

République Algérienne Démocratique et Populaire
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique

Université A/Mira de Bejaia

Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie

Département de Biologie Physico-Chimique

Option : Biochimie Fondamentale

Mémoire de Fin de Cycle

En vue de l'obtention du Diplôme de Master

Thème

Production par voie biotechnologique de métabolites secondaires d'intérêt pharmaceutique et alimentaire.

Réalisé par :

MANADI Ahlem & MAHTOUT Radia

Soutenu le 23/09/2021 devant le jury composé de :

Président	Mr Zaidi H.	MCB	U.A/Mira Béjaïa.
Examineur	Mme Arkoub S.	MAA	U.A/Mira Béjaïa.
Encadreur	Mme Kasmi S.	MAA	U.A/Mira Béjaïa.

Promotion 2020/2021



Remerciements

Tout d'abord on remercie le bon dieu tout puissant qui nous a guidés dans nos pas, qui nous a donné le courage, la volonté, et la patience pour surmonter les épreuves qu'on a rencontré tout au long de notre vie.

Nous tenons à remercier et exprimer notre profonde gratitude et vifs remerciements à notre encadreur Mme KASMI Souad pour ses encouragements, ses conseils et ses efforts à fin de terminer ce travail.

Nous tenons à remercier vivement les membres de jury, et à exprimer toute notre reconnaissance pour l'honneur qu'ils nous accordent en acceptant d'évaluer ce modeste travail.

Nous souhaitons également remercier tous les enseignants ayant assurés nos cours pendant nos années d'études.

Enfin, Nos remerciements vont également à nos collègues et amis de la promotion.



A la mémoire de ma grand-mère paternelle que dieu l'accueil dans son vaste paradis. Je voulais tant que tu vives ce jour, Dieu a décidé autrement. Repose en paix très chère grand-mère.

Je tiens sincèrement à dédier ce modeste travail à mes chers êtres qui m'ont mise au monde et les plus chers à mes yeux et qui sont la source de ma volonté depuis mon enfance, " mes parents" qui m'ont soutenue et orienté durant toute ma vie. Qu'Allah puisse vous gardé éternellement heureux. Merci du profond de mon cœur.

A mes chers frères Sifou, Ziad, Aymen

A mon fiançai et futur mari Nouredine

A mes très chers amies et copines de chambre

A ma binôme Wardouch et sa famille.

Ahlem, M



Je dédie mon travail à mon père, décédé trop tôt, qui m'a toujours soutenue et motivé dans mes études. Qu'il apprécie cet humble geste comme preuve de reconnaissance de la part de sa petite fille qui a toujours prié pour le salut de son âme. Puisse Dieu, le tout puissant, l'avoir en son paradis.

Aucune dédicace ne saurait exprimer mon respect, mon amour éternel et ma considération pour les sacrifices de ma chère mère. Que ce modeste travail soit l'exaucement de vos vœux tant formules, le fruit de vos innombrables sacrifices. Puisse Dieu, le Très Haut, vous accorder santé, bonheur et longue vie.

A mes chères sœurs Naima (paix à son âme), Yamina et Thilelli

A mes chers frères Idir (paix à son âme), Mhend, Amrane et Madjid

A mon beau-frère Amrane et belle-sœur Aida

A mon neveu Hassan et mes nièces Imene, Ryma, Asma, Nyama, Fatima Zahra, Melissa

A mon ami Imad et toutes mes amies Imene, Nawel, Nina, Céline et Camille

A ma binôme Ahlem et sa famille

Radia, M

TABLE DES MATIERES

TABLE DES MATIERES

LISTE DES FIGURES

LISTE DES TABLEAUX

LISTE DES ABREVIATIONS

Introduction 1

Chapitre I : Les métabolites secondaires

I.1. Définition..... 2

I.2. Structure et Classification 2

I.2.1. Terpènes..... 2

I.2.1.1. Définition 2

I.2.1.2. Structure et classification 3

I.2.1.3. Voie de biosynthèse 5

I.2.2. Composés phénoliques..... 6

I.2.2.1. Définition 6

I.2.2.2. Structure et classification 6

A. Acides phénoliques..... 6

B. Flavonoïdes..... 7

C. Tannins 8

D. Coumarines..... 9

I.2.2.3. Voie de biosynthèse 9

A. Voie de l'acide shikimique..... 10

B. Voie de l'acide acétique..... 10

I.2.3. Alcaloïdes..... 11

I.2.3.1. Définition 11

I.2.3.2. Structure 11

A. Alcaloïdes vrais : 11

B. Pseudo-alcaloïdes : 11

C. Proto-alcaloïdes 11

I.2.3.3. Voie de biosynthèse 11

I.3. Rôle des métabolites secondaires 12

I.3.1. Pour la plante 12

I.3.2. Pour l'Homme 13

Chapitre II : Production biotechnologique de métabolites secondaires

II.1.	Généralités	15
II.1.1	Définition.....	15
II.1.2	Techniques de base en biotechnologie	15
II.1.2.1	Fermentation	15
II.1.2.2	Culture cellulaire	16
II.1.2.3	ADN recombinant et génie génétique.....	16
II.2.	Production de métabolites secondaires d'intérêt pharmaceutique.....	16
II.2.1.	Production de flavonolignanes de <i>Silybum marianum</i> L. (chardon-Marie)	16
II.2.1.1.	Généralités	16
II.2.1.2.	Méthodes de production de silymarine par des techniques biotechnologiques ..	18
A.	Production de silymarine <i>in vitro</i> chez <i>S. marianum</i>	18
B.	Stimuler la production de silymarine dans les cultures <i>in vitro</i> de <i>S. marianum</i>	20
II.2.2.	Production biotechnologique des flavonoïdes méthylés.....	20
II.2.2.1.	Généralités	20
II.2.2.2.	Progrès biotechnologiques récents pour la méthylation des flavonoïdes	21
A.	Méthyltransferases.....	21
B.	Réaction enzymatique <i>in vitro</i>	22
C.	Synthèse biotechnologique moderne	22
II.3.	Méthodes de production de métabolite secondaire d'intérêt alimentaire.....	24
II.3.1.	Voie d'ingénierie enzymatique pour la production de flavonoïdes chez les microbes recombinants	24
II.3.2.1.	Stratégies d'ingénierie appliquées pour améliorer la fonctionnalité enzymatique	24
A.	Optimisation des codons pour une meilleure expression	24
B.	Ingénierie de fusion pour une expression et une activité enzymatiques améliorées	25
C.	Assemblage d'enzymes de la voie par des échafaudages	25
D.	Suppression du peptide signal pour améliorer l'expression.....	25
II.3.2.	Production d'alcaloïdes <i>in vitro</i> à partir de tissus de <i>Datura stramonium</i> L.	26
II.3.2.1.	Généralité.....	26
II.3.2.2.	Poduction d'alcaloïdes tropanique <i>in vitro</i> chez <i>Datura stramonium</i> L.....	27
A.	Culture de tissus indifférenciés (cals et suspensions cellulaires)	28
B.	Tissus différenciés (Chevelus racinaires)	29
Conclusion	30

Bibliographie

Résumé

LISTE DES FIGURES

Figure 1:	Structure de l'isoprène et de l'isoprène actif.....	3
Figure 2:	Classification des terpénoïdes.....	3
Figure 3:	Synthèse de différentes classes terpéniques chez les plantes.	5
Figure 4:	Structure de la molécule phénol (A) et celle d'un polyphénol (B).	6
Figure 5:	Structures chimiques des acides hydroxybenzoïques.....	7
Figure 6:	Quelques exemples d'acides phénols dérivés de l'acide cinnamique (C6-C3). 7	
Figure 7:	Squelette de base des flavonoïdes (motif flavane) avec la numérotation adoptée	7
Figure 8:	Exemple d'un tanin hydrolysable à gauche et un autre condensé droit.....	9
Figure 9:	Structure de base des coumarines.....	9
Figure 10:	Représentation des voies de biosynthèse des polyphénols	10
Figure 11:	Mélange de flavonolignanes	17
Figure 12:	Ingénierie métabolique pour la synthèse biologique de divers flavonoïdes méthylés	23
Figure 13:	Approches fréquemment utilisées dans l'ingénierie des enzymes de la voie des flavonoïdes.....	26
Figure 14:	Structure de l'hyoscyamine (à gauche) et la scopolamine (à droite)	27

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1: Différentes sous classe des terpènes.....	4
Tableau 2: Quelques classes distinctes des flavonoïdes.....	8

LISTE DES ABREVIATIONS

AdoMet OMT: Adenosyl-1-Methionine O Methyl Transferases

APT : Menace Persistante Avancée

B5 : Milieu de culture de Gamborg

BAP : 6-Benzyle Amino Purine

CMT : C-méthyl transférase

CRISPRi : Boîtier des répétitions palindromiques régulièrement interspaced

DMAPP: Dimethylallyl diphosphate

FPP : Diphosphate de farnesyl

GABA : Acide γ -aminobutyrique

GPP: Geranyl diphosphate

IAA : Acide indole-3-acétique

IBA: Acide indole-3-butyrique

IPP: Isopentenyl diphosphate

MEP: Méthyl Erythritol Phosphate

MRSA : Staphylocoque doré résistant à la méticilline

MS : Murashige et Skoog

NAA : Acide 1-naphtalèneacétique

NMT: N-méthyl transférase

SAM: S-adenosyl-L-méthionine

Introduction

Introduction

En 1891, Kossel est le premier à employer le terme de 'métabolite secondaire'. Il a par la suite établi une distinction entre ces deux types de métabolites, toujours valable aujourd'hui. Les métabolites primaires sont des composés de faible poids moléculaire, communs à toutes les plantes. Il en existe quelques centaines; tels les acides aminés ou les acides nucléiques. En revanche plusieurs dizaines de milliers de métabolites secondaires ont pu être identifiés, et s'avèrent spécifiques d'une famille, voire d'une espèce de plante (**Rhodes M.J.C. ; 1994**).

Les plantes aromatiques et médicinales constituent une véritable banque de ces molécules chimiques dites secondaires. Ces molécules qui appartiennent à des familles chimiques très diverses telles que les alcaloïdes, les polyphénols, et les terpénoïdes sont utilisées par l'Homme comme arômes, colorants, additifs alimentaires et comme principes actifs dans de nombreux médicaments (**Teixeira da Silva J. A. ; 2004**).

Les plantes produisant ces molécules sont désormais recherchées et cultivées de manière intensive lorsque cela est possible. Cependant, de nombreuses contraintes, qu'elles soient d'ordre climatique, ou liées à la complexité des procédés d'extraction, altèrent la quantité et la qualité de la production (**Curtin M.E. ; 1983**). La synthèse chimique également, est souvent trop onéreuse pour être rentable et parfois même, impossible. Compte tenu de la complexité chimique de ces molécules. De plus, nous assistons depuis plusieurs années à un regain d'intérêt pour les molécules dites 'naturelles'. Dès lors, et compte tenu des enjeux économiques, la production de métabolites secondaires par un matériel végétal cultivé *in vitro* devient potentiellement intéressante (**Bouque V. ; 1997**).

Grace à la biotechnologie, de nombreux métabolites secondaires végétaux ont trouvé une application commerciale en tant que médicaments, colorants, arômes, parfums, insecticides, etc, (**Verpoorte R. et al., 2002**). Cette biotechnologie qui est une science multidisciplinaire, associe les potentialités d'une entité vivante ou une partie de cette entité à différentes techniques et procédés dans un but, économique (**Rahmani S. ; 2020**). Plusieurs métabolites secondaires sont produits avec la culture de cellules végétales, la culture d'organes et la technologie de l'ADN recombinant (**Eibl R. et al., 2009**).

Dans cette étude, deux objectifs sont envisagés : définir et résumer les différents métabolites secondaires d'intérêt pharmaceutiques et alimentaires, et en vue d'éclaircir les procédés de synthèse biotechnologiques de ces molécules, quelques exemples de métabolites secondaires sont traités.

Chapitre I

Les métabolites secondaires

I.1. Définition

Les plantes médicinales ont la capacité de produire des substances naturelles très diversifiées. A côté des métabolites primaires, elles accumulent fréquemment des métabolites dites secondaires qui représentent une source importante de molécules utilisables par l'homme (**Marouf A. et Joël R. ; 2007**).

Les métabolites secondaires sont des molécules organiques complexes synthétisées et accumulées en petites quantités (**Marouf A. et Joël R. ; 2007**). Ces molécules sont plus spécifiques aux plantes, bactéries et champignons. Elles sont nombreuses, d'une variété structurale extraordinaire, elles ne sont pas nécessaires et vitales pour la cellule. Elles permettent parfois une taxonomie chimique, et sont souvent impliquées dans une écologie chimique inter-espèces (**Bruneton J. ; 1999**).

I.2. Structure et Classification

Les métabolites secondaires sont des produits à structures chimiques souvent complexes, très dispersés et différentes selon les espèces, ils existent plus de 20 000 métabolites secondaires classés selon leurs structures chimiques (**Bouhmama A. ; 2013**).

Nous pouvons classer les métabolites secondaires en trois groupes, chacun renferme une très grande diversité biologique (**Bruneton J. ; 2009**) :

- Les terpènes
- Les composés phénoliques
- Les alcaloïdes

I.2.1. Terpènes

I.2.1.1. Définition

Les terpènes sont une classe d'hydrocarbures cycliques à chaîne ouverte. Ce sont des produits naturels largement répandus dans le règne végétal. Leur particularité structurale la plus importante est la présence dans leur squelette d'unités isopréniques à 5 atomes de carbone (C₅H₈) (**Paris R. et Moxse H. ; 1965**). Les terpénoïdes sont isolés à partir des feuilles, des fruits, des graines, des racines et des écorces (**Bruneton J. ; 1993**).

I.2.1.2. Structure et classification

La structure carbonée de base des terpénoïdes reconnus par Wallach dès 1887 est constituée d'un assemblage d'un nombre variable d'unités 2-méthylbutane. Ces assemblages peuvent être modifiés par ajout/soustraction de groupes méthyles ou ajout d'atomes d'oxygène. La diversité chimique des terpénoïdes végétaux provient alors de la complexité de leurs voies biosynthétiques (Figure 1) (Bohlmann J. et Keeling C.I. ; 2008).

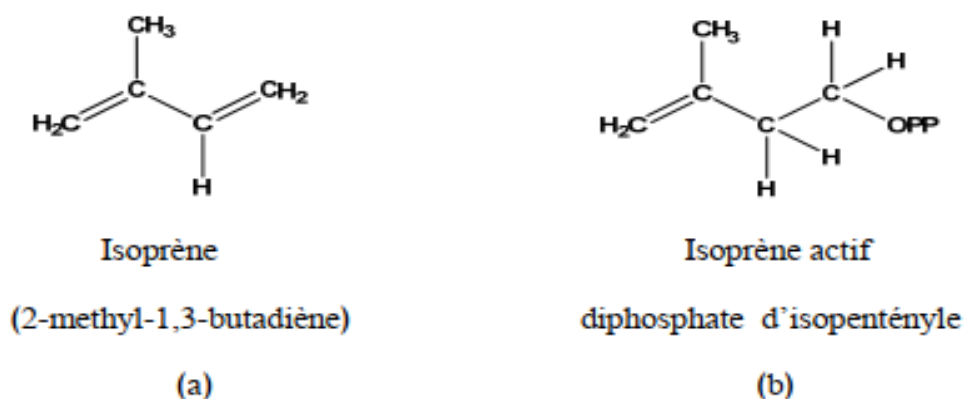


Figure 1: Structure de l'isoprène et de l'isoprène actif (Lamarti A. et al., 1994).

Les terpénoïdes sont classés selon le nombre d'unités isoprène dans leur structure de base comme illustré dans la figure 2 (McGarvey D.J. et Croteau R. ; 1995).

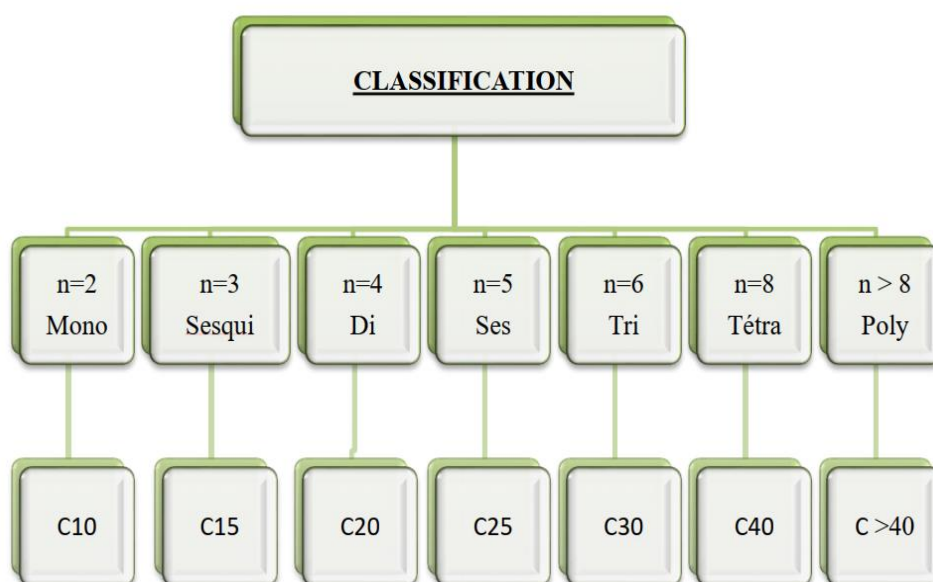
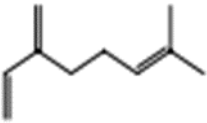
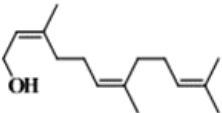
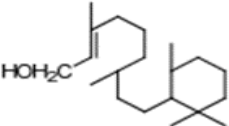
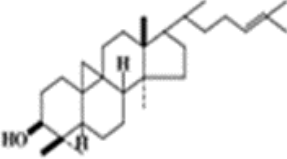
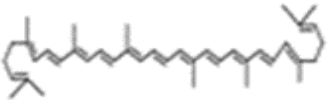
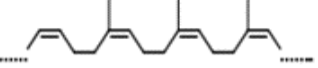


Figure 2: Classification des terpénoïdes (McGarvey D.J. et Croteau R. ; 1995).

Les squelettes isopréniques peuvent être disposés de manière linéaire ou former des anneaux, ce qui donne un spectre complet de composés terpéniques (Bruneton J. ; 1999), présenté dans le **tableau 1**.

Tableau 1: Les différentes sous classe des terpènes.

Sous-classe	Exemple	Références
Monoterpènes	Myrcène : 	Rahal S. ; (2004)
Sesquiterpènes	Farnésol : 	Guignard J.L. ; (1996)
Diterpènes	Phytol : 	Guignard J.L. et al., (1985)
Triterpènes	Phytostérols : 	Guignard J.L. et al., (1985)
Tetraterpènes	Lycopène : 	Guignard J.L. et al., (1985)
Polyterpènes	Caoutchouc : 	Ralambomananad A. ; (1998)

I.2.1.3. Voie de biosynthèse

Les voies de base de la biosynthèse de terpénoïdes ont été élucidées dans plusieurs systèmes biologiques. Les voies métaboliques des terpénoïdes végétaux sont toutes attachées à la formation de seulement deux précurseurs isomères à 5-carbones qui sont l'isopentenyl diphosphate (IPP) et le diméthylallyl diphosphate (DMAPP) (Cane D.E. ; 1999). Deux voies distinctes sont actuellement connues chez les organismes vivants pour la biosynthèse de l'IPP et du DMAPP : la voie classique du mévalonate (MVA) et la voie indépendante récemment découverte du 2-C-méthyl-D-érythritol phosphate (MEP) (Lichtenthaler H.K. ; 1999 ; Lange B.M. et al., 2000 ; Sapir-Mir M. et al., 2008).

La biosynthèse des terpénoïdes implique l'addition de l'unité isoprène avec son isomère pour former le geranyl diphosphate (GPP, C₁₀), condensé avec une autre unité IPP forment le diphosphate de farnesyl (FPP, C₁₅) à l'origine des sesquiterpènes. Les précurseurs parentaux compte tenu de la modification structurale par l'oxydation, la réduction, l'isomérisation, l'hydratation, la conjugaison et/ou d'autres transformations donnent une variété de terpénoïdes (Figure 3) (Dubey V.S. et al., 2003).

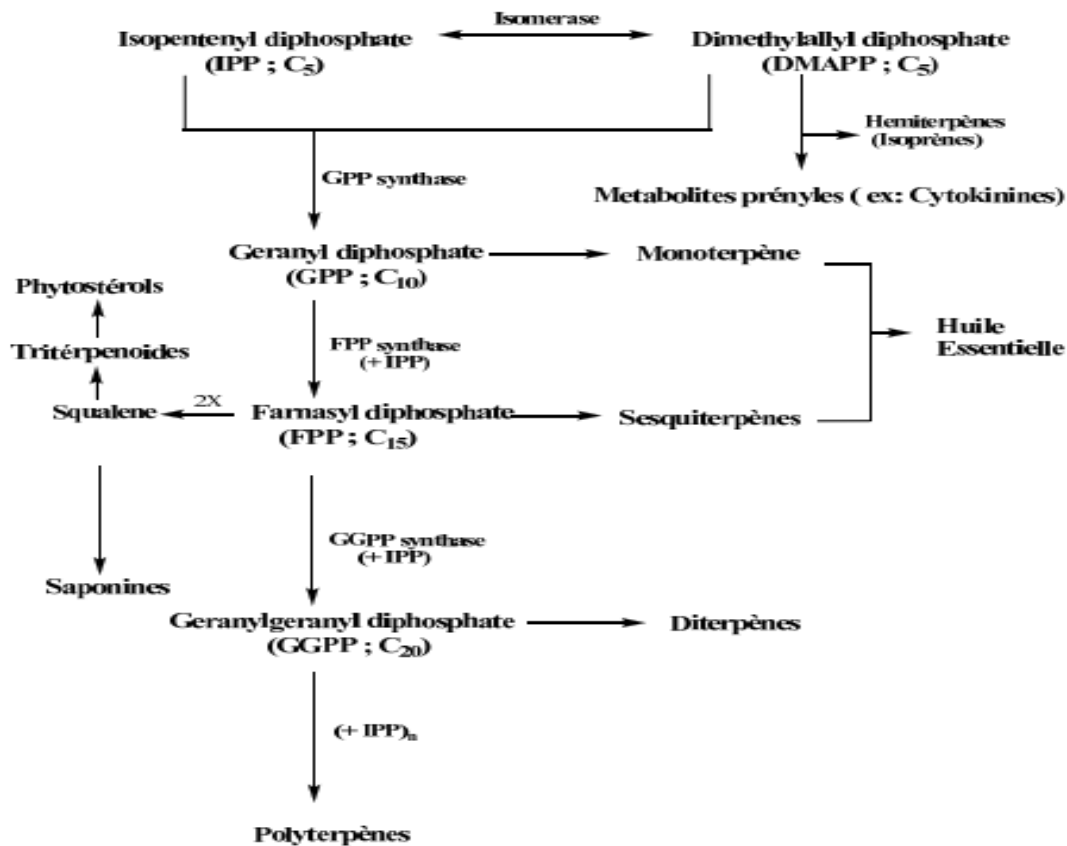


Figure 3: Synthèse de différentes classes terpéniques chez les plantes. (Dubey V.S. et al., 2003).

I.2.2. Composés phénoliques

I.2.2.1. Définition

Les composés phénoliques sont des métabolites secondaires (Macheix J.J. *et al.*, 2005), présents dans toutes les parties des végétaux (racines, tiges, feuilles, fleurs, pollens, fruits, grains et bois) (Bruneton J. ; 2009). Ils sont caractérisés par la présence d'un cycle aromatique portant des groupements hydroxyles libres ou engagés avec des glucides (Macheix J.J. *et al.*, 2005).

I.2.2.2. Structure et classification

La structure des composés phénoliques naturels varie depuis les molécules simples (acides phénoliques simples) vers les molécules les plus hautement polymérisées (tanins condensés) (Hennebelle T. *et al.*, 2004). Ils peuvent être regroupés en dizaines de classes (Amaaechina F.C. *et al.*, 2007) qui se différencient par la complexité du squelette de base, le degré de modification de ce squelette et par les liaisons possibles de ces molécules de base avec d'autres molécules (Figure 4) (Macheix J.J. *et al.*, 2006).

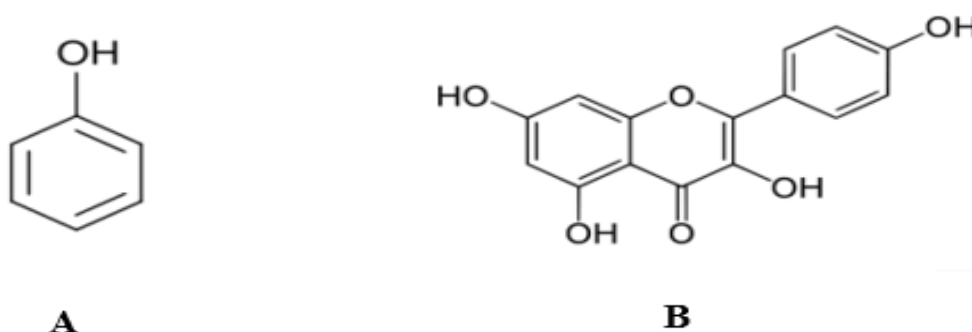


Figure 4: Structure de la molécule phénol (A) et celle d'un polyphénol (B) (Amaaechina F.C. *et al.*, 2007).

A. Acides phénoliques

Le terme acide phénolique peut être utilisé pour tous les composés organiques ayant au moins un groupe carboxyle et une fonction hydroxyphénol (Bruneton J. ; 2009).

Il existe deux classes des acides phénoliques (Amaaechina F.C. *et al.*, 2007) : les dérivés de l'acide benzoïque ou acides hydroxy-benzoïque qui ont une formule de base de type $C_6 - C_1$ et leur diversité structurale est due aux hydroxylation et/ou méthylation de noyau aromatique en diverses position (2, 3 et 4) (Figure 5) (Fleuriet A. *et al.* ; 2006). Les dérivés de l'acide cinnamique ou acides hydroxy cinnamiques dont la structure de base ($C_6 - C_3$)

dérive de celle de l'acide cinnamique grâce à des substitutions au niveau du cycle aromatique (Figure 6) (Macheix J.J. et al., 2006).

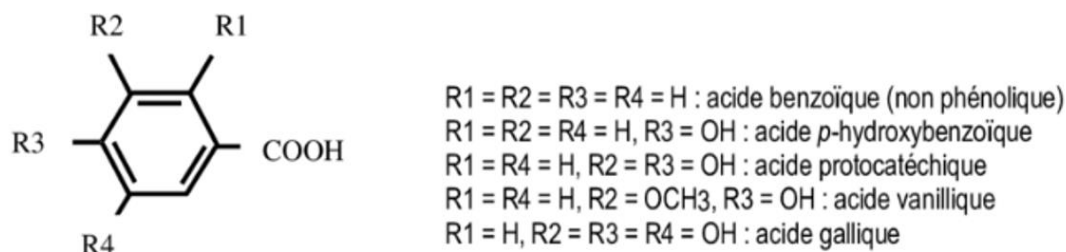


Figure 5: Structures chimiques des acides hydroxybenzoïques (Fleuriet A. et al., 2006).

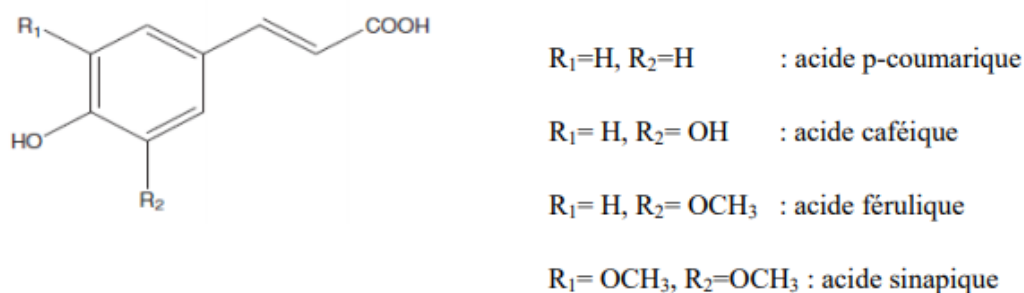


Figure 6: Quelques exemples d'acides phénols dérivés de l'acide cinnamique (C6-C3) (Amaechina F.C. et al., 2007).

B. Flavonoïdes

Plus de 4000 flavonoïdes ont été identifiés et qui représentent la plus grande partie des composés phénoliques (Manach C. et al., 2004), ont une origine biosynthétique commune dérivant de la voie de l'acide shikimique (Hennebelle T. ; 2004).

Ils possèdent un squelette carboné de quinze atomes de carbone constitué de deux cycles aromatiques (A) et (B) qui sont reliés entre eux par une chaîne en C₃ en formant ainsi l'hétérocycle (C) (Figure 7) (Ignat I. et al., 2011).

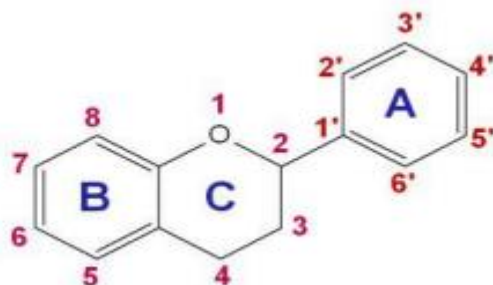
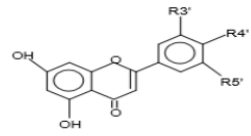
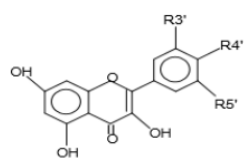
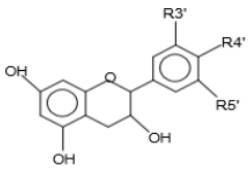
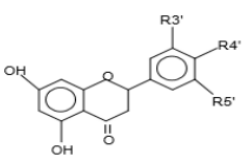
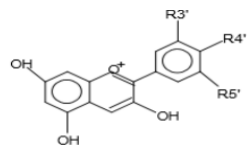
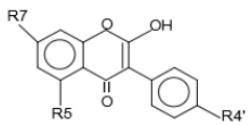


Figure 7: Squelette de base des flavonoïdes (motif flavane) avec la numérotation adoptée (Merghem R. ; 2000).

Selon le squelette, les flavonoïdes sont divisés en différentes classes (**Tableau 2**) (**Bruneton J. ; 2009**) :

Tableau 2: Quelques classes distinctes des flavonoïdes (**Manach C. et al., 2004**).

Classes	Formule	R3'	R4'	R5'	Exemple	Source
Flavones		H	OH	H	Apéginine	Persil, thym, romarin
Flavonols		OH	OH	OH	Myricetine	Canneberge, vin rouge
Flavanols		OH	OH	H	Catéchine	Thé vert, thé noir, pomme
Flavanones		H	OH	H	Naringénine	Fruits des genres <i>citrus</i>
Anthocyanes		OH	OH	H	Cyanidine	myrtille, cassis
Isoflavones		R5 OH	R7 OH	R4' OH	Genisteine	Soja

C. Tannins

Les tanins sont définis comme des composés phénoliques hydrosolubles, de masse moléculaire comprise entre 500 et 3000 (**Frutos P. et al., 2004**).

Deux grands groupes de tanins ont été distingués, différents à la fois par leur réactivité chimique et par leur composition : les tanins hydrolysables et les tanins condensés (**Figure 8**) (**Macheix, J.J. et al., 2006**).

- Tannins hydrolysables (THs) : Sont des oligo ou poly-esters d'un sucre, en général le glucose, associés à des molécules d'acide phénol (**Ignat I. et al., 2011**).

- Tannins condensés (TCs) : Sont des polyphénols appartenant à la famille des flavonoïdes (**fleuriet A. et al., 2006**).

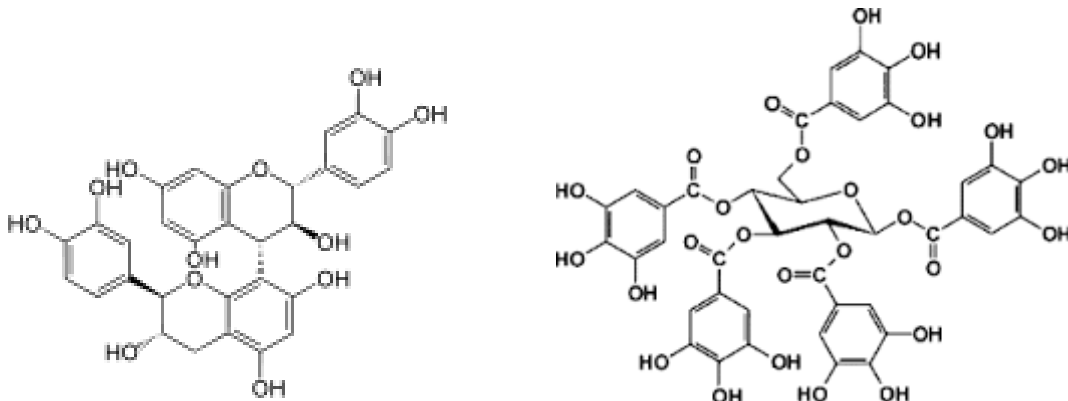


Figure 8: Exemple d'un tannin hydrolysable à gauche et un autre condensé droit (**Merghem R. ; 2000**).

D. Coumarines

Les coumarines sont des composés phénoliques cyclisés qui dérivent des acides t-cinnamique et p-coumarique pour la majorité d'entre eux. Leur structure est donnée dans la **figure 9** (**Khan M.A. et al., 2005**). Ils sont des 2H-1-benzopyran-2-ones que l'on peut considérer, en premier approximation, comme étant les lactones des acides 2-hydroxy-7ècinnamiques (**Bruneton J. ; 2009**), distribués dans tous le règne végétal et possèdent des propriétés très diverses (**Ignat I. et al., 2011**).

Dans la cellule, les coumarines sont principalement présentes sous forme glycosylée. Cette glycosylation serait une forme de stockage permettant d'éviter les effets toxiques des coumarines sur la cellule et la croissance (**Hennebelle T. et al., 2004**).

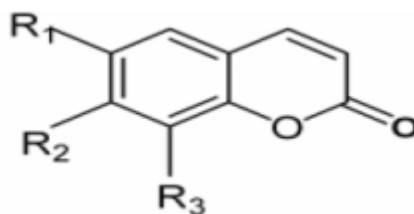


Figure 9: Structure de base des coumarines (**Ford R.A. et al. ; 2001**).

I.2.2.3. Voie de biosynthèse

Les polyphénols sont synthétisés à partir de deux voies biosynthétiques (**Akroum S. ; 2011**) :

A. Voie de l'acide shikimique

Dans cette voie, l'érythrose 4-phosphate et le phosphoénol pyruvate sont produits par les hydrates de carbones lors de leur dégradation par la voie des pentoses phosphate et la glycolyse respectivement (Macheix J.J. et al. ; 2006).

B. Voie de l'acide acétique

La voie acétate-malonate, rappelle que c'est la malonyl-CoA qui fournit par décarboxylation, les unités C₂ pour allonger le complexe acyl CoA. L'acide polycétonique formé se referme en un cycle portant une chaîne latérale (Nacz M. et Shahidi F. ; 2004).

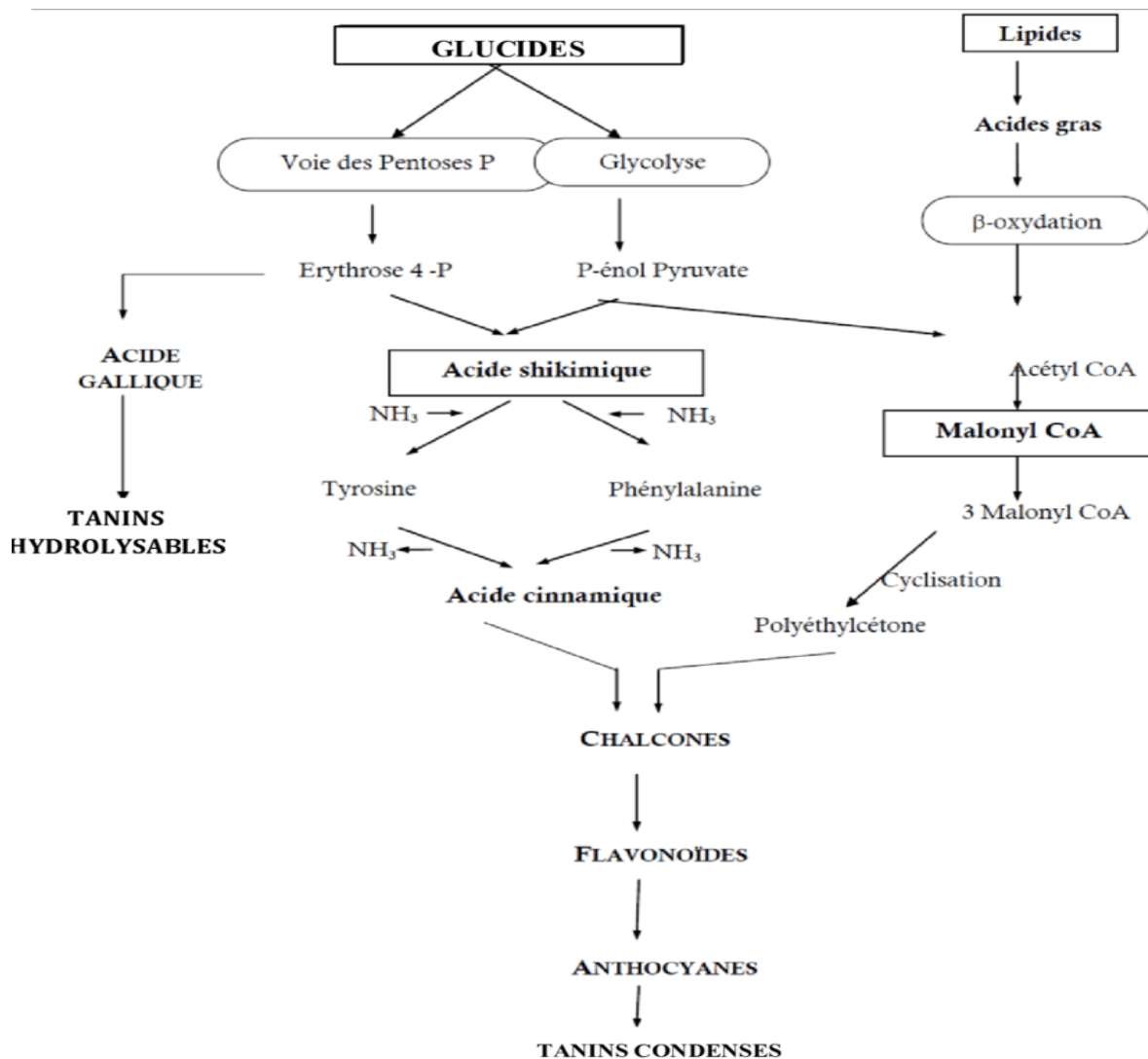


Figure 10: Représentation des voies de biosynthèse des polyphénols (Akroum S. ; 2011).

I.2.3. Alcaloïdes**I.2.3.1. Définition**

Les alcaloïdes sont les principaux métabolites secondaires azotés, la plus part ont des propriétés basiques (**Badiaga M. ; 2011**), généralement hétérocyclique, d'origine végétale, doués de propriétés physiologiques remarquables, telle que la morphine, la nicotine, la cocaïne et la quinine (**Mohammedi Z. ; 2013**). Environ 12000 composés sont synthétisés à partir des acides aminés (**Meyer S. et al., 2008**).

I.2.3.2. Structure

Selon l'origine biosynthétique, On divise les alcaloïdes en trois genres (**Rakotonanahary M. ; 2012**) :

A. Alcaloïdes vrais : ce sont des dérivés d'acides aminés, dont l'atome d'azote est inclus dans le système hétérocyclique. Ils sont présents dans les plantes, soit sous forme libre, soit sous forme de sel, soit comme N-Oxyde. (**Badiaga M. ; 2011**).

B. Pseudo-alcaloïdes : ils présentent le plus souvent toutes les caractéristiques des alcaloïdes vrais, mais ne sont pas des dérivés des acides aminés. Dans la majorité des cas connus, ce sont des dérivés d'isoprénoïdes (alcaloïdes terpéniques) et du métabolisme de l'acétate. (**Rakotonanahary M. ; 2012**).

C. Proto-alcaloïdes : ce sont des amines simples dont l'azote n'est pas inclus dans un système hétérocyclique. Ils ont un caractère basique et sont élaborés *in vivo* à partir d'acides aminés. Ils sont souvent appelés « amines biologiques » et ils sont solubles dans l'eau (**Bruneton J. ; 2009**).

I.2.3.3. Voie de biosynthèse

La biosynthèse des alcaloïdes chez les plantes implique de nombreuses étapes métaboliques, catalysées par des enzymes appartenant à une large gamme de familles de protéines; pour cette raison, les voies de biosynthèse des alcaloïdes sont considérablement complexes (**Facchini P.J. ; 2001**).

L'origine des alcaloïdes remontent aux acides aminés entre autres (**Mauro N. M.; 2006**) : l'ornithine, la lysine, la phénylalanine, la tyrosine, le tryptophane, l'histidine et l'acide

anthranilique (Mamadou B. ; 2011). Il y a quelques branches principales dans la synthèse des alcaloïdes qui incluent :

- **Biosynthèse des alcaloïdes tropiques et nicotiniques**

Dans ce groupe d'alcaloïdes, la biosynthèse est réalisée à partir des composés L-Arginine et Ornithine. Ils subissent un processus de décarboxylation par leurs enzymes respectives: l'arginine décarboxylase et l'ornithine décarboxylase.

Le produit de ces réactions sont des molécules putrines. Après d'autres étapes, qui incluent le transfert de groupes méthyle, des dérivés nicotiniques (tels que la nicotine) et des tropiques (tels que l'atropine et la scopolamine) sont produits (Facchini P.J. 2001).

- **Biosynthèse des alcaloïdes benzyloquinoléines**

La synthèse des alcaloïdes de ce groupe commence à partir de molécules de L-tyrosine, qui sont décarboxylées par l'enzyme tyrosine décarboxylase pour donner naissance à des molécules de tyramine.

L'enzyme norcoclaurine synthase utilise la tyramine produite à l'étape précédente et la L-DOPA pour former des molécules de norcoclaurine; ils subissent une autre série de réactions complexes pour donner naissance aux alcaloïdes berbérine, morphine et codéine (Ziegler J. et Facchini P.J.;2008).

- **Biosynthèse d'alcaloïdes indoliques terpéniques**

Ce groupe d'alcaloïdes est synthétisés à partir de deux voies: l'une partant du L-tryptophane et l'autre du géraniol. Les produits de ces voies sont la tryptamine et la sécolaganine, ces molécules sont le substrat de l'enzyme estreptosidina synthase, qui catalyse la synthèse de la strictosidine (De Luca V. et St Pierre B. ; 2000).

I.3. Rôle des métabolites secondaires

I.3.1. Pour la plante

Les métabolites secondaires interviennent dans l'adaptation de la plante à son environnement ainsi que la régulation des symbioses et d'autres interactions plantes-animaux

(Judd W.S. *et al.*, 2002), la défense contre les prédateurs et les pathogènes, comme agents alléopathiques ou pour attirer les agents chargés de la pollinisation ou de la dissémination des fruits (Bruneton J. ; 2009). Ces fonctions écologiques affectent énormément la survie de la plante (Judd W.S. *et al.*, 2002).

I.3.2. Pour l'Homme

Les métabolites secondaires ont des intérêts qui peuvent s'avérer essentiels (Hennebelle T. ; 2004) et dont on peut citer :

- **Métabolites secondaires d'intérêt pharmaceutique**

Les métabolites secondaires ont de nombreuses utilisations en milieu thérapeutique (Chebili S. ; 2012). Les terpènes, non cycliques sont en grande partie responsables de l'odeur suave des plantes et des fleurs. Ces substances possèdent des propriétés pharmacodynamiques très variées, en relation avec les différentes fonctions liées au squelette terpénique. Ils sont pourvus de plusieurs propriétés thérapeutiques comme les propriétés anti-hypertensives, anti-virales, anti-tumorales, anti-inflammatoires et analgésiques, anti-oxydantes, et anti-bactériennes vis-à-vis du MRSA (Staphylocoque doré résistant à la méticilline) (Parisr R. et Moxse H. ; 1965).

Les composés phénoliques jouent un rôle important dans l'utilisation en milieu thérapeutique telle que les flavonoïdes comme anti-oxydants naturels, anti-cancéreuses, anti-histaminique, anti-inflammatoire, et anti-septiques urinaires (Manach C. *et al.*, 2004).

Les métabolites secondaires de type alcaloïdes sont utilisées dans plusieurs médicaments, ils affectent chez l'être humain le système nerveux particulièrement les transmetteurs chimiques tels l'acétyl-choline, norepinephrine, acide γ aminobutyrique (GABA), dopamine et la serotonine (Badiaga M. ; 2011). Ils sont doués d'activité analgésique, anti-allergique, antipyrétiques, anti-parasitaires, anti-tumorale (sur différents modèles de tumeurs humaines, du poumon, du colon et des ovaires), et ils sont utilisés en ophtalmologie dans le traitement du glaucome (Berkal G. et Bouchama S. ; 2016).

- **Métabolites secondaires d'intérêt alimentaire**

Dans les aliments, les métabolites secondaires peuvent contribuer à l'amertume (principalement les flavanones), l'astringence, la couleur, la flaveur, l'odeur et la stabilité de l'oxydation de l'aliment (**Dih A. et Belguendouz A. ; 2017**).

Parmi ces métabolites considérés comme condiments, linalol, myrcène, caryophyllène ou β -caryophyllène (molécules terpénique), tanin (molécules phénolique), alcaloïde tropanique et aromates comme limonène (molécules terpénique), flavonoïdes, anthocyanine (molécules phénolique), eucalyptol ou cinéol. Ces molécules ont été et reste très liées à leurs propriétés organoleptiques, mais également trouvent leur utilisation comme suppléments diététiques (**Mohammedi Z. ; 2006**).

Chapitre II

Production biotechnologique de métabolites secondaires

II.1. Généralités

II.1.1 Définition

C'est l'application des principes de la science et de l'ingénierie au traitement de matériaux par des agents biologiques pour obtenir des produits et des services (**Niosi J. ; 2006**). Les voies biotechnologiques sont toutes les méthodes ou technologies qui utilisent des éléments du vivant (organismes, cellules, éléments subcellulaires ou moléculaires) pour trouver, produire ou transformer des éléments ou organismes d'origine végétale ou animale (**Arnold L.D. ; 2000**).

Le concept central de cette section est que la biotechnologie est de nos jours un domaine très large de la recherche scientifique et le terme «biotechnologie» englobe de nombreux applications et spécialités qui abordent des thématiques différentes (**Chevallier M. ; 1990**), y compris la biotechnologie rouge qui est destinée à la médecine (exp : production de vaccins et d'antibiotiques), la biotechnologie verte pour l'agriculture (exp : production de variétés végétales modifiées), la biotechnologie jaune liée à l'environnement (exemple : entretien de la biodiversité et la dépollution), la biotechnologie blanche qui correspond à l'industrie (exp : développement de nouvelles sources d'énergies durables comme les biocarburants) et la biotechnologie bleue accordée à la mer (exp : production de biomatériaux et agents pharmaceutiques régénératifs) (**Sinisterra J.V. ; 1992**).

II.1.2 Techniques de base en biotechnologie

La biotechnologie est une science novatrice qui se base sur plusieurs techniques, parmi elles (**Trouvin J.H. ; 2003**) :

II.1.2.1 Fermentation

La fermentation est une réaction biochimique de conversion de l'énergie chimique contenue dans une source de carbone (souvent du glucose) en une autre forme d'énergie directement utilisable par la cellule en l'absence de dioxygène (**Baduel P. ; 2002**) :

- **Fermentation sur milieu solide** : Les procédés de fermentation en milieu solide sont appliqués pour la production d'antibiotiques, de métabolites secondaires, d'enzymes industrielles, de produits alimentaires enrichis, de biocarburants, d'acides organiques,

d'hormones végétales (exp : champignons dépollueurs ou comestible)
(Andriambololona T. ; 2010).

II.1.2.2 Culture cellulaire

Les cultures cellulaires ont pour but de maintenir en vie et d'assurer la prolifération des cellules d'un tissu en dehors de l'organisme animal ou végétal indépendamment des influences qu'exerce l'organisme sur ces différents éléments (Chevallier M. ; 1990).

La culture *in vitro* de cellules, de tissus et d'organes offre une approche alternative attrayante et une solution appropriée aux problèmes associés à la production traditionnelle pour fournir des phytoconstituants aussi importants à partir de diverses cultures médicinales (Mulabagal V. et Tsay H.S. ; 2004).

De plus, des méthodes ont été développées pour la production de biomasse et de métabolites bioactifs à partir de bioréacteurs industriels à grande échelle pour les cultures cellulaires (Malik S. et al., 2011) et les cultures de racines de nombreuses plantes (Wu C.H. et al., 2018).

II.1.2.3 ADN recombinant et génie génétique

La biologie moléculaire a permis la découverte de la biotechnologie : il est aujourd'hui possible de séparer le gène responsable de la codification de la production de certaines substances, de le transférer dans un autre organisme-hôte et de produire ainsi certaines molécules utiles de manière plus efficace (Trouvin J.H. ; 2003).

Au moyen de la technique de l'ADN recombinant, il est possible de modifier de façon sélective les gènes qui codifient la synthèse cellulaire des molécules. Par la suite, lors du transfert du nouvel ADN dans un microorganisme-hôte, on peut obtenir une nouvelle souche qui produira la substance souhaitée (Zha J. et al., 2019).

II.2. Production de métabolites secondaires d'intérêt pharmaceutique

II.2.1. Production de flavonolignanes de *Silybum marianum* L. (chardon-Marie)

II.2.1.1. Généralités

La plante de chardon-Marie est considérée comme l'une des plantes médicinales importantes pour protéger le foie et traiter une gamme de maladies hépatiques (Abenavoli L.

et *al.*, 2010 ; Abenavoli L. et Milic N. ; 2017). L'application thérapeutique de *S. marianum* dans le traitement des maladies cardiovasculaires a été décrite dans le plus grand livre médical officiel en Chine, Taiping Shenghui Fang, avant le Xème siècle après JC (Zhao Z. et *al.*, 2019). *S. marianum* est une plante médicinale herbacée annuelle/biennale de la famille des astéracées. Cette plante est répandue dans le monde entier et cultivée depuis des siècles dans toute l'Europe, l'Afrique, la Chine, l'Inde et l'Australie, mais indigène de la région méditerranéenne (Polyak S.J. et *al.*, 2013).

Les fruits (akènes) de *S. marianum* contiennent un mélange de flavonolignanes (Figure 11), collectivement connus sous le nom de silymarine, un hépato-protecteur de haute valeur (Elateeq A.A. et *al.*, 2020).

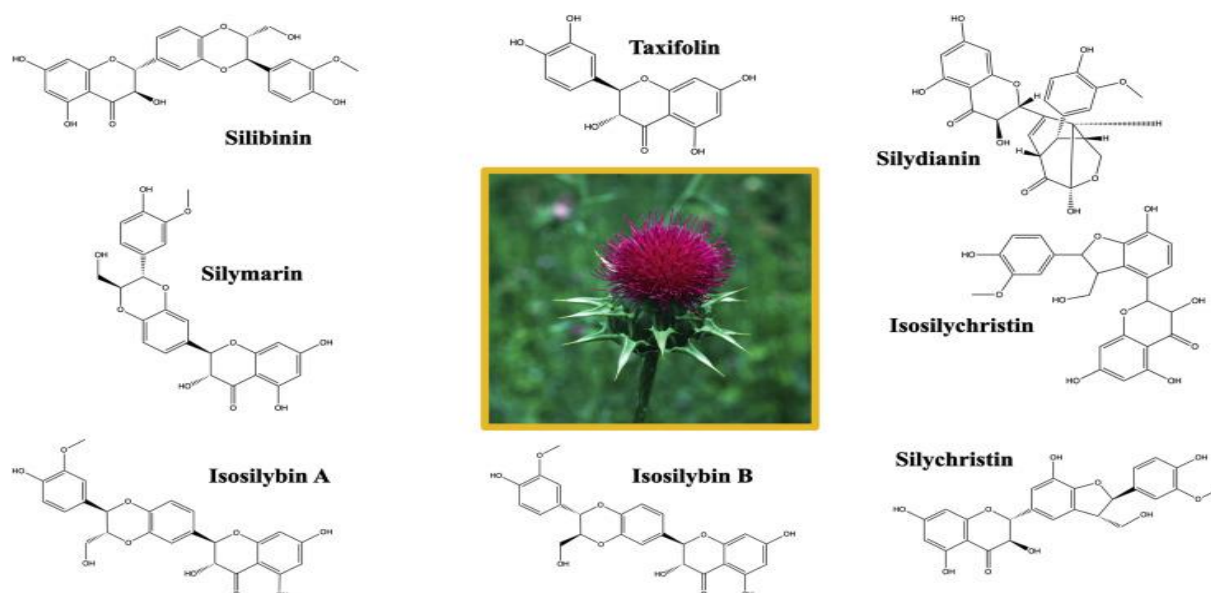


Figure 11: Mélanges de flavonolignanes (Elateeq A.A. et *al.*, 2020).

La silymarine et ses flavonolignanes sont disponibles dans le commerce dans diverses formulations contenant des extraits de fruits tels que des extraits liquides, des capsules et des comprimés, et également en combinaison avec des médicaments chimiques synthétiques ou d'autres matières végétales (Elateeq A.A. et *al.*, 2020). Les flavonolignanes du chardon-Marie sont synthétisés par la voie des phénylpropanoïdes à partir des précurseurs d'un flavonoïde (principalement la taxifoline) et de l'alcool coniférylique par la radicalisation oxydative de ces deux composés, suivie du couplage des deux radicaux (Dewick P.M. ; 2002). Ces deux précurseurs entraînent la voie du phénylpropanoïde à différentes branches (Le Roy J. et *al.*, 2017).

II.2.1.2. Méthodes de production de silymarine par des techniques biotechnologiques

Etant donné que *S. marianum* se comporte comme une plante annuelle d'hiver, le cycle de croissance prend des mois à un an pour produire les fruits secs permettant d'extraire la silymarine. Par conséquent, pour atteindre une productivité élevée de la silymarine pour la production commerciale, le développement de méthodes et de procédés de culture est nécessaire. Il est à noter que le chardon-Marie est une plante épineuse. Les épines mesurent de 1 à 5 cm de longueur et se trouvent sur les tiges, les feuilles et les réceptacles, présentant quelques difficultés lors de la récolte des fruits. Les fruits ont des pappus et sont dispersés au stade de maturité. Par conséquent, la récolte doit être effectuée lorsque 40 à 50 % des inflorescences ont un pappus visible (**Andrzejewska J. et Sadowska K. ; 2008**), avant que les fruits ne s'ouvrent (stade de déhiscence) et que les fruits s'envolent après maturation, car ces fruits entièrement desséchés avec la couleur brun foncé donne la plus forte teneur en silymarine (**Carrier D.J. et al., 2003**).

Avec la forte demande de silymarine, il existe un besoin urgent d'utiliser la production biotechnologique comme source potentielle (**Mulabagal V. et Tsay H.S. ; 2004**). Pour *S. marianum*, la manipulation des milieux de culture tissulaire et des paramètres micro-environnementaux, ainsi que la stratégie d'élicitation ont considérablement amélioré l'accumulation de silymarine dans diverses cultures (**Gabr A.M.M. et al., 2016 ; Younas M. et al., 2018 ; Shah M. et al., 2019**).

A. Production de silymarine *in vitro* chez *S. marianum***• Cultures de cals**

- Le tissu de cals est obtenu à partir d'explants cultivés sur un milieu solide modifié dans des conditions *in vitro* (**Sharafzadeh S. ; 2012 ; Bosila H. et al., 2016**).

- Des graines stériles de chardon-Marie sont germées sur un milieu de culture solide, elles deviennent brun orangé après avoir été stérilisées avec de l'hypochlorite de sodium à 1% pendant 20 min (**Murashige T. et Skoog F. ; 1962**).

- Des morceaux en uniforme sont prélevés sur le cotylédon, l'hypocotyle et la racine, qui sont excisés dans des semis *in vitro*, et transférés dans des milieux modifiés contenant des régulateurs de croissance des plantes (PGR) pour l'induction de cals (**Siwach P. et al., 2011**).

- Acide indole-3-acétique (IAA), acide indole-3-butyrique (IBA) et cytokinines Kinétine (Kin), la 6-benzyl adénine (BA), l'isopentényladénine (2ip) sont supplémentées selon différentes combinaisons aux milieux de culture du chardon-Marie pour l'initiation des cals (Gamborg O.L. et al., 1968).

• Cultures en suspension cellulaire

- La cal friable transférée dans des flacons contenant un milieu liquide et incubée à l'obscurité sur un agitateur (90-130 tr/min). Il est préférable d'établir des cultures en suspension cellulaire à partir de cellules de cal friable nouvellement formées (Tůmovà L. et al., 2005 ; Cacho M. et al., 2010).

- Les cellules de chardon-Marie dans les cultures en suspension sécrètent des composés de silymarine et des flavonoïdes dans le milieu liquide des suspensions par un transport actif, en particulier lors des traitements d'élicitation (Tůmovà L. et al., 2011 ; Corchete P. et Bru R. ; 2013).

- Les enzymes phospholipase D et phospholipase A2 sont également connues pour médier la sécrétion de silymarine dans le milieu de culture de *S. marianum* (0,3-0,6 mg / 50 ml) (Madrid E. et Corchete P. ; 2010 ; Corchete P. et Fernandez-Tarrgo J. ; 2014).

• Cultures de racines adventives

- La régénération des racines a été obtenue avec succès à partir d'explants de feuilles (2–4 mm) cultivés sur un milieu MS (Murashige et Skoog) modifié avec 2 mg/L de NAA (acide 1-naphtalèneacétique) et 0,2 mg/L de Kin (cytokinines Kinétine Kin) (John S.A. et Koperuncholan M. ; 2012).

- Après 4 semaines d'incubation sous un cycle lumière/obscurité de 16/8 h, environ 74 % d'induction racinaire et 34 racines par explant ont été observés sur MS contenant 4 % de saccharose et 1 mg/L de NAA (Khan M.A. et al., 2015).

• Cultures de racines velues

- Il y a des conditions à considérer lors de l'établissement d'un système racinaire velu, y compris une souche bactérienne d'*Agrobacterium rhizogenes*, un explant approprié, un

antibiotique approprié après la période de co-culture, des milieux de culture appropriés et des conditions d'incubation (**Hu Z.B. et Du M. ; 2006**).

- Bien que les racines velues puissent pousser sans PGR (régulateurs de croissance des plantes), l'ajout d'auxines au milieu de croissance peut améliorer les taux de croissance des racines velues et leur capacité à synthétiser différents composés. La supplémentation en NAA (0,1 mg/L) à la culture de racines velues de chardon-Marie a entraîné une production plus élevée de silymarine (0,15 mg/g) et un taux de croissance plus élevé (3,04 g) (**Hasanloo T. et al., 2009**).

B. Stimuler la production de silymarine dans les cultures *in vitro* de *S. marianum*

Après avoir établi divers types de cultures *in vitro*, d'autres applications de différents traitements sont utilisées pour améliorer l'accumulation de constituants bioactifs en augmentant la capacité de biosynthèse des cals, des cellules, des racines et des pousses cultivés. Différentes manières, y compris la sélection de lignées à haut rendement, l'optimisation des milieux de production et des conditions de culture, l'élicitation et l'alimentation des précurseurs ont été utilisées pour améliorer l'accumulation de silymarine dans les cultures de chardon-Marie en quantités allant de 0,45 à 18,67 mg/g dans les cultures de cals (**Younas M. et al., 2018 ; Hasanloo T. et al., 2008**), 0,21 à 19,00 mg/g dans les suspensions cellulaires (**Elwekeel A. et al., 2012 ; Tůmovà L. et al., 2011**), et 0,11-1,89 mg/g dans les cultures de racines velues (**Rahnama H. et al., 2008 ; Khalili M. et al., 2009**)

II.2.2. Production biotechnologique des flavonoïdes méthylés

II.2.2.1. Généralités

Naturellement, les flavonoïdes sont souvent sous forme glycosylée ou méthylée dans les plantes. La glycosylation des flavonoïdes se réalise par un outil biologique, la glycosyltransférase, dans lequel l'enzyme catalyse la fixation de la molécule de sucre dans l'aglycone, ce qui donne des glycosides (**Gantt R.W. et al., 2011 ; Thuan N.H. et al., 2013**). De la même manière, la méthylation du groupe hydroxyle dans les flavonoïdes se produit en présence de méthyltransférase qui attache des fragments méthyle à l'aglycone pour former des méthoxydes (**Cao H. et al., 2013 ; Walle T. ; 2007**).

La méthylation peut se produire via un atome d'oxygène ou de carbone pour former des composés O-méthylés ou C-méthylés (**Cao H. et al., 2013 ; Walle T. ; 2007**). Les dérivés O-

méthylés sont formés via la fixation du groupe méthyle avec l'oxygène de la fraction hydroxyle dans le squelette flavonoïde (**Kim D.H. et al., 2005**).

La méthylation de ces flavonoïdes pharmaceutiquement importants peut donner aux composés un avantage concurrentiel. La méthylation des groupes hydroxyle libres dans les flavonoïdes augmente considérablement leur stabilité métabolique et améliore leur transport membranaire, facilitant l'absorption et une plus grande biodisponibilité orale (**Wen X. et Walle T. ; 2006 ; T. Walle et al., 2007**). À l'appui de cela, Les flavones mono et diméthylées ont montré une puissante activité antiproliférative (**Murakami A. et al., 2002**). Ils ont inhibé la transcription et les activités du cytochrome P450 (CYP) activateur de cancer (**Morley K.L. et al., 2007**).

Les recherches actuelles suggèrent que les formes méthylées ont une stabilité métabolique, une biodisponibilité orale et une activité biologique plus élevées que les formes non méthylées. L'accent est mis sur l'effet de la modification de la méthylation sur les composés originaux, y compris l'augmentation de la stabilité métabolique et l'amélioration des propriétés biologiques (**Koirala N. et al., 2016**).

Les bioactivités du flavonoïde C-méthylé ont été vérifiées en tant qu'inhibiteurs de la neuraminidase pour la nouvelle grippe H₁N₁ (**Dao T.T. et al., 2010**), effet antioxydant (**Mathiesen L. et al., 1995 ; Malterud K.E. et al., 1996**).

II.2.2.2. Progrès biotechnologiques récents pour la méthylation des flavonoïdes

A. Méthyltransferases

- S-Adénosyl-l-méthionine (AdoMet) O-méthyltransferases (OMT) dépendants fonctionne en transférant le fragment méthyle à un groupe hydroxyle d'un composé accepteur a entraîné la formation de son dérivé d'éther méthylique et S-adénosyle-l-homocystéine (**Ibrahim R.K. et al., 1998**).

- Les classes I et II des OMT fonctionnent dans la méthylation des résidus hydroxyles phénoliques, tandis que les OMT de classe III fonctionnent sur les groupes carboxyle pour obtenir des esters méthyliques (**Kopycki J.G. et al., 2008 ; Qin J.C. et al., 2012**).

- Cinq régions hautement conservées sont proposées comme signature pour les O-méthyltransférases végétales, dont deux (régions I et IV) seraient impliquées respectivement dans la S-adenosyl-l-méthionine et la liaison aux métaux (**Ibrahim R.K. et al., 1998**).

B. Réaction enzymatique *in vitro*

De nombreuses O-méthyltransférases putatives ont été extraites de bactéries, de champignons et de plantes pour caractériser leur substrat en tant que flavonoïdes (**Poulton J.E. et al., 1977**). Par exemple, la lutéoline, la lutéoline 7-O-glucoside, ont été utilisées comme substrat pour une O-méthyltransférase après purification à partir de culture cellulaire en suspension de soja, puis ils ont été clonés et exprimés dans *Escherichia coli* (**Cho M.H. et al., 2012**).

C. Synthèse biotechnologique moderne

Les méthodes de biosynthèse basées sur la reconstruction de plasmides recombinants abritant des gènes de diverses sources et utilisant *E. coli* génétiquement modifié comme hôte conduisant à la génération de nombreux produits naturels et non naturels (**Thuan N.H. et al., 2013**). Grâce à la combinaison de conditions optimisées et de la production de cofacteur, le rendement maximal de la 7-O-méthyl génistéine était de 164 M (46,74 mg/L) et celui de la 7-O-méthyl daidzéine était de 382 M (102,75 mg/L) lorsque 200 M de génistéine et 400 M de daidzéine ont été supplémentés dans la culture fed batch (**Koirala N. et al., 2015**). Pour ajouter, une série de gènes biosynthétiques de flavonoïdes a été clonée dans des plasmides recombinants pour convertir l'acide p-coumarique en naringénine et dihydrokaempférol. Les auteurs peuvent générer du dihydrokaempférol en utilisant la naringénine comme substrat avant de convertir ce composé en 7-O-méthyl-aromadendrine finale. Le rendement en 7-OMA dépendait de la concentration d'acide p-coumarique dans l'alimentation et atteignait 30 mg/L (99,2 M) après 24 h (**Malla S. et al., 2012**). Sur le plan biochimique, la biosynthèse de ces composés est illustrée dans la **figure 12** ci-dessous :

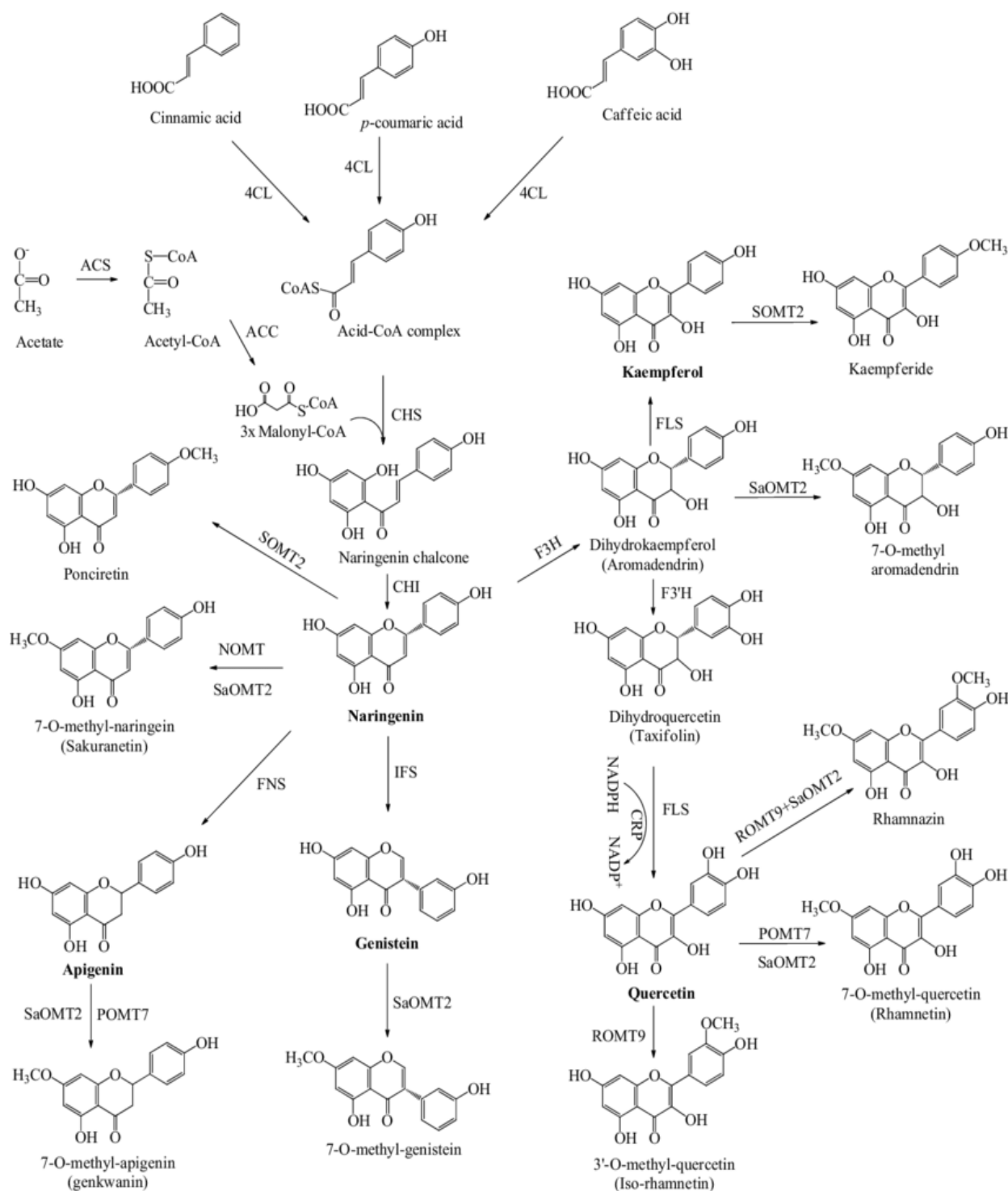


Figure 12: Ingénierie métabolique pour la synthèse biologique de divers flavonoïdes méthylés (Malla S. et al., 2012).

**II.3. Méthodes de production de métabolite secondaire d'intérêt
alimentaire****II.3.1. Voie d'ingénierie enzymatique pour la production de flavonoïdes chez les
microbes recombinants**

Comme alternative, les cellules microbiennes peuvent être utilisées pour synthétiser des flavonoïdes de manière durable et économique par des approches d'ingénierie métabolique (Chemler J.A. et Koffas M.A. ; 2008 ; Wang J. et al., 2016). Les usines de cellules microbiennes présentent des avantages distincts par rapport à l'extraction de plantes et à la synthèse chimique en termes de production de flavonoïdes. Par exemple, cette stratégie est respectueuse de l'environnement, à un traitement en aval facile et fournit une production stable. Les souches microbiennes peuvent être facilement cultivées et des outils d'ingénierie métabolique sophistiqués sont disponibles pour des modifications d'ingénierie métabolique élaborées. De plus, cette approche a également le potentiel de produire de nouveaux dérivés flavonoïdes qui pourraient avoir de nouvelles applications pharmaceutiques ou nutraceutiques comme des colorants et des arômes naturelles (Fowler Z.L. et al., 2011 ; Leonard E. et al., 2008).

II.3.2.1. Stratégies d'ingénierie appliquées pour améliorer la fonctionnalité enzymatique

La construction d'une plate-forme microbienne efficace pour produire divers flavonoïdes dans les micro-organismes nécessite une compréhension approfondie des enzymes de la voie métabolique chez leurs hôtes naturels. Ces informations dépendent de l'exploration de la cinétique de la réaction enzymatique, la préférence du substrat, la structure, l'évolution enzymatique et des propriétés biochimiques, etc, (Zha J. et al., 2019). En outre, les stratégies appliquées pour exprimer fonctionnellement ces enzymes dans des microbes recombinants afin d'améliorer la production de flavonoïdes sont présentés ci-dessous :

A. Optimisation des codons pour une meilleure expression

En raison du biais de codons entre les hôtes végétaux indigènes et les hôtes microbiens modifiés, l'expression des gènes de la voie des flavonoïdes végétaux dans les microbes est souvent difficile. En conséquence, l'optimisation des codons est généralement utilisée en fonction de la préférence d'utilisation des codons dans l'espèce microbienne à utiliser (Figure 13. 1) (Zha J. et al., 2019).

B. Ingénierie de fusion pour une expression et une activité enzymatiques améliorées

La fusion traductionnelle de plusieurs enzymes par étapes successives est une autre méthode efficace pour améliorer les performances enzymatiques. De telles fusions peuvent maximiser les concentrations locales de substrats pour chaque enzyme dans le système de fusion, permettant à plusieurs réactions de se dérouler efficacement tout en minimisant la dégradation des intermédiaires instables ou en réduisant les effets négatifs des intermédiaires toxiques (**figure 13. 2**) (**Springob K. et al., 2003**).

C. Assemblage d'enzymes de la voie par des échafaudages

La fusion des enzymes de la voie est une stratégie courante et utile, mais très souvent une telle fusion directe provoque un mauvais repliement et une perte de fonction. Alternativement, l'échafaudage d'ADN ou de protéines fournit un moyen d'assembler des enzymes de voie avec des activités catalytiques améliorées (**Figure 13.3**) (**Conrado R.J. et al., 2011**).

D. Suppression du peptide signal pour améliorer l'expression

L'expression hétérologue de certaines enzymes de la voie des flavonoïdes, telles que les hydroxylases, chez les procaryotes est parfois difficile et, généralement, les gènes doivent être modifiés avant leur expression fonctionnelle (**Figure 13.4**) (**Zha J. et al., 2019**). la version tronquée de la flavone 6-hydroxylase de *Scutellaria baicalensis* a montré une activité 10 fois plus élevée que la version pleine longueur dans la production de baicaléine dans *E. coli*, et la fusion de l'enzyme tronquée avec une étiquette d'expression a élevé l'activité par 2 fois (**Li J. et al., 2019**). Une compréhension complète du processus de transfert d'électrons dans le complexe enzymatique tronqué et la reconstruction d'un canal efficace pour le transfert d'électrons donneront lieu à des hydroxylases plus efficaces et solubles pour une application dans les souches procaryotes (**Zha J. et al., 2019**).

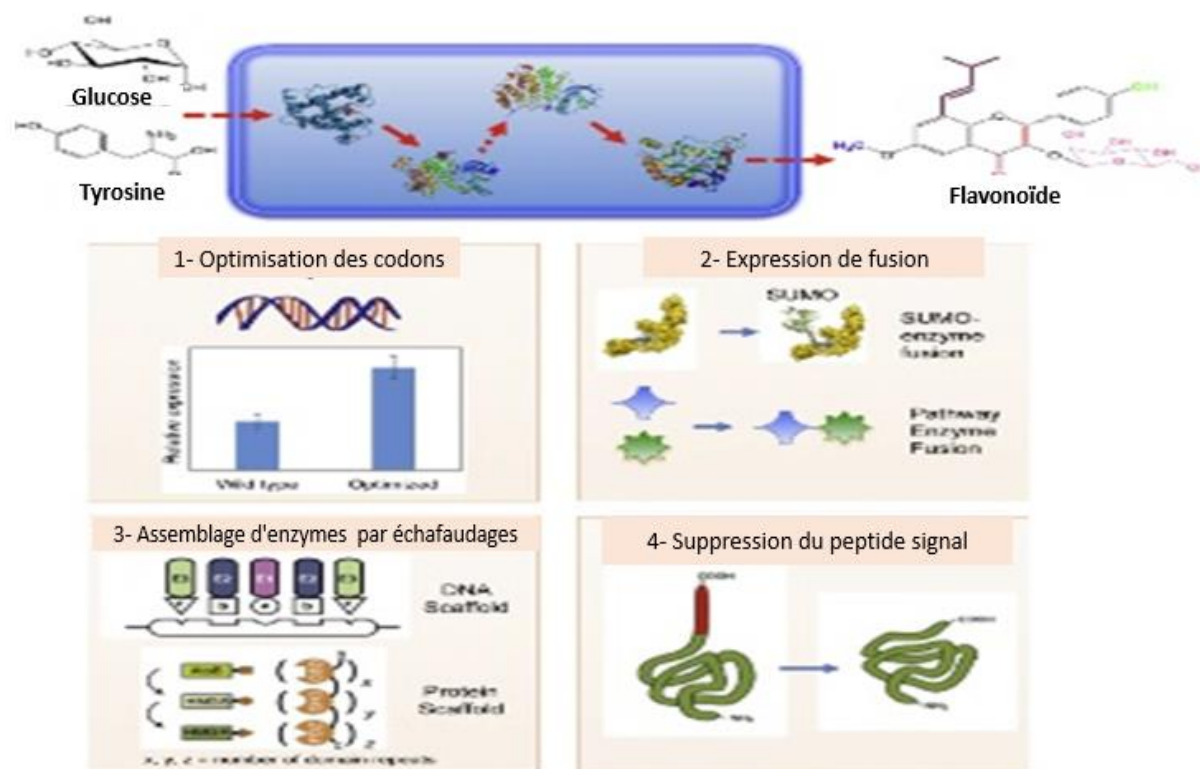


Figure 13: Les approches fréquemment utilisées dans l'ingénierie des enzymes de la voie des flavonoïdes (Conrado R.J. et al., 2011; Dueber J.E. et al., 2009).

II.3.2. Production d'alcaloïdes *in vitro* à partir de tissus de *Datura stramonium L.*

II.3.2.1. Généralité

Le datura stramoine, *Datura stramonium L.* est une plante annuelle de la famille des Solanacées (Schmelzer G.H. et al., 2008), vigoureuse mesurant 1 à 2 mètres de haut (Daniel M. ; 2006) à tige robuste, creuse, simple, droite (Nelson L. et al., 2007). Les feuilles sont alternes, simples, ovale et portées sur des petits pétioles. A l'état frais, elles dégagent quand on les écrase une odeur nettement désagréables (Masurel T.C.E. ; 2007). Elle est d'origine mexicaines (Boullard B. ; 2001), pousse bien dans les endroits ouverts et ensoleillés et dans les sols légers, riches en matières organiques et bien drainés (Board N. ; 2004).

D. stramonium L. renferme des alcaloïdes de nature tropanique dont la teneur oscille entre 0,2 et 0,6% de la plante sèche (Gaillard Y. et al., 2001). Les deux principaux sont l'hyoscyamine et la scopolamine (Figure 14), répartis en 1/3 de scopolamine et 2/3 d'hyoscyamine ou atropine (Aroukou H. et al., 2003) sont utilisés principalement pour la production d'huile. La nécessité de surveiller la présence d'alcaloïdes tropanique dans l'huile de canola s'est imposée afin d'empêcher une exposition accidentelle chez l'humain et de

protéger la qualité des récoltes de cette plante pour la filière canadienne de l'agriculture (Mulder P.P. et al., 2016).

Les produits alimentaires à base de cette plante ou de leurs produits dérivés contiennent plus souvent des alcaloïdes tropaniques : les céréales et leurs produits dérivés; les produits sans gluten ; les compléments alimentaires ; le thé et les tisanes; les légumineuses (séchées) et les graines oléagineuses (Gaillard Y. et al., 2001).

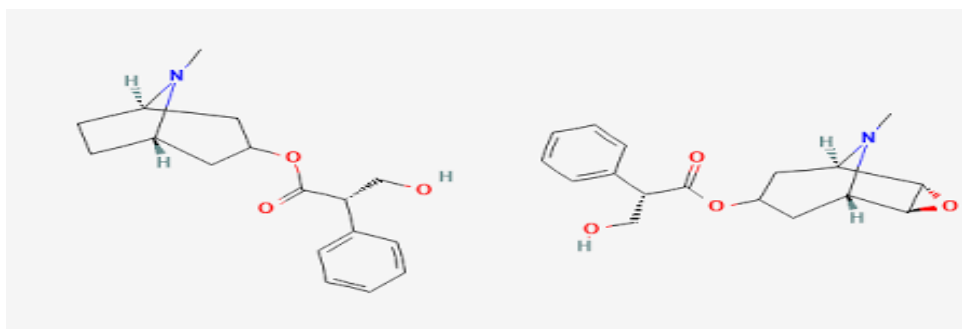


Figure 14: Structure de l'hyoscyamine (à gauche) et la scopolamine (à droite) (Bruneton J. ; 2016).

Ces alcaloïdes sont localisés dans toutes les parties de la plantes, mais avec des concentrations diverses (Gaillard Y. et al., 2001). Les alcaloïdes de *Datura* sont formés dans les racines et sont transportés aux feuilles, aux fleurs et finalement aux fruits (Schmelzer G.H. et al., 2008). Ils apparaissent quelques heures après la germination des graines (Milcent R. et Chau F. ; 2003).

La germination des graines de *Datura* peut se faire *in vitro* (Rezine R. ; 2004), les meilleures germinations sont obtenues avec les graines scarifiées et non trempées dans l'eau (Khelifi-Slaoui M. et al., 2005). La régénération peut se faire soit directement à partir de morceaux de plante mère tels que les feuilles, tiges, racines soit à partir de cals organogènes (Kurian A. et Sankar M.A. ; 2007).

II.3.2.2. Production d'alcaloïdes tropanique *in vitro* chez *Datura stramonium L*

La recherche sur la biosynthèse des alcaloïdes tropaniques est considérablement facilitée par le développement des techniques de cultures *in vitro*. Celles-ci constituent une source alternative pour la production des métabolites secondaires valables. Elles peuvent être divisées en deux classes principales, les cultures de tissus indifférenciés et les cultures de tissus différenciés (Eckhart W. et Wink M. ; 2004).

A. Culture de tissus indifférenciés (cals et suspensions cellulaires)

- **Cals**

Des travaux de production d'alcaloïdes à partir de divers explants de *Datura* sont menés avec succès par culture de cals. Les cals obtenus sur fragment d'entre nœuds du *D. stramonium*, *D. innoxia* et *D. odorata* contiennent de scopolamine et de l'hyoscyamine dont les teneurs sont variables en fonction de l'apparence des cals (**Lindsey K. et Yeomen M.M. ; 1993**).

La présence d'atropine et de scopolamine dans les cals semi hyalins issus des parties basales de feuilles de *D. stramonium* cultivés sous serre et sous une photopériode de 16h (**Iranbakhsh A. et al., 2006**). Par contre, la meilleur teneur en scopolamine chez *D. metel* est obtenu surtout dans les racines, que dans les feuilles et les tiges (**Raoufa A. et al., 2008**).

Des explants (fragment d'environ 0,5cm feuilles, racines) issus de vitro-semis âgés de 2 mois de *D. stramonium* est réalisé sur milieu MS additionné de 0,02 mg/l d'NAA et de 0,2 mg/l de BAP (6-Benzyle Amino Purine) répéter 40 fois. La culture est conduite à une température de $26 \pm 1^\circ\text{C}$ et sous une photopériode de 16h de lumières et 8h d'obscurité. Les cals sont séparées du milieu de culture puis séchés pendant 48h à 60°C , ils sont ensuite pesés pour déterminer la biomasse sèche (**Eckhart W. et Wink M. ; 2004**).

- **Suspensions cellulaires**

Chez le *Datura*, des protocoles d'établissement des suspensions cellulaires à partir de cals sont mis au point et étudiés par plusieurs auteurs et ceci dans le but d'améliorer la production d'alcaloïdes. Chez *D. stramonium*, les alcaloïdes tropanique peuvent être biosynthétisés dans des cultures de cellules en suspensions dans des flacons agitateurs et bioréacteurs (**Schmelzer G.H. et al., 2008**).

Ballica R. et al., 1993 ont montré que la quantité d'alcaloïdes tropaniques dans une culture de cellules en présence de la phénylalanine et de l'ornithine est 5 fois plus élevée que celle de la culture témoin. Par ailleurs, sur des suspensions cellulaires issues de cals de feuilles dans le milieu MS contenant 0,5 mg/l de Kinetine et 2 mg/l d'ADN, l'addition de 30 à 40 g/l de glucose et 20 à 40 g/l de saccharose conduit à un niveau plus élevé de la production

d'alcaloïdes et de biomasse. Par contre l'augmentation de la concentration du nitrate entraîne la réduction de la teneur en alcaloïdes (**Iranbakhsh A. et al., 2007**).

B. Tissus différenciés (Chevelus racinaires)

Les chevelus racinaires cultivés *in vitro* ont la capacité d'accumuler des métabolites secondaires qui sont normalement accumulées uniquement dans les parties aériennes de la plante intacte (**Kim Y. et al., 2002**), peuvent également produire de nouveaux composés qui ne peuvent pas être synthétisés par les racines non transformées (**HU Z.B. et Du M. ; 2006**).

Chez les chevelus racinaires de *D. stramonium*, l'hyoscyamine est une composante majeure de la fraction d'alcaloïdes et il représente au moins 0,3% de matière sèche, comparable aux plantes de *D. stramonium* cultivées en pot à partir desquelles les cultures sont lancées (**Payne J. et al., 1987**).

Le genre *Datura* est largement étudié pour la production des alcaloïdes à partir de chevelus racinaires, les meilleures concentrations testées sont : 1,10 g/l KNO₃, 0,17g/l KH₂PO₄ et 40 g/l de saccharose pour les diploïdies et de 1,10 g/l KNO₃, 0,17g/l KH₂PO₄ et 50 g/l de saccharose pour les tétraploïdes (**Pavlov A.I. et al., 2009**).

Conclusion

Conclusion

Les métabolites secondaires constituent un groupe de produits naturels qui sont explorés pour des propriétés pharmaceutiques et alimentaires très divers. Depuis des périodes très anciennes ces substances naturelles ont joué un rôle important dans la découverte de nouveaux agents thérapeutiques et leurs propriétés organoleptiques.

La demande en produits d'origine végétale est en forte croissance et la production de métabolites secondaires par l'intermédiaire de cultures aux champs est parfois insuffisante à cause de rendements limités. Les chercheurs se tournent donc vers de nouvelles voies de production en faisant appel à la biotechnologie qui consiste à utiliser des microorganismes, ainsi que des cellules végétales et animales afin de produire des matières, notamment des aliments, des médicaments et des produits chimiques utiles à l'humanité.

La biotechnologie se base sur plusieurs techniques parmi elles la fermentation, la culture cellulaire et l'ADN recombinant. Ces dernières sont utilisées dans la production des métabolites secondaires d'intérêt pharmaceutique tels que la production de flavonolignanes de *Silybum μmarianum L*, et les flavonoïdes méthylés ainsi que des molécules d'intérêt alimentaire tels que la production de flavonoïdes chez les microbes recombinants, et la production d'alcaloïdes *in vitro* à partir de tissus de *Datura stramonium L*.

Bien que la biotechnologie a un impact positif sur les différents domaines d'utilisation, mais d'un autre angle cette voie a des affections négatives, par exemple la stimulation de la dépression agricole, des risques pour l'environnement et pour la santé (listériose, maladies dues à l'alimentation animale, réactions allergiques aux aliments), des pollutions de toutes sortes et éventuel réchauffement de la terre, des érosion de la diversité génétique des espèces (restriction éventuelle de cultivars, variétés et écotypes) et la pollution par les transgènes véhiculés par le pollen des plantes.

Bibliographie

Bibliographie

- **Abenavoli L., Capasso R., Milic N. et Capasso F., (2010).** Milk thistle in liver diseases: past, present, future. *Phytother Res.* 24 (10), p 1423–1432.
- **Abenavoli L. et Milic N., (2017).** Silymarin for liver disease. In: Muriel P. Ed *Liver Pathophysiology: Therapies and Antioxidants*. Academic Press, p 621–631.
- **Agati, G., Tattini, M., 2010.** Multiple functional roles of flavonoids in photoprotection. *New Phytol.* 186, p 786–793.
- **Akroum S., (2011).** Etude Analytique et Biologique des Flavonoïdes Naturels. Thèse de doctorat. Université Mentouri de Constantine, p125.
- **Amaaechina F.C., Ayid B.A. et Omagbai E.K., (2007).** Pharmacognosy and hypotensive evaluation of focus exasperate vahl leaf. *Acta poloniae pharmaceutica* 64: p543-546.
- **Andrzejewska J. et Sadowska K., (2008).** Effect of cultivation conditions on the variability and interrelation of yield and raw material quality in milk thistle (*Silybum marianum* (L.) Gaertn.). *Acta Sci. Pol. Agric.* 7 (3), p 3–11.
- **Aroukou H., Matray M.D., Bragança C., Mpaka J.P., Chinello L., Castaing F., Bartou C et Poisot P., (2003).** L'intoxication volontaire par ingestion de *Datura Stramonium*. Une autre cause d'hospitalisation des jeunes en quête de sensations fortes. *Annales de médecine interne*, 154(1), p 46-50.
- **Avbelj M., Gaber R., Koprivnjak T., Mori J., Glavnik V., Vovk I., Bencina M., Hodnik V., Anderluh G., Dueber J.E., Jerala R. et DeLisa M.P., (2011).** DNA-guided assembly of biosynthetic pathways promotes improved catalytic efficiency. *Nucleic Acids Res.* 40, p 1879–1889.
- **Badiaga M., (2011).** Etude ethnobotanique, phytochimique et activités biologiques de *Nauclea Latifolia* Smith une plante médicinale africaine récoltée au Mali. thèse de doctorat, université de Bamako, p10.
- **Ballica R., Ryn D.D.Y et Kado C.I., (1993).** Tropane alkaloid production in *Datura stramonium* suspension cultures: Elicitor and precursor effects. *Biotechnology and Bioengineering*, 41(11), p 1075-1081.
- **Berkal G. et Bouchama S. (2016).** Etude phytochimique et activités biologiques d'une plante médicinale : *Euphorbia characias* L. Thèse de doctorat en Biochimie Moléculaire et Santé. Université des Frères Mentouri. Constantine. p60.
- **Board N., (2004).** Hand book on herbs cultivation and processing. Ed, Asia Pacific Business Press Inc. New Delhi, p 400.

Bibliographie

- **Bohlmann J. et Keeling C. I., (2008).** Terpenoid biomaterials. *Plant J.* 54, p 656-669.
- **Bouque V., (1997).** Etude de la production de métabolites secondaires par des cultures *in vitro* de Psoralées. Thèse de doctorat en Sciences agronomiques. Vandœuvre-lès-Nancy, p 1-2.
- **Bosila H., Hamza M.A. et El-Ateeq A.A., (2016).** Enhancement of callus growth and hyoscyamine alkaloid production in *Hyoscyamus muticus* by nanotechnology, biotic elicitor and precursor. *Int. J. Chem. Res.* 9 (7), p 135–142.
- **Bouhmama A., (2013).** Contribution à l'étude du pouvoir antimicrobien des extraits de feuilles de *Pergularia tomentosa* L. de la région d'Adrar. Thèse de doctorat en Biologie. Université de Tlemcen. Tlemcen. p 56.
- **Boullard B., (2001).** Plantes médicinales du monde : réalités et croyances. Ed. ESTEM, Paris, p 636.
- **Bruneton J., (1993).** Elément de phytochimie et de pharmacognosie, Technique et documentation Lavoisier, Paris. p 915
- **Bruneton J., (1999).** Pharmacognosie, phytochimie, plantes médicinales. Ed. TEC et DOC, Paris. p 54.
- **Bruneton J., (2009).** Pharmacognosie, phytochimie, plantes médicinales. 4ème Ed, lavoisier. Paris. p 259-1211
- **Bruneton J., (2016).** Pharmacognosie, phytochimie, plantes médicinales. Ed Tec et doc. Paris.5, p 1487.
- **Cacho M., Domínguez A.T. et Elena-Rossello J.A., (2010).** Are polyamines directly involved in silymarin production in the milk thistle [*Silybum marianum* (L) Gaernt]? *Plant Cell Tissue Organ Cult.* 103 (3), p 361–368.
- **Cacho M., Moràn M., Corchete P. et Fernandez-Tàrrago J., (1999).** Influence of medium composition on the accumulation of flavonolignans in cultured cells of *Silybum marianum* (L.) Gaertn. *Plant Sci.* 144, p 63–68.
- **Cane D. E. (1999).** *Comprehensive Natural Products Chemistry: Isoprenoids Including Carotenoids and Steroids.* Elsevier, Amsterdam, Netherland. p 155-200.
- **Carrier D.J., Crowe T., Sokhansanj S., Wahab J. et Barl B., (2003).** Milk thistle, *Silybum marianum* (L.) Gaertn., flower head development and associated marker compound profile. *J. Herbs Spices Med. Plants* 10 (1), 65–74.

- **Cao H., Jing X., Wu D. et Shi Y., (2013).** Methylation of genistein and kaempferol improves their affinities for proteins, *Int. J. Food Sci. Nutr.* 64, p 437–443.
- **Chebili S. (2012).** Extraction et caractérisation des alcaloïdes quinolizidiniques de *Cytisus triflorus* l'Hérit. Et l'étude de leurs activités antimicrobienne et antioxydante. Thèse de doctorat en Biologie. Université M'Hamed Bougara. Boumerdès. p 96.
- **Chemler J.A. et Koffas M.A., (2008).** Metabolic engineering for plant natural product biosynthesis in microbes. *Curr. Opin. Biotechnol.* 19, p 597–605.
- **Chevallier M.D., (1990).** Les applications des biotechnologies à l'agriculture et à l'industrie agro-alimentaire. Office parlementaire d'évaluations des choix scientifiques et technologiques. n°1, p 21-26.
- **Cho J.H., Lim Y., Ahn J.H. et Rhee S., (2007).** Crystallization and preliminary X-ray diffraction analysis of BcOMT2 from *Bacillus cereus*: a family of O-methyltransferase. *J. Microbiol. Biotechnol.* 17, p 369–372.
- **Cockell, K.S., Knowland, J., (1999).** Ultraviolet radiation screening compounds. *Biol. Rev.* 74, p 311–345.
- **Conrado R.J., Wu G.C., Boock J.T., Xu H., Chen S.Y., Lebar T., Turnsek J., Tomsic N., Avbelj M., Gaber R., Koprivnjak T., Mori J., Glavnik V., Vovk I., Bencina M., Hodnik V., Anderluh G., Dueber J.E., Jerala R. et DeLisa M.P., (2011).** DNA-guided assembly of biosynthetic pathways promotes improved catalytic efficiency. *Nucleic Acids Res.* 40, p 1879–1889.
- **Corchete P. et Bru, R., (2013).** Proteome alterations monitored by DIGE analysis in *Silybum marianum* cell cultures elicited with methyl jasmonate and methyl B cyclodextrin. *J. Proteom* 85, p 99–108.
- **Corchete P. et Fernandez-Tarrgo J., (2014).** Involvement of phospholipase A2 in the release of silymarin to the culture medium of *Silybum marianum* cell suspensions. *Biol. Plant* 58 (1), p 147–152.
- **Cress B.F., Leitz Q.D., Kim D.C., Amore T.D., Suzuki J.Y., Linhardt R.J. et Koffas M.A.G., (2017).** CRISPRi-mediated metabolic engineering of *E. coli* for O-methylated anthocyanin production. *Microb. Cell Factories* 16, p 10.
- **Cui X.H., Murthy H.N. et Paek, K.Y., (2014).** Production of adventitious root biomass and bioactive compounds from *Hypericum perforatum* L. through large scale bioreactor cultures. In: Paek, K.Y., Murthy, H., Zhong, J.J. (Eds.), *Production of*

- Biomass and Bioactive Compounds Using Bioreactor Technology. Springer, Dordrecht, p 251–283.
- **Curtin M.E., (1983).** Harvesting profitable products from plant tissue culture. *Biotechnology*. 1, p 649-657.
 - **Daniel M., (2006).** Medicinal plants: Chemistry and proprieties. Ed. Science publishers, Enfiled New Hampshire, p 276.
 - **De Luca V. et St Pierre B., (2000).** La biologie cellulaire et développementale de la biosynthèse des alcaloïdes. *Tendances en phytologie*, 5(4), p 168-173.
 - **Dewick P.M., (2002).** The shikimate pathway: aromatic amino acids and phenylpropanoids. In Dewick, P.M. (Ed.), Medicinal Natural Products. A Biosynthetic Approach. John Wiley & Sons, West Sussex, UK, p 121–166.
 - **Dih A. et Belguendouz A., (2017).** Contribution à l'étude phytochimique et évaluation du pouvoir antioxydant des alcaloïdes extraits d'*Osyris alba* L, récoltée au niveau de la région de Beni-Snousse. Tlemcen. Thèse de doctorat en biologie. Université Abou-Bekr Belkaïd. Tlemcen. p 39.
 - **Dubey V.S., Bhalla R. et Luthira R., (2003).** An overview of the normevalonate pathway for terpenoid biosynthesis in plants, *J. Biosci*, 28(5), p 637-646.
 - **Dueber J.E., Wu G.C., Malmirchegini G.R., Moon T.S., Petzold C.J., Ullal A.V., Prather K.L. et Keasling J.D., (2009).** Synthetic protein scaffolds provide modular control over metabolic flux. *Nat. Biotechnol.* 27, p 753–759.
 - **Dutta, D., Puzari, K.C., Gogoi, R., Dutta, P., (2014).** Endophytes: exploitation as a tool in plant protection. *Braz. Arch. Biol. Technol.* 57 (5), p 621–629.
 - **Eckhart W. et Wink M., (2004).** Biotechnology potential of hairy root culture. Recent progress in medicinal plants. *Biotechnology and Genetic Engineering*, v 4, p 441-453.
 - **Eibl R., Werner S. et Eibl D., (2009).** Disposable Bioreactors for Plant Liquid Cultures at Litre-scale. *Eng. Life Sci.*, 9(3), p 156-164.
 - **El-Maghraby, O.M.O., Shebany, Y.M., (2014).** Detection of mycotoxin produce by endophytic fungi. *Int. J. Life Sci. Res.* 2 (4), p 37–42.
 - **El Sherif F., Khattab S., Ibrahim A.K. et Ahmed S.A., (2013).** Improved silymarin content in elicited multiple shoot cultures of *Silybum marianum* L. *Physiol. Mol. Biol. Plants* 19 (1), p 127–136.

- **Elateeq A.A., Sun Y., Nxumalo W. et Gabr M.M.A., (2020).** Biotechnological production of silymarin in *Silybum marianum* L.: A review. *J. BCAB*. 29: p 101-775.
- **Elwekeel A., Abou Zid S., Sokkar N. et Elfishway A., (2012).** Studies on flavanolignans from cultured cells of *Silybum marianum*. *Acta Physiol. Plant*. 34, p 1445–1449.
- **Facchini P.J., (2001).** Biosynthèse des alcaloïdes chez les plantes: biochimie, biologie cellulaire, régulation moléculaire et ingénierie métabolique. *Revue annuelle de biologie végétale*, 52(1), p 29-66.
- **Fleuriet A., machiex J.L. et Sarni-manchado P., (2006).** Composés phénoliques dans la plante. Structure, biosynthèse, représentation et rôle des polyphénols en agroalimentaire CHEYNIER V. SARNI-MANCHADO P. Lavoisier et document, Paris, p 300-398.
- **Ford R.A., Hawkins D.R. et Mayo B.C., (2001).** The in vitro dermal absorption and metabolism of coumarin by rats and by human volunteers under simulated conditions of use in fragrances. *Food and Chemical Toxicology*. 39, p 153 -162.
- **Forterre P., (2006).** Three RNA cells for ribosomal lineages and three DNA viruses to replicate their genomes: a hypothesis for the origin of cellular domain. - *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 103, p 3669-3680.
- **Fowler Z.L., Shah K., Panepinto J.C. et Koffas, M.A.G., (2011).** Development of non-natural flavanones as antimicrobial agents. *PLoS One* 6, e25681.
- **Frutos P., hervas G.F. et Amotécon G., (2004).** Review tannins and ruminant nutrition *Spanish journal of agricultural research*. 2 (2), p 191-202.
- **Furusaki S., Takeda T., (2017).** Bioreactors for plant cell culture. In: Moo-Young, M. (Ed.), *Comprehensive Biotechnology*, third ed. Pergamon, p 519–530.
- **Gabr A.M.M., Ghareeb H., El Shabrawi H.M., Smetanska I. et Bekheet S.A., (2016).** Enhancement of silymarin and phenolic compound accumulation in tissue culture of milk thistle using elicitor feeding and hairy root cultures. *J. Genet. Eng. Biotechnol.* 14 (2), 327–333.
- **Gagnault J.C., Bidet D., Gaillard M. et Perronnet J., (1997).** Stérols et stéroïdes, Paris, p 11-31.
- **Gaillard Y., Cheze M et Pepin G., (2001).** Main toxic plants responsible for human deaths. *Annales de biologie Clinique*, 59(6), p 764-765.

Bibliographie

- **Gamborg, O.L., Miller, R.A., Ojima, K., (1968).** Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells. *Exp. Cell Res.* 50 (1), 151–158.
- **Gantt R.W., Peltier-Pain P., Thorson J.S., (2011).** Enzymatic methods for glycol (diversification/randomization) of drugs and small molecules, *Nat. Prod. Rep.* 28, p 1811–1853.
- **Gauthier A., Gulick P.J. et Ibrahim P.K., (1998).** Characterization of two cDNA clones which encode O-methyltransferases for the methylation of both flavonoid and phenylpropanoid compounds, *Arch. Biochem. Biophys.* 351 243–249.
- **Guerre, P., (2015).** Ergot alkaloids produced by endophytic fungi of the genus *Epicloë*. *Toxins* 7 (3), p 773–790.
- **Guignard J.L., Cosson L. et Henry M. (1985).** *Abrégé de phytochimie*, Masson et cie, Paris, p 154-174.
- **Guignard J.L., (1996).** *Biochimie végétale*, Masson, Paris, p 255
- **Harborne J.B., (1998).** *Phytochemical methods. A guide to modern techniques of plants analysis.* Third Edition.
- **Hasanloo T., Khavari-Nejad R.A., Majidi E. et Shams Ardakani, M.R., (2008).** Flavonolignan production in cell suspension culture of *Silybum marianum*. *Pharm. Biol.* 46 (12), 876–882.
- **Hasanloo T., Sepehrifar R., Rahnama H. et Shams M.R., (2009).** Evaluation of the yeast extract signaling pathway leading to silymarin biosynthesis in milk thistle hairy root culture. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 25 (11), p 1901–1909.
- **Hennebelle T., Sahpaz S. et Bailleul F., (2004).** Polyphénols végétaux, sources, utilisations et potentiel dans la lutte contre le stress oxydatif. *Phytothér*, 1, p 3-6.
- **Hidalgo D., Martínez-Marquez A., Cusido R., Bru-Martínez R., Palazon J. et Corchete P., (2017).** *Silybum marianum* cell cultures stably transformed with *Vitis vinifera* stilbene synthase accumulate *t*-resveratrol in the extracellular medium after elicitation with methyl jasmonate or methylated β -cyclodextrins. *Eng. Life Sci.* 17, p 686–694.
- **HU Z.B. et Du M., (2006).** Hairy root and its applications in plant genetic engineering. *Journal of Integrative Plant Biology*, 48(2), p 121-127.
- **Huang T.K. et Mc Donald K.A., (2012).** Bioreactor systems for *in vitro* production of foreign proteins using plant cell cultures. *Biotechnol. Adv.* 30 (2), p 398–409.

- **Ibrahim R.K., Bruneau A. et Bantignies B., (1998).** Plant O-methyltransferases: molecular analysis, common signature and classification, *Plant Mol. Biol.* 36, p 1–10.
- **Ignat I., Volf I. et Popa I.V., (2011).** A critical review of methods for characterization of polyphenolic compounds in fruits and vegetables. *Food chemistry* 126: p 1821-1835.
- **Iranbakhsh A., Oshaghi M. et Majd A., (2006).** Distribution of atropine and scopolamine in different organs and stages of development in *Datura stramonium* L. Structure and ultra-structure of biosynthesizing cells. *Acta Biologica, Series Botanica*, 48(1), p 13-18.
- **Jean M., (2008).** Nouvelles technologies, nouvelles pensées. La convergence des NBIC. n° 15, p 63-116.
- **John S.A. et Koperuncholan M., (2012).** Direct root regeneration and indirect organogenesis in *Silybum marianum* and preliminary phytochemical, antibacterial studies of its callus. *Int. J. Pharm.* 2 (2), p 392–400.
- **Judd W.S, Campbell C.S, Kellong E.A. et Stevens P., (2002).** Botanique Systématique: une perspective Phylogénétique, Ed 1 : DEBOECK, p 84-336.
- **Khalili M., Hasanloo T. et Tabar S.K.K., (2010).** Ag+ enhanced silymarin production in hairy root cultures of *Silybum marianum* (L.) Gaertn. *Plant Omics J.* 3 (4), p 109–114.
- **Khalili M., Hasanloo T., Tabar S.K.K. et Rahnama H., (2009).** Influence of exogenous salicylic acid on flavonolignans and lipoxygenase activity in the hairy root cultures of *Silybum marianum*. *Cell Biol. Int.* 33 (9), p 988–994.
- **Khan M.A., Abbasi B.H., Shah N.A. et Yücesan B., Ali H., (2015).** Analysis of metabolic variations throughout growth and development of adventitious roots in *Silybum marianum* L. (Milk thistle), a medicinal plant. *Plant Cell Tissue Organ Cult.* 123, p 501–510.
- **Khelifi-Slaoui M., Rezine R., Amroun S., Amdoun R et Khelifi L., (2005).** Embryons somatiques et bourgeons néoformés induits sur explants issus de vitro semis de *Datura stramonium* L d'origine algérienne. Actes du séminaire international sur l'amélioration des productions végétales, Alger, p 114-118.
- **Kim Y., Wyslouzil B.E et Weathers P.J., (2002).** Secondary metabolism of hairy root cultures in bioreactors. *In Vitro Cellular and Developmental Biology Plant*, 38, p 1-10.

- **Kim D.H., Kim B.G., Lee Y., Ryu J.Y., Lim Y., Hur H.G. Et Ahn J.H., (2005).** Regiospecific methylation of naringenin to ponciretin by soybean Omethyltransferase expressed in Escherichia coli. *J. Biotechnol.* 119, p 155–162.
- **Koirala N., Pandey R.P., Van Thang D., Jung H.J. et Sohng J.K., (2014).** Glycosylation and subsequent malonylation of isoflavonoids in E. coli: strain development, production and insights into future metabolic perspectives. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 41, p 1647–1658.
- **Koirala N., Thuan N.H., Ghimire G.P., Jung H.J., Oh T.J. et Sohng J.K., (2015).** Metabolic engineering of E. coli for the production of isoflavonoid-7-O-methoxides and their biological activities, *Biotechnol. Appl. Biochem.*
- **Koirala N., Pandey R.P., Parajuli P., Jung H.J., Sohng J.K., (2016).** Enzyme and Microbial Technology. 86, p 103–116.
- **Kopycki J.G., Rauh D., Chumanevich A.A., Neumann P., Vogt T., Stubbs M.T., (2008).** Biochemical and structural analysis of substrate promiscuity in plant Mg²⁺-dependent O-methyltransferases, *J. Mol. Biol.* 378, p 154–164.
- **Kurian A. et Sankar M.A., (2007).** Medicinal plants. Ed. New India publishing agency, New Delhi, p 356.
- **Kuzuyama T., Noel J.P. et Richard S.B., (2005).** Structural basis for the promiscuous biosynthetic prenylation of aromatic natural products. *Nature* 435, p 983–987.
- **Lamarti A., Badoc A., Deffieux G., et Carde J.P., (1994).** Biogenèse des monoterpènes, *Bull soc, Pharm, Bordeaux*, 133, p 69-118.
- **Lange B. et Rujan M., (2000).** Isoprenoid biosynthesis: the evolution of two ancient and distinct pathways across genomes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97, p 13172-13177.
- **Le Roy J., Blervacq A.S., Creach A., Huss B., Hawkins S. et Neutelings G., (2017).** Spatial regulation of monolignol biosynthesis and laccase genes control developmental and stress-related lignin in flax. *BMC Plant Biol.* p 17, 124.
- **Leonard E., Yan Y., Fowler Z.L., Li Z., Lim C.G., Lim K.H. et Koffas M.A.G., (2008).** Strain improvement of recombinant Escherichia coli for efficient production of plant flavonoids. *Mol. Pharm.* 5, p 257–265.

Bibliographie

- **Li J., Tian C., Xia Y., Mutanda I., Wang K. et Wang Y., (2019).** Production of plant-specific flavones baicalein and scutellarein in an engineered *E. coli* from available phenylalanine and tyrosine. *Metab. Eng.* 52, p 124–133.
- **Li Z. et Nair Satish K., (2015).** Structural basis for specificity and flexibility in a plant 4-coumarate: CoA ligase. *Structure* 23, p 2032–2042.
- **Lichtenthaler H.K., (1999).** The 1-deoxy-D-xylulose-5-phosphate pathway of isoprenoid biosynthesis in plants. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 50, p 47-65.
- **Lindsey K. et Yeoman M.M., (1993).** The Relationship between growth rate, differentiation and alkaloid accumulation in cell cultures. *Journal of Experimental Botany*, 34(8), p 1055-1065.
- **Louie G.V., Bowman M.E., Moffitt Michelle C., Baiga T.J., Moore Bradley S. et Noel J.P., (2006).** Structural determinants and modulation of substrate specificity in phenylalanine-tyrosine ammonia-lyases. *Chem. Biol.* 13, p 1327–1338.
- **Cho M.H., Park H.L., Park J.H., Lee S.W., Bhoo S.H. et Hahn T.R., (2012).** Characterization of regiospecific flavonoid 3/5-O-methyltransferase from tomato and its application in flavonoid biotransformation, *J. Korean Soc. Appl. Biol. Chem.* 55, p 749–755.
- **Macheix J.J., Fleuriet A. et Jay-Allemand C., (2005).** Les composés phénoliques des végétaux : un exemple de métabolisme secondaire d'importance économique. PPUR Presses polytechniques. p 189-190.
- **Macheix JJ., Fleuriet A. et Chritian J.A., (2006).** Composés phénoliques dans la plante- structure, biosynthèse, répartition et rôles In « les polyphénols en agroalimentaire ». Édition Lavoisier: p 1-27.
- **Madrid E. et Corchete P., (2010).** Silymarin secretion and its elicitation by methyl jasmonate in cell cultures of *Silybum marianum* is mediated by phospholipase Diphosphatidic acid. *J. Exp. Bot.* 61 (3), p 747–754.
- **Malik S., Cusido R.M., Mirjalili M.H., Moyano E., Palazon J. et Bonfill M., (2011).** Production of the anticancer drug taxol in *Taxus baccata* suspension cultures: a review. *Process Biochem.* 46 (1), p 23–34.
- **Mamadou B., (2011).** Etude Ethnobotanique, phytochimique et activités biologiques de *Nauclea latifolia* Smith une plante médicinale africaine récoltée au mali. Thèse

pour l'obtention du grade de Docteur d'université. Université Blaise Pascal de Clermont. Ferrand. p 137.

- **Manach C., Scalbert A., Morand C., Remesy C. et Liliana J., (2004).** Polyphenols: Food sources bioavailability. *American Society for clinical Nutrition*. 79, p 727-747
- **Marouf A. et Joël R., (2007).** La botanique de A à Z. Ed. Dunod. Paris, p 66-177.
- **Masurel T.C.E., (2007).** Contributions à l'étude de la contamination de l'ancilage de maïs par des adventices toxiques : conséquence pratiques chez les bovins. Thèse de doctorat écoles nationales vétérinaire, Telous, p 108.
- **Mauro N.M., (2006).** Synthèse d'alcaloïdes biologiquement actifs : la (+)-anatoxine-a et la (±)-camptothécine, thèse doctorat, l'université Joseph Fourier Grenoble, p 13-28.
- **Malterud K.E., Diep O.H. et Sund R.B., (1996).** C-methylated dihydrochalcones from *Myrica gale* L. effects as antioxidants and as scavengers of 1, 1-diphenyl-2-picrylhydrazyl, *Pharmacol. Toxicol.* 78, p 111–116.
- **Masi, M., Nocera, P., Reveglia, P., Cimmino, A., Evidente, A., (2018).** Fungal metabolites antagonists towards plant pests and human pathogens: structure-activity relationship studies. *Molecules* 23 (4), p 834.
- **Morley K.L. et Ferguson P.J., (2007).** Koropatnick, Tangeretin and nobiletin induce G1 cell cycle arrest but not apoptosis in human breast and colon cancer cells, *Cancer Lett.* 251, p 168–178.
- **Mathiesen L., Malterud K.E. et Sund R.B., (1995).** Antioxidant activity of fruit exudate and C-methylated dihydrochalcones from *Myrica gale*, *Planta Med.* 61, p 515–518.
- **Mc Garvey D.J. et Croteau R., (1995).** Terpenoid metabolism. *Plant Cell.* 7, p 1015-1026.
- **Merghem R., (2000).** Rôle des polyphénols et tanins condensés dans l'alimentation. Thèse de doctorat. Université de Constantine, p 113-118.
- **Meyer S., Reeb C. et Bosdeveix R., (2008).** Botanique : biologie et physiologie végétales. 2 Edition Maloine. Paris. p 14-15.
- **Milcent R. et Chau F., (2003).** Bases fondamentales de la chimie organique hétérocyclique. Ed. Diffusion Presse Sciences, Les Ulis, p 845.

Bibliographie

- **Mohammedi Z., (2006).** Etude du pouvoir antimicrobien et antioxydant des huiles essentielles et flavonoïdes de quelques plantes de la région de Tlemcen. Mémoire magister. Université Abou Bakr Belkaïd Tlemcen. p 155.
- **Mulabagal V. et Tsay H.S., (2004).** Plant cell cultures - an alternative and efficient source for the production of biologically important secondary metabolites. *Int. J. Appl. Sci. Eng.* 2 (1), p 29–48.
- **Mulder P.P., Nijs M., Castellari M., Hortos M., MacDonald S., Crews C. et Stransk, M. (2016).** Occurrence of tropane alkaloids in food. *EFSA Supporting Publications*, 13, p.1-200.
- **Murakami A., Koshimizu K., Ohigashi H., Kuwahara S., Kuki W. et Takahashi Y. (2002).** Characteristic rat tissue accumulation of nobiletin, a chemopreventive polymethoxyflavonoid, in comparison with luteolin, *BioFactors (Oxford Engl.)* 16, p 73–82.
- **Murashige T. et Skoog F., (1962).** A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plantarum* 15, p 473–497.
- **Murthy H.N., Dandin V.S. et Paek K.Y., (2016).** Tools for biotechnological production of useful phytochemicals from adventitious root cultures. *Phytochemistry Rev.* 15, p 129–145.
- **Thuan N.H., Park J.W. et Sohng J.K., (2013).** Toward the production of flavone-7-O--d-glucopyranosides using *Arabidopsis* glycosyltransferase in *Escherichia coli*, *Process Biochem.* 48, p 1744–1748.
- **Thuan N.H., Pandey R.P., Thuy T.T.T., Park J.W. et Sohng J.K., (2013).** Improvement of regio-specific production of myricetin-3-O--l-rhamnoside in engineered *Escherichia coli*, *Appl. Biochem. Biotechnol.* 171, p 1956–1967.
- **Naczk M. et Shahidi F., (2004).** Extraction and analysis of phenolics in food. *Journal of Chromatography A.*v 1054, p 95–111.
- **Nelson L., Shih R.D., Balick M.J et Lampe K.F., (2007).** Handbook of poisons and injurious plants. 2nd Ed, Springer, New York, p 340.
- **Niosi J., (2006).** La biotechnologie en Amérique latine. *La chronique des Amériques*, n° 41, p 4-6.

Bibliographie

- **Pandey R.P., Parajuli P., Koffas M.A. et Sohng J.K., (2016).** Microbial production of natural and non-natural flavonoids: pathway engineering, directed evolution and systems/synthetic biology. *Biotechnol. Adv.* 34, p 634–662.
- **Paris R. et Moyse H., (1965).** Précis de matière médicale, Tome 1, Ed, Paris, MASSON et Cie (1), p 1-16.
- **Patra N. et Srivastava A.K., (2017).** Mass production of artemisinin using hairy root cultivation of *Artemisia annua* in bioreactor. In: Pavlov, A., Bley, T. Ed, *Bioprocessing of Plant in Vitro Systems. Reference Series in Phytochemistry.* Springer International Publishing, p 343–359.
- **Pavlov A.I., Georgiev V.G., Marchev A.S. et Berkov S.H., (2009).** Nutrient medium optimization for hyscyamine production in diploid and tetraploid *Datura stramonium* L. Hairy root cultures. *Word Journal of Microbiology and Biotechnology.*
- **Payne J., Hamill J.D., Robins R.J et Rhodes M.J., (1987).** Production of Hyscyamine by Hairy Root Cultures of *Datura stramonium*. *Planta Medica*, 53(5), p 474-478.
- **Polyak S.J., Ferenci P., Pawlowsky J.M., (2013).** Hepatoprotective and antiviral functions of silymarin components in hepatitis C virus infection. *Hepatology* 57 (3), p 1262–1271.
- **Pollastri, S., Tattini, M., (2011).** Flavonols: old compounds for old roles. *Ann. Bot.* 108, p 1225–1233.
- **Poulton J.E., Hahlbrock K. et Grisebach H., (1977).** O-Methylation of flavonoid substrates by a partially purified enzyme from soybean cell suspension cultures, *Arch. Biochem. Biophys.* 180, p 543–549.
- **Qin J.C., Zhang Y.M., Lang C.Y., Yao Y.H., Pan H.Y. et Li X., (2012).** Cloning and functional characterization of a caffeic acid O-methyltransferase from *Trigonella foenumgraecum* L, *Mol. Biol. Rep.* 39, p 1601–1608.
- **Rahal S., (2004).** Chimie des produits naturels et des êtres vivants. O.P.U, Alger, p. 162.
- **Rahnama H., Hasanloo T., Shams M.R. et Sepehrifar R., (2008).** Silymarin production by hairy root culture of *Silybum marianum* (L.) Gaertn. *Iran. J. Biotechnol.* 6(2), p 113–118.
- **Rakotonanahary M., (2012).** Thèse de doctorat en pharmacie d'état, université Joseph Fourier, p 16-28.

Bibliographie

- **Ralambomananad A., (1998).** Contribution à l'étude chimique de *Senecio myricaefolius* Bojer (compositae) : Composition chimique de l'huile essentielle, Insaponifiable et alcaloïdes totaux chimio taxonomie du genre *Senecio*, Thèse de doctorat, option produit naturels, Université d'Antananarivo, Madagascar.
- **Raoufa A., El-Wakil H., Abou Gabal A et Khelifa H.D., (2008).** Production of scopolamine and hyscyamine in calli and regenerated cultures of *Datura stramonium* metel. *Journal of Applied Sciences Research*, 4(12), p 1858-1866.
- **Rausher, M.D., (2001).** Co-evolution of plants and their enemies. *Nature* 411, 857–864.
- **Rezine R., (2004).** Contributions à l'étude de la germination in vitro de graines de *Datura stramonium* L et l'initiation de la callogenèse à partir de différents types d'explants. Mémoires d'ingénieur, INA, Alger, p 49.
- **Rhodes M.J.C., (1994).** Physiological roles for secondary metabolites in plants: some progress, many outstanding problems. *Plant Mol. Biol.*, p 24, 1-20.
- **Malla S., Koffas M.A.G., Kazlauskas R.J. et Kim B.G., (2012).** Production of 7-O-methyl aromadendrin, a medicinally valuable flavonoid, in *Escherichia coli*, *Appl. Environ. Microbiol.* 78, p 684–694.
- **Sanchez-Sampedro M.A., Fernandez T.J., Corchete P., (2005a).** Enhanced silymarin accumulation is related to calcium deprivation in cell suspension cultures of *Silybum marianum* (L.) Gaertn. *J. Plant Physiol.* 162, p 1177–1182.
- **Sanchez-Sampedro M.A., Fernandez T.J., Corchete, P., (2005b).** Yeast extract and methyl jasmonate-induced silymarin production in cell cultures of *Silybum marianum* (L.) Gaertn. *J. Biotechnol.* 119, p 60–69.
- **Sapir-Mir M., Mett, A. et al. (2008).** Peroxisomal localization of Arabidopsis isopentenyl diphosphate isomerases suggests that part of the plant isoprenoid mevalonic acid pathway is compartmentalized to peroxisomes. *Plant Physiol.* 148, 1219-1228.
- **Sasaki, K., Tsurumaru, Y., Yazaki, K., (2009).** Prenylation of flavonoids by biotransformation of yeast expressing plant membrane-bound prenyltransferase SfN8DT-1. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 73, 759–761.
- **Schmelzer G.H., Gurib-Fakim A., Arroo R., Bosch C.H., De Ruijter A. et Simmonds M.S.J., (2008).** *Plant Resources of Tropical Africa* 11(1). Medicinal plants 1. Ed Backhys Publishers, p 791.

- **Schroeder A.C., Kumaran S., Hicks L.M., Cahoon R.E., Halls C., Yu O. et Jez J.M., (2008).** Contributions of conserved serine and tyrosine residues to catalysis, ligand binding, and cofactor processing in the active site of tyrosine ammonia lyase. *Phytochemistry* 69, p 1496–1506.
- **Schubert H.L. et Blumenthal R.M., (2003).** Cheng, Many paths to methyltransfer: a chronicle of convergence, *Trends Biochem. Sci.* 28, p 329–335.
- **Shah M., Ullah M.A., Drouet S., Younas M., Tungmunnithum D., Giglioli-Guivarc'h N., Hano C. et Abbasi B.H., (2019).** Interactive effects of light and melatonin on biosynthesis of silymarin and anti-inflammatory potential in callus cultures of *Silybum marianum* (L.) Gaertn. *Molecules* 24 (7), p 1207.
- **Sharafzadeh S., (2012).** *In vitro* callus induction in saffron leaves. *Int. J. Pharma Bio Sci.* 3 (1), p 171–175.
- **Shahasi, A., Dubois, Y., Viljoen, A., Nico, L., Ragama, P., Niere, B., (2006).** *In vitro* antagonism of endophytic *Fusarium oxysporum* isolates against the burrowing nematode *Radopholus similis*. *Nematology* 8 (4), p 627–636.
- **Sinisterra J.V., (1992).** Application of ultrasound to biotechnology: an overview. *Ultrasonics*. v 30, n°3, p 180-185.
- **Siwach P., Grover K. et Gill A.R., (2011).** The influence of plant growth regulators. Explant nature and sucrose concentration on *in vitro* callus growth of *Thevetia peruviana* Schum. *Asian J. Biotechnol.* 3 (3), p 280–292.
- **Springob K., Nakajima J., Yamazaki M. et Saito K., (2003).** Recent advances in the biosynthesis and accumulation of anthocyanins. *Nat. Prod. Rep.* 20, p 288–303.
- **Souza, J.J., Vieira, I.J.C., Rodrigues-Filho, E., Braz-Filho, R., (2011).** Terpenoids from endophytic fungi. *Molecules* 16, p 10604–10618.
- **Stec E., Li S.M., (2012).** Mutagenesis and biochemical studies on AuaA confirmed the importance of the two conserved aspartate-rich motifs and suggested difference in the amino acids for substrate binding in membrane-bound prenyltransferases. *Arch.Microbiol.* 194, p 589–595.
- **Sun H., Li Y., Feng S., Zou W., Guo K., Fan C., Si S. et Peng L., (2013).** Analysis of five rice 4-coumarate: coenzyme A ligase enzyme activity and stress response for potential roles in lignin and flavonoid biosynthesis in rice. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 430, p 1151–1156.
- **Su, N., Lu, Y., Wu, Q., Liu, Y., Xia, Y., Xia, K., Cui, J., (2015).** UV-B-induced anthocyanin accumulation in hypocotyls of radish sprouts continues in the dark after.

- **Walle T., (2007).** Methylation of dietary flavones greatly improves their hepatic metabolic stability and intestinal absorption, *Mol. Pharm.* 4, p 826–832.
- **Teixeira Da silva J.A., (2004).** Mining the essential oils of the anthemideae, *African journal of biotechnology*, 3(12), p 706-720.
- **Trouvin J.H., (2003).** Pourquoi les OGM et la biotechnologie en thérapeutique. *Ann. pharm. Fr* 61, p 103-108
- **Dao T.T., Tung B.T., Nguyen P.H., Thuong P.T., Yoo S.S. et Kim E.H., (2010).** C-methylated flavonoids from *Cleistocalyx operculatus* and their inhibitory effects on novel influenza A (H1N1) neuraminidase, *J. Nat. Prod.* 73, p 1636–1642.
- **Tůmovà L., Gallovà K., Rimàkovà J., Doležal M. et Tůma J., (2005).** The effect of substituted amides of pyrazine-2-carboxylic acids on flavonolignan production in *Silybum marianum* culture *in vitro*. *Acta Physiol. Plant.* 27, p 357–362.
- **Tůmovà L., Tuma J. et Dolezal M., (2011).** Pyrazinecarboxamides as potential elicitors of flavonolignan and flavonoid production in *Silybum marianum* and *Ononis arvensis* cultures *in vitro*. *Molecules* 16, p 9142–9152.
- **Vannelli, T., Qi, W.W., Sweigard, J., Gatenby, A.A., Sariaslani, F.S., (2007).** Production of phydroxycinnamic acid from glucose in *Saccharomyces cerevisiae* and *Escherichia coli* by expression of heterologous genes from plants and fungi. *Metab. Eng.* 9, 142–151.
- **Verpoorte R., Contin A. et Memelink J., (2002).** Biotechnology for the Production of Plant Secondary Metabolites. *Phytochemistry Reviews*, 1, p13-25.
- **Waqas, M., Khan, A.L., Kamran, M., Hamayun, M., Kang, S.M., Kim, Y.H., Lee, I.J., (2012).** Endophytic fungi produce gibberellins and indoleacetic acid and promotes host-plant growth during stress. *Molecules* 17 (9), p 10754–10773.
- **Walle T., Wen X., Walle U.K., (2007).** Improving metabolic stability of cancer chemoprotective polyphenols, *Exp. Opin. Drug Metab. Toxicol.* 3 p 379–388.
- **Wang J., Guleria S., Koffas M.A.G. et Yan Y., (2016).** Microbial production of value added nutraceuticals. *Curr. Opin. Biotechnol.* 37, p 97–104.
- **Weymouth-Wilson A.C., (1997).** The role of carbohydrates in biologically active natural products. *Nat. Prod. Rep.* 14, p 99–110.

Bibliographie

- **Wu C.H., Tang J., Jin Z.X., Wang M., Liu Z.Q., Huang T. et Lian M.L., (2018).** Optimizing co-culture conditions of adventitious roots of *Echinacea pallida* and *Echinacea purpurea* in air-lift bioreactor systems. *Biochem. Eng. J.* 132, p 206–216.
- **Wu C.Z., Jang J.H., Woo M., Ahn J.S., Kim J.S., Hong Y.S., (2012).** Enzymatic glycosylation of nonbenzoquinone geldanamycin analogs via *Bacillus* UDP-glycosyltransferase, *Appl. Environ. Microbiol.* 78, p 7680–7686.
- **Wen X. et Walle T., (2006).** Methylated flavonoids have greatly improved intestinal absorption and metabolic stability, *Drug Metab. Dispos: Biol. Fate Chem.* 34, p 1786–1792.
- **Younas M., Drouet S., Nadeem M., Giglioli-Guivarc'h N., Hano C. et Abbasi B.H., (2018).** Differential accumulation of silymarin induced by exposure of *Silybum marianum* L. callus cultures to several spectres of monochromatic lights. *J. Photochem. Photobiol. B Biol.* 184, p 61–70.
- **Zhang Z., He Y., Huang Y., Ding L., Chen L., Liu Y., Nie Y. et Zhang X., (2018).** Development and optimization of an in vitro multienzyme synthetic system for production of kaempferol from naringenin. *J. Agric. Food Chem.* 66, p 8272–8279.
- **Zha J., Zang Y., Mattozzi M., Plassmeier J., Gupta M., Wu X., Clarkson S., Koffas M.A.G., (2019).** Metabolic engineering of *Corynebacterium glutamicum* for anthocyanin production. *Microb. Cell Factories*, p 17, 3.
- **Zhao Z., Hodge J., Wang D. et Liu Q., (2019).** New light shed on the old herb – *Silybum marianum*. *Int. J. Cardiol.* 288, p 123.
- **Ziegler J. et Facchini P.J., (2008).** Biosynthèse des alcaloïdes: métabolisme et trafic. *Revue annuelle de biologie végétale*, 59(1), p 735-769.

Résumé

Les métabolites secondaires rentrent dans la composition chimique des plantes médicinales, qui représentent une source importante de molécules utilisables par l'homme, dans l'intérêt pharmaceutique, alimentaire, agroalimentaire,... etc. Dans le but de montrer l'intérêt que la biotechnologie à apporter au domaine pharmacologique et alimentaire, nous avons réalisé cette synthèse qui est basée sur des études et des recherches déjà faites dans ce domaines. Une alternative à leur extraction directe à partir de plantes, consiste à les faire produire par des cultures cellulaires *in vitro*, à savoir des flavonolignanes, des flavonoïdes méthylés, ou des alcaloïdes. Bien que les cultures de cellules indifférenciées soient utilisées pour la production de métabolites secondaires, de nombreux travaux ont mis en évidence la performance des cultures racinaires. Les activités et les méthodes de synthèse biologique, nous permet d'acquérir une compréhension approfondie de leur nature et de définir les nouvelles stratégies pour exploiter leurs applications.

Abstract

Secondary metabolites are part of the chemical composition of medicinal plants, which represent an important source of molecules that can be used by humans, for pharmaceutical, food, agrifood, etc. interest. In order to show the interest that biotechnology brings to the pharmacological and food field, we have produced this syntheses, which is based on studies and research already carried out in this field. An alternative to their direct extraction from plants consists in having them produced by cell cultures *in vitro*, namely flavonolignans, methylated flavonoids, or alkaloids. Although cultures of undifferentiated cells are used for the production of secondary metabolites, many studies have shown the performance of root hairs. The activities and methods of biological synthesis allow us to gain a deep understanding of their nature and to define new strategies to exploit their applications.

المخلص

المستقلبات الثانوية هي جزء من التركيب الكيميائي للنباتات الطبية، والتي تمثل مصدرًا مهمًا للجزيئات التي يمكن أن يستخدمها البشر للأدوية، الغذاء والأغذية الزراعية، وما إلى ذلك. من أجل إظهار الاهتمام الذي تجلبه التكنولوجيا الحيوية إلى المجال الدوائي والغذائي، قمنا بإنتاج هذه المراجعة، والتي تستند إلى الدراسات والأبحاث التي تم إجراؤها بالفعل في هذا المجال. يتمثل أحد البدائل لاستخراجها المباشر من النباتات في إنتاجها بواسطة مزارع الخلايا في المختبر مثل الفلافونوليجنان أو الفلافونويد الميثيل، أو القلويدات. على الرغم من استخدام مزارع الخلايا غير المتميزة لإنتاج المستقلبات الثانوية، فقد أظهرت العديد من الدراسات أداء شعر الجذر. تسمح لنا أنشطة وطرق التوليف البيولوجي باكتساب فهم عميق لطبيعتها وتحديد استراتيجيات جديدة لاستغلال تطبيقاتها.