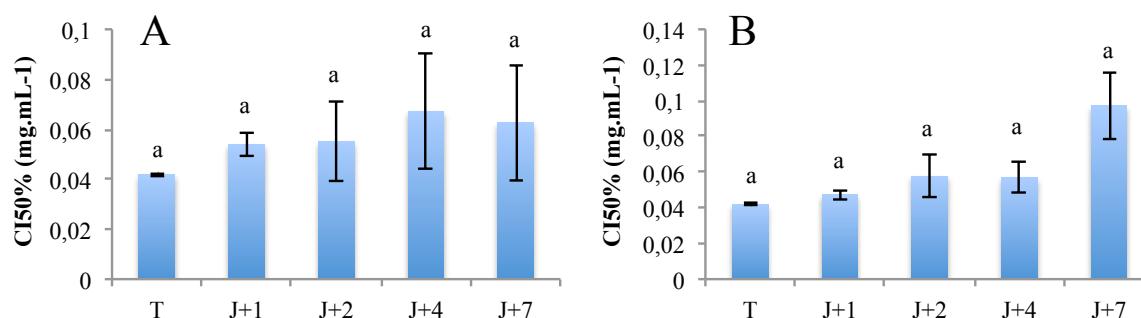


Figure 110 : Activité anti-radicalaire (DPPH) exprimée en CI50% (mg.mL⁻¹), de plants cultivés en serre de *T. maritimum* après arrosage avec une solution saline, en jours. . A: 15g/L ; B: 30g/L (n = 9).

c. Stress acide salicylique (juillet 2016)

Les pulvérisations d'acide salicylique sur les plants de *T. maritimum* n'ont pas eu d'effet significatif sur l'activité anti-radicalaire des extraits les 4 premiers jours de traitement (figure 111).

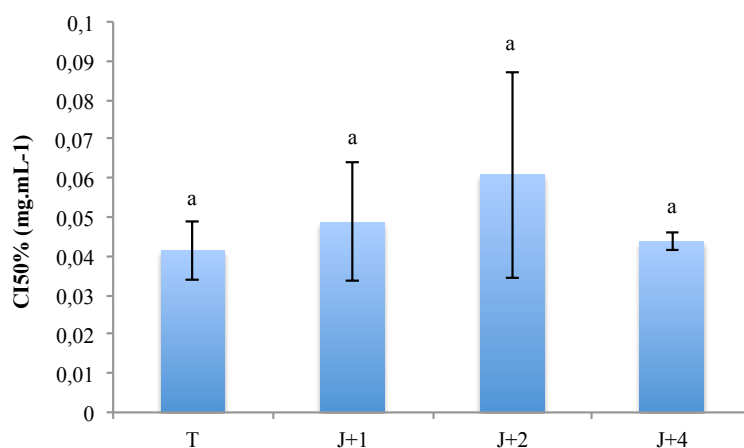


Figure 111 : Activité anti-radicalaire (DPPH) exprimée en CI50% (mg.mL⁻¹) des extraits de plants de *T. maritimum* après des pulvérisations foliaires d'acide salicylique (n = 9).

IV. DISCUSSION

Les expériences d'orientation métabolique pour la Matricaire et le Statice commun se sont déroulées sur deux années : une première partie en juillet 2016, puis une seconde en juillet 2017. Les conditions de culture expérimentées en 2016 ont entraîné la production d'une biomasse très active pour ces deux espèces, excédant largement l'activité anti-radicalaire communément trouvée pour ces espèces dans leur milieu naturel. Pour la Matricaire, l'activité anti-radicalaire était globalement deux fois supérieure sous serres en 2016 qu'en milieu naturel en 2017. Pour la Lavande de mer, l'activité constatée en serre était équivalente à celle constatée en milieu naturel en 2017 (cf p143), qui était déjà très forte. En revanche pour la même année 2017, l'activité anti-radicalaire de la Criste en serre s'est révélée environ 2,5 fois moins forte que celle des individus provenant des milieux naturels (cf p140).

La récolte 2016 a donc produit un extrait de Matricaire maritime aussi actif que celui du romarin, tandis que l'extrait de Lavande de mer est quasiment aussi actif que le BHT et le resveratrol.

Pendant le mois de juillet 2016 la durée d'ensoleillement fut de 170,4 heures (source : Météo-France). C'est bien plus qu'au mois précédent, en juin, où l'ensoleillement fut estimé par Météo France à 83,8 heures. Ce contraste et cet apport soudain d'ensoleillement a probablement induit un stress chez les plantes. À l'inverse en 2017, l'ensoleillement a été fort en juin avec 178 heures d'ensoleillement contre 139,9 heures en juillet. Les fortes intensités lumineuses sont connues pour influencer sur leur composition chimique en induisant la synthèse de composés phénoliques et d'autres métabolites secondaires (Yang *et al.*, 2018).

De plus, pendant la culture de l'année 2016, les plantes ont reçu un complément de lumière avec un éclairage artificiel à base de LEDs, afin d'assurer une longue photopériode (14h) ainsi que de fournir une source d'énergie même lors des jours couverts. Les LEDs horticoles peuvent augmenter la synthèse entre autres de composés phénoliques, même avec une photopériode normale. Ainsi les LEDs horticoles sont connues pour améliorer la qualité de nombreuses espèces à métabolites d'intérêts (Hasan *et al.*, 2017).

En conditions de culture *in vitro* et pour les trois espèces, l'activité du témoin varie au cours de la journée : du simple au double pour la Lavande de mer, jusqu'au quintuple pour la Criste. Il est donc possible qu'un rythme (circadien) fasse varier l'activité antioxydante, ce qui expliquerait les différences observées. Cet aspect n'a pas été particulièrement exploré, sauf chez *A. thaliana* et de quelques cultivars du genre *Brassica*. Les premiers résultats indiquent qu'il existe un rythme endogène faisant varier l'activité antioxydante par la modification de la composition en polyphénols (Soengas *et al.*, 2018). Cette observation corrobore les nombreux travaux concernant l'influence des cycles circadiens sur la synthèse des flavonoïdes (Brunetti *et al.*, 2015). De plus, selon le moment de la journée, les plantes ne réagissent pas de la même façon aux stress (Guadagno *et al.*, 2018). Avoir des informations à propos de la variation globale de l'activité antioxydante des plantes au cours de la journée permettrait d'optimiser la teneur en composés d'intérêt présents dans les extraits. Ce phénomène n'a cependant pas été observé chez les plantes récoltées en serre. Les plages horaires de prélèvement n'étaient pas les mêmes que pour les plantes *in vitro*, il est donc difficile de comparer les deux conditions. L'investigation de ce phénomène chez les plantes cultivées en serres est donc nécessaire.

La grande variabilité observée dans les expériences peut être due aux différences de capacité anti-radicalaire entre les clones. Il sera nécessaire à l'avenir de sélectionner les clones les plus intéressants, selon la fonctionnalité à laquelle les extraits sont destinés (antioxydant, anti-âge, etc).

Le stress salin sur les vitroplants de la Lavande de mer a permis d'améliorer l'activité anti-radicalaire des extraits. Cette augmentation, jusqu'à 60% de l'activité du témoin, n'a pas été reproduite sur des plants cultivés en serre dans les conditions testées.

L'augmentation de la quantité de myricétine et de tannins chez *L. bicolor* (Wang *et al.*, 2016) et l'augmentation de celle de l'ascorbate chez *L. stocksii* (Hameed *et al.*, 2015) en réponse au stress salin ont été constatés précédemment. Comme ici, le stress salin apporté a été ponctuel et modéré. Ces études n'ont cependant pas mesuré l'activité antioxydante des extraits issus de ces plantes. Compte tenu des métabolites synthétisés en réponse, il est probable que leur activité biologique soit améliorée, comme décrit chez *L. delicatulum* par Souid *et al.* (2016). En réponse à des concentrations en sel comparables à celles appliquées au cours de cette étude, les composés phénoliques et l'activité anti-radicalaire augmentent

proportionnellement, cette dernière étant au maximum multipliée par deux par rapport au témoin.

Une photopériode continue n'a pas permis d'améliorer l'activité anti-radicalaire des vitroplants et des plants en pots de la Lavande de mer, quelle que soit la source de lumière utilisée. L'exposition de vitroplants de *C. maritimum* à une photopériode continue n'a pas non plus amélioré de façon significative leur activité anti-radicalaire. La Criste marine semble réagir face au stress lumineux en accumulant du beta-carotène (Fenollosa *et al.*, 2017). Cette molécule antioxydante est cependant très peu présente dans les extraits polaires réalisés ici. L'exposition de vitroplants de Matricaire maritime à une photopériode continue a permis de multiplier l'activité de ces extraits par 2,4. Ces résultats n'ont pas été confirmés en serre.

Il est possible que la faible intensité lumineuse utilisée n'ait pas été suffisante pour initier une réaction antioxydante des plantes. Sans forcément faire subir une photopériode continue, l'utilisation d'une lumière forte, par exemple avec la lumière naturelle et un complément artificiel, pourrait permettre d'améliorer la qualité phytochimique des plants.

Les conditions d'exposition aux UV-B des vitroplants et des plants cultivés en serres de Lavande de mer au cours de cette étude n'ont pas permis d'améliorer l'activité anti-radicalaire. Une étude préliminaire d'exposition de vitroplants de *L. vulgare* avait permis de multiplier par un facteur 100 l'activité antioxydante. Les résultats n'ont pu être confirmés *in vitro* ou en serre.

L'exposition aux UV-B a déclenché une forte variation des activités anti-radicalaires chez les vitroplants de la Criste. Parmi les valeurs intéressantes, des multiplications par 26 et par 10 par rapport au témoin ont été mesurées, quelques heures après l'exposition à une dose modérée d'UV-B. Même si la valeur du témoin est faible, ces activités maximales restent respectivement 4 et 2 fois supérieures aux valeurs des extraits issus des plantes de milieux naturels (cf p). Les plants cultivés en serre n'ont pas montré d'amélioration de leur activité anti-radicalaire en réponse à l'exposition aux UV-B. Malgré cela, il a été observé une perte sévère de turgescence des plantes après exposition. La dose appliquée n'était peut-être pas adaptée, d'autres durées ou puissances sont donc à tester pour répliquer sur plantes en pot les observations faites sur les vitroplants.

De même, l'application dans les conditions décrites d'acide salicylique sur les plants de Lavande de mer n'a pas permis d'augmenter l'activité anti-radicalaire.

L'activité anti-radicalaire des extraits des vitroplants de *C. maritimum* a été améliorée par l'élicitation au sel dans une des conditions testées ici, pour améliorer l'activité de 20%. Néanmoins, l'arrosage des plants en serre avec une solution saline n'a pas permis confirmer cette augmentation de l'activité anti-radicalaire.

La stratégie de résistance au stress salin de la Criste ne lui permet pas de survivre à de fortes doses, bien supportées dans les mêmes conditions par la Lavande de mer. La concentration maximale utilisée ici en serre, proche de la concentration de l'eau de mer, est trop forte à long terme pour la Criste. Une autre étude a constaté une augmentation de 25% de l'activité antioxydante, avec une autre méthode chez la Criste en réponse à une concentration modérée en sel, mais sans que cela ne soit significatif (Boestfleisch et Papenbrock, 2017).

L'arrosage avec une solution salée de vitroplants de la Matricaire maritime a permis de multiplier l'activité de leurs extraits jusqu'à 6. Une nouvelle fois, ces résultats n'ont pu être confirmés en serre sur plantes en pots dans les conditions testées ici.

Les éliciteurs testés en serre n'auront pas permis d'améliorer l'activité anti-radicalaire des trois espèces de cette étude. L'activité antioxydante de ces plantes, cultivées sous serres en 2016 notamment, s'est révélée très forte (cf p.) : il est donc probable que cette puissante activité de base soit difficile à améliorer.

Le test anti-radicalaire DPPH, même s'il donne une idée globale de l'activité anti-radicalaire d'un échantillon, reste incomplet au regard des usages destinés à ces plantes. Afin de compléter les analyses, les échantillons les plus actifs détectés pourraient être testés pour d'autres activités biologiques, notamment les activités anti-enzymatiques décrites précédemment (anti-tyrosinase, anti-élastase et anti-collagénase), et d'autres tests antioxydants mesurant d'autres mécanismes comme le FRAP.

L'application de chacun de ces stress a un coût : L'arrosage au sel nécessite un système d'irrigation spécialement conçu à cet effet ; Le maintien d'une photopériode continue doit se faire dans une serre hermétique, de façon à ne pas perturber les autres plants ;

L'application d'UV-B nécessite l'achat de matériel permettant de passer dans les rangs, ou de passer les plants dans une cabine d'exposition ; etc. Ces coûts restent à calculer et doivent être à minima amortis par le gain en activité. Ainsi, les éliciteurs doivent être choisis, en plus de leur efficacité, en fonction de leur rentabilité.

V. CONCLUSION - PERSPECTIVES

Il semblerait que l'activité anti-radicalaire des vitroplants varie au cours de la journée. Même si cela n'a pas été observé pour les plantes en serre, il serait intéressant de le vérifier en la suivant pendant 24 heures. Au cours de cette étude, une forte variation des activités anti-radicalaires en fonction des paramètres environnementaux a été constatée.

Les réactions aux stress ont différé selon le modèle de culture, *in vitro* ou en serre. Les plantes étant dans des états différents, il est difficile de trouver des conditions de stress comparable. En effet, les vitroplants sont plus fragiles, et cultivés dans un environnement très contrôlé par rapport aux plants en pots cultivés sous serre. Les vitroplants risquent donc d'être plus sensibles, et les stress employés en serre doivent donc être plus intenses.

La plupart des tests effectués sur les vitroplants a montré une tendance, dans certaines conditions, à améliorer l'activité anti-radicalaire des plantes. L'élicitation est adaptable et d'autres tests, avec d'autres modalités (intensité et durées d'exposition) devraient permettre d'améliorer l'activité de plantes en pots.

Les paramètres comme l'ensoleillement et l'éclairage complémentaire ont eu un grand impact sur l'activité anti-radicalaire de la Matricaire maritime et de la Lavande de mer. Dans le cadre d'une production de biomasse valorisable pour son potentiel antioxydant, l'apport supplémentaire de lumière pourrait être un facteur d'amélioration de la qualité du produit final.

CONCLUSION GENERALE

La micropropagation, principale technique de culture *in vitro* mise en œuvre au cours de cette étude, a permis la production quasi-illimitée de plants homogènes sans impacter les ressources naturelles pour la Lavande de mer et la Matricaire maritime. Pour la Criste, les taux de multiplication sont plus faibles mais les protocoles mis en œuvre permettent déjà de produire à grande échelle en anticipant plus en amont la production. La technique d'acclimatation mise au point donne un taux de survie maximal pour les trois espèces. La biomasse produite alors donne des rendements importants, mais la culture en serre pourrait encore être optimisée, notamment en travaillant sur la nutrition des plantes. Faire varier les conditions environnementales et/ou la fertilisation pourrait en effet permettre d'améliorer quantitativement et qualitativement les récoltes.

Le fractionnement des extraits associé à la démarche de bioguidage a permis de concentrer les activités biologiques dans quelques fractions par espèce. Les principales molécules antioxydantes des extraits de chacune des espèces ont été caractérisées. Chez la Criste, l'acide chlorogénique, l'acide 3,5-dicafféoylquinique, ainsi que les quercétines glycosylées ont été identifiées comme les molécules concourant majoritairement à l'activité antioxydante de l'extrait brut. Les activités antioxydantes de la Lavande de mer sont les plus puissantes de cette étude. Cette très forte activité est expliquée par la présence de myricétines glycosylées et d'éthyl gallate qui ont été identifiés au sein des fractions les plus antioxydantes. D'autres expérimentations devraient permettre de séparer et d'identifier les molécules majoritaires de deux autres fractions, pour lesquelles nous disposons déjà d'informations globales sur leur structure. Des composés antioxydants majeurs ont enfin été identifiés chez la Matricaire maritime, en particulier l'acide 3,5 dicafféoylquinique, la matricaria lactone et une nouvelle structure jamais décrite dans la littérature, la tripleurospermine. Celle-ci possède en outre une activité anti-tyrosinase intéressante. Le protocole de purification de ce composé a été mis au point et permet d'en isoler une quantité suffisante pour réaliser les nombreux tests complémentaires encore nécessaires. D'une manière générale, les extraits et fractions de chaque espèce n'ont pas présenté d'effet sur la collagénase ni sur l'élastase. D'autres plantes pourraient être testées, en particulier celles sélectionnées au début du projet.

À notre connaissance, cette étude est la première faisant mention d'une activité anti-tyrosinase pour ces espèces. Chez celles-ci, plusieurs fractions se sont révélées très actives, avec des activités proches de celle de l'acide kojique, molécule anti-tyrosinase de référence

utilisée en recherche et en industrie. Les fractions les plus actives, qui sont aussi les plus apolaires, doivent encore être purifiées pour isoler les composés responsables.

Les différents extraits pourront aussi être combinés, dans des proportions qu'il reste à définir, afin de tester s'il existe des effets de synergie permettant de proposer au partenaire économique des cocktails plus efficaces en termes d'activités antioxydantes et anti-tyrosinase.

Ces extraits peuvent donc être valorisés en industrie, en agro-alimentaire comme en cosmétique. Les acteurs de ce dernier ont intensifié ces dernières années la recherche de composés à activité photoprotectrice. En effet, aucun écran solaire d'origine naturel n'est pour le moment commercialisé, ceux produits aujourd'hui sont tous d'origine minérale. Leur fabrication est très polluante, et leurs effets sur les organismes marins (en particulier les coraux) a valu l'interdiction de certains dans l'archipel de Paolos, tandis qu'Hawaï prépare une réglementation similaire.

Des résultats préliminaires de cytotoxicité ont montré une innocuité de ces extraits sur certaines lignées cellulaires. D'autres tests *in vitro* seront nécessaires sur des lignées plus ciblées (de peau ou de tube digestif, selon le débouché visé) pour confirmer ces résultats encourageants, avant de passer à des essais pré-cliniques *in vivo*.

En plus des activités biologiques explorées ici, d'autres pourraient permettre d'aborder des marchés industriels différents, comme le secteur médical. Les espèces décrites ici, riches en molécules d'intérêt, pourraient posséder également des substances anti-inflammatoires, anti-cancérogènes, ou agissant contre les maladies neurodégénératives de type Parkinson ou Alzheimer, activités actuellement très recherchées chez les plantes.

Les expériences d'orientation métabolique, ainsi que les prélèvements sur le terrain ont montré que les niveaux d'activité antioxydante étaient influencés par les conditions environnementales. Dans plusieurs cas, les activités se sont montrées très fortes pour les mécanismes d'antioxydation testés. Sur ce point, les différentes lignées testées ont présenté des activités contrastées, et l'outil de micropropagation s'avère efficace afin de sélectionner les meilleurs génotypes pour chacune des activités recherchées. Cependant, les expériences ont montré qu'il était possible d'augmenter l'activité des plantes cultivées en conditions *in*

in vitro sous l'effet d'éliciteurs. Les métabolites alors synthétisés en situation de stress étant nombreux et variés, il est possible que d'autres activités puissent être dévoilées ou améliorées, comme l'activité anti-tyrosinase ou photoprotectrice.

A terme, l'objectif sera d'établir une corrélation entre les résultats obtenus en conditions *in vitro* et en serre, et de disposer ainsi d'un modèle prédictif à petite échelle du comportement des plantes entières.

Le modèle de multiplication *in vitro* permettant de produire une très grande quantité de plantes, il est maintenant possible d'envisager des expériences avec de nombreux précurseurs et d'autres éliciteurs physiques (pH, températures, types d'éclairage, sel, etc) ou chimiques (régulateurs de croissance, sel,, etc...) avec de nouvelles intensités et modalités d'applications. De même, des combinaisons de plusieurs éliciteurs pourraient s'avérer efficaces pour améliorer la qualité phytochimique des plantes cultivées et améliorer les rendements en principes actifs recherchés.

BIBLIOGRAPHIE

Abbayes (des) H., Corillion R., Claustres G., Dupont P., (1971). Flore et végétation du Massif armoricain - Tome I - Flore vasculaire. Presses Universitaires de Bretagne, Saint-Brieuc, 1226 p.

Abdelly, C., Barhoumi, Z., Ghnaya, T., Debez, A., Hamed, K.B., Ksouri, R., Talbi, O., Zribi, F., Ouerghi, Z., and Smaoui, A. (2006). Potential utilisation of halophytes for the rehabilitation and valorisation of salt-affected areas in Tunisia. In *Biosaline Agriculture and Salinity Tolerance in Plants*, (Springer), 163–172.

Afreen, F., Zobayed, S.M.A., and Kozai, T. (2005). Spectral quality and UV-B stress stimulate glycyrrhizin concentration of *Glycyrrhiza uralensis* in hydroponic and pot system. *Plant Physiology and Biochemistry* 43, 1074–1081.

Agati, G., and Tattini, M. (2010). Multiple functional roles of flavonoids in photoprotection. *The New Phytologist* 186, 786–793.

Ahmed, K.M., Kandil, F., Fayez and Mabry, T.J. (1999). An Anticancer Tannin and Other Phenolics from *Limonium axillare* (Fam. *Plumbaginaceae*). *Asian Journal of Chemistry* 11. 261-263.

Akhani, H., Malekmohammadi, M., Mahdavi, P., Gharibiyani, A.W. Chase, M. (2013). Phylogenetics of the Irano-Turanian taxa of *Limonium* (*Plumbaginaceae*) based on ITS nrDNA sequences and leaf anatomy provides evidence for species delimitation and relationships of lineages. *Botanical Journal of the Linnean Society* 171, 519-550.

Alfermann A.W., Petersen M., and Fuss E. (2003). Production of natural products by plant cell biotechnology: results, problems and perspectives. In: Laimer M., Rucker W. (eds) *Plant Tissue Culture*. Springer, Vienna, 153-166.

Alqahtani, A., Tongkao-on, W., Li, K.M., Razmovski-Naumovski, V., Chan, K., and Li, G.Q. (2015). Seasonal variation of triterpenes and phenolic compounds in australian *Centella asiatica* (L.). *Phytochemical Analysis* 26, 436–443.

Altundag, E., and Ozturk, M. (2011). Ethnomedicinal studies on the plant resources of East Anatolia, Turkey. *Procedia - Social and Behavioral Sciences* 19, 756–777.

Aly, M.A., Rathinasabapathi, B., and Kelley, K. (2002). Somatic embryogenesis in perennial statice *Limonium bellidifolium*, *Plumbaginaceae*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 68, 127–135.

Amo-Marco, J.B., and Ibanez, M.R. (1998). Micropropagation of *Limonium cavanillesii* Erben, a threatened statice, from inflorescence stems. *Plant Growth Regulation* 24, 49–54.

Anderson, W. C. (1984). A revised tissue culture medium for shoot multiplication of rhododendron. *Journal of the American Society for Horticultural Science* 109, 343-347.

Aniy, Y., Miyagi, C., Nakandakari, A., and Kamiya, S. (2002). Free radical scavenging action of the medicinal herb *Limonium wrightii* from the Okinawa islands. *Phytomedicine* 9, 239.

Arbona, V., Manzi, M., Ollas, C., and Gómez-Cadenas, A. (2013). Metabolomics as a Tool to Investigate Abiotic Stress Tolerance in Plants. *International Journal of Molecular Sciences* 14, 4885–4911.

Atia, A., Debez, A., Barhoumi, Z., Smaoui, A., and Abdelly, C. (2009). ABA, GA₃, and nitrate may control seed germination of *Crithmum maritimum* (*Apiaceae*) under saline conditions. *Comptes Rendus Biologies* 332, 704–710.

Atia, A., Ben Hamed, K.B., Debez, A., and Abdelly, C. (2006). Salt and seawater effects on the germination of *Crithmum maritimum*. In : *Biosaline Agriculture and Salinity Tolerance in Plants*, (Springer), pp. 29–33.

Baenas, N., García-Viguera, C., and Moreno, D. (2014). Elicitation: A Tool for Enriching the Bioactive Composition of Foods. *Molecules* 19, 13541–13563.

Baker, L.A., Horbury, M.D., Greenough, S.E., Allais, F., Walsh, P.S., Habershon, S., and Stavros, V.G. (2016). Ultrafast Photoprotecting Sunscreens in Natural Plants. *The Journal of Physical Chemistry Letters* 7, 56–61.

Bandurska, H., Niedziela, J., and Chadzinikolau, T. (2013). Separate and combined responses to water deficit and UV-B radiation. *Plant Science* 213, 98–105.

Baylac, S., and Racine, P. (2004). Inhibition of human leukocyte elastase by natural fragrant extracts of aromatic plants. *International Journal of Aromatherapy* 14, 179–182.

Baysal, G., Duman, H., and Tipirdamaz, R. (2013). Seasonal changes of inorganic and organic osmolyte content in three endemic *Limonium* species of Lake Tuz (Turkey). *Turkish Journal of Botany* 37, 455–463.

Be, L.V., Debergh, P.C. (2006). Potential low-cost micropropagation of pineapple (*Ananas comosus*). *South African Journal of Botany* 72, 191–194.

Ben Amor, N., Ben Hamed, K., Debez, A., Grignon, C., and Abdelly, C. (2005). Physiological and antioxidant responses of the perennial halophyte *Crithmum maritimum* to salinity. *Plant Science* 168, 889–899.

Ben Hamed, K., Ben Youssef, N., Ranieri, A., Zarrouk, M., and Abdelly, C. (2005). Changes in content and fatty acid profiles of total lipids and sulfolipids in the halophyte *Crithmum maritimum* under salt stress. *Journal of Plant Physiology* 162, 599–602.

Ben Hamed, K., Chibani, F., Abdelly, C., and Magne, C. (2014). Growth, sodium uptake and antioxidant responses of coastal plants differing in their ecological status under increasing salinity. *Biologia* 69.

Benzie, I.F., Strain, J.J. (1996). The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of “antioxidant power” : the FRAP assay. *Analytical Biochemistry* 239, 70–76.

Bernal, M., Verdaguer, D., Badosa, J., Abadía, A., Llusà, J., Peñuelas, J., Núñez-Olivera, E., and Llorens, L. (2015). Effects of enhanced UV radiation and water availability on performance, biomass production and photoprotective mechanisms of *Laurus nobilis* seedlings. *Environmental and Experimental Botany* 109, 264–275.

Bhandari, S.R., Kwak, J.H. (2014). Seasonal variation in phytochemicals and antioxidant activities in different tissues of various broccoli cultivars. *African Journal of Biotechnology* 13, 604–615.

Bhandari, S., Jo, J., and Lee, J. (2015). Comparison of Glucosinolate Profiles in Different Tissues of Nine Brassica Crops. *Molecules* 20, 15827–15841.

Bhatia, S., and Bera, T. (2015). Somatic Embryogenesis and Organogenesis. In : *Modern Applications of Plant Biotechnology in Pharmaceutical Sciences*, (Elsevier), 209–230.

Biteau, F., Bourgaud, F., Gontier, E., Fevre, J.-P. (2006). Process of the production of recombinant protein using carnivorous plants. Patent US8178749B2.

Blois, M.S. (1958). Antioxidant determinations by the use of a stable free radical. *Nature*, 181, 1199–1200.

Bloom, A.J. (1997). Interactions between inorganic nitrogen nutrition and root development. *Zeitschrift Für Pflanzenernährung Und Bodenkunde* 160, 253–259.

Bock, K., Lundt, I., Pedersen, C. (1973). Assignment of anomeric structure to carbohydrates through geminal ¹³C-H coupling constants. *Tetrahedron Letters* 13, 1037-1040.

Boestfleisch, C., Papenbrock, J. (2017). Changes in secondary metabolites in the halophytic putative crop species *Crithmum maritimum* L., *Triglochin maritima* L. and *Halimione portulacoides* L. Aellen as reaction to mild salinity. *PLOS* 12 (4), e0176303.

Boestfleisch, C., Wagenseil, N.B., Buhmann, A.K., Seal, C.E., Wade, E.M., Muscolo, A., Papenbrock, J. (2014). Manipulating the antioxidant capacity of halophytes to increase their cultural and economic value through saline cultivation. *AoB Plants* 6, plu046.

Bortagaray, I., Gatchair, S. (2012). Accessing and producing tissue cultured banana plantlets in Costa Rica and Jamaica: Insights on the distributive consequences of emerging technologies. *Technological Forecasting and Social Change* 79, 213–222.

Bose, S., Karmakar, J., Fulzele, D.P., Basu, U., Bandyopadhyay, T.K. (2017). *In vitro* shoots from root explant, their encapsulation, storage, plant recovery and genetic fidelity assessment of *Limonium* hybrid “Misty Blue”: a florist plant. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 129, 313–324.

Bouchereau, A., Duhazé, C., Martin-Tanguy, J., Guégan, J.-P., Larher, F. (1999). Improved analytical methods for determination of nitrogenous stress metabolites occurring in *Limonium* species. *Journal of Chromatography A* 836, 209–221.

Boudermine, S., Malafronte, N., Mencherini, T., Esposito, T., Aquino, R., Beghidja, N., Samir, B., D’Ambola, M., Vassallo, A. (2015). Phenolic Compounds from *Limonium pruinosum*. *Natural Product Communications* 10, 319–321.

Bravo, K., Alzate, F., and Osorio, E. (2016). Fruits of selected wild and cultivated Andean plants as sources of potential compounds with antioxidant and anti-aging activity. *Industrial Crops and Products* 85, 341–352.

Brunetti, C., Guidi, L., Sebastiani, F., and Tattini, M. (2015). Isoprenoids and phenylpropanoids are key components of the antioxidant defense system of plants facing severe excess light stress. *Environmental and Experimental Botany* 119, 54–62.

Bubb, W.A. (2003). NMR spectroscopy in the study of carbohydrates: Characterizing the structural complexity. *Concepts in Magnetic Resonance* 19A, 1–19.

Calatayud, P-A, Garrec, P.-A., Michel J.-P., Michel, N. (2013). Adaptation des plantes aux stress environnementaux. 229-245.

Carocho, M., Morales, P., and Ferreira, I.C.F.R. (2018). Antioxidants: Reviewing the chemistry, food applications, legislation and role as preservatives. *Trends in Food Science & Technology* 71, 107–120.

Carrel A. (1912). Pure culture of cells. *The Journal of Experimental Medicine*, 16(2), 165-168.

Carvalho, I.S., Cavaco, T., Carvalho, L.M., and Duque, P. (1972). Effect of photoperiod on flavonoid pathway activity in sweet potato (*Ipomoea batatas* (L.) Lam.) leaves. *Food Chemistry* 118, 384–390.

Casazza, G., Savona, M., Carli, S., Minuto, L., and Profumo, P. (2002). Micropropagation of *Limonium cordatum* (L.) Mill. for conservation purposes. *The Journal of Horticultural Science and Biotechnology* 77, 541–545.

Catalfomo, P., Block, J.H., Constantine Jr, G.H., and Kirk Jr, P.W. (1973). Choline sulfate (ester) in marine higher fungi. *Marine Chemistry* 1, 157–162.

Cérantola, S., Kervarec, N., Pichon, R., Magné, C., Bessieres, M.-A., and Deslandes, E. (2004). NMR characterisation of inulin-type fructooligosaccharides as the major water-soluble carbohydrates from *Matricaria maritima* (L.). *Carbohydrate Research* 339, 2445–2449.

Chang, T.-S. (2009). An Updated Review of Tyrosinase Inhibitors. *International Journal of Molecular Sciences* 10, 2440–2475.

Chée, R., Pool R.M. (1987). Improved inorganic media constituents for in vitro shoot multiplication of *Vitis*. *Scientia Horticulturae* 32, 85.

Cheeseman, J.M. (2015). The evolution of halophytes, glycophytes and crops, and its implications for food security under saline conditions. *New Phytologist* 206, 557–570.

Chen, Y., Wang, M., Rosen, R.T., and Ho, C.-T. (1999). 2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl Radical-Scavenging Active Components from *Polygonum multiflorum* Thunb. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 47, 2226–2228.

Cherrak, S.A., Mokhtari-Soulimane, N., Berroukeche, F., Bensenane, B., Cherbonnel, A., Merzouk, H., and Elhabiri, M. (2016). In Vitro Antioxidant versus Metal Ion Chelating Properties of Flavonoids: A Structure-Activity Investigation. *PLOS* 11, e0165575.

Chokoe, P., Masoko, P., Mokgotho, M., Howard, R., and Mampuru, L. (2008). Does seasonal variation influence the phytochemical and antibacterial properties of *Carpobrotus edulis*? *African Journal of Biotechnology* 7, 4164–4171.

Coiffard, L. (1991). Aperçu historique de l'utilisation médicinale et alimentaire du crithme maritime. *Revue d'Histoire de la Pharmacie*, XXXVIII, n°290, 3^e TRIM.

Cong, Y., Guo, J., Wang, T., Li, M., Li, K., Wang, J., and Li, Q. (2009). Chemical constituents and antitumor activity on leukemia K562 cell of *Leonurus heterophyllus*. *Zhongguo Zhong Yao Za Zhi* 34, 1816-1818.

Cornara, L., D'Arrigo, C., Pioli, F., Borghesi, B., Bottino, C., Patrone, E., and Mariotti, M.G. (2009a). Micromorphological investigation on the leaves of the rock samphire (*Crithmum maritimum* L.) : Occurrence of hesperidin and diosmin crystals. *Plant Biosystems* 143, 283–292.

Cornara, L., La Rocca, A., Marsili, S., and Mariotti, M.G. (2009b). Traditional uses of plants in the Eastern Riviera (Liguria, Italy). *Journal of Ethnopharmacology* 125, 16–30.

Cunsolo, F., Ruberto, G. (1993). Bioactive metabolites from Sicilian marine fennel (*Crithmum maritimum* L.). *Journal of Natural Products* 56, 1598-1600.

Dam, A., Bhattacharya, C., and Bandyopadhyay, T.K. (2017). Somatic embryogenesis of *Limonium sinense*: a study on the regeneration efficacy via direct and indirect approach followed by *Agrobacterium*-mediated genetic transformation. *The Journal of Horticultural Science and Biotechnology* 92, 411–423.

Dam, A., Paul, S., and Bandyopadhyay, T.K. (2010). Direct somatic embryogenesis and plant regeneration from leaf explants of *Limonium sinensis* (Girard) Kuntze. *Scientia Horticulturae* 126, 253–260.

Das, A., Gosal, S.S., Sidhu, J.S., and Dhaliwal, H.S. (2000). Induction of mutations for heat tolerance in potato by using *in vitro* culture and radiation. *Euphytica* 114, 205–209.

de Bruyn A., Anteunis M., de Gussem R. (1976). ¹H-NMR study of L-rhamnose, methyl -L-rhamnopyranoside, and 4-O--D-galactopyranosyl-L-rhamnose in deuterium oxide. *Carbohydrate research* 47, 158-163.

Dechambre A. (1886). *Dictionnaire encyclopédique des sciences médicales*. Masson, Paris, t. XXIII, p. 357.

del Río, L.A. (2015). ROS and RNS in plant physiology: an overview. *Journal of Experimental Botany* 66, 2827–2837.

Delassus L. & Magnanon S., Colasse V., Glemarec E., Guitton H., Laurent E., Thomassin G., Bioret F., Catteau E., Clément B., Diquelou S., Felzines J.-C., Foucault B., Gauberville C., Gaudillat V., Guillevic Y., Haury J., Royer J.-M., Vallet J., Geslin J., Goret M., Hardegen M., Lacroix P., Reimringer K., Sellin V., Waymel J., and Zambettakis C., 2014 - *Classification phytosociologique et phytosociologique des végétations de Basse-Normandie, Bretagne et Pays de la Loire*. Conservatoire botanique national de Brest, 260 p. (Les cahiers scientifiques et techniques du CBN de Brest ; 1).

Dizdaroglu, M., Jaruga, P., Birincioglu, M., and Rodriguez, H. (2002). Free radical-induced damage to DNA: mechanisms and measurement. *Free Radical Biology and Medicine* 32, 1102–1115.

Dong, J., Wan, G., and Liang, Z. (2010). Accumulation of salicylic acid-induced phenolic compounds and raised activities of secondary metabolic and antioxidative enzymes in *Salvia miltiorrhiza* cell culture. *Journal of Biotechnology* 148, 99–104.

Dučaiová, Z., Petruľová, V., and Repčák, M. (2013). Salicylic acid regulates secondary metabolites content in leaves of *Matricaria chamomilla*. *Biologia* 68.

El-Sherif, N.A. (2017). *Impact of Plant Tissue Culture on Agricultural Sustainability*. (Springer, Berlin Heidelberg).

Etienne, H., and Berthouly, M. (2002). Temporary immersion systems in plant micropropagation. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 69, 215–231.

Fenollosa, E., Munné-Bosch, S., and Pintó-Marijuan, M. (2017). Contrasting phenotypic plasticity in the photoprotective strategies of the invasive species *Carpobrotus edulis* and the coexisting native species *Crithmum maritimum*. *Physiologia Plantarum* 160, 185–200.

Flamini, G., Mastrorilli, E., Cioni, P.L., Morelli, I., and Panizzi, L. (1999). Essential Oil from *Crithmum maritimum* Grown in Liguria (Italy): Seasonal Variation and Antimicrobial Activity. *Journal of Essential Oil Research* 11, 788–792.

Flowers, T.J. and Yeo, A. (1986). Ion relations of plants under drought and salinity. *Australian Journal of Plant Physiology* 13 (1), 75-91.

Flowers, T.J. (1985). Physiology of halophytes. In *Biosalinity in Action: Bioproduction with Saline Water*, Springer, 41–56.

Flowers, T.J., and Colmer, T.D. (2008). Salinity tolerance in halophytes. *The New Phytologist* 179, 945–963.

Flowers, T.J., Hajibagheri, M.A., and Clipson, N.J.W. (1986). Halophytes. *The Quarterly Review of Biology* 61, 313–337.

Flowers, T.J., Troke, P.F., and Yeo, A.R. (1977). The mechanism of salt tolerance in halophytes. *Annual Review of Plant Physiology* 28, 89–121.

Foyer, C.H., and Noctor, G. (2003). Redox sensing and signalling associated with reactive oxygen in chloroplasts, peroxisomes and mitochondria. *Physiologia Plantarum* 119, 355–364.

Fraisse, D., Felgines, C., Texier, O., and Lamaison, J.-L. (2011). Caffeoyl derivatives: major antioxidant compounds of some wild herbs of the Asteraceae family. *Food and Nutrition Sciences* 2, 181.

Franke, W. (1982). Vitamin C in sea fennel (*Crithmum maritimum*), an edible wild plant. *Economic Botany* 36, 163–165.

Gadetskaya, A.V., Mohamed, S.M., Tarawneh, A.H., Mohamed, N.M., Ma, G., Ponomarev, B.N., Zhusupova, G.E., Cantrell, C.L., Cutler, S.J., and Ross, S.A. (2017). Phytochemical characterization and biological activity of secondary metabolites from three *Limonium* species. *Medicinal Chemistry Research* 26, 2743–2750.

Gadetskaya, A.V., Tarawneh, A.H., Zhusupova, G.E., Gemejiyeva, N.G., Cantrell, C.L., Cutler, S.J., and Ross, S.A. (2015). Sulfated phenolic compounds from *Limonium caspium*: Isolation, structural elucidation, and biological evaluation. *Fitoterapia* 104, 80–85.

García-García, R., and Searle, S.S. (2016). Preservatives: Food Use. In *Encyclopedia of Food and Health*, Elsevier, 505–509.

Gautheret, R.J. (1935). Recherches sur la culture des tissus végétaux . Ph.D. Thesis, Paris.

Gautheret, R.J. (1939). Sur la possibilité de réaliser la culture indéfinie des tissus de tubercules de carotte. *Comptes Rendus Hebdomadaires Séances Académiques Scientifiques* 208, 118–120.

Generalčić Mekinić, I., Blažević, I., Mudnić, I., Burčul, F., Grga, M., Skroza, D., Jerčić, I., Ljubenković, I., Boban, M., Miloš, M. (2016). Sea fennel (*Crithmum maritimum* L.): phytochemical profile, antioxidative, cholinesterase inhibitory and vasodilatory activity. *Journal of Food Science and Technology* 53, 3104–3112.

Generalčić Mekinić, I., Šimat, V., Ljubenković, I., Burčul, F., Grga, M., Mihajlovski, M., Lončar, R., Katalinić, V., and Skroza, D. (2018). Influence of the vegetation period on sea fennel, *Crithmum maritimum* L. (*Apiaceae*), phenolic composition, antioxidant and anticholinesterase activities. *Industrial Crops and Products* 124, 947–953.

Geng, D., Chi, X., Dong, Q., and Hu, F. (2015). Antioxidants screening in *Limonium aureum* by optimized on-line HPLC–DPPH assay. *Industrial Crops and Products* 67, 492–497.

Gil, R., Bautista, I., Boscaiu, M., Lidon, A., Wankhade, S., Sanchez, H., Llinares, J., and Vicente, O. (2014). Responses of five Mediterranean halophytes to seasonal changes in environmental conditions. *AoB PLANTS* 6, plu049.

Gill, S.S., and Tuteja, N. (2010). Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants. *Plant Physiology and Biochemistry* 48, 909–930.

Giri, C.C., and Zaheer, M. (2016). Chemical elicitors versus secondary metabolite production in vitro using plant cell, tissue and organ cultures: recent trends and a sky eye view appraisal. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 126, 1–18.

Glenn, E.P., Brown, J.J., and Blumwald, E. (1999). Salt tolerance and crop potential of halophytes. *Critical Reviews in Plant Sciences* 18, 227–255.

Gosal S.S., Gosal S.K. (2000) Genetic transformation and production of transgenic plants. In: Trivedi PC (ed) Plant biotechnology—recent advances. Panima Publishers, New Delhi, 29–40

Grigore, M.-N., and Toma, C. (2017). Anatomical Adaptations of Halophytes (Springer International Publishing).

Grigoriadou, K., and Maloupa, E. (2008). Micropropagation and salt tolerance of *in vitro* grown *Crithmum maritimum* L. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 94, 209–217.

Gruhlke, M.C.H., and Slusarenko, A.J. (2012). The biology of reactive sulfur species (RSS). *Plant Physiology and Biochemistry* 59, 98–107.

Guadagno, C.R., Ewers, B.E., and Weinig, C. (2018). Circadian Rhythms and Redox State in Plants: Till Stress Do Us Part. *Frontiers in Plant Science* 9.

Haberlandt, G. (1902). Kulturversuche mit isolierten Pflanzenzellen. *Sitzungsber. Akad. Wiss. Wien. Math.-Naturwiss. Kl., Abt. J. III*, 69–92.

Hameed, A., Gulzar, S., Aziz, I., Hussain, T., Gul, B., and Khan, M.A. (2015). Effects of salinity and ascorbic acid on growth, water status and antioxidant system in a perennial halophyte. *AoB Plants* 7.

Harada D. (1992). How to grow *Limonium*. FloraCulture International. 22–25.

Harborne, J.B., and Boardley, M. (1984). Use of high-performance liquid chromatography in the separation of flavonol glycosides and flavonol sulphates. *Journal of Chromatography A* 299, 377–385.

Hartmann, A., Gostner, J., Fuchs, J., Chaita, E., Aligiannis, N., Skaltsounis, L., and Ganzera, M. (2015). Inhibition of Collagenase by Mycosporine-like Amino Acids from Marine Sources. *Planta Medica* 81, 813–820.

Hasan, M.M., Bashir, T., Ghosh, R., Lee, S.K., and Bae, H. (2017). An Overview of LEDs' Effects on the Production of Bioactive Compounds and Crop Quality. *Molecules* 22, 1420.

Hasegawa, P.M., Bressan, R.A., Zhu, J.-K., and Bohnert, H.J. (2000). Plant cellular and molecular responses to high salinity. *Annual Review of Plant Biology* 51, 463–499.

Hideg, É., Jansen, M.A.K., and Strid, Å. (2013). UV-B exposure, ROS, and stress: inseparable companions or loosely linked associates? *Trends in Plant Science* 18, 107–115.

Hong, S., Joo, T., and Jhoo, J.-W. (2015). Antioxidant and anti-inflammatory activities of 3,5-dicaffeoylquinic acid isolated from *Ligularia fischeri* leaves. *Food Science and Biotechnology* 24, 257–263.

Houta, O., Akrouf, A., Najja, H., Neffati, M., and Amri, H. (2015). Chemical Composition, Antioxidant and Antimicrobial Activities of Essential Oil from *Crithmum maritimum* Cultivated in Tunisia. *Journal of Essential Oil Bearing Plants* 18, 1459–1466.

Huang, C.L., Hsieh, M.T., Hsieh, W.C., Sagare, A.P., and Tsay, H.S. (2000). In vitro propagation of *Limonium wrightii* (Hance) Ktze. (*Plumbaginaceae*), an ethnomedicinal plant, from shoot-tip, leaf-and inflorescence-node explants. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant* 36, 220–224.

Hussein, A.-A., Mansour, B.M.M., Toaima, N., Craker, L., and Shetty, K. (2001). Tissue Culture Selection for Phenolics and Rosmarinic Acid in Thyme. *Journal of Herbs, Spices & Medicinal Plants* 8, 31–42.

Igawa, T., Hoshino, Y., and Mii, M. (2002). Efficient plant regeneration from cell cultures of ornamental statice, *Limonium sinuatum* Mill. *In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant* 38, 157–162.

Iqbal, N., Khan, N.A., Ferrante, A., Trivellini, A., Francini, A., and Khan, M.I.R. (2017). Ethylene Role in Plant Growth, Development and Senescence: Interaction with Other Phytohormones. *Frontiers in Plant Science* 8.

Jallali, I., Megdiche, W., M'Hamdi, B., Oueslati, S., Smaoui, A., Abdelly, C., and Ksouri, R. (2012). Changes in phenolic composition and antioxidant activities of the edible halophyte *Crithmum maritimum* L. with physiological stage and extraction method. *Acta Physiologiae Plantarum* 34, 1451–1459.

Jallali, I., Zaouali, Y., Missaoui, I., Smeoui, A., Abdelly, C., and Ksouri, R. (2014). Variability of antioxidant and antibacterial effects of essential oils and acetonic extracts of two edible halophytes: *Crithmum maritimum* L. and *Inula crithmoides* L. *Food Chemistry* 145, 1031–1038.

Jalmi, S.K., and Sinha, A.K. (2015). ROS mediated MAPK signaling in abiotic and biotic stress- striking similarities and differences. *Frontiers in Plant Science* 6.

Jansen, M.A.K., Hectors, K., O'Brien, N.M., Guisez, Y., and Potters, G. (2008). Plant stress and human health: Do human consumers benefit from UV-B acclimated crops? *Plant Science* 175, 449–458.

Jeong, J.H., Murthy, H.N., and Paek, K.Y. (2001). High frequency adventitious shoot induction and plant regeneration from leaves of statice. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 65, 123–128.

Jeong, E., Yang, M., Kim, N.-H., Heo, J.-D., and Sung, S. (2014). Hepatoprotective effects of *Limonium tetragonum*, edible medicinal halophyte growing near seashores. *Pharmacognosy Magazine* 10, 563.

Jia, X., Sun, C., Li, G., Li, G., and Chen, G. (2015). Effects of progressive drought stress on the physiology, antioxidative enzymes and secondary metabolites of *Radix astragali*. *Acta Physiologiae Plantarum* 37.

Joubert, E., and de Beer, D. (2014). Antioxidants of Rooibos Beverages. In *Processing and Impact on Antioxidants in Beverages*, Elsevier, 131–144.

Kalyana Sundaram, I., Sarangi, D.D., Sundararajan, V., George, S., and Sheik Mohideen, S. (2018). Poly herbal formulation with anti-elastase and anti-oxidant properties for skin anti-aging. *BMC Complementary and Alternative Medicine* 18.

Kanashiro, A., Souza, J., M Kabeya, L., Azzolini, A., and Lucisano-Valim, Y. (2007). Elastase Release by Stimulated Neutrophils Inhibited by Flavonoids: Importance of the Catechol Group. *Zeitschrift Für Naturforschung C, (Journal of Biosciences)* 62, 357–361.

Karadag, A., Ozcelik, B., and Sanoner, S. (2009). Review of Methods to Determine Antioxidant Capacities. *Food Analytical Methods* 2, 41–60.

Kay, Q.O.N. (1994). *Tripleurospermum Inodorum* (L.) Schultz Bip. *The Journal of Ecology* 82, 681.

Kedare, S.B., and Singh, R.P. (2011). Genesis and development of DPPH method of antioxidant assay. *Journal of Food Science and Technology* 48, 412–422.

Kenouche, S., Latreche, A., Sabrina, B., Bentamene, A., Lassed, S., Boucheham, R., Nassima, B., Creche, J., Zama, D., Samir, B. (2016). Phytochemical and Antioxidant Activity of *Limonium pruinosum* (L.). *Research Journal of Pharmaceutical, Biological and Chemical Sciences* 7.

Kim, S., Jung, E., Kim, J.-H., Park, Y.-H., Lee, J., and Park, D. (2011). Inhibitory effects of (-)- α -bisabolol on LPS-induced inflammatory response in RAW264.7 macrophages. *Food and Chemical Toxicology* 49, 2580–2585.

Kintzios, S., and Michaelakis, A. (1999). Induction of somatic embryogenesis and in vitro flowering from inflorescences of chamomile (*Chamomilla recutita* L.). *Plant Cell Reports* 18, 684–690.

Koyro, H.W., Geissler, N., Hussin, S., Debez, A., and Huchzermeyer, B. (2008). Strategies of halophytes to survive in a salty environment. *Abiotic Stress and Plant Responses*. International Publishing House, New Delhi, 83–104.

Kulisic-Bilusic, T., Blažević, I., Dejanović, B., Miloš, M., and Pifat, G. (2010). Evaluation of the antioxidant activity of essential oils from caper (*Capparis spinosa*) and sea fennel (*Crithmum maritimum*) by different methods : antioxidant activity of essential oil of caper and sea fennel. *Journal of Food Biochemistry* 34, 286–302.

Kumarasamy, Y., Cox, P.J., Jaspars, M., Nahar, L., and Sarker, S.D. (2002). Screening seeds of Scottish plants for antibacterial activity. *Journal of Ethnopharmacology* 83, 73–77.

Kundu, S., Chakraborty, D., and Pal, A. (2011). Proteomic analysis of salicylic acid induced resistance to Mungbean Yellow Mosaic India Virus in *Vigna mungo*. *Journal of Proteomics* 74, 337–349.

Kuo, Y.-C., Lin, L.-C., Tsai, W.-J., Chou, C.-J., Kung, S.-H., and Ho, Y.-H. (2002). Samarangenin B from *Limonium sinense* Suppresses Herpes Simplex Virus Type 1 Replication in Vero Cells by Regulation of Viral Macromolecular Synthesis. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 46, 2854–2864.

Kusano, M., Tohge, T., Fukushima, A., Kobayashi, M., Hayashi, N., Otsuki, H., Kondou, Y., Goto, H., Kawashima, M., Matsuda, F. (2011). Metabolomics reveals comprehensive reprogramming involving two independent metabolic responses of *Arabidopsis* to UV-B light: Dynamic metabolic response to UV-B. *The Plant Journal* 67, 354–369.

Lahondère, C. (1997). Initiation à la phytosociologie sigmatiste. Bulletin de la Société Botanique du Centre-Ouest *16*, 1-47

Lang A., Reinhard E., (1961). Gibberellins and flower formation. *Gibberellins* *28*, 8:71-79.

Larher, F., and Hamelin, J. (1975). L'acide β -triméthylaminopropionique des rameaux de *Limonium vulgare* mill. *Phytochemistry* *14*, 205–207.

Lavola, A., Julkunen-Tiitto, R., Aphalo, P., De La Rosa, T., and Lehto, T. (1997). The effect of UV-B radiation on UV-absorbing secondary metabolites in birch seedlings grown under simulated forest soil conditions. *New Phytologist* *137*, 617–621.

Lavola, A., Julkunen-Tiitto, R., M. de la Rosa, T., Lehto, T., and Aphalo, P. (2001). Allocation of Carbon to growth and secondary metabolites in birch seedlings under UV-B radiation and CO₂ exposure. *Physiologia Plantarum* *109*, 260–267.

Lee, K.-K., Kim, J.-H., Cho, J.-J., and Choi, J.-D. (1999). Inhibitory effects of 150 plant extracts on elastase activity, and their anti-inflammatory effects. *International Journal of Cosmetic Science* *21*, 71–82.

Lee, J.I., Kong, C.-S., Jung, M.E., Hong, J.W., Lim, S.Y., and Seo, Y. (2011). Antioxidant activity of the halophyte *Limonium tetragonum* and its major active components. *Biotechnology and Bioprocess Engineering* *16*, 992–999.

Lee, S.-G., Karadeniz, F., Seo, Y., and Kong, C.-S. (2017). Anti-Melanogenic Effects of Flavonoid Glycosides from *Limonium tetragonum* (Thunb.) Bullock via Inhibition of Tyrosinase and Tyrosinase-Related Proteins. *Molecules* *22*, 1480.

Lee, S.Y., Baek, N., and Nam, T. (2016). Natural, semisynthetic and synthetic tyrosinase inhibitors. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry* *31*, 1–13.

Legros, J.-P. (2009). La salinisation des terres dans le Monde. Académie Des Sciences et Lettres

Li Y., (2008). Effect of Salt Stress on Seed Germination and Seedling Growth of Three Salinity Plants. *Pakistan Journal of Biological Sciences*, *11*, 1268-1272.

Li Y., Kui-Shan W., Xiao R., Ying-Xian Z., Feng W., and Qiang W. (2018). Response of Plant Secondary Metabolites to Environmental Factors. *Molecules* *23*, 762.

Li A.-N., Li S., Li H.-B., Xu D.-P., Xu X.-R., and Chen F. (2014). Total phenolic contents and antioxidant capacities of 51 edible and wild flowers. *Journal of Functional Foods* *6*, 319–330.

Liang, N., and Kitts, D. (2014). Antioxidant Property of Coffee Components: Assessment of Methods that Define Mechanisms of Action. *Molecules* *19*, 19180–19208.

Liebezeit, G., Künnemann, T.D., and Gad, G. (1999). Biotechnological potential of North Sea salt marsh plants—a review of traditional knowledge. *Journal of Biotechnology* *70*, 77–84.

Lima, J.E., Kojima, S., Takahashi, H., and von Wiren, N. (2010). Ammonium triggers lateral root branching in *Arabidopsis* in an ammonium transporter 1;3-Dependent Manner. *The Plant Cell Online* *22*, 3621–3633.

Liyanarachchi, G.D., Samarasekera, J.K.R.R., Mahanama, K.R.R., and Hemalal, K.D.P. (2018). Tyrosinase, elastase, hyaluronidase, inhibitory and antioxidant activity of Sri Lankan medicinal plants for novel cosmeceuticals. *Industrial Crops and Products* *111*, 597–605.

Loftsson, T. (2014). *Drug stability for pharmaceutical scientists* (Academic Press).

Lu, D., Zhang, M., Wang, S., Cai, J., Zhou, X., and Zhu, C. (2010). Nutritional characterization and changes in quality of *Salicornia bigelovii* Torr. during storage. *Food Science and Technology* *43*, 519–524.

Maday, E., Szöke, É., Muskáth, Z., and Lemberkovics, E. (1999). A study of the production of essential oils in chamomile hairy root cultures. *European Journal of Drug Metabolism and Pharmacokinetics* *24*, 303–308.

Magid, A., Voutquenne-Nazabadioko, L., Bontemps, G., Litaudon, M., and Lavaud, C. (2008). Tyrosinase Inhibitors and Sesquiterpene Diglycosides from *Guioa villosa*. *Planta Medica* 74, 55–60.

Mahmood K., Sarwar G., Hussain N., Schmeisky H., Muhammad S. (2009). Effect of soil salinity. *Pakistan Journal of Agricultural Resources*. 22, (3) 132-139.

Martin, C., and Pérez, C. (1992). Multiplication *in vitro* of *Limonium estevei* Fdez. Casas. *Annals of Botany*, 70 (2), 165-167.

Martín, C., and Pérez, C. (1995). Micropropagation of five endemic species of *Limonium* from the Iberian peninsula. *Journal of Horticultural Science* 70, 97–103.

Marwah, R.G., Fatope, M.O., Mahrooqi, R.A., Varma, G.B., Abadi, H.A., and Al-Burtamani, S.K.S. (2007). Antioxidant capacity of some edible and wound healing plants in Oman. *Food Chemistry* 101, 465–470.

Masuda, T., Yonemori, S., Oyama, Y., Takeda, Y., Tanaka, T., Andoh, T., Shinohara, A., and Nakata, M. (1999). Evaluation of the Antioxidant Activity of Environmental Plants: Activity of the Leaf Extracts from Seashore Plants. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 47, 1749–1754.

Medini, F., Bourgou, S., Lalancette, K., Snoussi, M., Mkadmini, K., Coté, I., Abdelly, C., Legault, J., and Ksouri, R. (2015). Phytochemical analysis, antioxidant, anti-inflammatory, and anticancer activities of the halophyte *Limonium densiflorum* extracts on human cell lines and murine macrophages. *South African Journal of Botany* 99, 158–164.

Medini, F., Fellah, H., Ksouri, R., and Abdelly, C. (2014). Total phenolic, flavonoid and tannin contents and antioxidant and antimicrobial activities of organic extracts of shoots of the plant *Limonium delicatulum*. *Journal of Taibah University for Science* 8, 216–224.

Medini, F., Megdiche, W., Mshvildadze, V., Pichette, A., Legault, J., St-Gelais, A., and Ksouri, R. (2016). Antiviral-guided fractionation and isolation of phenolic compounds from *Limonium densiflorum* hydroalcoholic extract. *Comptes Rendus Chimie* 19, 726–732.

Méot-Duros, L., and Magné, C. (2009). Antioxidant activity and phenol content of *Crithmum maritimum* L. leaves. *Plant Physiology and Biochemistry* 47, 37–41.

Méot-Duros, L., Cérantola, S., Talarmin, H., Le Meur, C., Le Floch, G., and Magné, C. (2010). New antibacterial and cytotoxic activities of faltarindiol isolated in *Crithmum maritimum* L. leaf extract. *Food and Chemical Toxicology* 48, 553–557.

Méot-Duros, L., Le Floch, G., and Magné, C. (2008). Radical scavenging, antioxidant and antimicrobial activities of halophytic species. *Journal of Ethnopharmacology* 116, 258–262.

Meudec A, Poupart N (2010) Hydroponic culture method for the production of halophytes. Patent n°WO10066857.

Miller, C., Skoog, F., Von Saltza, M.H., and Strong, F. M. (1955). Kinetin, a cell division factor from desoxyribonucleic acid. *Journal of the American Chemical Society*. 77, 1392

Mittler, R. (2017). ROS Are Good. *Trends in Plant Science* 22, 11–19.

Mohammad, R., Hamid, S., An, A., Norbert, D.K., and Patrick, V.D. (2010). Effects of planting date and seedling age on agro-morphological characteristics, essential oil content and composition of German chamomile (*Matricaria chamomilla* L.) grown in Belgium. *Industrial Crops and Products* 31, 145–152.

Mukherjee, P.K., Maity, N., Nema, N.K., and Sarkar, B.K. (2011). Bioactive compounds from natural resources against skin aging. *Phytomedicine* 19, 64–73.

Munns R., Passioura J.B. (1984). Effect of Prolonged Exposure to Nacl on the Osmotic Pressure of Leaf Xylem Sap From Intact, Transpiring Barley Plants . *Functional Plant Biology* 11, 497-507.

Murashige T. and Skoog F. (1962). A revised medium for rapid growth and bio-assays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum* 15, 473–497

Murray, A.P., Rodriguez, S., Frontera, M.A., Tomas, M.A., and Mulet, M.C. (2004). Antioxidant Metabolites from *Limonium brasiliense* (Boiss.) Kuntze. *Zeitschrift Für Naturforschung C* 59, 477–480.

Nascimento, L.B. dos S., Leal-Costa, M.V., Menezes, E.A., Lopes, V.R., Muzitano, M.F., Costa, S.S., and Tavares, E.S. (2015). Ultraviolet-B radiation effects on phenolic profile and flavonoid content of *Kalanchoe pinnata*. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology* 148, 73–81.

Neumann, K.-H., Ashwani Kumar, and Imani, J. (2009). *Plant cell and tissue culture: a tool in biotechnology: basics and application*, Berlin, Springer.

Nimse, S.B., and Pal, D. (2015). Free radicals, natural antioxidants, and their reaction mechanisms. *Royal Society of Chemistry Advances* 5, 27986–28006.

Niyogi, K.K., Björkman, O., and Grossman, A.R. (1997). The roles of specific xanthophylls in photoprotection. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 94, 14162–14167.

Nobécourt, P. (1939). Sur la pérennité et l'augmentation de volume des cultures de tissus végétaux. *C.R. Séances Soc. Biol. Ses Fil.* 130, 1270–1271.

Oberprieler, C., Himmelreich, S., and Vogt, R. (2007). A new subtribal classification of the tribe *Anthemideae* (*Compositae*). *Willdenowia* 37, 89–114.

Oyaizu, M. (1986). Studies on products of browning reaction. *The Japanese Journal of Nutrition and Dietetics*, 44(6), 307-315.

Özcan, M.M., Pedro, L.G., Figueiredo, A.C., and Barroso, J.G. (2006). Constituents of the essential oil of sea fennel (*Crithmum maritimum* L.) growing wild in Turkey. *Journal of Medicinal Food* 9, 128–130.

Ozcelik, B., Lee, J.H., and Min, D.B. (2003). Effects of Light, Oxygen, and pH on the Absorbance of 2, 2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl. *Journal of Food Science* 68, 487–490.

Ozga, J.A., Saeed, A., Wismer, W., and Reinecke, D.M. (2007). Characterization of Cyanidin- and Quercetin-Derived Flavonoids and Other Phenolics in Mature Saskatoon Fruits (*Amelanchier alnifolia* Nutt.). *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 55, 10414–10424.

Ozgur, R., Uzilday, B., Sekmen, A.H., and Turkan, I. (2013). Reactive oxygen species regulation and antioxidant defence in halophytes. *Functional Plant Biology*.

Öztürk, E., Özer, H., Çakir, A., Mete, E., Kandemir, A., and Polat, T. (2010). Chemical Composition of the Essential Oil of *Tripleurospermum corymbosum* E. Hossain, an Endemic Species from Turkey. *Journal of Essential Oil Bearing Plants* 13, 148–153.

Paek, K.Y., Chakrabarty, D., and Hahn, E.J. (2005). Application of bioreactor systems for large scale production of horticultural and medicinal plants. In : *Liquid Culture Systems for in Vitro Plant Propagation*, Springer, 95–116.

Palop, M., Palacios, C., and González-Candelas, F. (2000). Development and across-species transferability of microsatellite markers in the genus *Limonium* (*Plumbaginaceae*). *Conservation Genetics* 1, 177–179.

Parejo, I., Jauregui, O., Sánchez-Rabaneda, F., Viladomat, F., Bastida, J., and Codina, C. (2004). Separation and Characterization of Phenolic Compounds in Fennel (*Foeniculum vulgare*) Using Liquid Chromatography–Negative Electrospray Ionization Tandem Mass Spectrometry. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 52, 3679–3687.

Parvez, S., Kang, M., Chung, H.-S., and Bae, H. (2007). Naturally occurring tyrosinase inhibitors: mechanism and applications in skin health, cosmetics and agriculture industries. *Phytotherapy Research* 21, 805–816.

Pateira, L., Nogueira, T., Antunes, A., Venâncio, F., Tavares, R., and Capelo, J. (1999). Two chemotypes of *Crithmum maritimum* L. from Portugal. *Flavour and Fragrance Journal* 14, 333–343.

Pavela, R., Maggi, F., Lupidi, G., Cianfaglione, K., Dauvergne, X., Bruno, M., and Benelli, G. (2017). Efficacy of sea fennel (*Crithmum maritimum* L., Apiaceae) essential oils against *Culex quinquefasciatus* Say and *Spodoptera littoralis* (Boisd.). *Industrial Crops and Products* 109, 603–610.

Perron, N.R., and Brumaghim, J.L. (2009). A Review of the Antioxidant Mechanisms of Polyphenol Compounds Related to Iron Binding. *Cell Biochemistry and Biophysics* 53, 75–100.

Petronilho, S., Maraschin, M., Coimbra, M.A., and Rocha, S.M. (2012). In vitro and in vivo studies of natural products: A challenge for their valuation. The case study of chamomile (*Matricaria recutita* L.). *Industrial Crops and Products* 40, 1–12.

Piwowarski, J.P., Kiss, A.K., and Kozłowska-Wojciechowska, M. (2011). Anti-hyaluronidase and anti-elastase activity screening of tannin-rich plant materials used in traditional Polish medicine for external treatment of diseases with inflammatory background. *Journal of Ethnopharmacology* 137, 937–941.

Pokorný, J. (2007). Are natural antioxidants better – and safer – than synthetic antioxidants? *European Journal of Lipid Science and Technology* 109, 629–642.

Preil, W. (2005). General introduction: a personal reflection on the use of liquid media for in vitro culture. In : *Liquid Culture Systems for in Vitro Plant Propagation*, Springer, 1–18.

Prior, R.L., Wu, X., and Schaich, K. (2005). Standardized Methods for the Determination of Antioxidant Capacity and Phenolics in Foods and Dietary Supplements. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 53, 4290–4302.

Raal, A., Kaur, H., Orav, A., Arak, E., Kailas, T., and Müürisepp, M. (2011). Content and composition of essential oils in some Asteraceae species. *Proceedings of the Estonian Academy of Sciences* 60, 55.

Raal, A., Kaur, H., Orav, A., Arak, E., Kailas, T., and Müürisepp, M. (2011b). Content and composition of essential oils in some Asteraceae species. *Proceedings of the Estonian Academy of Sciences* 60, 55.

Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M., and Rice-Evans, C. (1999). Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Biology and Medicine* 26, 1231–1237.

Renna, M., and Gonnella, M. (2012). The use of the sea fennel as a new spice-colorant in culinary preparations. *International Journal of Gastronomy and Food Science* 1, 111–115.

Rice-Evans, C.A., Miller, N.J., and Paganga, G. (1996). Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. *Free Radical Biology and Medicine* 20, 933–956.

Robbins, W.J. (1922). Cultivation of Excised Root Tips and Stem Tips Under Sterile Conditions. *Botanical Gazette* 73, 376–390.

Robinson, S.A. (2001). Plant Light Stress. In : eLS. American Cancer Society.

Rodrigues, M.J., Soszynski, A., Martins, A., Rauter, A.P., Neng, N.R., Nogueira, J.M.F., Varela, J., Barreira, L., and Custódio, L. (2015). Unravelling the antioxidant potential and the phenolic composition of different anatomical organs of the marine halophyte *Limonium algarvense*. *Industrial Crops and Products* 77, 315–322.

Rout, G.R., Mohapatra, A., and Jain, S.M. (2006). Tissue culture of ornamental pot plant: A critical review on present scenario and future prospects. *Biotechnology Advances* 24, 531–560.

Rozema, J., Staaij, J. van de, Björn, L.O., and Caldwell, M. (1997). UV-B as an environmental factor in plant life: stress and regulation. *Trends in Ecology & Evolution* 12, 22–28.

Ruberto, G., Tiziana Baratta, M., G. Deans, S., and J. Damien Dorman, H. (2001). Antioxidant and Antimicrobial Activity of *Foeniculum vulgare* and *Crithmum maritimum* Essential Oils. *Planta Medica* 66, 687–693.

Sakakibara, H. (2006). Cytokinins: activity, biosynthesis, and translocation. *Annual Review of Plant Biology* 57, 431–449.

Sakalauskaitė, J., Viskelis, P., Dambrauskienė, E., Sakalauskienė, S., Samuolienė, G., Brazaitytė, A., Duchovskis, P., and Urbonavičienė, D. (2013). The effects of different UV-B radiation intensities on morphological and biochemical characteristics in *Ocimum basilicum* L. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 93, 1266–1271.

Saleh, N.A., El-Negoumy, S.I., El-Hadidi, M.N., and Hosni, H.A. (1983). Comparative study of the flavonoids of some local members of the Umbelliferae. *Phytochemistry* 22, 1417–1420.

Schreiner, M., Mewis, I., Huyskens-Keil, S., Jansen, M.A.K., Zrenner, R., Winkler, J.B., O'Brien, N., and Krumbein, A. (2012). UV-B-Induced Secondary Plant Metabolites - Potential Benefits for Plant and Human Health. *Critical Reviews in Plant Sciences* 31, 229–240.

Sehgal, S.K., Kaur, S., Gupta, S., Sharma, A., Kaur, R., and Bains, N.S. (2011). A direct hybridization approach to gene transfer from *Aegilops tauschii* Coss. to *Triticum aestivum* L.: A direct hybridization approach to gene transfer. *Plant Breeding* 130, 98–100.

Sharifi-Rad, M., Nazaruk, J., Polito, L., Morais-Braga, M.F.B., Rocha, J.E., Coutinho, H.D.M., Salehi, B., Tabanelli, G., Montanari, C., del Mar Contreras, M. (2018). *Matricaria* genus as a source of antimicrobial agents: From farm to pharmacy and food applications. *Microbiological Research* 215, 76–88.

Sharma, O.P., and Bhat, T.K. (2009). DPPH antioxidant assay revisited. *Food Chemistry* 113, 1202–1205.

Simon, H.-U., Haj-Yehia, A., and Levi-Schaffer, F. (2000). Role of reactive oxygen species (ROS) in apoptosis induction. *Apoptosis* 5, 415–418.

Singh, O., Khanam, Z., Misra, N., and Srivastava, M. (2011). Chamomile (*Matricaria chamomilla* L.): An overview. *Pharmacognosy Reviews* 5, 82.

Siracusa, L., Kulisic-Bilusic, T., Politeo, O., Krause, I., Dejanovic, B., and Ruberto, G. (2011). Phenolic Composition and Antioxidant Activity of Aqueous Infusions from *Capparis spinosa* L. and *Crithmum maritimum* L. before and after Submission to a Two-Step *in Vitro* Digestion Model. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 59, 12453–12459.

Skoog, F. and Miller, C. O. (1957). Chemical regulation of growth and organ formation in plant tissue cultures *in vitro*. *Symp. Soc. Exp. Biol.* 11, 118–131.

Soengas, P., Cartea, M.E., Velasco, P., and Francisco, M. (2018). Endogenous Circadian Rhythms in Polyphenolic Composition Induce Changes in Antioxidant Properties in *Brassica* Cultivars. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 66, 5984–5991.

Solimine, J., Garo, E., Wedler, J., Rusanov, K., Fertig, O., Hamburger, M., Atanassov, I., and Butterweck, V. (2016). Tyrosinase inhibitory constituents from a polyphenol enriched fraction of rose oil distillation wastewater. *Fitoterapia* 108, 13–19.

Souid A., Gabriele, M., Longo, V., Pucci, L., Bellani, L., Smaoui, A., Abdelly, C., Ben Hamed, K. (2016). Salt tolerance of the halophyte *Limonium delicatulum* is more associated with antioxidant enzyme activities than phenolic compounds. *Functional Plant Biology* 43, 607.

Souid, A., Bellani, L., Magné, C., Zorrig, W., Smaoui, A., Abdelly, C., Longo, V., and Ben Hamed, K. (2018). Physiological and antioxidant responses of the sabkha biotope halophyte *Limonium delicatulum* to seasonal changes in environmental conditions. *Plant Physiology and Biochemistry* 123, 180–191.

Stadtman, E.R. (1990). Metal ion-catalyzed oxidation of proteins: biochemical mechanism and biological consequences. *Free Radical Biology and Medicine* 9, 315–325.

Swanson, S., and Gilroy, S. (2010). ROS in plant development. *Physiologia Plantarum* 138, 384–392.

Szopa, A., Ekiert, H., Szewczyk, A., and Fugas, E. (2012). Production of bioactive phenolic acids and furanocoumarins in *in vitro* cultures of *Ruta graveolens* L. and *Ruta graveolens ssp. divaricata* (Tenore) Gams. under different light conditions. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 110, 329–336.

Tang, X.-H., Yan, L.-F., Gao, J., Yang, X.-L., Xu, Y.-X., Ge, H.-Y., and Yang, H.-D. (2012). Antitumor and immunomodulatory activity of polysaccharides from the root of *Limonium sinense* Kuntze. *International Journal of Biological Macromolecules* 51, 1134–1139.

Tang, X.-H., Yu, F., Liu, J., Gao, J., Yan, L.-F., and Dong, M.-M. (2014). Isolation and identification of anti-tumor polysaccharide LSP21 from *Limonium sinense* (Girard) Kuntze. *International Journal of Biological Macromolecules* 70, 138–142.

Teixeira, J., Gaspar, A., Garrido, E.M., Garrido, J., and Borges, F. (2013). Hydroxycinnamic Acid Antioxidants: An Electrochemical Overview. *BioMed Research International* 2013, 1–11.

Thorat, I. (2013). Antioxidants, their properties, uses in food products and their legal implications. *International Journal of Food Studies* 2, 81–104.

Thring, T.S., Hili, P., and Naughton, D.P. (2009). Anti-collagenase, anti-elastase and antioxidant activities of extracts from 21 plants. *BMC Complementary and Alternative Medicine* 9.

Tofighi, Z., Molazem, M., Doostdar, B., Taban, P., Shahverdi, A.R., Samadi, N., and Yassa, N. (2015). Antimicrobial activities of three medicinal plants and investigation of flavonoids of *Tripleurospermum disciforme*. *Iranian Journal of Pharmaceutical Research* 14, 225.

Topoonyanont, N., Ampawan, R., and Debergh, P.C. (2000). Reversion of *Limonium* hybrid « Misty Blue » inflorescence development and its applicability in micropropagation. *Scientia Horticulturae* 83, 283–299.

Tsoukatou, M., Tsitsimpikou, C., Vagias, C., and Roussis, V. (2001). Chemical Intra-Mediterranean Variation and Insecticidal Activity of *Crithmum maritimum*. *Zeitschrift Für Naturforschung. C, Journal of Biosciences* 56, 211–215.

Uleberg, E., Rohloff, J., Jaakola, L., Trôst, K., Junttila, O., Häggman, H., and Martinussen, I. (2012). Effects of Temperature and Photoperiod on Yield and Chemical Composition of Northern and Southern Clones of Bilberry (*Vaccinium myrtillus* L.). *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 60, 10406–10414.

Vasil, V. and Hildebrandt, A. C. (1965). Differentiation of tobacco plants from single, isolated cells in micro cultures. *Science* 150, 889–892.

Veen, H. (1983). Silver thiosulphate: an experimental tool in plant science. *Scientia Horticulturae* 20, 211–224.

Vicente, O., Boscaiu, M., Naranjo, M.Á., Estrelles, E., Bellés, J.M., and Soriano, P. (2004). Responses to salt stress in the halophyte *Plantago crassifolia* (*Plantaginaceae*). *Journal of Arid Environments* 58, 463–481.

Wang, L., Li, W., Ma, L., Chen, J., Lü, H., and Jian, T. (2016). Salt stress changes chemical composition in *Limonium bicolor* (Bag.) Kuntze, a medicinal halophytic plant. *Industrial Crops and Products* 84, 248–253.

Watkins, D.W., Jenkins, J.M.X., Grayson, K.J., Wood, N., Steventon, J.W., Le Vay, K.K., Goodwin, M.I., Mullen, A.S., Bailey, H.J., Crump, M.P., et al. (2017). Construction and *in vivo* assembly of a catalytically proficient and hyperthermostable de novo enzyme. *Nature Communications* 8.

White, P.R. (1939). Potentially Unlimited Growth of Excised Plant Callus in an Artificial Nutrient. *American Journal of Botany* 26, 59.

Wong-Paz, J.E., Muñoz-Márquez, D.B., Aguilar-Zárate, P., Rodríguez-Herrera, R., and Aguilar, C.N. (2014). Microplate Quantification of Total Phenolic Content from Plant

Extracts Obtained by Conventional and Ultrasound Methods: Microplate Quantification of Total Phenolic Content. *Phytochemical Analysis* 25, 439–444.

Woodward A. and Bartel, B. (2005). Auxin: Regulation, Action, and Interaction. *Annals of Botany* 95, 707–735.

Xiang, Z., and Ning, Z. (2008). Scavenging and antioxidant properties of compound derived from chlorogenic acid in South-China honeysuckle. *LWT - Food Science and Technology* 41, 1189–1203.

Xiao, Y., and Kozai, T. (2006). In vitro multiplication of statice plantlets using sugar-free media. *Scientia Horticulturae* 109, 71–77.

Xu, F., Cao, S., Shi, L., Chen, W., Su, X., and Yang, Z. (2014). Blue Light Irradiation Affects Anthocyanin Content and Enzyme Activities Involved in Postharvest Strawberry Fruit. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 62, 4778–4783.

Yang, M., Kim, N.-H., Heo, J.-D., Sung, S. and Jeong, E. (2014). Hepatoprotective effects of *Limonium tetragonum*, edible medicinal halophyte growing near seashores. *Pharmacognosy Magazine* 10, 563.

Yensen NP (2006) Halophyte uses for the twenty-first century. In: Khan MA, Weber DJ (eds) *Ecophysiology of high salinity tolerant plants*. Springer, Dordrecht, pp 367–396.

Yuan, F., Leng, B., and Wang, B. (2016). Progress in Studying Salt Secretion from the Salt Glands in Recretohalophytes: How Do Plants Secrete Salt? *Frontiers in Plant Science* 7.

Zhang, H., Forde, B.G. (2000). Regulation of *Arabidopsis* roots development by nitrate availability. *Journal of Experimental Botany* 342, 51-59.

Zhou, L.G., and Wu, J.Y. (2006). Development and application of medicinal plant tissue cultures for production of drugs and herbal medicinals in China. *Natural Product Reports* 23, 789.

Zu, Y., Pang, H.-H., Yu, J.-H., Li, D.-W., Wei, X.-X., Gao, Y.-X., and Tong, L. (2010). Responses in the morphology, physiology and biochemistry of *Taxus chinensis* var. *mairei* grown under supplementary UV-B radiation. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology* 98, 152–158.

Titre : Culture in vitro de plantes halophiles du littoral breton et orientation de leur métabolisme vers la production de principes actifs pour la nutrition et la cosmétique.

Mots clés : Halophytes, culture in vitro, activités biologiques, orientation métabolique, RMN.

Résumé : Les plantes halophiles sont des plantes résistantes au stress salin, qui subissent une grande variété de stress dans leur environnement naturel. Ces conditions les ont menées à synthétiser des molécules de défense, qui peuvent présenter des activités biologiques intéressantes de par leur structure et diversité. Dans le cadre d'une collaboration avec la PME Salipouss, trois espèces ont été choisies sur la base de tests antioxydants préliminaires, avec pour objectif d'optimiser (i) la multiplication de plants in vitro pour des cultures industrielles en serre et (ii) d'améliorer le niveau d'activité de leurs extraits. La diversité des composés potentiellement actifs présents dans ces extraits est ensuite analysée par fractionnement bioguidé, afin d'isoler des molécules valorisables. Ce fractionnement est appuyé par des analyses de composés par RMN, permettant d'obtenir des informations sur la structure des composés bio-actifs. Les résultats obtenus montrent le fort potentiel de valorisation de ces trois espèces dans l'industrie, et plus particulièrement dans la nutrition et la cosmétique.

Title : In vitro culture of halophytes from Brittany coast and metabolic engineering towards bioproduction of active extracts for food and cosmetic industries.

Keywords : Halophytes, in vitro culture, biological activity, metabolic engineering, NMR.

Abstract : Halophytes are salt tolerant or salt-resistant plants which undergo high stress in their natural habitat. As a consequence of environmental stresses, they produce a number of active defense molecules which display interesting biological activities because of their diverse actions or structures. For the present study, three halophytic species were selected from preliminary antioxidant screening. In collaboration with Salipouss SME, objectives of the work were (i) to optimize in vitro halophyte multiplication in order to produce biomass under greenhouse and (ii) to elicit particular metabolic pathways in order to improve extract activities. To attempt to isolate molecules with potentially valuable activities, the variety of compounds from these extracts is reduced by successive fractionations. In addition, NMR analyzes allow to obtain indications on the nature and on the structure of the active compounds. First results highlight the strong activities of the selected halophytes, making them promising candidates for industrial uses, especially in nutrition and cosmetics.