

Research Article

ETUDE DE L'INFLUENCE DE DEUX PHYTOHORMONES SUR LA PRODUCTION D'ALCALOÏDES INVITROCHEZBALANITES AEGYPTIACA DEL.

Bougoudogo Koumba, *Konaré Mamadou A, Togola Issiaka, Diarra Nouhoum

Laboratoire de Biochimie Végétale, Alimentaire et de Biotechnologies (LBVA_B) / Faculté des Sciences et Techniques (FST), Université des Sciences, des Techniques et des Technologies de Bamako (USTTB), Bamako, Mali.

Received 24th April 2021; Accepted 24th May 2021; Published online 30th June 2021

ABSTRACT

Cette étude avait pour but d'évaluer la production d'alcaloïdes *in vitro* chez *Balanites aegyptiaca* Del. sous l'influence de deux phytohormones : l'Acide 3 Indole Acétique (AIA) et la 6-Benzylaminopurine (BAP). Les graines, pré-germinées dans les boîtes de pétri, sont transférées dans des flacons contenant du milieu de culture liquide Murashige et Skoog (MS) enrichi de ces deux phytohormones à une concentration de 1,5 mg/L. Les teneurs en alcaloïdes ont été évaluées dans le milieu MS et au niveau des feuilles et racines des plants par la méthode gravimétrique. L'analyse des alcaloïdes a été réalisée par chromatographie sur couche mince (CCM). L'analyse des extraits alcaloïdiques par CCM a montré que l'apport de phytohormones (AIA/BAP) stimule la production d'alcaloïdes au niveau des feuilles dès la première semaine de culture. Les résultats obtenus montrent une production d'alcaloïdes plus importante en moyenne au niveau des feuilles (1,4%) qu'au niveau des racines (1,17%). D'une manière générale, les teneurs en alcaloïdes des feuilles et des racines issues du milieu supplémenté de phytohormones sont plus importantes que celles obtenues avec les témoins (p -value < 0,05). Ces résultats indiquent aussi que les plants de *Balanites aegyptiaca* exsudent des alcaloïdes dans le milieu de culture liquide aussi bien chez les témoins que chez les plants cultivés sur milieu enrichi de phytohormones. Cette étude a montré par ailleurs qu'il est possible de produire, par culture *in vitro*, des alcaloïdes avec cette espèce. Cette potentialité pourrait être mise à profit pour mieux valoriser cette espèce médicinale très prisée au Mali.

Keywords: Phytohormones, Alcaloïdes, *Balanites aegyptiaca*, culture *in vitro*.

INTRODUCTION

De nombreux composés naturels dérivent de plantes à croissance lente et sont parfois difficiles à synthétiser par la méthode chimique. Parmi ces composés, les alcaloïdes occupent une place importante et interviennent dans la défense de la plante vis à vis des agressions abiotiques et biotiques (Mauro, 2006). De nos jours, plus de quinze milles alcaloïdes ont été isolés des plantes (Harborne & Herbert, 1995 ; Hesse, 2002). Les alcaloïdes figurent parmi les principes actifs les plus importants en pharmacologie et en médecine. L'intérêt qu'on leur porte reposait traditionnellement sur leur action physiologique et psychologique particulièrement violente chez l'homme. Leurs propriétés biologiques, aussi variées que leurs structures, continuent à être bénéfiques dans les traitements de différentes maladies ou des dysfonctionnements de l'organisme humain (Harborne et al., 1999 ; Badiaga, 2011). Les alcaloïdes tropaniques ont des propriétés antispasmodiques dans le système gastro-intestinal et également des propriétés antisécrétoires (utiles au cours des interventions chirurgicales). L'atropine est largement utilisée dans le domaine de l'ophtalmologie en tant qu'agent mydriatique pour dilater la pupille (Bhat et al., 2005). Ces produits naturels fournissent un point de départ pour de nouveaux composés synthétiques, avec diverses structures et mécanismes d'actions (Koehn & Carter, 2005). Des études ont montré que *Balanites aegyptiaca* Del., espèce très prisée par les populations locales au Mali, est l'une des espèces riches en alcaloïdes (Chothani & Vaghasiya, 2011 ; Sarker et al., 2000) et en antioxydants (Konaré et al., 2019). Des saponines complexes ont été isolées

de ses fruits (Staerk et al., 2006). Depuis longtemps, il a été démontré que les hormones végétales ou phytohormones sont des substances organiques qui jouent un rôle régulateur de croissance et sont donc impliqués dans les mécanismes physiologiques de la plante (Skoog & Tsui, 1948). L'objectif de cette étude était de suivre l'évolution de la production éventuelle d'alcaloïdes dans le milieu de culture et au niveau des organes (feuilles et racines) de *Balanites aegyptiaca* suite à un apport exogène de phytohormones : l'Acide 3 Indole Acétique (AIA) et la 6-Benzylaminopurine (BAP).

MATERIEL ET METHODES

Materiel

Les graines de *Balanites aegyptiaca*, récoltées en Mars 2012 dans la commune de Tori / Cercle de Bankass / Région de Mopti au Mali, ont été utilisées comme matériel végétal.

Méthodes

Préparation des plants

Les amandes provenant des graines ont été introduites dans des boîtes de pétri contenant de l'eau distillée stérile. Après une semaine de germination, elles sont transférées dans un pot contenant un mélange de terreau et de sable à proportion égale. Après deux (2) semaines de croissance sur le milieu solide, les plants sont désinfectés à l'hypochlorite de sodium puis rincés avec de l'eau distillée stérile. Ils sont ensuite transférés dans un flacon de culture (BD falcon tissue culture Flasks, canted Neck) de 275 mL contenant du milieu nutritif MS dilué deux fois et enrichi de phytohormones (AIA et BAP) à une concentration de 1,5 mg/mL chacune. Des plants témoins ont été cultivés sur du milieu MS dilué deux fois.

*Corresponding Author: Konaré Mamadou A,

Laboratoire de Biochimie Végétale, Alimentaire et de Biotechnologies (LBVA_B) / Faculté des Sciences et Techniques (FST), Université des Sciences, des Techniques et des Technologies de Bamako (USTTB), Bamako, Mali.

Extraction des alcaloïdes totaux

Les feuilles et racines des plants cultivés *in vitro* ont été cueillies et séchées à la température ambiante. Cent grammes (100 mg) de chaque échantillon sont finement broyés. Le broyat est introduit dans un erlenmeyer contenant 5 mL de H₂SO₄ dilué à 5%. Le mélange est hermétiquement fermé et mis en macération pendant 24 heures à la température ambiante (30-35 °C). Le macéré est filtré à l'aide d'un papier Whatman. Cent millilitres (100 mL) du milieu de culture sont soumis au même traitement. Les différents filtrats obtenus sont utilisés pour les analyses qualitatives (Sofowora, 1982).

Recherche des alcaloïdes totaux

Les alcaloïdes totaux ont été recherchés dans les organes (feuilles et racines) et dans le milieu de culture MS des vitro-plants grâce aux réactions colorées en tube. L'apparition de précipités orangés (pour Dragendorff) et blanchâtres (pour Mayer) indique la présence des alcaloïdes (Sofowora, 1982 ; Harborne, 1973).

Evaluation quantitative des alcaloïdes totaux

La détermination de la teneur en alcaloïdes des extraits (organes et milieu de culture liquide) a été réalisée en utilisant la méthode gravimétrique basée sur la précipitation en milieu alcalin décrite par Harborne (1973). Cinq grammes (5g) de poudre de racines et feuilles ou 5 mL du milieu MS ont été dissous dans 20 mL d'acide acétique à 10% dans de l'éthanol. Le mélange a été laissé pendant quatre (4) heures à température ambiante (30 – 35°C). Après filtration à travers le papier Whatman (n° 42), le filtrat a été concentré par évaporation sur un bain de vapeur. Pour précipiter les alcaloïdes, quelques gouttes d'une solution d'ammonium concentrée ont été ajoutées à l'extrait jusqu'à ce qu'il soit en excès. Le précipité d'alcaloïdes résultant a été récupéré par filtration à l'aide de papier filtre préalablement pesé. Ce précipité a été lavé à l'aide d'une solution d'ammoniaque à 9% et séché dans le four à 60°C pendant 30

minutes puis refroidi dans un dessiccateur et pesé. Le taux d'alcaloïdes (en %) a été déterminé par la différence de poids et exprimé en pourcentage du poids du produit brut.

$$\% \text{ Alcaloïdes} = \frac{P_2 - P_1}{\text{Prise d'essai (g)}} \times 100 \quad (1)$$

P₁ : Poids du papier filtre (g) ; P₂ = Poids du papier filtre + précipités d'alcaloïdes (g)

Analyse des extraits alcaloïdiques par CCM

La technique chromatographique sur couche mince (CCM) a été utilisée pour identifier les alcaloïdes présents dans nos extraits.

Dix microlitres (10µL) de chaque extrait ont été déposés à l'aide d'une micropipette sur une plaque de gel silice de 0,2 mm de couche. Après séchage des dépôts, la plaque est placée dans une cuve de migration contenant la phase mobile constituée de Chloroforme – Méthanol - Acide acétique (30 : 70 : 3 v/v/v). Après une migration de 30 min, les plaques sont retirées et séchées. La révélation a été faite par pulvérisation de la plaque avec le réactif de Dragendorff à 10%. Le facteur de rétention ou rapport frontal (RF) de chaque spot est calculé en utilisant la formule ci-après.

$$\text{Rapport frontal (RF)} = \frac{\text{Distance parcourue (cm)}}{\text{Distance totale (cm)}} \quad (2)$$

Les résultats obtenus avec les rapports frontaux ont été confrontés avec ceux de la littérature pour identifier les molécules d'alcaloïdes correspondantes à nos spots.

Analyse des données

Les données quantitatives ont été exprimées en moyennes ± SD (déviations standard). Le logiciel Minitab 18.1 a été utilisé pour l'analyse statistique. Les moyennes ont été comparées avec l'ANOVA à un seul facteur utilisant le test de Fischer au seuil de 0.05. Elles sont considérées comme significatives lorsque p-value < 0.05.

RESULTATS ET DISCUSSION

Résultats

Caractérisation

Le tableau 1 montre les résultats du screening phytochimique.

Tableau 1. Screening phytochimique

Réactifs	Organes		Milieu de culture	
	Feuilles	Racines	Avec AIA/BAP	Témoin
Dragendorff	+	+	+	+
Mayer	+	+	+	+

*(+): Présence des alcaloïdes

Les alcaloïdes ont été révélés dans les extraits de feuilles, racines et le milieu de culture liquide.

Teneurs en alcaloïdes au niveau des feuilles et racines des plants

Le tableau 2 présente les quantités d'alcaloïdes obtenues par semaine et par organe végétal.

Tableau 2 : Taux d'alcaloïdes (mg/100mg d'extraits) par semaine et par organe végétal.

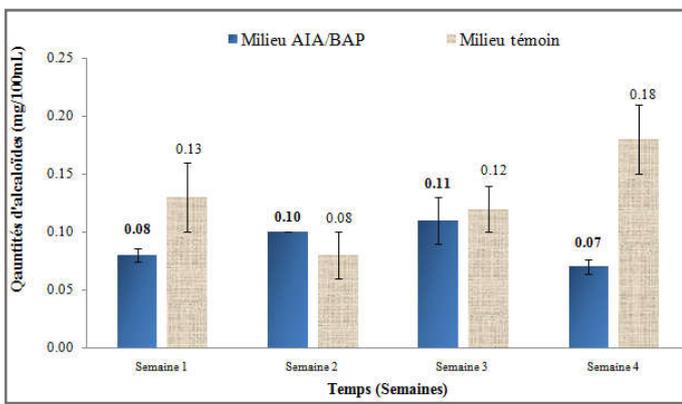
Semaines	Quantités d'alcaloïdes (mg/100mg d'extraits)			
	Feuilles		Racines	
	Milieu AIA/BAP	Milieu témoin	Milieu AIA/BAP	Milieu témoin
1	1.50 ± 0.26 ^{bcd}	0.93 ± 0.06 ^e	1.27 ± 0.26 ^B	0.77 ± 0.06 ^{DE}
2	1.67 ± 0.11 ^b	1.37 ± 0.11 ^{cd}	1.43 ± 0.06 ^{BC}	1.20 ± 0.10 ^{CD}
3	1.37 ± 0.06 ^{cd}	1.32 ± 0.03 ^d	1.93 ± 0.23 ^A	1.17 ± 0.21 ^{CD}
4	1.57 ± 0.11 ^{bc}	2.00 ± 0.10 ^a	0.80 ± 0.00 ^E	1.53 ± 0.23 ^B
p-value	0,000002		0,000013	

*Pour chaque organe, les moyennes ne partageant aucune lettre sont significativement différentes.

Pour les Feuilles, les teneurs en alcaloïdes enregistrées dans le milieu témoin augmentent progressivement de la première à la quatrième semaine de culture. Concernant les feuilles du milieu supplémenté en phytohormones, de la 1^{ère} à la 4^{ème} semaine, le taux d'alcaloïdes suit une évolution constante, exception faite à la 3^{ème} semaine où ce taux chute significativement (1.37 mg/100mg). Au niveau des racines, les teneurs en alcaloïdes augmentent progressivement de la 1^{ère} à la 3^{ème} semaine de 1.27 à 1.93 mg/100mg. Ainsi au niveau des racines et des feuilles, la production d'alcaloïdes par les plants semble être stimulée par la présence de la combinaison hormonale AIA/BAP au cours des trois premières semaines. Cependant, cet effet est plus marqué chez les racines que chez les feuilles.

Teneurs en alcaloïdes dans le milieu de culture

Les quantités d'alcaloïdes produits et exsudés dans les milieux de culture liquide sont indiquées ci-dessous (figure 1).



*Les moyennes ne partageant aucune lettre sont significativement différentes.

Figure 1. Quantités d'alcaloïdes dans le milieu de culture liquide

Les teneurs en alcaloïdes dans le milieu de culture contenant les phytohormones augmentent au cours des trois premières semaines et chutent à la 4^{ème} semaine. Cependant elles restent légèrement inférieures à celles du milieu témoin.

Analyse par CCM.

Les résultats des tests de Dragendorff et de Mayer utilisés ont été confirmés par une analyse des extraits alcaloïdiques de feuilles par CCM. Après migration, la figure 2 indique la photographie de la plaque de migration et le tableau 3 montre les rapports frontaux des spots obtenus.

Table 3. Valeurs des rapports frontaux des différents spots révélés.

Spots	1	2	3	4
Rapports frontaux (Rf)	0.64 ± 0.01	0.72 ± 0.02	0.84 ± 0.03	0.92 ± 0.03

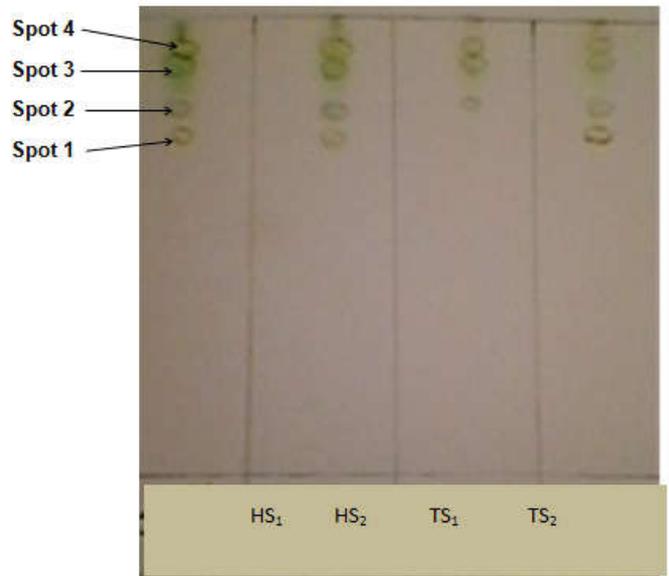


Figure 2. Chromatogramme des alcaloïdes totaux

(Eluant : Chloroforme – Méthanol - Acide acétique : 30-70-3).
 *HS₁, HS₂= 1^{ère} et 2^{ème} semaines de culture sur milieu hormonal
 TS₁, TS₂= 1^{ère} et 2^{ème} semaines de culture sur milieu Témoin

L'analyse de la plaque après migration montre quatre (4) spots excepté l'extrait du milieu témoin de la 1^{ère} semaine (TS₁) qui laisse apparaître trois (3) spots.

Discussion

L'objectif de la présente étude était d'évaluer la production d'alcaloïdes *in vitro* chez *Balanites aegyptiaca* sous l'influence de deux phytohormones : l'Acide 3 Indole Acétique (AIA) et la 6-Benzylaminopurine (BAP). Les réactions en tube ont révélé la présence d'alcaloïdes dans les organes (feuilles et racines) et les milieux de culture liquide. La caractérisation couplée à la CCM a montré que les plants de *Balanites aegyptiaca*, cultivés *in vitro* en présence ou en absence de phytohormones exsudent des alcaloïdes dans le milieu de culture. Pendant les trois premières semaines, le taux d'alcaloïdes est plus élevé dans les milieux supplémentés d'hormones au niveau des feuilles (1,37 ± 0,06 à 1,67 ± 0,26 mg/100mg d'extrait) et racines (1,27 ± 0,26 à 1,93 ± 0,23 mg/100mg d'extrait) que dans les milieux témoins. Par contre dans les milieux enrichis, on note une chute significative du taux d'alcaloïdes au cours de la 4^{ème} semaine de culture. Cette diminution pourrait être due à la disparition de l'effet des phytohormones et/ou une réponse des plants au stress qui s'en suit. Ces teneurs sont inférieures à celles obtenues par Hassane *et al.*, (2020) avec des teneurs maximales de 0,47±0,01% enregistrées au niveau des racines des vitro plants de *Balanites aegyptiaca*. De même des travaux similaires conduits par Togola *et al.* (2019) sur une autre espèce (*Datura innoxia*) ont montré des teneurs en alcaloïdes de 0,20% au niveau des feuilles ; ce qui est supérieur aux nôtres. La production moyenne d'alcaloïdes est plus importante au niveau des feuilles qu'au niveau des racines en présence ou en absence de phytohormones (p-value < 0,05). Ces données confortent celles obtenues par Togola *et al.* (2019). Le taux le plus élevé en alcaloïdes a été obtenu au niveau des feuilles issues des plants cultivés sur milieu supplémenté en phytohormones (AIA/BAP) au bout de la deuxième semaine de culture. Nos données corroborent celles de nombreux travaux. Miraldi *et al.* (2001) ont montré que le taux d'alcaloïdes est plus élevé dans les feuilles que les racines ; et ce quel que soit le milieu de culture. Des travaux réalisés sur l'espèce *Hyoscyamus albus* L., ont montré que le taux d'alcaloïdes au niveau des feuilles issues des milieux (avec ou sans

hormone) est plus élevé que celui des racines issues de ces deux milieux de culture en présence de phytohormones (Kadi & Yahia, 2007). Ces mêmes auteurs ont par ailleurs montré que certaines phytohormones ont des effets positifs sur l'accumulation des alcaloïdes dans les organes végétaux. Notre étude a montré que les plants de *Balanites aegyptiaca* exsudent des quantités relativement faibles d'alcaloïdes dans le milieu de culture. L'étude menée par Togola et al. en 2019 avait déjà signalé ce phénomène d'exsudation des alcaloïdes dans le milieu de culture MS. En plus, ces auteurs avaient noté une production importante d'alcaloïdes par *Datura innoxia* dans les feuilles et racines ainsi que dans le milieu de culture liquide (MS). Par contre Konaré et al. (2019) n'ont pas observé ce phénomène d'exsudation de métabolites avec les vitro plants de *Zizyphus mauritiana* en présence ou non de phytohormones. Cette différence pourrait être liée à la richesse de *Balanites aegyptiaca* en alcaloïdes. L'analyse chromatographique des extraits alcaloïdiques des échantillons d'organes et de milieux de culture a révélé quatre spots différents (figure 2). Ceci indique la présence de quatre types d'alcaloïdes dans nos extraits. Les rapports frontaux des deux premiers spots obtenus (0.64 et 0.72) sont similaires à ceux obtenus par Togola et al. (2019) en utilisant le même éluant. En effet ces auteurs avaient indiqué que ces rapports frontaux correspondraient à ceux de l'atropine (0.64) et de l'hyoscyamine (0.72). L'extrait alcaloïdique de l'échantillon témoin de la 1^{ère} semaine de culture sur milieu liquide sans phytohormones ne montre pas le spot 1 (Rf = 0.64). Cette observation pourrait s'expliquer par le fait que la production de cet alcaloïde qui n'apparaît qu'après la deuxième semaine de culture dans les milieux témoins est stimulée par l'apport de la combinaison hormonale AIA/BAP. Selon Mostafa & Alhamd (2011), certaines phytohormones tels la gibbérelline et l'acide indole acétique peuvent stimuler considérablement la production d'alcaloïdes dans les feuilles de *B. aegyptiaca*. Cette affirmation est en accord avec nos résultats obtenus. Les plants de *Balanites aegyptiaca* exsudent des alcaloïdes dans le milieu de culture liquide. Les résultats obtenus avec le milieu liquide laissent entrevoir une possible exploitation de ce système pour la production de métabolites par cette espèce et d'autres plantes ligneuses d'intérêt médicamenteux, cosmétique et alimentaire.

CONCLUSION

Les résultats de cette étude montrent que les phytohormones (AIA/BAP) utilisées présentent des effets positifs sur la production d'alcaloïdes chez *Balanites aegyptiaca*. Cette étude a montré par ailleurs qu'il est possible de produire, par culture *in vitro*, des alcaloïdes avec cette espèce. Pour une meilleure valorisation de cette espèce, il serait intéressant d'optimiser la production d'alcaloïdes *in vitro* et d'étendre le temps de suivi des vitro plants.

REMERCIEMENTS

Nous remercions le **Professeur Feu Maïga Seydou Zibba** pour sa supervision scientifique.

REFERENCES

1. 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/Mali et Université Blaise Pascal de Clermont-Ferrand/France.
2. Bhat, S., Nagasampagi, B., & Sivakumar, M. (2005). Chemistry of Natural Products (237. Narosa, New Delhi, India. 2005, Ch. 4, ed.).
3. Chothani, D.L., & Vaghasiya, H. (2011). A review on *Balanites aegyptiaca* Del (desert date): phytochemical constituents,

traditional uses, and pharmacological activity. *Pharmacognosy Reviews*, 5(9), 55.

4. Harborne, J. B. (1973). *Phytochemical methods: A guide to modern techniques of plant analysis*. London, UK: Chapman and Hall Ltd, 20–28.
5. Harborne, J., Baxter, H., & Moss, G. (1999). *Phytochemical dictionary: A handbook of bioactive compounds from plants*. 2nd Ed. Taylor & Francis, London.
6. Harborne, J., & Herbert, B. (1995). *Phytochemical Dictionary: A Handbook of Bioactive Compounds from Plants*. Bristol: Taylor & Francis.
7. Hassane, A., Togola, I., Konaré, M. A., Diarra, N., Maïga, M. S., & Maïga, S. Z. (2020). Production d'alcaloïdes et croissance des organes de *Balanites aegyptiaca* Del. en culture *in vitro*. *International Journal of Progressive Sciences and Technologies (IJPSAT)*, 24(1), 270–277.
8. Hesse, M. (2002). *Alkaloids. Nature's Curse or Blessing?* Wiley-VHC, Zürich, 2002, 413p., ISBN 3-906390-24-1.
9. Kadi, K., & Yahia, A. (2007). Effect of phyto-hormones 2,4-D and kinitin, applications on alkaloids accumulation in *Hyoscyamus albus* L. *Sciences & Technologie. C, Biotechnologies*, 13–17.
10. Koehn, F., & Carter, G. (2005). The evolving role of natural products in drug discovery. *Nature Reviews Drug Discovery*, 4(3), 206–220.
11. Konaré, M. A., Tounkara, F., Diarra, N., Togola, I., Keïta, S., Maïga, S. S. Z., ... Sanogo, R. (2019). Étude de l'effet combiné de l'acide indole 3-acétique (AIA) et de la 6-Benzyl Amino-Purine (BAP) sur la production de protéines et de métabolites secondaires chez *Zizyphus mauritiana* Lam. dans les conditions de culture *in vitro*. *American Journal of Innovative Research and Applied Sciences*, 9(2), 210–215.
12. Konaré, M. A., Tounkara, F., Somda, M. K., Diarra, N., Diakité, M., Wélé, M., ... Biology, E. T. (2019). Phytochemistry and *in vitro* antioxidant activities of four consumed picking products in sikasso, Mali. *International Journal of Advanced Research*, 7(12), 847–857. <https://doi.org/10.21474/IJAR01/10221>
13. Mauro, N. M. (2006). Synthèse d'alcaloïdes biologiquement actifs: la (+)-anatoxine-a et la (±)- camptothécine. Autre. Université Joseph-Fourier - Grenoble I. France.
14. Miraldi, E., Masti, A., Ferri, S., & Comparini, I. (2001). Distribution of hyoscyamine and scopolamine in *Datura stramonium*. *Fitoterapia*, 72, 644–648.
15. Mostafa, G., & Alhamd, M. (2011). Effect of Gibberelic Acid and Indol 3-acetic Acid on improving Growth and Accumulation of Phytochemical composition in *Balanites aegyptiaca* Plants. *American Journal of Plant Physiology*, 6(1), 36–43.
16. Sarker, S.D., Bartholomew, B., & Nash, R. (2000). Alkaloids from *Balanites aegyptiaca*. *Fitoterapia*, 71(3), 328–330.
17. Skoog, F., & Tsui, C. (1948). "Chemical control of growth and bud formation in tobacco stem segments and callus cultured *in vitro*". *American Journal of Botany*, 35(10), 782–787.
18. Sofowora, A. (1982). *Medicinal plants and traditional medicine in Africa*. 1st Edn. USA: John Wiley and Sons Ltd, 168–171.
19. Staerk, D., Chapagain, B., Lindin, T., Wiesman, Z., & Jaroszewski, J. (2006). Structural analysis of complex saponins of *Balanites aegyptiaca* by 800 MHz 1H NMR spectroscopy. *MagnResonChem*, 44(923–928).
20. Togola, I., Konaré, M. A., Diakité, M., Diarra, N., Tounkara, F., Sanogo, R., ... Saonogo, R. (2019). Évaluation de la teneur en alcaloïdes totaux à différents stades de développement de *Datura innoxia* Mill., une plante utilisée dans la médecine traditionnelle au Mali. *American Journal of Innovative Research and Applied Sciences*, 9(2), 200–207.