

Note

Dosage d'alcaloïdes dihydrofuro[2,3-*b*]quinoleinium dans des tissus végétaux *in vitro* par chromatographie sur couche mince de gel de silice et fluorodensitométrie

M. MONTAGU* et P. LEVILLAIN

Laboratoire de Chimie Analytique, Faculté de Pharmacie, B.P. 3213, 37032 Tours Cedex (France)
et

J. C. CHENIEUX et M. RIDEAU

Laboratoire de Biologie Végétale, Faculté de Pharmacie, B.P. 3213, 37032 Tours Cedex (France)
(Reçu le 8 août 1985; manuscrit modifié reçu le 17 septembre 1985)

Les études sur la production de métabolites secondaires par des cellules végétales *in vitro* ont fait des progrès considérables ces dernières années¹. La stratégie classiquement adoptée repose à la fois sur la sélection de souches à haute production et sur l'optimisation des conditions de culture. Au cours de ces deux étapes, la nécessité de doser les métabolites produits dans des quantités très faibles de tissus exige l'utilisation de techniques sensibles, simples et très rapides²⁻⁶.

Les métabolites que nous étudions sont des alcaloïdes quaternaires dihydrofuro[2,3-*b*]quinoleinium synthétisés en culture *in vitro* à partir de tissus de diverses Rutacées⁷ et présentant des propriétés cytotoxiques⁸. L'absence de méthodes analytiques pour ces composés nous a conduits antérieurement à proposer deux techniques mises au point sur des échantillons de cultures de *Choisya ternata*.

Fluorimétrie⁹

La technique nécessite une purification des extraits végétaux suivie d'une chromatographie sur couche mince de gel de silice et d'une élution à partir de ce support, ce qui entraîne une perte de sensibilité par dilution.

Chromatographie liquide haute performance¹⁰

Très fiable, beaucoup plus simple que la précédente méthode, cette technique demeure encore longue et onéreuse principalement quand on l'utilise pour de grandes séries expérimentales.

Les contraintes imposées par ces deux techniques nous ont conduits à rechercher un dosage par fluorodensitométrie, utilisable en routine.

MATÉRIEL ET MÉTHODES

Alcaloïdes étalons

Le platydesminium perchlorate et le balfourodinium chlorure ont été précédemment isolés à partir de feuilles de *Choisya ternata* H.B.K. (Rutacées) et analysés par résonance magnétique nucléaire et spectrographie de masse⁸.

Matériel végétal

Quatre souches de *Choisya ternata* sont cultivées *in vitro* selon les techniques précédemment décrites¹¹. Elles diffèrent par leur aspect, leur physiologie et leur teneur en alcaloïdes.

Extraction, purification et chromatographie des alcaloïdes

Après culture, les tissus végétaux lyophilisés et pulvérisés sont extraits par du méthanol (10 mg/ml; macération sous agitation, 2 h; centrifugation).

Les extraits méthanoliques sont utilisés selon trois procédés: (1) sans purification; (2) après agitation (2 h) en présence de 50 mg/ml d'alumine (Prolabo 21013); (3) après complexation des alcaloïdes avec le bleu de bromothymol⁹. Le résidu d'évaporation de 2 ml d'extrait est repris par 2 ml d'une solution de colorant (10^{-4} M, en tampon phosphate pH 6). Les paires d'ions sont extraites par le dichlorométhane (3×1 ml). Après évaporation de la phase organique, le résidu est solubilisé dans 0,5 ml de méthanol. Des volumes de 1 μ l d'extraits (correspondant respectivement à 10 μ g, 10 μ g, 40 μ g de matériel végétal sec pour les procédés 1, 2, 3 précédents) sont chromatographiés sur gel de silice 60 (Merck 5553) dans les conditions suivantes: cuve sandwich (Camag); mélange éluant eau-acide formique-acétate d'éthyle (1:1:10); durée 15 min; dépôts réalisés avec une micro-seringue (Hamilton) ou avec un déposeur automatique (Camag). Les plaques chromatographiques sont séchées 2 h à l'air libre avant la lecture fluorodensitométrique.

Mesures de fluorescence

Les mesures de fluorescence ont été réalisées avec un fluorodensitomètre Shimadzu CS 920, équipé d'une lampe à vapeur de mercure, d'un monochromateur à l'excitation et offrant un choix de quatre filtres d'arrêt pour l'émission. Les caractéristiques de cet appareil ont été récemment étudiées par Huf¹².

RÉSULTATS

Fluorodensitométrie du platydesminium et du balfourodinium

La Fig. 1 montre les spectres d'excitation et d'émission des deux alcaloïdes en solution aqueuse¹³. Avec un fluorodensitomètre à filtres (Shimadzu) ne disposant à l'excitation que des raies du mercure, les meilleures conditions de lecture sont les suivantes: platydesminium $\lambda_{exc.} = 313$ nm, balfourodinium $\lambda_{exc.} = 254$ nm. Même dans ces dernières conditions qui ne sont pas optimales, les limites de détection sont voisines de 3 pmoles pour le platydesminium et de 0,1 pmole pour le balfourodinium. Comme l'indique le Tableau I, le coefficient de variation, calculé pour huit échantillons déposés sur huit plaques distinctes, est de 5-8% et les relations entre quantités d'alcaloïdes et signal lu après migration chromatographique sont linéaires (dans la limite de 60 pmoles pour le platydesminium). Selon Shellard¹⁴, ces relations peuvent servir de base de calcul pour des dosages ultérieurs.

Fluorodensitométrie d'extraits de culture in vitro

La possibilité de doser les alcaloïdes dans des cultures *in vitro* a été étudiée avec des extraits provenant de souches chlorophylliennes ou non et accumulant des teneurs variables en alcaloïdes.

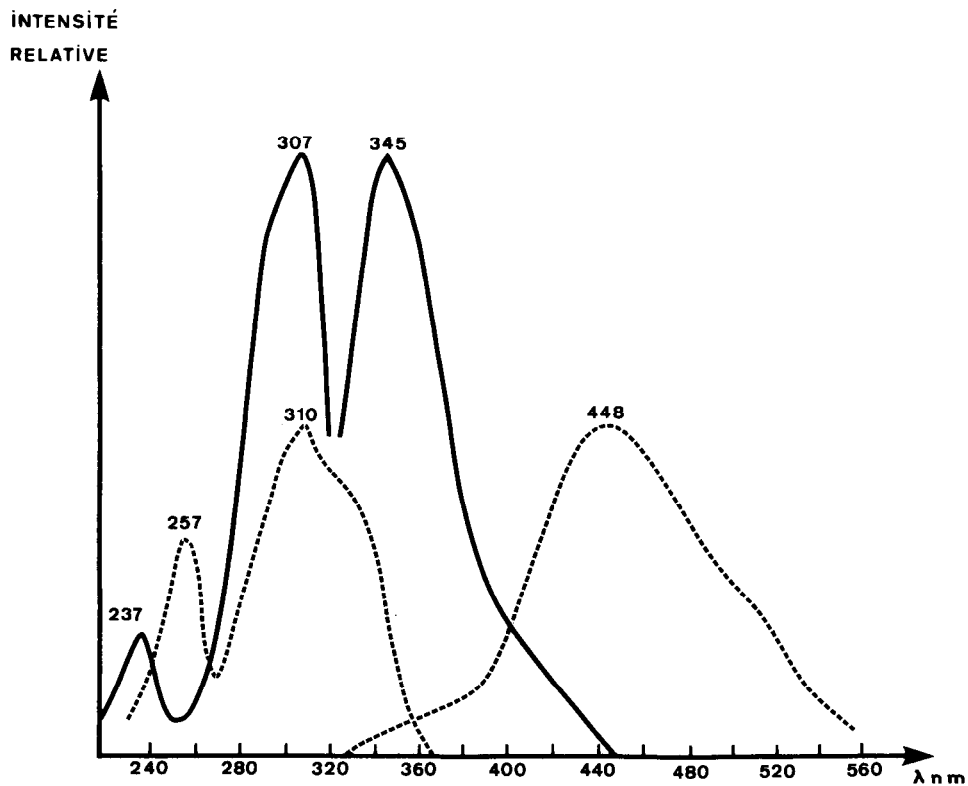


Fig. 1. Spectres d'excitation et d'émission des alcaloïdes en solution aqueuse. (—) Platydesminium; (---) balfourodinium.

TABLEAU I

LINÉARITÉ ET REPRODUCTIBILITÉ POUR LE DOSAGE DES DEUX ALCALOÏDES

\bar{x} est la moyenne de 8 mesures (en unités arbitraires) effectuées sur 8 plaques de chromatographie. Les relations entre quantités d'alcaloïdes en picomoles (Q) et valeurs lues (V) sont pour le platydesminium: $Q = 2,99 \cdot 10^{-2} V + 2,73 \cdot 10^{-1}$ et pour le balfourodinium: $Q = 3,0 \cdot 10^{-3} V - 9,7 \cdot 10^{-3}$.

Alcaloïdes	Quantité déposée (pmoles)	Valeurs lues ($\bar{x} \pm \text{écart-type}$)	Coefficient de variation (%)
Platydesminium	1,2	35 ± 23	65
	6	191 ± 9	5
	12	388 ± 19	5
	60	1988 ± 120	6
	120	3316 ± 232	7
Balfourodinium	0,65	209 ± 16	8
	3,25	1094 ± 87	8
	6,50	2180 ± 130	6

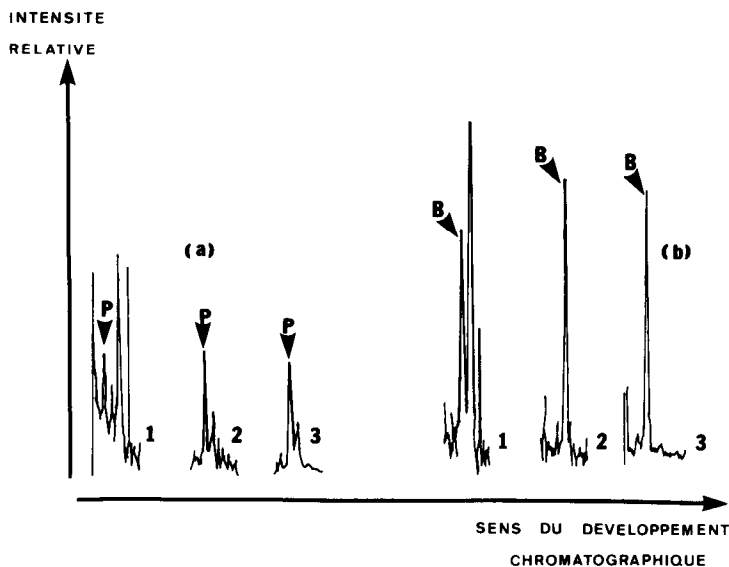


Fig. 2. Chromatogrammes obtenus pour la souche 2. (a) Lecture du platydesminium (P) ($\lambda_{exc.}$: 313 nm). (b) Lecture du balfourodinium (B) ($\lambda_{exc.}$: 254 nm). Filtre d'arrêt No. 1 à l'émission. Les extraits méthanoliques sont chromatographiés: 1, sans purification; 2, après purification par l'alumine; 3, après purification par extraction de paires d'ions.

La Fig. 2 présente les tracés chromatographiques obtenus pour l'une de ces souches, les autres donnant des tracés similaires. Elle met en évidence la complexité du tracé chromatographique d'extraits non purifiés (Fig. 2a1 et b1) dont la ligne de base est mal définie. Ceci explique que, principalement pour le platydesminium, les teneurs déterminées dans ces souches sont bien supérieures à celles obtenues après purification. Il est donc nécessaire de purifier les extraits méthanoliques.

Une étude antérieure du comportement chromatographique des alcaloïdes sur divers supports a mis en évidence la sélectivité d'une purification par l'alumine¹⁰. Une simple agitation des extraits avec cet adsorbant suffit à améliorer considérablement les tracés chromatographiques (Fig. 2a2 et b2) qui deviennent alors similaires à ceux obtenus en purifiant les alcaloïdes par extraction de paires d'ions formées avec le bleu de bromothymol (Fig. 2a3 et b3 et Tableau II), compte tenu du rendement de l'étape d'éluion de ce dernier procédé qui est de $93 \pm 2\%$ ⁹. Le coefficient de corrélation entre ces deux procédés, de 0,9944 pour le platydesminium et de 0,9998 pour le balfourodinium, montre l'exactitude de la méthode proposée.

CONCLUSION

Comparée aux techniques décrites antérieurement: chromatographie liquide haute performance et fluorimétrie après éluion, la méthode décrite ici pour le dosage des alcaloïdes dihydrofuro[2,3-*b*]quinoléinium dans des tissus de Rutacées, utilisant la fluorodensitométrie, présente divers avantages:

(1) la souplesse d'exécution: compte tenu de la complexité du matériel végétal,

TABLEAU II

DOSAGES DES ALCALOÏDES POUR QUATRE SOUCHES DE *CHOISYA TERNATA* APRÈS CHROMATOGRAPHIE D'EXTRAITS DIVERSEMENT PURIFIÉS

Les résultats sont exprimés en micromoles d'alcaloïdes par gramme de matériel végétal sec.

Extraits méthanoliques	Souches	Teneurs en alcaloïdes			
		<i>Platydesminium</i>		<i>Balfourodinium</i>	
		Moyenne \pm écart-type	Coefficient de variation (%)	Moyenne \pm écart-type	Coefficient de variation (%)
Non purifiés	1	0,178 \pm 0,092	50	non détecté	
	2	1,340 \pm 0,071	5	0,211 \pm 0,008	3
	3	2,674 \pm 0,044	2	0,240 \pm 0,008	3
	4	4,542 \pm 0,360	8	0,522 \pm 0,016	3
Purifiés par l'alumine	1	0,113 \pm 0,060	50	non détecté	
	2	0,684 \pm 0,027	4	0,166 \pm 0,015	9
	3	1,800 \pm 0,110	6	0,182 \pm 0,012	7
	4	3,050 \pm 0,150	5	0,488 \pm 0,026	5
Purifiés par extraction de paires d'ions	1	0,140 \pm 0,070	50	0,015 \pm 0,004	30
	2	0,589 \pm 0,055	9	0,156 \pm 0,022	14
	3	1,439 \pm 0,074	5	0,164 \pm 0,015	9
	4	2,872 \pm 0,192	7	0,455 \pm 0,012	3

les étapes de purification, de chromatographie et de lecture sont très rapides (environ 30 min de manipulation pour 10 dosages).

(2) la sensibilité: les quantités d'alcaloïdes déposées sur la couche mince de gel de silice correspondent à 0,01 mg de matériel végétal. Elles sont 2500 fois plus faibles que celles déposées en utilisant la méthode fluorimétrique proposée antérieurement⁹ et 25 fois plus faibles que celles injectées en chromatographie liquide haute performance¹⁰. Les limites de détection obtenues sont de 3 pmoles pour le platydesminium et de 0,1 pmoles pour le balfourodinium alors qu'elles sont respectivement de 10 et de 100 pmoles lorsqu'on utilise la chromatographie liquide haute performance¹⁰ ou la méthode fluorimétrique⁹.

(3) le coût peu élevé: les quantités de solvants utilisées sont en effet très réduites.

Nous appliquons maintenant cette technique en routine dans notre laboratoire, non seulement pour les alcaloïdes des souches de *Choisya ternata* mais aussi pour d'autres souches de Rutacées: *Ruta graveolens* (15) et *Ptelea trifoliata* synthétisant d'autres alcaloïdes dihydrofuro[2,3-*b*]quinoléinium.

BIBLIOGRAPHIE

- 1 A. Fujiwara, *Plant Tissue Culture*, JAPTC, Tokyo, 1982, 839 pp.
- 2 R. Verpoorte, T. Mulder-Krieger, R. Wijnsma, J. M. Verzijl et A. Baerheim Svendsen, *Z. Naturforsch. C*, 39 (1984) 680.
- 3 F. Sasse, J. Hammer et J. Berlin, *J. Chromatogr.*, 194 (1980) 234.

- 4 E. W. Weiler, dans W. Barz, E. Reinhard et M. H. Zenk (Rédacteurs), *Plant Tissue Culture and its Biological Application*, Springer, New York, 1977, p. 266.
- 5 F. Sasse, U. Heckenberg et J. Berlin, *Plant Physiol.*, 69 (1982) 400.
- 6 B. D. Neumann et M. H. Zenk, *Planta Med.*, 162 (1984) 250.
- 7 P. G. Waterman, *Biochem. Systematics Ecol.*, 3 (1975) 149.
- 8 M. Rideau, C. Verchere, P. Hibon, J. C. Chenieux, P. Maupas et C. Viel, *Phytochemistry*, 18 (1979) 155.
- 9 M. Montagu-Bourin, M. Rideau, P. Levillain et J. C. Chenieux, *Planta Med.*, 38 (1980) 50.
- 10 M. Montagu, P. Levillain, J. C. Chenieux et M. Rideau, *J. Chromatogr.*, 331 (1985) 437.
- 11 M. Gras, J. Creche, J. C. Chenieux et M. Rideau, *Planta Med.*, 46 (1982) 231.
- 12 F. A. Huf, *Pharm. Weekbl. Sci.*, 6 (1984) 7.
- 13 M. Montagu, P. Levillain, M. Rideau et J. C. Chenieux, *Talanta*, 28 (1981) 709.
- 14 E. J. Shellard, *Quantitative Paper and Thin-layer Chromatography*, Academic Press, Londres, 1968, 140 pp.
- 15 K. G. Ramawatt, M. Rideau et J. C. Chenieux, *Phytochemistry*, 24 (1985) 441.