



Faculté de Pharmacie

Ecole Doctorale en Sciences Pharmaceutiques

Reprogrammation métabolique induite dans les tissus hyperplasiques formés chez le tabac infecté par *Rhodococcus fascians*: aspects fondamentaux et applications potentielles.

Aminata Pagnimdebsom NACOULMA

Thèse présentée en vue de l'obtention du grade de Docteur en Sciences Biomédicales et Pharmaceutiques

Promoteur : Professeur Mondher El Jaziri Laboratoire de Biotechnologie végétale (Faculté des Sciences ULB)

Co-promoteur : Professeur Pierre Duez Laboratoire de Pharmacognosie, Bromatologie et Nutrition humaine

Composition du jury :

Prof. Marc Van Damme (Président) Prof. Caroline Stévigny Prof. Jean-Michel Kauffmann (Secrétaire) Prof. Pierre Van Antwerpen

Prof. Marie-Laure Fauconnier (Unité de Chimie Générale Organique, ULg-Gembloux)

Année académique 2012-2013

REMERCIEMENTS

Au terme de ce travail, je voudrais remercier tous ceux qui, d'une manière ou d'une autre, par un conseil, une idée, un coup de main et surtout par leur amitié m'ont permis de réaliser cette thèse.

Je tiens particulièrement à remercier le Professeur Marc VAN DAMME pour la confiance qu'il a placée en moi mais aussi pour tout le soutient qu'il m'a apporté durant mon cursus universitaire et académique au sein de la faculté de Pharmacie.

Merci au Professeur Mondher El JAZIRI d'avoir accepté, malgré ses multiples occupations, de diriger cette thèse et de guider mes premiers pas dans la recherche. Sa rigueur scientifique, ses conseils et ses encouragements m'ont été bénéfiques tout au long de la préparation et de la finalisation de cette thèse.

Je tiens aussi à exprimer toute ma gratitude au Professeur Pierre Duez pour m'avoir accueillie au sein de son service, pour avoir mis à ma disposition des conditions matérielles favorables à la réalisation de ce travail mais aussi pour sa disponibilité dans la finalisation de cette thèse. Merci à Marie-Louise Faes et Olivier Vaillant pour leur disponibilité et leur sympathie à mon égard.

Je remercie les Professeurs Marie-Laure FAUCONNIER (ULg), Caroline STEVIGNY (ULB), Jean-Michel KAUFFMANN (ULB), Pierre VAN ANTWERPEN (ULB) et Marc VAN DAMME (ULB) pour avoir accepté de juger ce travail.

Je tiens à remercier particulièrement Véronique Mégalizzi, Manuella De Lorenzi, Laurent Pottier, Adeline Mol pour leur sympathie, leur disponibilité, leur amitié et leurs encouragements. Je remercie Véronique Mathieu, Jacques Dubois et Jean-Michel Kauffman ainsi que tous les membres des services de Toxicologie ; de Chimie Bio-analytique, Toxicologie et Chimie Physique Appliquée ; de Chimie analytique instrumentale et Bioélectrochimie que j'ai côtoyés tout au long de cette thèse et avec qui j'ai noué des relations affectueuses en particulier Touria Lamkami et Dominique Mertens.

Je pense également à tous les Professeurs, assistants, techniciens, doctorants et étudiants que j'ai pu rencontrer au sein de la faculté de Pharmacie.

Je tiens à exprimer toute ma reconnaissance à mes chers parents qui m'ont soutenue et encouragée tout au long de mes études de Pharmacie puis durant ces années de thèse. Cette thèse est Le cadeau que je leur fait à tous les deux et j'espère qu'ils sont fiers et satisfaits de la personne que je suis devenue. Merci « *papa et maman* » d'avoir fait de moi ce que je suis.

Merci à mes frères, mes sœurs, mes tantes et oncles, à toute ma très grande famille (Belgique et Burkina) sans bien sûr oublier mes amis pour leur soutien, leur réconfort ainsi que pour leur patience à mon égard.

ABRÉVIATIONS
ABSTRACT
RÉSUMÉ
INTRODUCTION12
1. Contexte global de l'étude12
1.1. Le métabolisme secondaire chez les végétaux : une nécessité adaptative ?
1.2. Les métabolites secondaires : fonctions dans la plante et utilisation par l'Homme14
1.3. Régulation du métabolisme secondaire chez les plantes19
2. Problématique globale de l'étude : Modulation du métabolisme secondaire végétal lors des interactions plantes-bactéries pathogènes
3. Problématique spécifique de l'étude : le pathosystème <i>R.fascians</i> -plante, état de la question25
OBJECTIFS
MATÉRIEL ET MÉTHODES
1. Matériel biologique (végétal et animal)
1.1. Préparation du matériel végétal34
1.1.1. Préparation des extraits végétaux et fractionnement bioguidé par MTT
1.1.2. Dosage des composés phénoliques et des flavonoïdes totaux
1.2. Culture cellulaire in vitro
2. Etude métabolomique des extraits de plantes infectées et non infectées par R. fascians
2.1. Métabolomique basée sur la RMN
2.2. Analyses statistiques de données multivariées 40
3. Evaluation des propriétés biologiques des extraits de la galle feuillée versus la plante non infectée43
3.1. Etude des propriétés antibactériennes
3.2. Etude des propriétés anti-oxydantes 44
3.2.1. Méthode de réduction du cation ferrique (FRAP)44
3.2.2. Méthode d'inhibition du radical DPPH45
3.3. Etude des propriétés anti-inflammatoires par inhibition de la lipooxygénase
4. Investigation de l'activité anti-tumorale des extraits de galle feuillée sur des cellules cancéreuses animales47
4.1. Etude de l'activité antiproliférative 48

Table des matières

4.1.1. Le test colorimétrique MTT	48
4.1.2. Vidéomicroscopie (mesure de la croissance globale)	49
4.2. Etude de l'effet sur le cycle cellulaire et le cytosquelette	51
4.2.1. Vidéomicroscopie (mesure de la durée et du nombre de division cellulaire)	51
4.2.2. Cytométrie de flux	52
4.2.3. Immuno-marquage (noyau, tubuline et actine)	53
4.3. Identification des structures responsables de l'activité anti-tumorale par chromatographie gazeuse couplée à la spectrométrie de masse	؛ 55
RÉSULTAT 1	57
RÉSULTAT 2	60
RÉSULTAT 3	64
DISCUSSION GÉNÉRALE	67
CONCLUSION	74
PERSPECTIVES	77
BIBLIOGRAPHIE	81

ABRÉVIATIONS

ADN: Acide DésoxyriboNucléique	DPPH : 2,2-Dil
anti-UV : anti-Ultra Violet	EAA : Equivale
ATCC: American Type Culture Collection	EAG: Equivale
attR : régulateur transcriptionnel du gène att	EQ: Equivalent
BINGO : Biological Network Gene	ETI : Effector-
Ontology	ETS : Effector-
BSA : Bovine Serum Albumine	FCR : Folin-C
BY-2 : Bright Yellow 2 tobacco cell	FID: Free Induc
CCM : Chromatographie sur Couche Mince	FRAP: Ferric R
CDCl ₃ : chloroforme deutéré	GC-MS : Chron
CMF: Cytométrie de Flux	à la Spectromét
CS: Chalcone Synthase	GG : Global Gr
CycB1;1: Cyclin B-dependent protein kinase	¹ H-NMR/ ¹ H-1
D ₂ O : eau deutérée	Magnétique du
DABCO: 1-4-Diazabi- Cyclo(2,2,2)-Octane	HR: Hypersens
DAMP : Damage Associated Molecular Pattern	HRGPs : Hydro Proteins
DAPI: 4',6'-DiAmidino-2-PhénylIndole	IC ₅₀ : concentra croissance cellu
DMSO : Diméthylsulfoxyde	

Phényl-1-PicrylHydrazyl

ent Acide Ascorbique

ent Acide Gallique

Quercétine

Triggered Immunity

Triggered Susceptibility

iocalteu Reagent

ction Decay

Reducing Antioxidant Power

matographie Gazeuse couplée rie de Masse

owth

RMN : Résonance Proton

sitive Reaction

oxyproline Rich Glyco

ation qui inhibe 50% de la laire

LB : Luria Bertani culture medium

LOX : lipoxygénase

LysR: régulateur transcriptionnel du gène *Lys*

MAMP: Microbe Associated Molecular Pattern

M-CoA: malonyl-Coenzyme A

MR: Masse Relative

MS ¹/₂ : Murashige and Skoog half culture medium

MTT : 3-[4,5-diméthylthiazol-2yl]diphényltétrazolium

OPLS-DA : Analyse Discriminante par Projection Orthogonale de Structures Latentes

ORF: Open Reading Frame

PAL: Phénylalanine Amino Lyase

PAMP : Pathogen Associated Molecular Pattern

PBS: Phosphate Buffered Saline

PCA/ ACP : Principal component Analysis/ Analyse en Composantes Principales

PDB: Protein Data Bank

PLS-DA : Analyse de Discrimination par Projection de Structures latentes

Protéines PR: Pathogen-Related proteins

PTI : PAMP Triggered Immunity

ROS: Reactive Oxygen Species

STS: stilbène synthase

UFC/mL: Unité Formant Colonie par millilitre

TAL: Tyrosine AminoLlyase

4-IBP: N-(N-benzylpiperidin-4-yl)-4-iodobenzamide

ABSTRACT

Plant-bacteria pathosystems often result within plant cell a profound reprogramming at both morphogenetic and metabolomic levels. Such alterations are the results of an invasive strategy developed by the pathogenic bacteria leading to the establishment of its ecological niche.

For the case study of plant-*Rhodococcus fascians*, a phytopathogenic bacteria, a particular morphological structure is developed at the site of infection which consists in an hyperplasia with multiple malformed leaves and embryonic adventitious buds that are inhibited for further outgrowth. This hyperplasia is also called "leafy gall".

Within leafy gall cells, the residing bacteria induce considerable metabolic alterations. Such alterations concern both primary metabolites that can be used by the endophytic bacteria as nutrients and secondary metabolites, more particularly compounds that affect plant cell and/or bacteria proliferation. Other secondary metabolites may also protect bacteria against plant defense machinery. All together these considerations suggest that the synthesis and accumulation of such metabolites occurring in leafy galls are induced and regulated by both partners of the interaction. This makes them a potential resource for novel and/or original chemical structures that can be the topic of fundamental research as well as in pharmaceutical research for potential drugs with notable biotechnological application.

In the present study, we focused on two main objectives:

- To characterize metabolic alterations of mature (well developed) tobacco hyperplasic tissues following infection with *R. fascians*.

- To confirm if the antiproliferative effect observed within leafy gall cells can also be observed on human cancer cell lines treated with *R. fascians*-infected tissues extracts.

To tackle these issues, non-targeted metabolomic analysis of aqueous and chloroform extracts of leafy gall and non-infected tobacco was carried out by ¹H-NMR coupled to PCA and OPLS-DA. Polar metabolite profiling reflects modifications mainly in the primary metabolites and in some phenolics. In contrast, main modifications occurring in non-polar metabolites concern secondary metabolites, GC-MS indicating alterations in the diterpenoids family (Résultat 1).

With regard to the observed phenolics accumulation in leafy gall tissue, tobacco leafy galls extracts were used to investigate i) the phenolic and flavonoid contents; ii) the antioxidant 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl radical scavenging activity by and ferric reducing antioxidant/power assays; iii) the anti-inflammatory activity by the lipoxygenase inhibition assay. Infection by *R. fascians* significantly modifies the phytochemical profile of *N. tabacum* as well as its biological properties. The total phenolic content was increased (120-307 %), and that of flavonoids was reduced (20-42.5 %). Consequently, the antioxidant and anti-inflammatory activities of non-infected tobacco extracts are significantly modified when plants are infected by *R. fascians*. This shows that infection by *R. fascians* favored the production of anti-inflammatory and antioxidant compounds in N. tabacum (Résultat 2).

With respect to the observed diterpenoids accumulation, the chromatographic fractionation of chloroformic extract of leafy galls yielded fraction F3.1.1which inhibited the proliferation of glioblastoma U373 cells (IC₅₀ = 4.5 μ g/mL). Using time-lapse videomicroscopy imaging, combined with flow cytometry and immunofluorescence analysis, F.3.1.1 was shown to increase cell division duration, cause nuclear morphological deformations and cell enlargement, and, at higher

concentrations, karyokinesis defects leading to polyploidy and apoptosis. Gas chromatography coupled to mass spectrometry revealed that F3.1.1 consisted of a mixture of isomers probably belonging to the cembrenoids. The cellular defects induced by F3.1.1 were caused by peculiar cytoskeleton disorganization, with the occurrence of fragmented tubulin and strongly organized microtubule aggregates within the same cell. Colchicine, paclitaxel, and cembrene also affected U373 cell proliferation and karyokinesis, but the induced microtubule rearrangement was very different from that provoked by F3.1.1. Altogether our data indicate that the cembrenoid isomers in F3.1.1 have a unique mode of action and are able to simultaneously modulate microtubule polymerization and stability (Résulta 3)

RÉSUMÉ

Les pathosystèmes, plante-bactérie, aboutissent souvent au niveau de la plante à de profondes reprogrammations, tant au niveau de la morphogenèse que du métabolome. Ces altérations constituent l'aboutissement de la stratégie invasive développée par la bactérie pour la mise en place de sa niche écologique.

Dans le cas de l'interaction plante-*Rhodococcus fascians*, une bactérie phytopathogène, il se développe, au niveau du site d'infection, une structure morphologique particulière qui est une hyperplasie formée par une multitude de bourgeons néoformés et qui sont inhibés dans leur développement ultérieur. Cette structure est nommée « galle feuillée ».

Au sein de cette hyperplasie, la bactérie qui y réside provoque des altérations métaboliques considérables. Ces altérations métaboliques concernent non seulement les produits du métabolisme primaire qui peuvent servir de source de nutriment pour la bactérie mais également le métabolisme secondaire, plus particulièrement des composés qui affectent la prolifération cellulaire végétale et bactérienne, d'autres qui participent à la protection de la plante contre l'invasion bactérienne. D'autre part, la bactérie se protège en synthétisant des substances agissant contre les mécanismes de défense de la plante. Ces composés sont parfois spécifiques aux tissus végétaux infectés, ce qui suggère que la synthèse et l'accumulation de ces métabolites sont induites et coordonnées lors du processus d'interaction plante/bactérie-pathogène.

Ces métabolites spécifiques aux galles végétales constituent dès lors une nouvelle source de composés qui mérite d'être explorée non seulement dans un objectif de recherche fondamentale mais également dans une perspective de recherche/développement pour des applications biotechnologiques, dans le domaine pharmaceutique notamment.

Dans le cadre de notre travail de thèse, nous nous sommes fixés deux objectifs principaux :

- Caractériser certaines de ces altérations métaboliques au niveau des tissus hyperplasiques de tabac formés suite à une infection par *R. fascians*.
- Vérifier si des extraits de l'hyperplasie de tabac inhibent également la prolifération des cellules cancéreuses humaines, comme cela semble être le cas pour les cellules de la galle feuillée.

Pour aborder le premier objectif, nous avons utilisé une approche métabolomique globale, basée sur une analyse comparative des spectres ¹H-RMN d'extraits bruts de tissus infectés et de tissus non-infectés couplée à des analyses statistiques de données multivariées (ACP, OPLS-DA). Cette analyse métabolomique a permis la mise en évidence de groupes de métabolites dont l'accumulation diffère significativement entre les deux types de tissus analysés. Le résultat le plus marquant concerne l'accumulation marquée de composés phénoliques et de métabolites de la famille des diterpènes dans les tissus de la galle feuillée (Résultat 1).

Nous avons également évalué l'activité biologique de l'ensemble des substances phénoliques de la galle feuillée, activités antioxydante (DPPH, FRAP) et anti-inflammatoire (15-LOX) notamment.

L'analyse du profil phytochimique par tests colorimétriques indique une augmentation significative de ces substances (120 à 307 %) dans l'extrait polaire (méthanol/eau) et une diminution nette du taux de flavonoïdes (20 à 42,5 %) pour les extraits de plante infectée comparés aux tissus non infectés. De plus, il ressort, de l'analyse des activités biologiques, une augmentation du potentiel réducteur et anti-radicalaire des extraits de la galle feuillée ainsi qu'une activité inhibitrice envers la lipoxygénase (Résultat 2).

L'accumulation des composés diterpéniques dans les tissus de la galle feuillée est particulièrement intéressante puisque diverses activités biologiques sont reportées dans la littérature pour ce groupe de composés. Notons que lorsque la galle feuillée est formée, la croissance des cellules qui la constituent est inhibée tant que la bactérie est encore vivante dans les tissus hyperplasiques. Cette observation nous a conduits à formuler l'hypothèse de l'existence, au sein des cellules de l'hyperplasie, de composés qui peuvent également affecter la prolifération des cellules cancéreuses humaines. Notre approche a été de tester différents extraits des hyperplasies de tabac, toujours en comparaison avec les cellules de plantes non infectées. Cette étude a abouti à la mise en évidence d'un mélange d'isomères (F3.1.1) appartenant probablement au groupe des incensoles (famille des cembrènoïdes) qui affectent la prolifération *in vitro* des cellules de glioblastome U373 ($IC_{50} = 4,5 \mu g/mL$), ralentissent la durée de la division cellulaire, affectent la taille des cellules et enfin induisent des anomalies lors de la karyokinèse. Des investigations plus approfondies ont permis d'identifier la dynamique tubuline/microtubule comme étant la cible de ce mélange de composés (F3.1.1) et ce, d'une manière originale par rapport aux autres agents connus, qui ont pour cible la polymérisation ou la dépolymérisation des microtubules, tels la colchicine, le paclitaxel ou encore le colchitaxel.

Le mécanisme d'action des composés de F3.1.1 est unique et prometteur du fait que la dynamique des microtubules reste une cible de choix dans le traitement des cellules cancéreuses. De même, la découverte des diterpènes dans les extraits de cellules hyperplasiques de tabac, conforte notre première approche métabolomique, puisqu'il s'agit de composés terpéniques. (Résultat 3)

INTRODUCTION

1. Contexte global de l'étude

1.1. Le métabolisme secondaire chez les végétaux : une nécessité adaptative ?

Les plantes sont des organismes autotrophes qui se nourrissent d'éléments simples (carbone, oxygène, azote) et synthétisent des composés organiques pour leur métabolisme, à la fois primaire et secondaire. Les métabolites primaires, comme les protéines, les acides nucléiques, les acides/esters gras et les carbohydrates, sont des polymères construits à partir d'unités moléculaires simples (acides aminés, nucléotides, acides maloniques et sucres, respectivement). Ils se retrouvent dans toutes les espèces et ont un rôle essentiel pour le métabolisme ainsi que le développement végétal. Par contre, les métabolites secondaires, qui dérivent de ces métabolites primaires (Figure 1) (Aharoni and Galili 2011), sont des composés qui ne participent pas directement au développement de la plante, bien qu'ils participent pleinement à l'efficacité de sa photosynthèse ou de sa reproduction (attraction des pollinisateurs, par exemple); ils interviennent principalement dans les relations que la plante a avec son environnement (Kliebenstein and Osbourn 2012 ; Pavarini *et al.*, 2012). Contrairement aux métabolites primaires, les produits du métabolisme secondaire ne sont pas indispensables à la survie de l'individu mais à la survie de la population végétale dans son ensemble au sein de son biotope (Hartmann 2007).

Le métabolisme secondaire présente une certaine spécificité car la nature des composés varie fortement d'une famille botanique à l'autre et ils accomplissent des fonctions multiples, traduisant ainsi une plasticité et une diversité utile. En effet, les plantes se distinguent des autres organismes vivants par cette expansion du métabolisme secondaire qui aboutit à la synthèse d'une myriade de molécules aux propriétés et fonctions diverses. De même, il est utile de rappeler que la biosynthèse de ces métabolites secondaires, ou plutôt « non primaires », est souvent associée ou même essentielle aux processus de défense de la plante. Leur synthèse peut être constitutive, c'est à dire présente durant tout le cycle de vie de la plante, même en absence d'agression, ou induite lorsque la synthèse est déclenchée en réponse à la prédation. Dans la mesure où la synthèse de ces composés a un coût métabolique parfois élevé pour la plante (synthèse d'un composé nécessitant plusieurs étapes enzymatiques, par exemple), les réponses induites représentent une solution probablement optimale en termes de bilan énergétique, ce qui pourrait résulter d'un caractère adaptatif (Neilson *et al.*, 2013).

Il faut garder à l'esprit que la colonisation du milieu terrestre par les végétaux qui sont contraints à être immobile a conduit à une multiplication des niveaux d'interactions biotiques et abiotiques (sol avec sa flore de microorganismes, animaux terrestres, radiation, ...) et, par conséquent, à une nécessité de diversification fonctionnelle des métabolites secondaires. L'émergence d'un écosystème de plus en plus complexe et la diversification des niches écologiques constituent la base de la biodiversité que nous connaissons. Les métabolites secondaires seraient-ils des acteurs dans la régulation fine de la biodiversité ?

1.2. Les métabolites secondaires : fonctions dans la plante et utilisation par l'Homme.

Prises dans leur ensemble, les plantes produisent plus de 200 000 métabolites secondaires et on peut en identifier au moins trois grandes classes (Figure 1): les alcaloïdes (qui dérivent des acides aminés), les molécules phénoliques (qui dérivent de la voie des phénylpropanoïdes, issues de l'acide shikimique et de l'acide malonique) et les terpénoïdes (qui dérivent de l'isopentényl pyrophosphate, issu du méthylérythritol-4-phosphate ou de l'acide mévalonique) (Wink 2003, Aharoni and Galili 2011). Toutefois, la grande diversité observée dans le métabolisme secondaire résulte des réactions chimiques post-biosynthèse (hydroxylation, glycosylation, carboxylation, condensation, notamment) mais aussi d'un processus évolutif, issu de la sélection naturelle, favorisant surtout l'acquisition de mécanismes de défense contre les microorganismes pathogènes, la production de phytoalexines¹, de molécules de signalisation essentielles à l'établissement des réactions d'hypersensibilité, de résistance locale acquise et de résistance systémique acquise (Benderoth 2006). Ces molécules ont été sélectionnées au cours de l'évolution pour l'interaction qu'elles ont avec un récepteur d'un organisme agresseur. Elles représentent une grande source potentielle d'agents thérapeutiques, largement exploitée par l'Homme dans différents domaines de la vie quotidienne (Croteau et al., 2000; Cragg and Newman 2010 ; Ncube et al., 2012).

¹Phytoalexine: Composé synthétisé et accumulé par la plante après avoir été exposée à des microorganismes. Ces composés peuvent avoir une activité antimicrobienne, protégeant ainsi la plante contre les agressions des microorganismes (Ahuja *et al.*, 2012).



(pyruvate, phosphoénolpyruvate, acétyl-CoA), de la voie des pentoses phosphate (glycéraldéhyde-3-P, Erythrose-4-P) Figure 1: Origine biosynthétique des métabolites secondaires. La production des métabolites secondaires (vert) est et du métabolisme des lipides (glycéraldéhyde-3-P et acétyl-CoA). Ces précurseurs sont à l'origine de la diversité étroitement liée au métabolisme primaire (rouge). La plupart des précurseurs (bleu) sont issus de la glycolyse structurale observée au niveau des métabolites secondaires. (Adapté de Aharoni and Galili 2011). Les alcaloïdes sont biologiquement actifs et sont au cœur des phénomènes d'adaptation et de défense face aux pressions biotiques (herbivores, microorganismes) (Tiwari et al., 2013). D'un point de vue biosynthétique, il existe une multitude de sous-familles d'alcaloïdes, qui ont été classées en fonction de leurs origines biosynthétiques et de la nature des hétérocycles azotés (Figure 2). On les classe en général comme alcaloïdes « vrais » lorsqu'ils possèdent un azote intra-cycle, en proto-alcaloïdes lorsqu'ils proviennent d'acides aminés dont l'azote est extra-cycle (L-phénylalanine, acides aminés aliphatiques), en pseudo-alcaloïdes lorsque leur squelette ne provient pas d'acides aminés (dérivés xanthiques, terpéniques, stéroïdiens, pipéridiniques) (Croteau et al., 2000 ; Glenn 2013). Cette famille de métabolites secondaires a été particulièrement étudiée, du fait des intérêts thérapeutiques et économiques qui y sont associés. On retrouve des molécules exploitées par l'industrie pharmaceutique comme la quinine, des stupéfiants (la morphine, la cocaïne), des anticancéreux (la colchicine, la vincristine, la camptothécine, le taxol, ...), des molécules utilisées comme poisons (la strychnine, ...) ou encore comme stimulants (la caféine, ...) (O'Connor 2012).

Les composés phénoliques constituent une vaste famille qui regroupe des composés non azotés présentant des cycles aromatiques hydroxylés (Figure 3). Ils regroupent plusieurs types de composés impliqués dans les différents mécanismes de défense des plantes. D'un point de vue biosynthétique, la majeure partie des composés aromatiques retrouvés dans les plantes appartiennent à la famille des phénylpropanoïdes, qui dérivent de la phénylalanine ou de la tyrosine (Mandal *et al.*, 2010; Bhattacharya *et al.*, 2010). Elle comprend :



Figure 2 : Origine biosynthétique de différentes classes d'alcaloïdes. Les noyaux de base de ces différents alcaloïdes dérivent des acides aminés du métabolisme primaire.

- des dérivés simples de l'acide cinnamique dont certains sont utilisés dans des domaines alimentaires et cosmétiques (vanilline, eugénol...), mais aussi en industrie pharmaceutique (l'acide salicylique) (Croteau *et al.*, 2000)
- des coumarines synthétisées en réponse à des attaques par des pathogènes (Ayabe *et al.*, 2010) et lors des réactions de compétition plante à plante (allélopathiques) (Silva *et al.*, 2013),
- des flavonoïdes qui constituent en eux même une famille de composés extrêmement vaste, jouant des rôles physiologiques importants comme attracteurs de pollinisateurs (anthocyanes), filtres anti-UV, défense contre les pathogènes (glycéolline du soja) et de signalisation/communication inter-règne, notamment lors des interactions légumineuses/*Rhizobium*. La variété des composés est essentiellement liée au degré d'hydroxylation, de méthylation et/ou de glycosylation de chacun des trois cycles des molécules de base. De nombreux flavonoïdes, présents dans les aliments, présentent un intérêt du point de vue de la santé humaine, particulièrement de par leurs activités biologiques (hespéridine utilisé pour son effet sur les vaisseaux sanguins et isoflavones comme phytoestrogènes dans la ménopause) et leur caractère antioxydant, mais aussi comme colorants alimentaires (anthocyanes) (Wang *et al.*, 2011 ; Ferreyra *et al.*, 2012 ; Abdel-Lateif *et al.*, 2012).



familles de composés phénoliques dérivent de l'acide shikimique. TAL= tyrosine amino lyase, Figure 3 : Origine biosynthétique des phénylpropanoïdes. Les noyaux de base de différentes PAL= phénylalanine amino lyase, STS= stilbène synthase, CS= chalcone synthase, et M-CoA= malonyl-Coenzyme A.

• des composés condensés de monomères d'acides phénoliques, de flavanols ou de phénylpropanes (tanins galliques, ellagiques, catéchiques, proanthocyanes et lignanes respectivement) intervenant dans la formation de barrières physiques et dans le renforcement des parois cellulaires pour protéger la plante lors des attaques biotiques et abiotiques. L'astringence conférée par les tanins provoque une baisse d'appétence chez l'herbivore et surtout une diminution de la digestibilité des protéines. La précipitation par les tanins des enzymes secrétées par certains phytopathogènes est une propriété qui peut contribuer à la résistance chez certaines plantes. La synthèse des tanins est, dans certains cas, induite par la perception de stress abiotique et est médiée par des mécanismes de signalisation impliquant l'acide jasmonique et/ou l'éthylène (Dearing *et al.*, 2005; Moura *et al.*, 2010).

Les terpénoïdes constituent une vaste famille de composés, qui sont issus de la condensation d'unités de type isoprène (5 atomes de carbones). Cette famille des isoprénoïdes regroupe des molécules non-volatiles et volatiles, composants principaux d'huiles essentielles, mais aussi des molécules de haut poids moléculaire. La classification des terpénoïdes repose sur le nombre d'unités isopréniques. On parle d'hémiterpènes (C5), de mono-(C10), sesqui-(C15), di-(C20), tri-(C30) et de tétra-(C40) terpènes notamment (Figure 4). Ils interviennent dans les mécanismes de défense contre les bactéries et dans la signalisation mise en place lors des interactions plantes-insectes (mono-, sesqui- et di- terpènes). Ces substances sont exploitées industriellement comme colorants, arômes alimentaires et cosmétiques (monoterpènes, tétraterpènes), en thérapeutique pour leurs effets anti-inflammatoires, antibactériens (monoterpènes), et anticancéreux (taxoïdes diterpéniques) (Ramar and Ponnampalam 2010 ; Mazid *et al.*, 2011).



Figure 4 : Origine biosynthétique des terpénoïdes. Les noyaux de base des différents terpénoïdes dérivent de l'isoprène(C5) produit par la voie du mévalonate ou du méthylerythritol-4-P. Ces précurseurs proviennent du métabolisme des sucres (Figure1). Par ailleurs, les isoprénoides participent à la biosynthèse d'autres composés, tels que les pigments chlorophylliens (chlorophylles a, b et d) et les transporteurs d'électrons impliqués dans le processus de photosynthèse (ubiquinone, plastoquinone).

Les hétérosides sont un ensemble de structures formées par la condensation d'un ose (glycone) et d'une substance non glucidique, appelée génine ou aglycone; l'origine biosynthétique de ces génines est très hétérogène. Beaucoup d'hétérosides sont des formes biologiquement inactives qui libèrent les formes bioactives suite au clivage du sucre par des enzymes spécifiques (hétérosides cyanogènes, hétérosides soufrés) (Wink 2011; Kliebenstein and Osbourn 2012). Toutefois, les saponosides et les hétérosides cardiotoniques doivent leurs propriétés biologiques en partie aux résidus glucidiques. Les saponosides ont la capacité d'altérer la stabilité des membranes et sont souvent impliqués dans la résistance aux pathogènes. Ils sont utilisés en industrie comme tensioactifs dans la confection de détergents. Les hétérosides cardiotoniques sont des molécules très toxiques impliquées dans la défense contre les insectes et les herbivores. Ces molécules sont largement utilisées en thérapeutique pour leur action sur le cœur (Wink 2011).

1.3. Régulation du métabolisme secondaire chez les plantes.

La régulation du métabolisme secondaire est influencée par les facteurs endogènes, liés aux différents stades de développement de la plante, et également par des facteurs exogènes, liés aux paramètres environnementaux (facteurs biotiques et/ou abiotiques) (Bruni and Sacchetti 2009; Reichling 2009). Ces facteurs activent spécifiquement des mécanismes conduisant à la modulation (biogénèse, accumulation) des métabolites secondaires afin de permettre à la plante de coordonner son développement, sa reproduction et ses multiples interactions avec son biotope (Figure 5) (Wink 2009 ; Hartman 2007)

Dans le cas des régulations endogènes, des études ont montré qu'il existe une régulation physiologique de certaines classes de métabolites, en fonction de la croissance et/ou de la différenciation (phytohormones), et du stade de développement/maturité de la plante (alcaloïdes, terpénoïdes) (Gupta *et al.*, 2011).

Les facteurs exogènes regroupent les modifications environnementales (pollution), climatiques (température, irradiation) et les stress biotiques (plantes, insectes, herbivores, micro-organismes). Les facteurs environnementaux induisent la production de métabolites secondaires impliqués dans la protection de la plante (composés phénoliques) tandis que les attaques biotiques provoquent la synthèse de métabolites secondaires impliqués dans les mécanismes de résistance/défense de la plante (composés de natures diverses, phénoliques, alcaloïdes, terpénoïdes) (Pavarini *et al.*, 2012 ; Ncube *et al.*, 2012).

La plante est constamment confrontée à des agressions de toute nature, allant des rayonnements électromagnétique, aux attaques d'herbivores, d'insectes et de microorganismes divers (Agrawal, 2007). Elles sont en effet la cible privilégiée pour de nombreux organismes hétérotrophes qui

19



Figure 5: Fonctions écologiques des métabolites secondaires des plantes. Les produits du métabolisme secondaire interviennent dans les différentes relations des plantes avec leur écosystème. (Hartmann 2007)

n'ont pas la capacité de produire tous les composés carbonés indispensables à partir de molécules inorganiques. Ainsi, pour se protéger, les plantes ont développé des stratégies de défenses adaptées et diverses (mécaniques et/ou chimiques). Dans le cas particulier des interactions avec des agresseurs externes, ces derniers sont amenés à franchir, au préalable, une barrière de résistance mécanique associée aux défenses constitutives ou passives de la plante (épines, poils, écorce, épiderme, parois cellulaires) et une barrière de résistance chimique (les métabolites secondaires bioactifs) ; souvent une barrière supplémentaire est activée lorsqu'il s'agit de systèmes de défenses inductibles et spécifiques à l'agresseur (Tuomi, 1992; Agrawal, 2007 ; Reichling 2009).

Dans le cadre de ce travail nous allons focaliser notre attention sur les altérations métaboliques chez les cellules végétales qui sont en interaction avec des microorganismes. Dans ce contexte, il est utile de préciser qu'une multitude de microorganismes partage le même environnement que les plantes, avec un contact permanent et ce, depuis l'origine de leur développement et tout au long de leur co-évolution. Ce contact peut s'établir dès que la graine tombe au sol ; dans certains cas, ce contact peut se poursuivre et se développer tout au long de la croissance de la plante. La majorité de ces microorganismes vivent probablement en saprophyte et n'exercent *a priori* aucune action sur la plante ; d'autres peuvent protéger et favoriser le développement de la plante (*Plant Growth Promoting Bacteria*, bactéries symbiotiques fixatrices d'azote et champignons mycorhiziens, notamment). D'autres microorganismes, dits pathogènes, au contraire, exercent un effet néfaste ou délétère. Plus particulièrement nous allons orienter nos recherches sur les modulations métaboliques induites chez les cellules végétales en interaction avec ces bactéries pathogènes.

Problématique globale de l'étude : Modulation du métabolisme secondaire végétal lors des interactions plantesbactéries pathogènes.

Les interactions plantes/bactéries pathogènes sont constamment rencontrées, ce qui oblige les plantes à trouver des stratégies adaptées pour se défendre face aux nombreuses attaques dont elles font l'objet (Spiteller, 2008).

La reconnaissance du pathogène par la plante est un évènement important pour la mise en place du processus de résistance chez l'hôte. Selon le type d'agresseur rencontré, la plante a la possibilité de réagir de trois façons différentes.

- Dans un premier cas, <u>la plante est en mesure d'identifier de manière non spécifique la présence d'un pathogène</u>; de ce fait, elle est capable de mettre en place une cascade de processus pour se défendre. Cette résistance non-spécifique de l'hôte est basée sur la reconnaissance d'éliciteurs généraux communs à de nombreux agents pathogènes. La relation est dite dans ce cas *« non-hôte »*. Ce terme d'éliciteur est attribué à un ensemble de composés de natures diverses (protéines, glycoprotéines, glycanes, lipides) qui induisent les réactions de défense générale chez les plantes (Montesano *et al.*, 2003). Ainsi, les éliciteurs peuvent être soit exogènes, lorsqu'il s'agit d'éléments constitutifs des parois microbiennes ou de molécules sécrétées par le microorganisme, soit endogènes lorsqu'ils proviennent de la dégradation des parois cellulaires de l'hôte sous l'effet des enzymes hydrolytiques du pathogène (Montesano *et al.*, 2003; Garcia-Brugger *et al.*, 2006 ; Henry *et al.*, 2012).

La notion d'éliciteur a récemment évolué vers celle de P (M ou D) AMP (*Pathogen, Microbe or Damage Associated Molecular Pattern*) qui représente des motifs spécifiques retrouvés dans des composés protéiques ou polysaccharidiques. Ainsi la reconnaissance des P (M ou D) AMPs comme des molécules exogènes «non soi» par la plante hôte est le premier niveau d'activation des mécanismes de défenses végétales. Ce mécanisme, appelé PTI (*PAMP Triggered Immunity*) correspond au système d'immunité basal (Jones and Dangl, 2006 ; Boyd *et al.*, 2012).

- Dans un deuxième cas, <u>la plante est en mesure d'identifier de manière **spécifique** la <u>présence d'un pathogène</u>, la relation est dite *« hôte-incompatible »*, lorsqu'il existe une incompatibilité entre l'espèce végétale et le pathogène qui est, dans ce cas, incapable d'infecter son hôte. L'induction d'une réaction de défense hypersensible (HR) par la plante bloque immédiatement l'attaque. En effet, lorsque la plante repère les produits d'un gène de virulence spécifique du pathogène reconnu, elle active la synthèse spécifique du produit du gène de résistance correspondant, induisant ainsi une résistance spécifique, caractérisée par la mort cellulaire programmée des cellules attaquées (Dodds and Rathgen 2010). Ce phénomène de résistance basé sur la reconnaissance spécifique d'effecteurs de l'agent pathogène est qualifié d'ETI (Effector-Triggered Immunity) (Boyd *et al.*, 2012).</u>

Enfin dans un troisième cas, lorsque <u>la plante n'arrive pas à identifier le pathogène</u>, elle subit l'infection et développe la pathologie associée. Cette sensibilité de la plante aux effecteurs du pathogène est qualifiée d'ETS (*Effector-Triggered Susceptibility*) (Jones and Dangl, 2006 ; Dodds and Rathgen 2010). On parle alors de relation « *hôte-compatible* ». Dans ce cas de non reconnaissance du pathogène (virulent), la plante est dite sensible ; elle ne réagit pas ou oppose très peu de résistance face à l'agresseur, ce qui a pour conséquence l'apparition des symptômes spécifiques de la maladie provoquée par le pathogène conduisant soit à la mort de l'hôte, soit à la survie de l'hôte qui s'adapte et résiste au pathogène mais présente cependant des signes pathologiques.

Ce dernier cas, nous intéresse plus spécifiquement dans le cadre de ce travail de thèse et nous aborderons les altérations métaboliques des tissus végétaux qui présentent des symptômes particuliers associés à la présence de bactéries pathogènes.

En fonction des cas de figures qui se présentent, les plantes adaptent leur réaction au pathogène en question et mettent en place des mécanismes divers en réponse à l'invasion, en l'occurrence :

- Une modification et un renforcement des parois cellulaires au niveau du site d'inoculation de l'agent pathogène, par la synthèse de glycoprotéines riches en hydroxyproline (HRGPs), de phénylpropanoïdes (lignine), de composés polyphénoliques (tanins) et lipidiques (subérine) (Hematy *et al.*, 2009 ; Reichling 2009).
- Une accumulation, rapide et localisée au niveau du site d'infection, d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) dans un processus communément appelé «stress oxydatif» (Reichling 2009) dont l'effet radicalaire est néfaste pour le pathogène ainsi que pour les cellules de la zone infectée de l'hôte (Torres *et al.*, 2006).
- Une synthèse de protéines de résistance PR (*Pathogen-Related proteins*), induite très rapidement en réponse au stress biotique lors d'une interaction incompatible, et à un niveau plus élevé que dans une interaction compatible. Ces protéines intra- ou extracellulaires, de faibles poids moléculaires, sont réparties en plusieurs classes selon la séquence de leurs acides aminés et/ou leur activité biologique (Sels *et al.*, 2008).

3. Problématique spécifique de l'étude : le pathosystème *R.fascians*-plante, état de la question.

R. fascians est une bactérie actinomycète phytopathogène (proche des Mycobactéries et des Corynebactéries) à Gram positif, aérobique, non mobile et ne formant pas de spores (Gurgler and Seviour 2010). On la retrouve comme la plupart des *Rhodococcus* sp. dans l'environnement, particulièrement au niveau du sol et de l'eau (Gurgler and Seviour 2010)³. Cultivée sur milieu solide à la surface d'un gel d'agar, elle forme des colonies lisses ou rugueuses de couleur orange (Figure 6). Elle est la seule espèce phytopathogène de ce genre (Gurgler and Seviour 2010) et est capable d'infecter de nombreuses plantes, aussi bien les dicotylédones que les monocotylédones (Crespi *et al.,* 1992; Vereecke *et al.,* 2000; Putnam and Miller 2007 ; Stes *et al.,* 2011). *R. fascians* induit, au niveau de ses hôtes, différentes malformations communément appelées «fasciations» qui résultent d'une prolifération locale des cellules des tissus infectés.

³ Depuis la découverte par Tilford en (1936) de structures fasciées chez *Lathyrus odoratus* L., le spectre d'hôte de *R. fascians* ne cesse de s'étendre et, dans une revue récente, Stes *et al.*, (2011) estime à 164 le nombre d'espèces végétales qui sont sensibles à *R. fascians* ; ces espèces se répartissent dans 43 familles botaniques. Cette maladie est particulièrement dommageable lorsqu'il s'agit de cultures ornementales car les plantes sont malformées et elles produisent moins de fleurs (Goethals *et al.*, 2001; Putnam and Miller 2007). A ce jour, le problème causé *par R. fascians* dans l'industrie ornementale est persistant et augmente chaque année, car nous ne disposons pas de moyens efficaces pour éradiquer cette maladie (Depuydt *et al.*, 2008). Il est important de signaler que d'autres espèces de *Rhodococcus* ont été rapportées comme pathogènes chez l'homme et les animaux (Gurgler and Seviour 2010).

- Une synthèse de métabolites secondaires, dans le but d'inhiber le développement et la croissance du pathogène. Cette synthèse de métabolites secondaires spécifiques de défense (Baris and Jones, 2009) ou « phytoalexines » (Ahuja *et al.*, 2012), est activée avec une rapidité proportionnelle à la vitesse de reconnaissance du pathogène (Dixon *et al.*, 2002 ; Reichling 2009).
- Il arrive cependant que le pathogène puisse échapper à tous ces systèmes de défense et qu'il soit capable d'induire chez l'hôte des symptômes pathologiques qui conduisent, soit à la mort de la plante, soit à sa survie avec, alors, la mise en place d'une interaction spécifique au pathogène inducteur. L'interaction peut dans certains cas aboutir à une modulation de la morphogenèse chez la plante infectée que l'on désigne comme « galle », et dans laquelle le pathogène peut être confiné et se développer (Raman, 2011). Ces structures sont des niches écologiques où l'interaction plante-bactérie pathogène aboutit à une reprogrammation du métabolisme de la bactérie et de l'hôte. De ce fait, la composition métabolique des galles varie fortement en fonction du type de pathosystème (Reichling 2009).

Dans le cadre de cette thèse, nous allons focaliser notre attention sur le cas particulier du pathosystème tabac-*Rhodococcus fascians* aboutissant à la néoformation d'une hyperplasie² nommée « galle feuillée ». Nous allons nous intéresser aux altérations métaboliques induites chez les cellules infectées qui constituent la niche écologique de cette bactérie phytopathogène.

² Hyperplasie: excroissance anormale qui se développe suite à une prolifération anarchique de cellules d'apparence normale au niveau des tissus de certains organes



R. fascians



Galle feuillée induite chez Atropa belladonna

Figure 6 : Illustration des caractéristiques de *R. fascians* et de la galle feuillée. **(a)** La culture de *R. fascians* sur gel d'agar montre la présence de plusieurs colonies colorées en orange. **(b)** L'infection de la plante par *R. fascians* induit la formation d'une structure hypertrophique composée de bourgeons immatures et de feuilles malformées nommée galle feuillée. **(c)** Agrandissement de la galle feuillée formée sur une plante d'*Atropa belladonna*.

Dans le cas de la souche D188 de *R. fascians* (qui fait l'objet de ce travail), le symptôme le plus typique est la galle feuillée, une structure hautement différenciée composé de feuilles malformées et de bourgeons axillaires néoformés, immatures et inhibés dans leur développement ultérieur qui forment ainsi une source de nutriment pour les formes épiphytiques et endophytiques des bactéries qui résident dans cette niche écologique (Stes *et al.*, 2011).

La formation et le maintien de cette niche écologique, « la galle feuillée », sont nécessairement accompagnés par des modifications profondes, non seulement aux niveaux morphologique mais également aux niveaux génétique, physiologique et métabolomique. Chez *Arabidopsis thaliana* L., par exemple (Figure 7), il a été montré que le processus métabolique de la cellule végétale infectée est redirigé vers une augmentation de la biosynthèse et une accumulation d'acides aminés spécifiques (la proline, la valine, la phénylalanine, le tryptophane) et de sucres (le tréhalose, le glucose, le fructose), ce qui assure certainement une bonne source de nutriment (carbone et azote) pour la prolifération bactérienne dans sa niche écologique (Depuyt *et al.,* 2009). De plus, cette accumulation de tryptophane est particulièrement intéressante dans la mesure où, chez *R. fascians*, c'est le précurseur de la voie de biosynthèse de l'acide indole acétique, une auxine (Vandeputte *et al.,* 2005) connue pour son action stimulatrice du métabolisme primaire chez la plante. Le syndrome⁴ « galle feuillée » consiste en une prolifération de bourgeons caulinaires adventifs observés au site de l'infection par *R. fascians*.

⁴ Ensemble de plusieurs symptômes ou signes en rapport avec un état pathologique donné et permettant, par leur groupement, d'orienter le diagnostic.



réponses de la plante en vert. (c) Le processus de formation de la galle induite par R. fascians sur A. thaliana Figure 7 : Résumé des différentes étapes conduisant à la mise en place de la galle feuillée chez Arabidopsis thaliana. (a) La pathogénicité de la bactérie se traduit par l'expression des gènes de virulence avec une distinction faite entre les bactéries épiphytes (orange) et endophytes (vert). (b) Les échanges chimiques impliqués dans cette interaction sont décrits. Les signaux bactériens sont représentés en orange et les est représenté en fonction du temps. (Stes et al. 2011).
Des études montrent que ce symptôme est causé par une production bactérienne de facteurs de croissance (cytokinines et auxines) (Pertry *et al.*, 2010 ; Vandeputte *et al.*, 2005) aboutissant à une altération de la balance hormonale de la plante et une reprogrammation morphogénétique des cellules infectées. La production de phytohormones végétales par des microbes associés aux plantes est observée de manière générale lors des interactions (Babalola 2010 ; Francis *et al.*, 2010) et des gènes responsables de la biosynthèse de ces hormones végétales sont bien identifiés chez plusieurs phytopathogènes.

Une des caractéristiques spécifique à *R. fascians* est sa capacité à provoquer une reprogrammation morphogénétique avec des galles différenciées, contrairement à *Agrobacterium tumefasciens* qui induit une prolifération de cellules indifférenciées, « la galle du collet ». Les morphogènes sont communs dans les deux cas mais, contrairement à *A. tumefasciens* qui colonise génétiquement les cellules végétales avec un ADN comportant des oncogènes, *R. fascians* ne colonise pas génétiquement les cellules végétales mais perturbe la morphogenèse végétale par une action exogène de facteurs de croissance qu'elle synthétise et, vraisemblablement, par une modification de la sensibilité des cellules végétales à ces phytohormones (Verrecke, El Jaziri, communication personnelle).

Chez *R. fascians* (souche D188), la virulence dépend de la présence du plasmide linéaire pFiD188 (Figure 7). Il a été montré que la souche D188-5 de *R. fascians*, une souche dépourvue de ce pFiD188, n'induit pas de symptôme chez le tabac (Crespi *et al.*, 1992). Deux loci (*fas* et *att*), impliqués dans la formation des galles feuillées, ont été identifiés sur ce plasmide linéaire (Crespi *et al.*, 1992; Maes *et al.*, 2001).

27

Le locus att se compose de 9 ORFs (Open Reading Frames) homologues à des gènes de biosynthèse de l'arginine et de β -lactames (Maes *et al.*, 2001). L'expression du locus *att* est contrôlée par un régulateur transcriptionnel (attR) de type LysR, lui même activé par le produit du locus att; on parle de ce fait d'auto-régulation de type feed-back-positif. Lorsqu'un taux suffisant du produit *att* est atteint, nous observons une activation du second locus, l'opéron *fas* (Figure 7). Dès lors, l'opéron att est essentiel pour la régulation de la transition de l'état non-virulent épiphytique à un état pathogénique endophytique chez R. fascians (Cornelis et al., 2002). Le locus fas est composé de 6 ORF, dont le fasD qui code pour une isopentényl transférase, une enzyme clé dans la voie de biosynthèse des cytokinines. Plusieurs études indiquent que R. fascians est capable de synthétiser 6 types de cytokinines différentes structurellement isopentényladénine (iP), cis-zéatine (cZ), trans-zéatine (tZ) et leurs dérivés méthylthio (2MeSiP, 2 MeScZ et 2MeStZ) (Pertry et al., 2009; 2010). Ces auteurs avancent l'hypothèse que le mélange de ces 6 cytokinines est essentiel pour la virulence de la bactérie ainsi que pour la reprogrammation morphogénétique et métabolique. En effet, les cytokinines sont impliquées dans la régulation de la croissance et du développement des végétaux. Elles jouent également un rôle clé dans les mécanismes d'interaction entre les plantes et différents organismes pathogènes tels que les bactéries. Au sein des tissus hyperplasiques, les cytokinines ont une double origine, bactérienne et végétale, et leur action peut se traduire par une induction des réactions de défense vis-à-vis de l'attaque de pathogènes. Plus globalement, la perturbation de l'homéostasie des cytokinines peut être à l'origine d'une modulation de la sensibilité des cellules végétales à ce type de morphogène et, par conséquent, ils induisent une cascade de transduction de signaux aboutissant à une modification de l'expression génique des cellules infectées.

Cette modulation de l'expression génique chez les tissus infectés par *R. fascians* est aujourd'hui largement documentée par des résultats d'études transcriptomiques chez différentes espèces végétales en interaction avec cette bactérie, en l'occurrence *Atropa belladonna* L. (Nouar *et al.*, 2003), *Nicotiana tabacum* L. (Simon-Mateo *et al.*, 2006), et *Arabidopsis thaliana* L. (Depuydt *et al.*, 2009).

Un fait tout à fait remarquable dans cette interaction est issu de l'observation illustrée par la Figure 8. Il est tentant de postuler que le pathogène et la plante hôte contribuent ensemble à l'initiation et à la maintenance de l'hyperplasie. Globalement, le symptôme semble être confiné au site de l'infection et, même si la plante n'a plus de substrat nutritif, la galle feuillée reste bien verte et la bactérie ne semble pas capable d'envahir l'ensemble de la plante. Cette observation suggère que la plante exerce un contrôle sur la prolifération bactérienne en son sein et, lorsque la bactérie pénètre dans les tissus d'une plante de tabac, il a été observé une auto-fluorescence due à l'accumulation de substances phénoliques spécifiques aux tissus infectés (7-méthyl-esculine) (Vereecke et al 1997). Cela traduit une activation du système de défense de la plante qui ne semble pas très efficace, car la bactérie persiste dans les tissus infectés. Clairement, et même à un stade assez avancé dans le développement du symptôme, tant que la galle feuillée est encore attachée à la plante infectée, la prolifération de la population bactérienne endophyte est limitée et nous n'avons, à ce jour, aucune indication sur l'activation d'un mécanisme de défense de la plante qui vise à éliminer totalement ou en grande partie la population bactérienne. De nouveau, l'accumulation de l'auxine dans les tissus symptomatiques (Nouar et al., 2003) pourrait contribuer à une atténuation des mécanismes de défense de la plante contre la bactérie pathogène (Bari and Jones 2009).



Figure 8 : Co-évolution de la plante infectée et de la galle feuillée. **(a)** La galle feuillée (formation et maintien) induite par *R. fascians* reste localisée au niveau du site d'infection, ce qui semble indiquer un contrôle par la plante pour empêcher une généralisation du symptôme. De plus, la survie des deux entités (galle et plante infectée) est indépendante car la galle feuillée est capable de survivre à la plante. **(b)** De même il est intéressant de noter que la galle feuillée reste bien chlorophyllienne (verte) alors que la plante mère est complètement sénescente, ce qui traduit un retard de la sénescence des cellules de l'hyperplasie, un signe physiologique d'une accumulation probable de cytokinine (El Jaziri, communication personnelle).

Par contre, et comme l'illustre la Figure 9, lorsque l'hyperplasie prélevée de la plante est transférée sur un milieu nutritif, une fulgurante prolifération des cellules bactériennes émerge des tissus végétaux et envahit l'ensemble de la galle feuillée, provoquant la mort des cellules végétales. Cette observation renforce ainsi l'hypothèse du contrôle exercé par la plante pour empêcher la prolifération bactérienne dans les tissus infectés.

Toutefois si la galle feuillée est placée sur un milieu nutritif additionné d'antibiotique (Claforan® (céfotaxime), 500mg/L), une multitude de plantules se développent qui, lorsqu'elles sont repiquées en terre, forment des racines et se développent normalement. Ces observations ont amené les auteurs à proposer l'utilisation de *R. fascians* comme méthode alternative à la propagation végétative et clonale chez les végétaux (Jaziri *et al.*, 1997 ; Vereecke *et al.*, 2000). Mais, au delà des perspectives d'applications biotechnologiques, dans le domaine de la propagation clonale végétale, les résultats de cette expérience nous interpellent à un niveau plus fondamental.

Pour mieux situer cette question fondamentale dans son contexte global, il est utile de rappeler que le pathosystème étudié aboutit à une reprogrammation morphologique où les cellules végétales se dédifférencient pour ensuite être réactivées et se reprogrammer⁵ pour former des structures embryonnaires de bourgeons adventifs. Ces bourgeons restent inhibés dans leur croissance et leur développement ultérieur tant que la bactérie est présente au sein de la galle feuillée, suggérant ainsi une inactivation de la prolifération des bourgeons néo-formés, suite à l'interaction *R. fascians*-plante (Figure 10).

30

⁵ La reprogrammation cellulaire végétale fait appel à la notion de totipotence cellulaire (du latin *totus*, tout, et *potentia*, puissance). Capacité que possède une cellule à se différencier en diverses cellules spécialisées et à participer à la formation de n'importe quel tissu de l'organisme, à former divers organes, voire des organismes complets.



Transfert des hyperplasies sur un milieu de culture contenant du Claforan (antibiotique)

Figure 9 : Propagation végétative. La galle feuillée est constituée de bourgeons immatures dont la croissance est inhibée par la présence de la bactérie qui exerce un contrôle sur leur développement. (a) Si les galles feuillées sont transférées sur un milieu nutritif on assiste à un développement des bactéries qui colonisent cette niche écologique. (b) L'élimination des bactéries par le Claforan® permet de lever l'inhibition de croissance des bourgeons qui se traduit par la formation de nouvelles plantules à partir de la galle feuillée. (d'après Jaziri *et al.,* 1997 ; Vereecke *et al.,* 2000).



Figure 10 : Modèles expérimentaux utilisés dans le cadre de la thèse. **(a)** *Nicotiana tabacum* non infecté par *R. fascians* et **(b)** une galle feuillée typique de tabac (2 mois post-infection). Noter la présence abondante de trichomes sur les jeunes feuilles de la galle feuillée.

Jusqu'à présent, les études menées pour tenter d'apporter des réponses pour supporter cette hypothèse ont porté sur l'étude du cycle cellulaire végétal en interaction avec la bactérie. La première observation est rapportée par de O'Manes et al., (2001) qui montre une activation du cycle cellulaire suite à une infection par R. fascians de plantes de tabac transgéniques (le promoteur du gène CycB1;1 contrôlant le gène rapporteur codant pour la β-glucuronidase de Escherishia coli). D'autres expériences ont également été réalisées avec divers promoteurs du cycle cellulaire, aussi bien chez le tabac que chez A. thaliana (Verrecke et al., 2000) et les résultats vont dans le même sens; une activation du cycle cellulaire lors des stades précoces de l'interaction. Des études plus approfondies ont ensuite été menées sur des suspensions cellulaires de tabac (souche Bright Yellow 2, BY-2) synchronisées en phase S par un traitement à l'aphidicoline (Vandeputte et al., 2007). Ces études mettent clairement en évidence une accélération dans l'entrée en mitose suivie par un ralentissement de la sortie de la mitose, indiquant un double effet des traitements (extrait de galle feuillée, mélange histidine/pyruvate) sur la progression dans le cycle cellulaire des cellules végétales. De même une étude transcriptomique comparative des cellules infectées versus cellules non infectées met en évidence des expressions différentielles de plusieurs gènes associés au cycle cellulaire, principalement à la phase S et à la transition G2/M (Vandeputte et al., 2007).

La démonstration d'une altération du cycle cellulaire des cellules végétales suite à une interaction avec *R. fascians* est apportée par ces études mais la nature de(s) composé(s) et le(s) mécanisme(s) mis en place lors de cette altération restent encore à démontrer.

OBJECTIFS

L'état de la question que nous venons de dresser sur ce pathosystème particulier, *R. fascians*plante, nous amène à admettre l'instauration d'un réel « *dialogue moléculaire* » entre les deux partenaires de cette interaction.

Ce dialogue moléculaire semble impliquer aussi bien le métabolisme primaire que le métabolisme secondaire, chez la plante mais également chez la bactérie.

De même, il semble bien y avoir un « *contrôle moléculaire* » de la part de la plante pour confiner le développement de la bactérie dans sa niche écologique, tout comme un « contrôle moléculaire » de la bactérie pour la prolifération des cellules végétales.

Nos objectifs, dans le cadre de ce travail, visent à contribuer à une meilleure compréhension de ce « dialogue moléculaire » dans ce pathosystème.

Comme modèle de plante, notre choix s'est porté sur le tabac (*Nicotiana tabacum* L. voir Annexe 1) ; cette plante répond en effet à l'infection par *R. fascians* en formant une galle feuillée bien différenciée et nous sommes assurés d'une reproductibilité du symptôme, car ce modèle est étudié depuis une décennie au Laboratoire de Biotechnologie Végétale de l'ULB. Par ailleurs, le métabolisme secondaire chez le tabac étant suffisamment documenté dans la littérature, cela nous facilitera l'interprétation et nous donnera une excellente base de discussion des résultats.

Une double approche est proposée pour répondre à nos objectifs.

La première approche est globale et originale pour ce pathosystème, en l'occurrence une étude métabolomique comparative de la galle feuillée versus tissus non-infectés et ce, dans le but de mettre en évidence les éventuels changements qui concernent aussi bien le métabolisme primaire que le métabolisme secondaire.

La deuxième approche est plus ciblée et vise à mettre en évidence des changements métaboliques, au sein de la galle feuillée, qui engendrent l'accumulation de composés biologiquement actifs. C'est le métabolisme secondaire qui est visé dans ce cas et nous déclinerons cette étude en deux parties:

- Une première partie visant à mettre en évidence des activités biologiques usuelles issue d'un changement métabolique au sein d'un pathosystème, activité antioxydante et activité anti-inflammatoire.

- Une seconde partie, plus spécifique à notre pathosystème, vise à mettre en évidence le(s) composé(s) qui sont à l'origine d'une activité antiproliférative, démontrée chez les cellules végétales, mais que nous évaluerons et étudierons sur des lignées de cellules cancéreuses humaines.

MATÉRIEL ET MÉTHODES

1. Matériel biologique (végétal et animal).

1.1. Préparation du matériel végétal.

Les graines de tabac provenant de la collection du Laboratoire de Biotechnologie végétale (Variété petit Havana) sont lavées et désinfectées successivement par des solutions contenant du Tween 80, de l'éthanol à 70% (v/v) et de d'hypochlorite de calcium à 5% (m/v). Elles sont ensuite ensemencées sur un milieu MS $\frac{1}{2}$ solide (Murashige and Skoog 1/2, Duchefa, Belgium). Les feuilles des plantes non infectées sont récoltées 12 semaines après ensemencement et conservées à -80°C. Pour les plantes infectées, le bourgeon apical des plantules, âgées de 4 semaines, est blessé et inoculé par 10 µL de suspension bactérienne d'une culture de *R. fascians* dans du milieu Luria Bertani (LB, Duchefa, Belgium). Les galles feuillées formées sont récoltées 8 semaines après l'infection dans de l'azote liquide et conservée à -80°C jusqu'à leur utilisation.

1.1.1. Préparation des extraits végétaux et fractionnement bioguidé par MTT.

Le matériel végétal est extrait par macération sous agitation puis par des épuisements successifs avec des solvants à polarité croissante (hexane, chloroforme, méthanol:eau). Tous les solvants utilisés sont de grade analytique (Chem-Lab, Belgique). Les extraits bruts obtenus à partir de l'hexane, du chloroforme, du méthanol et de l'eau sont dissous à l'aide de DMSO (max 5% (v/v)) et du milieu de culture pour obtenir des concentrations allant de 100 µg/mL à 0,01 µg/mL. L'extrait total chloroformique est ensuite fractionné par chromatographie sous pression intermédiaire (CombiFlash® Rf 200 psi, Teledyne Isco[®], Lincoln, USA). L'injection en phase solide, par fixation préalable de l'extrait sur du silica gel (F254) 60 mesh, a été utilisée pour permettre un fractionnement (Figure 11) sur une colonne de silice phase normale (4 g silica RediSep® Rfcolumns, Teledyne Isco®, Lincoln, USA). L'élution est effectuée grâce à un gradient par paliers de dichlorométhane/méthanol allant de 0% à 40% (v/v) méthanol avec un débit de 15 à 10 mL/min. Les fractions obtenues sont analysées via chromatographie sur couche mince (CCM). Le protocole utilise une plaque de silice 60 fluorescente à 254 nm, un solvant de migration composé d'un mélange chloroforme/méthanol 9:1 (v : v) et un système de révélation par pulvérisation d'une solution méthanolique de vanilline 1% (m/v) et d'acide sulfurique 3% (m/v) suivie du chauffage de la plaque à 100 °C pendant 3 min. Les fractions (F1 à F7) sont ensuite rassemblées en fonction de leur profil CCM, évaporées à sec sous vide puis évaluées lors du bioguidage par le test colorimétrique MTT. Celui-ci est réalisé sur des lignées cellulaires cancéreuses humaines après dissolution des différentes fractions dans du DMSO et du milieu de culture (solution stock à 1 mg/mL à 50% (v/v)) pour obtenir des concentrations allant de 100 μ g/mL à 0,01 μ g/mL. Les fractions les plus actives, F2 et F3, sont séparées par chromatographie sous pression intermédiaire suivant le protocole initial avec un débit de 15 ml/mn et un gradient par paliers allant de 10% à 30% (v/v) de méthanol. L'analyse par CCM permet de réunir les fractions dont les profils sont proches puis de déterminer leur activité biologique par le test MTT. Les sous-fractions obtenues sont traitées de la même manière que précédemment pour aboutir aux fractions les plus actives, utilisées pour l'évaluation de l'activité antiproliférative.



Figure 11: Illustration de la flash chromatographie avec dépôt solide. **(a)** L'échantillon solubilisé dans un solvant organique est fixé sur de la silice, séché et transvasé dans une cartouche vide. **(b)** La cartouche préparée et la colonne de séparation sont placées dans les dispositifs prévus à cet effet sur l'appareil de chromatographie. **(c)** Le protocole expérimental défini est lancé, l'appareil procède au fractionnement sous pression intermédiaire en collectant les fractions dans les tubes présents dans les racks et génère à la fin du processus un rapport d'expérience et un chromatogramme.

1.1.2. Dosage des composés phénoliques et des flavonoïdes totaux.

Le dosage des phénoliques totaux a été réalisé selon la procédure décrite par Lamien-Meda et al., (2008). Celle-ci repose sur la grande oxydabilité des composés phénoliques. Le réactif utilisé est un mélange de phosphomolybdate et de tungstate de sodium, qui est réduit lors de l'oxydation des phénols en milieu alcalin en un mélange d'oxydes bleus de tungstène et de molybdène. Ainsi ce réactif, dit de Folin-Ciocalteu (FCR, Sigma-Aldrich, Belgique) voit ses propriétés colorimétriques modifiées lorsqu'il réagit avec la fonction hydroxyle (-OH) des phénols. Une courbe étalon est réalisée en utilisant plusieurs concentrations d'acide gallique (0-200 µg/mL). Ainsi, dans chaque tube à essai on ajoute 500 µL de l'échantillon (acide gallique ou extrait à doser 100 µg/mL) et 2,5 mL de la solution de FCR (0,2 M). Après 5 min, on y ajoute 2 mL d'une solution de carbonate de sodium (75 g/L). Après agitation, les différents tubes sont laissées au repos, à l'abri de la lumière, pendant 2 heures. La mesure de l'absorbance est réalisée à 760 nm à l'aide d'un spectrophotomètre (CE 2041, Cecil Instruments Ltd, Cambridge ENGLAND), par rapport à un blanc constitué d'un mélange de 500 µL de méthanol, 2,5 mL de FCR et 2 mL de carbonate de sodium. Trois essais biologiques différents sont réalisés et les résultats sont exprimés en mg d' « Equivalent Acide Gallique » (EAG) pour 100 mg d'extrait sec (mg EAG/100 mg).

Les flavonoïdes totaux sont déterminés par la méthode colorimétrique de Dowd adaptée par Lamien-Meda *et al.*, (2008). Un volume de 2 mL de AlCl₃ à 2% (m/v) dans du méthanol est mélangé avec 2 mL d'extrait à 100 μ g/mL dans le méthanol. Après 10 min, les absorbances sont mesurées à l'aide d'un spectrophotomètre à 415 nm.

Une courbe d'étalonnage est réalisée avec la quercétine comme substance de référence. Trois essais biologiques différents sont réalisées et les résultats sont exprimés en mg d' « Equivalent Quercétine » (EQ) pour 100 mg d'extrait sec (mg EQ/100 mg)

Le calcul des équivalent acide gallique et quercétine se fait selon la formule :

$$C = \frac{Q_{\acute{e}chantillon}^{lue \ sur \ la \ droite \ d'\acute{e}talonnage} \times D \times 100}{m_{\acute{e}chantillon}}$$

Où C est concentration en phénoliques totaux ou flavonoïdes des échantillons (mgE/mg), $Q_{echantillon}^{lue sur la droite d' étalonnage}$ est la quantité de référence (mg) correspondant à l'absorbance de l'échantillon lue sur la droite d'étalonnage, D est le facteur de dilution et m_{échantillon} est la masse de l'échantillon (mg).

Les phénoliques totaux ainsi que les flavonoïdes totaux ont été quantifiés dans les extraits chloroformiques et hydrométhanoliques des galles feuillées et de tabac non infecté. L'acide gallique et la quercétine sont utilisés comme référence (Figure 12).

1.2. Cultures cellulaires in vitro.

Les lignées cellulaires cancéreuses utilisées dans ce travail sont d'origine humaine ; il s'agit des lignées U373 (glioblastome astrocytaire), A549 (carcinome de poumon), PC3 (adénocarcinome de prostate) et MCF-7 (carcinome mammaire). Elles proviennent de l'American Type Culture Collection (ATCC) (Manassas, VA, USA). Tous les milieux et compléments de culture cellulaire proviennent de GIBCO-Invitrogen (Merelbecke, Belgium).



Figure 12 : Composés de référence utilisés lors des différents tests. L'acide gallique et la quercétine sont utilisés lors du dosage des phénoliques et flavonoïdes totaux. L' acide ascorbique est utilisé lors des tests antioxydants (FRAP et DPPH).

Les cellules sont cultivées dans des flacons de culture cellulaire (T25 ou T75) contenant le milieu de culture MEM supplémenté par 5% (v/v) de sérum de bœuf fœtal, 0,6 mg/ml de glutamine, 0,1mg/ml de gentamycine et 200 UI/ml de pénicilline-streptomycine. La culture se fait dans des incubateurs à atmosphère saturée à 5% (v/v) de CO₂ et à 37°C. Le milieu est renouvelé toutes les 72 heures. Au moment de leur utilisation, les cellules sont trypsinisées, comptées à l'aide d'un Beckman coulter et resuspendues dans du milieu de culture de façon à obtenir une densité cellulaire permettant un ensemencement adapté pour les différents tests biologiques utilisés (40000 cellules par mL pour le test MTT et 15000 cellules par mL pour la vidéomicroscopie).

2. Etude métabolomique des extraits de plantes infectées et non infectées par *R. fascians*.

2.1. Métabolomique basée sur la RMN.

La métabolomique est l'étude de l'ensemble des métabolites dans une matrice biologique. Elle associe une étape d'extraction simple suivie d'une mesure analytique des échantillons pour en obtenir l'empreinte métabolique. L'analyse en RMN se fait dans des solvants deutérés afin que les signaux du solvant n'interfèrent pas avec ceux des molécules à étudier. L'appareil fonctionne en accumulant successivement des spectres individuels ou scans qui sont ensuite moyennés afin d'améliorer le rapport signal/bruit. Le spectre final est obtenu, sous forme d'onde «Free Induction Decay» (FID), et contient un nombre de signaux correspondant aux différents protons des différents molécules présentes dans l'extrait.

Le FID est de ce fait utilisé pour caractériser le profil métabolique de l'échantillon (Figure 13). En pratique, le matériel végétal est lyophilisé, broyé et 300 mg sont introduits dans un tube à centrifuger dans lequel on rajoute 5 mL de chloroforme deutéré (CDCl₃) ou d'eau deutérée (D₂O contenant 90 mM KH₂PO₄ pH 7,4). Le tube est vortexé puis placé dans un bain à ultrasons pendant 2 h. Il est ensuite centrifugé à 3000 rpm pendant 15 min. L'extraction est répétée 3 fois. Les surnageants sont recueillis dans un ballon à fond rond adapté au rotavapor pour une évaporation à sec sous pression réduite. Le résidu est redissout par 1 mL de CDCl₃ ou D₂O (Sigma-Aldrich, Belgium) et 800 µL sont introduits dans un tube RMN (Choi et al., 2006) pour l'analyse dans un spectromètre RMN (Bruker Biospin, Belgium) fonctionnant à une fréquence de 300 MHz. Pour chaque échantillon, 128 scans sont enregistrés afin d'obtenir l'empreinte spectrale des échantillons. La ligne de base du spectre est corrigée, l'échelle des déplacements chimiques du spectre est calibrée par rapport aux solvants résiduels, le spectre est découpé en plusieurs intervalles de 0,04 ppm constituant les variables statistiques à analyser et est ensuite normalisé en fonction de l'aire totale des pics grâce au logiciel de traitement de spectre MestreNova (Mestrelab Research, Santiago de Compostela University, Spain). Le spectre est ainsi exporté sous format ASCII dans un fichier Microsoft Excel qui servira de base de données dans le logiciel d'analyse statistique SIMCA-P+ (Umetrics, Sweden). L'information obtenue de chaque spectre RMN est réduite en des variables distinctes pour permettre l'analyse statistique en utilisant des outils statistiques d'analyse de données multivariées.

2.2. Analyses statistiques de données multivariées.

Parmi les méthodes statistiques les plus couramment utilisées en métabolomique, on trouve l'analyse en composantes principales (ACP). Elle correspond à une technique de regroupement non supervisée des échantillons, n'exigeant aucune connaissance préalable des données, contrairement aux analyses de discrimination par projection (PLS-DA) qui sont des méthodes supervisées utilisées pour créer des modèles adaptés en fonction des données. Ces techniques par projection nécessitent, au préalable, une connaissance de la répartition des échantillons en groupes. Tous ces modèles d'analyse de données multivariées réduisent, par principe, la multi-dimensionnalité des données, tout en préservant la majeure partie de la variabilité entre échantillons du même groupe mais en donnant une forte importance à la séparation entre les groupes (Figure 13). Cela conduit, par conséquent, à une simplification de l'interprétation et de la détermination de marqueurs biologiques potentiels responsables de la discrimination entre les groupes.

Les spectres ¹H-RMN, partitionnés tous les 0,04 ppm et normalisés en fonction de la surface totale des pics, donnent de multiples variables décrivant les signaux ¹H-RMN des extraits de plantes. Les données sont ensuite centrées sans une mise à l'échelle préalable, afin de générer une matrice de covariance. Le modèle crée par l'ACP (Figure 13 Ba) permet de réduire l'ensemble des données à deux composantes principales majeures, qui sont des combinaisons linéaires des variables originales (Ghosh and Chattopadhyay 2012). Ces composantes sont analysées à la recherche de caractéristiques éventuelles de changements métaboliques, survenus lors de l'infection du tabac par *R. fascians*, en se basant sur les *«loading scores»*.



Figure 13: Illustration de la métabolomique basée sur la RMN couplée à l'analyse statistique des données multivariée. (A) Le spectre obtenu (courbe d'intensité fonction des fréquences de déplacement chimique) pour chaque échantillon est traité et fragmenté par un logiciel spécifique pour générer les variables constituant la base de données pour modèles les statistiques. (B) Les échantillons constituent les observations (points tandis que les vert et bleu)

variables (déplacement chimique ppm) représentent les axes (dimensions spatiales). (B.a., B.b1) Illustration de projection des échantillons dans un plan bi-dimentionnel de composantes (PC1 et PC2) générées par méthode non supervisée de l'analyse en composantes principales ACP. (B.b.1) Lorsque l'ACP n'est pas assez robuste pour discriminer les échantillons en groupes respectifs de leur nature, (B.b.2) une méthode supervisée, l'analyse par projection orthogonale des structures latentes OPLS, peut être générée sur base de composantes prédictives (Cp, corrélée aux groupes) et orthogonales (Co, corrélée aux variations entre échantillons) pour améliorer la discrimination. Dans le cas de la métabolomique basée sur la RMN, les *«loadings»* sont analysés pour détecter les zones spectrales responsables de la discrimination des observations et ainsi identifier la nature des métabolites qui discriminent au mieux les groupes. Dans la matrice de covariance générée, les «loading scores» conservent la même importance que les signaux d'origine, ce qui permet de les mettre en corrélation avec les modifications métaboliques observées lors de l'analyse des profils (Kara 2009).

Cependant, lorsqu'une grande variabilité entre les échantillons d'un groupe ne permet pas à l'ACP de montrer une nette différence entre les groupes, l'interprétation de toute discrimination basée sur cette méthode risque d'être biaisée (Figure 13 Bb1). Afin de permettre une interprétation efficace des données, d'autres techniques d'analyse statistique doivent être utilisées, notamment, les méthodes supervisées basées sur la connaissance première du regroupement des échantillons. Parmi ces outils, l'OPLS-DA (méthode de projection supervisée de données multivariées) est appliquée pour mieux faire ressortir les différences entre les échantillons (inter-groupes) mais aussi pour distinguer les variables propres à une classe (variables spécifiques au groupe ; intragroupe) des variables responsables de la séparation des classes. Dans ce modèle, la répartition préalable des échantillons en groupes est nécessaire. Le grand avantage de l'OPLS-DA (Figure 13 Bb2) est sa capacité à séparer la variation prévisible intragroupe, de la variation intergroupe non corrélée au groupe, dans le but de faciliter la compréhension des différentes sources de variation (Mavel et al., 2013). Les effets de la concentration de l'échantillon, de la correction de la ligne de base, du bruit de fond et de la variation biologique, sont analysés séparément grâce aux composantes orthogonales de l'OPLS.

Pour faciliter l'interprétation des analyses statistiques de données multivariées, des outils sont proposés pour la visualisation et l'interprétation des résultats. Pour ce faire, les *«score plots»* permettent de visualiser la distribution des échantillons dans les plans 2D ou 3D des composantes des modèles. Dans le cas de l'ACP, le *«loadings plot»* est un tracé qui permet d'identifier les signaux des métabolites responsables des différences, statistiquement significatives, observées au niveau du «score plot». De même, dans la méthode OPLS-DA, le «S-plot» consiste en la représentation graphique de la covariance en fonction de la corrélation, en tenant compte des composantes du modèle généré. Son tracé repose à la fois sur les contributions des métabolites au modèle et sur la fiabilité du modèle par rapport aux variables d'origines.

3. Evaluation des propriétés biologiques des extraits de la galle feuillée versus la plante non infectée.

3.1. Etude des propriétés antibactériennes.

L'évaluation de l'activité antibactérienne de divers extraits (voir 1.1.1) obtenus à partir de tabac infecté et non infecté par R. fascians, est faite par la détermination des diamètres d'inhibition (Figure 14). Chaque échantillon est dissout dans du DMSO 5% (v/v) pour obtenir une concentration initiale de 1 mg/mL. Les solutions d'extraits sont stérilisées par filtration sur filtres de 0,22 µm de diamètre et déposé sur les disques pour obtenir 200 µg/disque. Des antibiotiques de référence commerciaux ont été utilisés. Il s'agit de l'ampicilline (10 µg), de la ciprofloxacine (5 μ g), et de la gentamicine (10 μ g). Un inoculum de 10⁸ UFC/mL pour l'ensemencement sur boîte de Pétri a été préparé à partir de plusieurs souches bactériennes (Bacillus cereus ATCC 13061; Escherichia coli ATCC 25922; Proteus mirabilis ATCC 35659; Salmonella thyphimurium ATCC 13311; Staphylococcus aureus ATCC 6538) (Labioca, Université de Ouagadougou) mises en suspension dans du milieu physiologique stérile (NaCl 0,9% (m/v)) et comparé avec une solution de 0,5 Mac Farland (mesure de la turbidité ; correspond à une densité bactérienne de 10⁸ CFU/mL). Les disques préparés sont placés dans un incubateur à 37°C pendant 24h pour être mis en contact avec les bactéries pré-incubées (24h à 37°C) dans des boîtes de Pétri. Les extraits ayant une zone d'inhibition ≥ 5 (c'est-à-dire ≥ 13 mm, diamètre du disque inclus) sont considérés comme ayant une activité antibactérienne (Sfeir et al., 2013).



Figure 14 : Activité antibactérienne par mesure du diamètre d'inhibition de croissance. Les bactéries sont ensemencées sur un gel d'agar contenant du milieu nutritif. Des disques imprégnés d'antibiotiques ou d'extraits de plante sont mis en contact avec les colonies bactériennes en croissance pendant 24 h. La mesure du diamètre d'inhibition de croissance bactérien (flèches rouges) permet d'évaluer l'activité antibactérienne des antibiotiques ou des extraits de plante analysés (illustration d'antibiogramme).

3.2. Etude des propriétés antioxydantes.

L'activité antioxydante de divers extraits obtenus à partir de tabac infecté et non infecté par *R*. *fascians* a été évaluée à travers deux méthodes différentes que sont la méthode FRAP (*Ferric Reducing Antioxidant Power*) et la méthode au DPPH (DiPhénylPicrylHydrazine). L'acide ascorbique est utilisé comme référence (Figure 12)

3.2.1.Méthode de réduction du cation ferrique (FRAP).

Les métaux sont en général les meilleurs initiateurs de réactions en chaîne susceptibles de déséquilibrer la balance du stress oxydatif en faveur de prooxydants. Parmi ces métaux, le cation ferrique Fe³+ est le plus actif et on le retrouve souvent dans les aliments d'origine végétale ou animale. Le pouvoir réducteur d'un extrait vis-à-vis du cation ferrique peut être considéré comme un indicateur de son activité antioxydante. L'activité antioxydante, non enzymatique, d'inhibition de radicaux libres et de la peroxydation lipidique, est généralement contrôlée par des réactions d'oxydo-réduction ; la méthode FRAP (Figure 15a) peut être une bonne méthode pour investiguer le pouvoir antioxydant d'un extrait en évaluant son pouvoir de réduction du cation ferrique. La capacité totale en antioxydant de chaque extrait de plante est déterminée par la méthode Hinneburg adaptée par Lamien-Meda *et al.*, (2008).

Un aliquote de 500 μ L d'échantillon (100 μ g/mL dissous dans du DMSO-méthanol 1:9 (v/v)) est mélangé à 1,25 mL de tampon phosphate (0,2 M, pH 6,6) et 1,25 mL d'une solution aqueuse d'hexacyanoferrate de potassium [K₃Fe(CN)₆] 1% (m/v). Après un chauffage à 50°C au bainmarie pendant 30 min, 1,25 mL d'acide trichloracétique 10% (v/v) sont ajoutés. Le mélange est centrifugé à 3000 rpm pendant 10 min. On ajoute alors à 625 μ L du surnageant obtenu, 625 μ L d'eau distillée puis 125 μ L de FeCl₃ 1% (m/v) fraîchement préparé. Un blanc solvant est préparé dans les mêmes conditions. Trois essais biologiques différents sont analysés. L'absorbance est mesurée à 700 nm. Une courbe étalon est établie grâce à une gamme de concentrations d'acide ascorbique allant de 0-100 μ g/mL. La quercétine et l'acide gallique sont utilisés comme contrôles positifs (25 μ g/mL). La concentration en composés réducteurs dans l'extrait (C) est exprimée en μ mol Equivalent Acide Ascorbique par gramme (μ molEAA)/g) d'échantillon selon la formule:

$$C = \frac{c_{\text{\acute{e}chantillon}}^{\text{lu sur la courbe d'étalonnage}} \times D}{MR_{\text{acide ascorbique}} \times c_{\text{solution mère}}^{\text{initiale}}}$$

où $c_{echantillon}^{lu sur la courbe d'étalonnage}$ est la concentration d'acide ascorbique (µg/mL) correspondant à l'absorbance de l'échantillon lue sur la droite d'étalonnage, $c_{solution mère}^{initiale}$ est la concentration initiale de l'échantillon (1 mg/mL), D représente le facteur de dilution et, MR_{acide ascorbique} est la masse relative de l'acide ascorbique (176,1 g/mol).

3.2.2. Méthode d'inhibition du radical DPPH.

Le DPPH, un radical stable présentant une absorbance maximale à 517 nm, est largement utilisé dans la recherche de molécules anti-radicalaires. L'activité antioxydante, basée sur la réduction de l'absorbance à 517 nm quand le radical libre stable 2,2-diphényl-picrylhydrazyl réagit avec un donneur d'hydrogène (antioxydant) (Figure 15b), a été déterminée selon la méthode de Koleva adaptée par Lamien-Méda *et al.*, (2008).



Figure 15: Principes des tests utilisés pour l'étude des activités antioxydantes. **(a)** La méthode FRAP (Ferric Reducing Antioxidant Power) évalue la capacité des composés antioxydants (extraits et fractions) à réduire l'ion ferrique (Fe³⁺) en ion ferreux (Fe²⁺). **(b)** La méthode utilisant le radical stable DPPH est basée sur la réduction de l'absorbance en présence d'un composé antioxydant RH.

Pour ce faire, 500 μ L d'échantillon (100 μ g/mL) sont mélangés à 1 mL d'une solution de DPPH (Sigma-Aldrich, Belgique) (20 mg/L dans du méthanol). Après 15 min d'incubation, l'absorbance est mesurée à 517 nm contre un blanc contenant 500 μ L de méthanol et 1 ml de DPPH. L'essai pour chaque échantillon est effectué en triplicat. Une courbe étalon est établie grâce à une gamme de concentrations d'acide ascorbique allant de 0-100 μ g/mL. La quercétine et l'acide gallique sont utilisés comme contrôles positifs (25 μ g/mL). La concentration en composés réducteurs dans l'extrait est exprimée en μ mol Equivalent Acide Ascorbique par gramme (μ molEAA/g) d'échantillon selon la formule précédente.

3.3. Etude des propriétés anti-inflammatoires par inhibition de la lipooxygénase.

La lipoxygénase est une dioxygénase intracellulaire qui catalyse l'oxydation des acides gras polyinsaturés (acide arachidonique) contenant une structure 1-cis,4-cis-pentadiénique pour former des hydroperoxydes conjugués (Figure 16) (Ivanov et *al.*, 2010). Sa masse moléculaire avoisine 95 KDa avec 2 atomes de fer non-hémique. L'effet inhibiteur des extraits sur l'activité de la lipoxygénase a été déterminée par une méthode spectrophotométrique adaptée par Compaoré *et al.*, (2011). Une solution stock d'acide linoléique (substrat cis C18:2 ω -6) est utilisée pour mesurer l'activité de l'enzyme. Cette solution est composée de 10 μ L d'acide linoléique (à 250 μ M), 30 μ L d'éthanol et 120 mL de tampon borate (solution aqueuse de tétraborate de sodium 0,2 M à pH 9) (concentration finale d'acide linoléique de 134 μ M).



Figure 16 : Principe réactionnel détaillé de la réaction catalysée par les lipoxygénases. L'activité enzymatique est proportionnelle à la formation d'hydroperoxydes d'acide gras mesurée à 234 nm. (Ivanov *et al.,* 2010)

La solution préparée doit être utilisée dans les 24 h. La solution d'enzyme a été obtenue par préparation de la lipoxygénase (15-LOX, EC 1.13.11. 33 ; Sigma Aldrich Belgique) (200 U/mL) dans du tampon borate pour une concentration finale de 167 U/mL dans le milieu réactionnel. Les solutions sont saturées en oxygène pour être dans des conditions optimales d'activité enzymatique. L'activité des échantillons (100 μ g/mL) a été déterminée en mesurant la formation de l'acide hydroperoxy-linoléique à 234 nm. La quercétine (25 μ g/mL) a servi de contrôle positif. Le pourcentage de l'inhibition a été calculé selon la formule

$$I(\%) = \frac{E-S}{E}$$

où E est la mesure de l'activité de l'enzyme (absorbance de l'échantillon ne contenant pas d'inhibiteur) et S représente l'activité en présence de l'extrait à tester.

4. Investigation de l'activité anti-tumorale des extraits de galle feuillée sur des cellules cancéreuses animales.

Plusieurs techniques peuvent être utilisées afin d'étudier les effets d'une molécule sur la prolifération de cellules cancéreuses animales. Les paramètres souvent analysés sont ceux essentiels au développement et à la survie de la tumeur. Les méthodes rencontrées de nos jours permettent une analyse aux niveaux morphologique, histologique ou biochimique. Elles permettent notamment, d'évaluer l'effet d'un composé sur la prolifération cellulaire, d'étudier le cycle cellulaire, d'observer et de caractériser la migration cellulaire, mais aussi de déterminer le type de mort cellulaire.

4.1. Etude de l'activité antiproliférative.

Deux méthodes basées sur l'estimation du taux de croissance globale des cellules ont été utilisées pour évaluer l'effet antiprolifératif de composés ou d'extrait. Il s'agit du test colorimétrique de viabilité cellulaire utilisant des sels de tétrazolium (MTT) et de l'analyse de la croissance cellulaire basée sur la vidéomicroscopie assistée par ordinateur.

4.1.1. Le test colorimétrique MTT.

C'est un test basé sur la méthode de réduction enzymatique en cristaux de formazan du produit MTT (3-[4,5-diméthylthiazol-2yl]-diphényltétrazolium) par les enzymes mitochondriales décrit par Mosmann et adaptée par Bury *et al.*, 2013 (Figure 17a). L'effet antiprolifératif des extraits testés est estimé par la concentration inhibitrice d'un pourcentage donné de la croissance cellulaire globale, pour un temps donné et par rapport au contrôle. Il est possible de calculer, sur base de la courbe dose-réponse générée et en appliquant une méthode de régression linéaire, la concentration de produit qui inhibe 50% de la croissance cellulaire (IC₅₀). Les cellules en culture sont trypsinisées, comptées et re-suspendues dans du milieu de culture de façon à obtenir une concentration permettant un ensemencement cellulaire de 4000 cellules par puits dans des plaques 96 puits. Après 24 h les toxiques, dissous à l'aide de DMSO et du milieu de culture, sont ajoutés à des concentrations allant de 100 µg/mL à 0,01 µg/mL puis laissés en contact avec les cellules pendant 72 h. Le milieu est ensuite éliminé puis remplacé par une solution de MTT à 0,5 mg/ml dans du MEM blanc. Les plaques sont incubées (37°C et 5% (v/v) CO₂) au-moins durant 3h, centrifugées à 4000 rpm durant 10 min puis le surnageant est éliminé.



Figure 17: Le test de viabilité cellulaire MTT. (a) Principe réactionnel du test. Illustration d'une plaque 96 puits dans laquelle le test a été réalisé. A J0 les cellules sont ensemencées puis à J1, mises en présence ou de concentrations non croissantes du toxique d'intérêt pour une durée de 72h. (b) Le toxique est remplacé par la solution de MTT. Ce dernier est transformé en cristaux de formazan les par mitochondries encore fonctionnelles des cellules. Ces cristaux

sont ensuite dissous dans du DMSO, et donnent une coloration violette plus ou moins intense selon la proportion de cellules actives présentes. La plaque est ensuite placée dans un lecteur de plaque pour mesurer l'absorbance et quantifier les effets observés. (c) La courbe dose-réponse est tracée pour rechercher la valeur de l' IC_{50} en utilisant l'équation de la courbe de régression du % d'inhibition (y) en fonction du logarithme de la concentration (x). L' IC_{50} est obtenue en identifiant l'abscisse du point d'intersection de la courbe et de la droite y= 0,5 dans le domaine des concentrations testées. La fonction linéaire est privilégiée et utilisée lorsque cela est possible.

Après avoir ajouté 100 µL de DMSO dans chaque puits, la plaque est lue par un lecteur de plaque (680XR Biorad, Biorad, Nazareth, Belgique) à une longueur d'onde de 570 nm (Figure 17b). L'absorbance mesurée est proportionnelle au nombre de cellules ayant une activité mitochondriale. Le taux de croissance dans les conditions « traitées » comparé à la condition contrôle « non traitée » peut alors être évalué pour chacune des concentrations d'extrait testées (Figure 17c).

4.1.2. Vidéomicroscopie (mesure de la croissance globale).

Dans cette méthode, le taux de croissance global des cellules est obtenu après comptage à différents temps d'analyse (Debeir *et al.*, 2008). Le logiciel d'analyse a été développé à partir d'images obtenues par vidéomicroscopie assistée par ordinateur et permet de calculer plusieurs paramètres dont celui qui détermine le taux de croissance global (GG ou *Global Growth*). Les cellules sont ensemencées dans une boîte de culture T25, 24 h avant le début du test. Le milieu de culture est ensuite renouvelé et les cellules mises en présence ou non du produit testé. Les boîtes de culture sont placées dans une enceinte régulée à 37 °C sous un microscope à contraste de phase (Olympus, Anvers, Belgique) équipé d'un objectif 10x et d'une caméra digitale (model KP-M1E/K-S10, Hitachi Denshi,Tokyo, Japan) reliée à un système d'acquisition d'image (32-bit Matrix Vision PC-GRAB-GI frame grabber) (Figure 18). Le programme d'acquisition permet de prendre une photo du champ observé suivant un intervalle de temps prédéterminé (4 min) et durant une période définie (48 à 72 h) (Figure 19).

Le niveau de croissance global (GG) au sein d'une condition de culture cellulaire donnée est défini comme le rapport entre le nombre de cellules présentes après 24, 48 ou 72 h de culture et le nombre de cellules présentes au début de l'expérience (t = 0 h).



Figure 18 : Dispositif utilisé pour l'analyse de la prolifération cellulaire par vidéomicroscopie. Les boîtes de culture contenant les cellules traitées ou non (contrôle) par le toxique sont déposées sur les platines des microscopes à contraste de phases surmontés d'une caméra et placés dans une enceinte thermostatisée à 37°C. Les caméras sont reliées à un ordinateur qui enregistre toutes les 4 minutes les photos des cellules. A la fin de l'expérience, un film est réalisé et permet d'étudier grâce au logiciel spécifique (Debeir *et al.*, 2008), les effets du toxique sur l'activité proliférative des cellules.

4.2. Etude de l'effet sur le cycle cellulaire et le cytosquelette.

Le cycle cellulaire correspond aux différentes étapes de la division cellulaire (Figure 20a). Il a été analysé par plusieurs techniques dont l'observation des évènements de division cellulaire par vidéomicroscopie et la visualisation des différentes phases du cycle par cytométrie de flux. L'étude de l'effet sur le cytosquelette se fait principalement par analyse en microscopie de fluorescence après marquage immunocytologique des éléments du cytosquelette (actine, tubuline) par des sondes fluorescentes.

4.2.1.Vidéomicroscopie (mesure de la durée et du nombre de divisions cellulaires).

La détermination de la durée et du nombre de division cellulaire est effectuée grâce à un logiciel qui détecte et suit les phénomènes de division et permet d'obtenir le nombre et la durée des divisions cellulaires détectées au cours du temps. S'appuyant sur les caractéristiques morphologiques spécifiques des cellules adhérentes lors des divisions cellulaires, c'est à dire arrondissement suite à la perte de la plupart des points de contact avec le support ainsi que l'apparition d'une forte réfringence, la vidéomicroscopie en contraste de phase est depuis peu utilisée pour détecter les cellules en division cellulaire (Figure 19). Les fichiers d'image sont traités par le logiciel d'analyse d'image (Debeir *et al.*, 2008) qui permet de tirer des informations, après validation manuelle des évènements détectés, sur les divisions cellulaires effectives. Il permet de ce fait de compter les cellules qui se sont divisées durant les 72 h, et d'évaluer la durée des divisions survenues.


Figure 19 : Illustration de la détection du phénomène de division cellulaire par vidéomicroscopie. Les imagettes représentent la même cellule traquée dans les photos prises toutes les 4 min par les caméras du système. La séquence d'imagettes présentée montre l'évolution d'une cellule au cours du temps. **(a1-c6)** Les imagettes marquées en rouge représentent les étapes non validées pour la division (la cellule n'est pas en division) et en vert les étapes validées prises en compte dans la division (dès que la cellule entre dans un processus de division). **(a10)** L'entrée en division cellulaire est caractérisée par une forme arrondie et une forte réfringence de la cellule. **(b6)** L'observation de ces imagettes permet de situer la cellule en phase de caryokinèse et **(b10)** de cytokinèse, ainsi que **(a10-b7)** l'estimation de la durée de division. (Debeir *et al.,* 2008)

Le résultat obtenu est basé sur la possibilité de diviser le cycle cellulaire en trois phases selon la teneur en ADN (n) des cellules au cours de celles-ci (Figure 20a), mais il ne permet pas de distinction nette entre certaines des phases. Ainsi cette technique donne des informations sur les phases: G0/G1 (2n), S (2n - 4n), G2/M (4n) et indique la présence éventuelle de polyploïdes (>4n) ou de cellules en apoptose phase Pré-G1 (Figure 20b). Les cellules étant analysées individuellement, l'intensité de chaque fluorescence est proportionnelle à la quantité d'ADN présent dans la cellule. Un contrôle positif de la phase Pré-G1 est utilisé et correspond à des cellules (U373) traitées pendant 72 h avec du 4-IBP à 10 μ M. Des cellules non traitées, ayant été cultivées dans les mêmes conditions que les autres échantillons constituent le contrôle négatif.

4.2.3. Immuno-marquage (noyau, tubuline et actine).

La technique d'immunofluorescence par marquage avec un fluorochrome ou par marquage indirect à l'aide d'un anticorps spécifique, combiné à un anticorps secondaire couplé à un fluorochrome, permet de localiser une organelle ou un antigène (protéine d'intérêt) dans un tissu ou dans une cellule (Figure 21). La fluorescence est détectée à l'aide d'un microscope inversé à fluorescence Axio Observer Z1 (Zeiss, Oberkochen, Allemagne) couplé à un système d'analyse d'image informatique de type Axio Vision KS300 (Zeiss, Oberkochen, Allemagne). Pour les expériences d'immunofluorescence, les cellules sont cultivées sur des lamelles de verre déposées dans des plaques 6 puits. Après incubation ou non avec les produits à tester, les cellules sont fixées pendant 20 min à 4 °C par du formaldéhyde à 4% (v/v), tamponné à pH 7,4, dans du PBS. Après fixation, les cellules sont rincées par du PBS, puis perméabilisées avec une solution de PBS contenant 0,1% (v/v) de Triton X-100 durant 5 min.

Le nombre de divisions compté est rapporté au nombre de cellules présentes dans la première image enregistrée pour donner le nombre total de divisions effectuées par les cellules présentes au cours du temps d'analyse. Les résultats obtenus sont évalués par rapport à un contrôle négatif enregistré dans les mêmes conditions d'expérience sur des cellules non traitées.

4.2.2. Cytométrie de flux.

La technique la plus utilisée pour l'étude du cycle est l'analyse par cytométrie de flux. La cytométrie de flux (CMF) est utilisée pour compter et détecter la fluorescence de cellules préalablement perméabilisées et marquées par un agent fluorescent. Elle est définie comme l'étude précise de cellules isolées, entraînées par un flux liquide à travers un faisceau laser. L'analyse du cycle cellulaire se fait après marquage de l'ADN à l'aide de sondes fluorescentes telles que l'iodure de propidium (agent intercalant). Cette technique permet de quantifier le nombre de cellules dans les différentes phases de la division cellulaire (Bury et al., 2013). Les cellules sont ensemencées dans des boîtes de culture et mises en contact avec le toxique étudié à une concentration donnée pendant des temps de 24, 48, et 72 h. Après traitement, elles sont trypsinisées, lavées, perméabilisées et fixées à l'éthanol avant le marquage par l'iodure de propidium. La procédure de marquage se fait en deux étapes, dont la première consiste en la perméabilisation par l'éthanol 70% (v/v) à 4 °C des cellules traitées qui sont conservées toute une nuit à -20 °C. Le marquage se fait sur les cellules décongelées et lavées par du PBS. L'iodure de propidium (1 mg/mL) et la RNase-A (0,2 mg/mL) dissous dans du PBS sont ajoutés à la suspension cellulaire qui est ensuite incubée 30 min à 37 °C. Les cellules marquées sont alors analysées en CMF (Beckman Coulter Epics XL, Analis, Suarlée, Belgique).



Figure 20 : La cytométrie de flux permet d'étudier les phases de la division cellulaire. **(a)** La détermination du taux d'ADN cellulaire permet de situer la cellule dans les différentes phases du cycle. **(b)** Le rapport d'analyse par cytométrie de flux indique le profil de la distribution des cellules dans ces différentes phases.

Après lavage, la lamelle est saturée avec un tampon de blocage (1% (m/v) BSA dans du PBS), afin de bloquer toutes liaisons protéiques aspécifiques éventuelles. Les conditions d'incubation successives avec l'anticorps primaire ou le fluorochrome et l'anticorps secondaire couplé au fluorochrome dépendront des protéines d'intérêt recherchées. Après un nouveau rinçage par du PBS, le montage lamelle/lame se fait avec une solution d'alcool polyvinylique + DABCO antifading (Fluka, Sigma-Aldrich, Belgique). Six lamelles par condition expérimentale ont été réalisées et analysées.

Le marquage du noyau, de l'actine fibrillaire et de la tubuline est réalisé respectivement à l'aide du DAPI (Invitrogen, Belgique), d'un double marquage par la phalloïdine couplée avec le fluorochrome Alexa-488 (Life technology, Invitrogen, Belgique) et par l'anticorps anti- α/β tubuline (Santa-Cruz Biotechnology, USA). Après avoir réalisé les différentes étapes de fixation, perméabilisation et rinçage décrits ci-dessus, les cellules sont incubées pendant 2 h à température ambiante dans l'obscurité, avec un mélange phalloïdine (165 nM) /anti- α/β Tubuline (1/50 (v/v)) dans du PBS et de la BSA 0,1% (m/v). Les lames sont rincées 2 fois par du PBS, incubées avec l'anticorps secondaire anti-tubuline (1/400 (v/v)), rincées à nouveau (2 x5 min dans du PBS) puis marquées 5 min par du DAPI (300 nM dans du PBS).



Figure 21: Illustration d'une analyse en microscopie à fluorescence. Les cellules (traitées ou non) sont fixées sur lamelles, marquées par des sondes fluorescentes et observées au microscope.

4.3. Identification des structures responsables de l'activité antitumorale par chromatographie gazeuse couplée à la spectrométrie de masse.

La spectrométrie de masse est une technique destructive, qui permet d'obtenir la mesure de la masse moléculaire d'une substance ainsi que des données structurales par l'analyse de la fragmentation de la substance ionisée. Les ions formés, séparés par un champ magnétique, sont détectés pour être caractérisés de manière qualitative ou quantitative. La valeur déterminée pour l'analyse est le rapport masse/charge (m/z). Ce type de spectrométrie donne des renseignements sur la masse moléculaire, la masse des fragments ainsi que la structure des composés. La masse moléculaire est obtenue à partir de la valeur m/z du pic moléculaire dans le spectre. Ce pic correspond au dernier fragment (m/z) le plus intense, contenant la majorité des atomes de la molécule ionisée, généré suite à la perte ou au gain d'une charge négative. Plusieurs étapes sont préalables à l'analyse d'un composé par spectrométrie de masse. Tout d'abord, le composé est vaporisé sous vide, ionisé puis les ions formés sont accélérés et séparés par l'application de champs magnétiques et électriques. Il existe plusieurs méthodes d'ionisation des composés que l'on classe généralement en fonction de la puissance de l'ionisation. Pour notre travail, nous avons utilisé un appareil Thermo ITQ900 (Thermo Fisher Scientific Inc©, USA) constitué d'une chromatographie gazeuse équipée d'une colonne capillaire DB5 (30m x 0,25 mm x 0,25 µm) (Agilent, USA) couplé à un détecteur de masse. Ce dernier est composé d'un générateur d'ion par

impact électronique (IE), d'un analyseur de masse (ITQ) qui sépare les ions produits en fonction des rapports m/z des fragments selon les principes physiques de déflexion par un champ magnétique quadripolaire (Q) et de confinement dans un piège à ion (IT).

Les échantillons sont dissous dans du dichlorométhane et un volume de 2 μ L d'une solution à 50 μ g/mL est injecté. L'enregistrement des chromatogrammes (TIC) et des spectres de masse (IE: 70 eV ; m/z allant de 29 à 400) a été réalisé par le centre de recherche Celabor (Herve, Belgique). La programmation de la température de l'injecteur et du four est adaptée de celle décrite par Hamm *et al.* 2003. La fragmentation des composés a été analysée et comparée aux fragmentations de structures de la littérature en vue de proposer une hypothèse de structure probable pour un des composés de la fraction la plus active F3.1.1 (collaboration avec Dr Laurent Pottier).

RÉSULTAT 1

« Metabolomic-based study of the leafy gall, the ecological niche of the phytopathogen *Rhodococcus fascians*, as a potential source of bioactive compounds»

Aminata P. Nacoulma , Olivier M. Vandeputte , Manuella De lorenzi , Mondher El Jaziri and Pierre Duez

International Journal of Molecular Science, 14(6), 12533-12549 (2013)

Nacoulma et al., 2013a

La galle feuillée est une hyperplasie induite chez les plantes suite à une infection par la bactérie phytopathogène *Rhodococcus fascians*. Précédemment, des analyses génomiques et transcriptomiques, à des stades précoces du développement des symptômes, ont mis en évidence des altérations des métabolites primaires et secondaires. La présente étude est fondée sur l'hypothèse que la galle feuillée, au stade de maturité, pourrait représenter une source potentielle de nouveaux composés bioactifs. Ainsi, dans le cadre de ce travail, l'analyse métabolomique non-ciblée des extraits chloroformiques et aqueux de plantes de *Nicotiana tabacum* L. infectées et non infectées par *R. fascians*, a été effectuée sur base des profils ¹H-RMN à l'aide des techniques d'analyses statistiques de données multivariées (analyse en composantes principales PCA et analyse discriminante par projection orthogonale de structures latentes OPLS-DA).

La métabolomique est, par définition, l'étude du métabolome d'un système biologique dans sa matrice. C'est une technique qui permet d'étudier simultanément les métabolites présents dans une matrice biologique au moyen d'outils de spectrométrie analytique. Une analyse statistique subséquente des profils métaboliques générés est ensuite utilisée pour identifier les différences spécifiques à l'échelle moléculaire.

Dans le cadre de l'étude de la reprogrammation métabolomique du tabac infecté par *R*. *fascians*, l'analyse du profil des métabolites polaires indique des altérations, principalement au niveau des métabolites primaires et de certains composés phénoliques. En revanche, les principales modifications observées au niveau des métabolites non-polaires reflètent des altérations du pool de métabolites secondaires, dont les diterpénoïdes. Cette observation est confirmée par l'analyse qualitative en GC-MS.

D'une manière générale, nos résultats indiquent que l'interaction phyto-pathogénique étudiée induit des changements métaboliques chez l'hôte qui ont pour conséquence l'établissement de la galle feuillée comme niche écologique pour *R. fascians* (altération du métabolisme primaire) et l'activation des mécanismes de défense de la plante suite à l'infection (altération du métabolisme secondaire).

Aussi, plusieurs extraits bruts de galle feuillée et de plante non infectée ont été testés pour leur activité antiproliférative. Ces extraits ont montré des effets distincts sur quatre lignées cancéreuses humaines (poumon A549, sein MCF-7, prostate PC3 et glioblastome U373). Le fractionnement bio-guidé de l'extrait chloroformique de la galle feuillée (extrait le plus actif sur les quatre lignées cellulaires) par le test MTT sur la lignée U373 (IC_{50} = 58,9 µg/mL), a permis d'obtenir des fractions semi–purifiées, plus actives, qui inhibent la prolifération de la lignée de glioblastome U373 (2,4 µg/mL< IC_{50} des fractions < 14,0 µg/mL).

En considérant le rôle prometteur de l'exploitation des diterpénoïdes comme composés biologiquement actifs, les hyperplasies végétales, et la galle feuillée du tabac en particulier, pourraient être une source propice pour la découverte de nouveaux médicaments antitumoraux.

OPEN ACCESS International Journal of Molecular Sciences ISSN 1422-0067 www.mdpi.com/journal/ijms

Article

Metabolomic-Based Study of the Leafy Gall, the Ecological Niche of the Phytopathogen *Rhodococcus Fascians*, as a Potential Source of Bioactive Compounds

Aminata P. Nacoulma ^{1,*}, Olivier M. Vandeputte ², Manuella De Lorenzi ¹, Mondher El Jaziri ² and Pierre Duez ³

- ¹ Laboratory of Toxicology, Faculty of Pharmacy, Université Libre de Bruxelles, CP 205/1, Boulevard du Triomphe, Brussels B-1050, Belgium; E-Mail: manuela.de.lorenzi@ulb.ac.be
- ² Laboratory of Plant Biotechnology, Faculty of Sciences, Université Libre de Bruxelles, 12 rue des Professeurs Jeener et Brachet, Gosselies B-6041, Belgium; E-Mails: olivier.vandeputte@ulb.ac.be (O.M.V.); jaziri@ulb.ac.be (M.E.J.)
- ³ Laboratory of Pharmacognosy, Bromatology and Human Nutrition, Faculty of Pharmacy, Université Libre de Bruxelles, CP 205/9, Boulevard du Triomphe, Brussels B-1050, Belgium; E-Mail: pduez@ulb.ac.be
- * Author to whom correspondence should be addressed; E-Mail: aminata.nacoulma@ulb.ac.be; Tel./Fax: +32-2650-5174.

Received: 22 April 2013; in revised form: 21 May 2013 / Accepted: 4 June 2013 / Published: 14 June 2013

Abstract: Leafy gall is a plant hyperplasia induced upon *Rhodococcus fascians* infection. Previously, by genomic and transcriptomic analysis, it has been reported that, at the early stage of symptom development, both primary and secondary metabolisms are modified. The present study is based on the hypothesis that fully developed leafy gall, could represent a potential source of new bioactive compounds. Therefore, non-targeted metabolomic analysis of aqueous and chloroform extracts of leafy gall and non-infected tobacco was carried out by ¹H-NMR coupled to principal component analysis (PCA) and orthogonal projections to latent structures-discriminant analysis (OPLS-DA). Polar metabolite profiling reflects modifications mainly in the primary metabolites and in some polyphenolics. In contrast, main modifications occurring in non-polar metabolites concern secondary metabolites, and gas chromatography and mass spectrometry (GC-MS) evidenced alterations in diterpenoids family. Analysis of crude extracts of leafy galls and non-infected tobacco leaves exhibited a distinct antiproliferative activity against all four tested human cancer cell lines. A bio-guided fractionation of chloroformic crude extract

yield to semi-purified fractions, which inhibited proliferation of glioblastoma U373 cells with IC_{50} between 14.0 and 2.4 µg/mL. Discussion is focused on the consequence of these metabolic changes, with respect to plant defense mechanisms following infection. Considering the promising role of diterpenoid family as bioactive compounds, leafy gall may rather be a propitious source for drug discovery.

Keywords: metabolomics; tobacco; multivariate data analysis; diterpenoids; leafy gall; *Rhodococcus fascians*

1. Introduction

Plant galls are tumors triggered by external aggressions, especially microorganisms or insects [1]. Although galls display many phenotypes, they provide niches to protect and ensure the survival of the pathogen [2,3]. In the case of bacteria, the interaction involves a complex chemical exchange contributed by and specific to both the host and the pathogen [4,5]. Galls are of great medicinal value and have widely been used in traditional medicines. Therefore, prospecting for chemicals that are specifically induced in plant galls is a promising alternative for drug discovery [6–8]. For instance, *Rhodococcus fascians*, a phytopathogenic soil Gram-positive actinomycete has been shown to produce phytohormones [5,9,10], triggering plant cell divisions and signal transduction. This leads to cell reprogramming [11,12], resulting in the development of the so-called leafy galls on a wide range of host plants [8]. At the early stage of leafy gall development, both primary and secondary metabolisms are modified to contribute to symptoms development [12]. However, the metabolic changes characterizing the fully developed leafy gall, which is the ecological niche of the *R. fascians*, remain largely unexplored, except for the identification of 7-methyl-esculin, a phenolic compound accumulated in tobacco symptomatic tissues, but not in non-infected tissues [13].

Actinomycetes are a rich and highly exploited source of antibiotics and other bioactive secondary metabolites of medical or industrial interest [14,15]. Similarly, medicinal plants have been used since prehistory to treat human diseases or to improve human health and today plant drug discovery remains extremely important for the pharmaceutical industry [16,17]. Recently, non-pathogenic actinomycetes, living inside plant tissues as endophytes, are being screened for the production of bioactive compounds [18,19]. However, plant tissue hyperplasia induced upon interaction with pathogenic bacteria are, to our knowledge, an unexplored yet unique resource for new compounds with promising potential for drug development. With the availability of non-targeted methods, biological samples can be characterized by innovative approaches; metabolomic methods, based on gas or liquid chromatography and mass spectrometry (GC-MS and LC-MS), or on nuclear magnetic resonance (NMR), generate comprehensive metabolic fingerprints of metabolites being modified during a biological process or occurring in symptomatic tissues [20].

Here, the monitoring of the metabolic status was investigated by NMR and antiproliferative activity by MTT assay, comparing polar and non-polar extracts between well-developed leafy galls and non-infected tobacco tissues. The NMR data analyses were performed with an unsupervised

clustering method (principal component analysis, PCA) and, when appropriate, by a supervised method (orthogonal projections to latent structures-discriminant analysis, OPLS-DA).

2. Results and Discussion

2.1. The Morphological Features of Plant Material

Leafy galls (LG) were induced in four-week-old *in vitro* growing tobacco plants following infection with the virulent *R. fascians* strain D188. Figure 1 illustrates the phenotype of the non-infected (NI) tobacco plants 11 weeks post germination and a typical eight-week-old LG, a morphological structure with multiple dormant buds and malformed leaves characterized by increased trichomes formations.

Figure 1. The morphological features of leafy gall (LG) formed in *Rhodococcus fascians*infected tobacco plant (eight weeks post infection) and non-infected (NI) tobacco plant grown for 12 weeks. The *in vitro* tobacco plants were infected four weeks post germination. Bar = 1 cm.



2.2. Characteristics of ¹H NMR Spectra of Polar and Non-Polar Tobacco Extracts

As shown in Figure 2, visual inspection of the ¹H-NMR spectra of non-polar metabolites (chloroformic extracts) revealed roughly similar chemical shift patterns in the aromatic region (δ 7–8 ppm) but striking differences in both the olefinic (δ 4.9–6.5 ppm) and aliphatic (δ 0–3 ppm) regions. According to Qin [21], the methyl signals located at δ 0.7–1.3 ppm might originate from steroids or terpenoids and, at δ 1.2–1.4 ppm, from fatty components. Thus, the significant signals observed at δ 1.5–3.0 ppm and at δ 5.0–5.5 ppm might be assigned to methylene group from sesquiterpenes or diterpenes and to olefinic signals from fatty components, steroids, or terpenoids, respectively. These data suggest an alteration in biosynthetic pathways leading to the accumulation of

terpenoids and/or fatty compounds to the detriment of the metabolites diversity in infected tobacco cells. In contrast, a visual observation of the ¹H-NMR spectra of polar metabolites (aqueous extracts) revealed no obvious differences in chemical shifts between *R. fascians* infected (LG) and non-infected (NI) tobacco plants (Figure 3).

Figure 2. The typical ¹H-NMR spectra (300.13 MHz) of non-polar tobacco metabolites from NI and LG tissues. Zoom-ups of the aliphatic (0.5–3.0 ppm) and olefinic (5.0–5.5 ppm) regions are included.



Figure 3. The typical ¹H-NMR spectra (300.13 MHz) of polar tobacco metabolites from NI and LG infected tissues.



2.3. Statistical Analysis of the Non-Polar Metabolites

As shown in the score plot (Figure 4a), the first two principal components explain 99.7% of the variability in the dataset (PC1: 78.6% and PC2: 21.1%) and clearly identify two different clusters of samples. These PCA scores were tested by a one-way-ANOVA (Table 1), indicating significant differences between *R. fascians*-infected and non-infected tobacco metabolites profiles (p < 0.001). According to the mapping metabolite approach described by Graham [22], the PC1 component allows an obvious discrimination between extracts of *R. fascians*-infected and non-infected tobacco plants. Examination of the loadings plot (Figure 4b) shows that the variance along the first principal component is mainly driven by modifications in the aliphatic ($\delta 0.7-3$ ppm) and the olefinic ($\delta 5.0-5.5$ ppm) regions. These PC1 discriminating signals confirm that low-polarity secondary metabolites, possibly steroids or terpenoids, could account for some major changes occurring in tobacco plants following *R. fascians* infection. To further support this assumption, qualitative GC-MS analysis of chloroformic extracts from both LG and non-infected plants was investigated. Figure 5 shows major differences in the GC

chromatograms, particularly in compounds eluted from 45 to 60 min., which, according to Hamm [23], correspond to tobacco diterpenoids, such as cembrenoids, as illustrated by the retention time of commercially available cembrene (at 49.1 min) which are found to be accumulated more than two times in LG as compared to NI extracts. It is noteworthy to mention that cembrenoids and closely related metabolites are found to accumulate in tobacco trichomes [24], a characteristic anatomical feature of leafy galls (Figure 1). It is therefore tempting to postulate that, diterpene biosynthetic pathway and particularly cembrenoids family is stimulated in infected tobacco tissue.

The non-polar metabolites fingerprinting reveals that the R. fascians infection induces the expression of secondary metabolites with aliphatic signals consistent with the induction and accumulation of terpenic compounds. The qualitative GC analyses of the LG and NI tobacco extracts, according to a procedure described in the literature for the profiling of terpenoids [23], indicates that induced compounds could belong to the tobacco diterpene family. This confirms a previous observation by transcriptomic and BiNGO (Biological Network Gene Ontology) analysis of up-regulated genes in *R. fascians* infected-Arabidopsis that revealed an up-regulation of the plant host diterpenoid pathway [12]. To date, the role of terpenoid compounds in the R. fascians-plant interactions remains unknown, although some tobacco-pathogen interactions are known for leading to alterations in the terpenes pathway. The induction of the monoterpene E(b)-ocimene and the sesquiterpenes caryophyllene, β -elemene and α -farnesene, have been shown during the interaction of Nicotiana tabacum with Golovinomyces cichoracearum [25] and Pseudomonas syringae [26], respectively. Seo [27] identified a diterpene, the (11E,13E)-labda-11,13-diene-8a,15-diol, as an endogenous signal for the activation of tobacco defense responses to wounding and to infection with the tobacco mosaic virus; many terpenoids are known for their function as phytoalexins, contributing to plant defenses against microbes [28].

Figure 4. Principal components analysis (PCA) of ¹H-NMR spectra for chloroformic extracts of both LG and NI tobacco tissues; (a) The first two components explain 99.7% of the variation (PC1: 78.6% and PC2: 21.1%) with a clear discrimination between LG and NI extracts along PC1; (b) Loading plot of the PC1 component shown in **a**. The discrimination between infected and non-infected tobacco plant extracts mainly takes place in the aliphatic region, at δ 0.7–3.0 ppm, and in the olefinic region, at δ 5.0–5.5 ppm. These spectral regions correspond to the signals characteristic of terpenoids and steroids [21].

Extracts		DF	F	<i>p</i> -value
Polar metabolites		8	0.15	0.71
Non-polar metabolites		12	636.3	4.37×10^{-11}
DE 1 1 1 1	6.6	1	1 12 /1	C 1 CC : /

DF: describes the degrees of freedom and F the fisher coefficient.

Figure 5. The typical GC-MS chromatograms of non-polar tobacco metabolites from NI and LG tobacco tissues. The arrow indicates the gas chromatography and mass spectrometry (GC-MS) peak corresponding to commercially available cembrene. See Material and Methods for chromatographic conditions.

2.4. Statistical Analysis of Polar Metabolites

As shown in Figure 6a, the first two principal components explain 81.5% of the variability in the dataset (PC1: 62.2% and PC2: 19.3%) and could not identify samples clusters. PCA scores were tested

by a one-way-ANOVA (Table 1), indicating non-significant difference between *R. fascians*-infected and non-infected tobacco metabolites profiles (p > 0.05). Examination of the PCA loadings plot (Figure 6b) shows that the variance along the first principal component is mainly driven by modifications in the region $\delta 2.0-5.5$ ppm. To avoid any biased interpretation of group discrimination based on PCA analysis, the dataset was reanalyzed using OPLS-DA, a supervised method based on an *a priori* knowledge of distinct samples.

Figure 6. The principal components analysis of ¹H-NMR spectra for aqueous extracts of both NI and LG tobacco tissues; (**a**) The first two components explain 81.5% of the variation (PC1: 62.2% and PC2: 19.3%) with a small discrimination between NI and LG extracts along PC1; (**b**) Loading plot of the PC1 component shown in (a). The discrimination between infected and non-infected tobacco plant extracts mainly takes place at δ 2–5.5 ppm.

As shown in Table 2, the comparisons between samples in models gave better predictions in OPLS-DA compared to PCA analysis (predictability of the total model: Q^2 OPLS-DA > Q^2 PCA; 0.93 and 0.65, respectively). OPLS-DA facilitates the identification of the different sources of variation that contribute to the differences between the extracts, by separating inter-group variation (*i.e.*, variation that is predictive of differences between LG and NI tissues) from intra-group variation (*i.e.*, variation that is unrelated to group separation). As shown in Figure 7a, a part of the total variance (predictive component, Cp 46.1%) is predictive, being specifically related to the differences induced by R. fascians infection. In contrast, the first orthogonal component (Co) describing 19.4% of the total variation in the dataset is responsible of the high variability within the dataset. The discriminating signals were interpreted through a loading S-plot (Figure 7b) that allows distinguishing of both the covariance (contribution of the effect) and the correlation (reliability of the predicted variables) for the identification of the major contributors in samples discrimination. In this OPLS model, increased metabolites correspond to those that show a high (i) correlation with the predictive scores, (p(corr) > 0.5) and (ii) co-variation with the predictive scores (p > 0.05), with respect to the component scores model. At these cut-off levels, only the metabolites identified by the OPLS-DA model were considered as significant contributors [29]. In OPLS-based regression, VIP values (variable importance in the projections) are directly proportional to the influence of variables on the separation on score

plots. Variables with higher VIP values are more important for the samples discrimination. In the OPLS-DA analysis of LG and NI tobacco plants extracts, VIP values for the main metabolites, responsible for separation on the score plot, are represented in Figure 7c and Table 3. The high VIP scores identified for proline, inositol, malic acid, and caffeoylquinic acid, legitimate their occurrence in the well-developed LG, as compared to NI tissues.

Figure 7. The orthogonal projections to latent structures discriminating analysis (OPLS-DA) of ¹H-NMR spectra for aqueous extracts of both NI and *Rhodococcus fascians*-infected LG tobacco tissues; (**a**) The predictive component (Cp, *X*-axis) explains 46.1% and the first orthogonal component (Co1, *Y*-axis) 19.4% of the dataset variation; (**b**) The *X* axis (p) describes the loadings of each variable and *Y*-axis (p(corr)) represents the reliability of each variable in the dataset. Cut-off values for the covariance and the correlation were assigned to p > 0.05 and p(corr) > 0.5, respectively (S-plot). Metabolites in the upper-right and lower-left quadrants are potential biomarkers, and best discriminate the LG and NI samples with smaller risk for illegitimate correlations (p > 0.05); the induced compounds corresponding to discriminant loadings are inferred according to the literature [21,30]. These include sugars (raffinose, galactitol), aminoacids (proline, glutamine), organic acids (malic acid), and phenolics (caffeoylquinic acid); (**c**) OPLS-DA variable importance in the projection-plot with confidence intervals of buckets contributing to discriminating LG and NI tobacco plants polar extracts; the arrows indicate the ¹H chemical shifts (ppm) of significant polar metabolites (Table 3).

Multivariate data analysis models	Α	n	R ²	Q^2	
PCA					
Non-polar metabolites	3	13	0.99	0.99	
Polar metabolites	6	9	0.99	0.65	
OPLS-DA					
Polar metabolites	1+4	9	0.98	0.93	

Table 2. The summary of PCA and OPLS-DA models.

A describes the model components; *n*, the number of observations; R^2 , the total variation explained; Q^2 , the predictability and statistical validity of model ($Q^2 > 0.5$ is considered significant).

Table 3. The VIP (variable importance in the projections) values of the major metabolites change in *Rhodococcus fascians*-infected tobacco (LG) contributing for the separation in the OPLS-DA score plots.

Significant polar metabolites	¹ H chemical shifts (ppm)	VIP values
5,O-caffeoylquinic acid	3.73 (dd, <i>J</i> = 9.7 Hz, 3.5 Hz, H-4)	6.48
Inositol	3.61 (t, $J = 9.7$ Hz, H-4 and 6)	4.94
Proline	2.34 (m, H-3)	4.61
Malic acid	2.80 (dd, <i>J</i> = 15.9 Hz, 4.5 Hz, H- <i>b</i>)	2.33

The polar metabolites fingerprinting shows that metabolites discriminating LG from NI tobacco plants are likely primary metabolites, such as sugars (raffinose, galactitol), amino acids (proline, glutamine), and some organic and phenolic acids (malic acid, caffeoylquinic acid derivatives), suggesting a role of these compounds in the established ecological niche of R. fascians. Synthesis of primary metabolites seems to be a quite general mechanism, observed during plant-pathogen interactions [31,32], and the response of *N. tabacum* is probably not specific to this interaction. The increase in sugar contents in LG may reflect the energy costs linked to the activation of the plant defenses [33] or a redirection of the host plant metabolism, presumably to the R. fascians own advantage [12]. The increase in some amino acids, such as proline and glutamine, may contribute to the pathogenicity of R. fascians by providing appropriate conditions for the expression of virulence factors [12]. Interestingly though, the third main discriminatory class of molecules emerging from our study are organic acids and phenols (malic acid, caffeoylquinic acid, and kaempferol), pointing to a possible defense reaction occurring in LG; this is consistent with the induction of defense-related genes observed in developed LG of Atropa belladonna, tobacco and Arabidopsis [12,34,35]. Indeed, the phenylpropanoid pathway is known to be induced in response to a pathogen attack [36], and several phenolics are known for their potential anti-bacterial activities. For instance, caffeoylquinic acid derivatives were recently identified as antimicrobials and inhibitors of efflux pump of Gram-positive pathogenic bacteria [37].

2.5. Leafy Gall (LG) Tissues Contain Potent Compounds That Affect the Proliferation of Different Human Cancer Cell Lines

The occurrence of antiproliferative activity in LGs and NI was assessed in crude water, hexane, methanol, and chloroform extracts by determining the concentration of extract required to obtain a

50% inhibition (IC_{50}) of the proliferation of four different cancer cell lines, U373, A549, MCF-7, and PC-3 using MTT assays. The hexane, methanol, and water extracts of the LGs and the NI extracts did not affect any of the cell lines (Table 4). In contrast, the chloroformic extract of the LGs, but not of NIs, exhibited a distinct antiproliferative activity against all four tested cell lines, albeit to different extents.

Coll Brog		Infected pla	nts (IC ₅₀ µg/m]	L)	Non infected plants (IC ₅₀ μg/mL)				
Centines	Water	Methanol	Chloroform	Hexan	Water	Methanol	Chloroform	Hexan	
A549	NA	>100	69.8 ± 0.9	>100	NA	NA	>100	>100	
MCF-7	NA	NA	85.6 ± 1.0	>100	NA	NA	>100	NA	
PC3	NA	NA	84.5 ± 4.3	>100	NA	NA	>100	NA	
U373	NA	>100	58.9 ± 2.0	>100	NA	NA	>100	>100	

Table 4. Determination of *in vitro* growth activity of LG and NI tobacco crude extracts.

NA indicates non active fraction.

The proliferation of line U373 was affected most strongly (IC₅₀ = $58.9 \pm 2.0 \ \mu\text{g/mL}$), followed by that of line A549 (IC₅₀ = $69.8 \pm 0.9 \ \mu\text{g/mL}$), whereas lines MCF-7 and PC-3 had a lower but comparable sensitivity for the crude extract (IC₅₀ = $84.5 \pm 4.3 \ \mu\text{g/mL}$ and $85.6 \pm 1.0 \ \mu\text{g/mL}$, respectively).

Figure 8. The crude chloroformic extract of tobacco leafy galls contain compounds with antiproliferative activity against the glioblastoma U373 cell line. Schematic overview of the bio-guided fractionation of LG crude extract using the MTT colorimetric cell growth inhibition bioassay. The efficiency of each considered fraction is expressed as the IC_{50} value; fractions in bold were analyzed further. The data are presented as the mean \pm SD (n = 3).

Because the glioblastoma cell line U373 exhibited the strongest sensitivity toward the LG extract, this line was chosen for all further experiments. As a first step in the chemical characterization of the bioactive compound(s) present in the LGs, the crude chloroformic extract was fractionated and the IC_{50} was determined for each fraction. As shown in Figure 8, a first chromatographic fractionation yielded two out of seven fractions with IC_{50} values below the value obtained for the crude extract (F2 and F3).

These fractions were subjected to a second chromatography fractionation allowing the isolation of three active sub-fractions (F2.2, F2.3 from F2, and F3.1 from F3). These preliminary results on the inhibition of human tumor cell growth indicate that fully developed leafy gall, could represent a potential source of new bioactive compounds.

Because none of the tested extracts from NI exhibited antiproliferative activity, the biological activity observed in the chloroformic extract of LGs has to be associated with the reprogramming of the development and metabolism of the host, essentially the diterpenoids family (Figure 5) since such compounds have already been reported to inhibit cell proliferation [38].

3. Experimental Section

3.1. Solvents and Chemicals

Analytical grade chloroform was purchased from Chemlab (Redu, Belgium). $CDCl_3$ (99.96%) and D_2O (99.0%) with buffering agent (pH 6.5) were purchased from Sigma Aldrich (St. Louis, MO, USA).

3.2. Plant Material and Bacterial Infection

Tobacco plants (*Nicotiana tabacum* L. cv. Petit Havana) were aseptically grown from sterile seeds (obtained at the Jean Massart Botanical Garden from the Université Libre de Bruxelles) on solid half-strength MS medium (Duchefa), supplemented with 3% sucrose, in a growth chamber at 23 °C in a 16-h light photoperiod (70 μ mol photonsm⁻²s⁻¹). Four week-old plants were injured and infected at the apical bud with 10 μ L of *R. fascians* virulent cultures strain D188 according to Rajaonson *et al* [39]. The leafy galls (LG) that formed were harvested eight weeks after infection. Non-infected (NI) tobacco plants were harvested after twelve weeks of growth (at the same developmental stage as the infected plants).

3.3. Established Cell Lines

The human U373 (ATCC code HTB-17) glioblastoma, A549 (DSMZ code ACC107) non-small cells lung carcinoma, MCF-7 (DSMZ code ACC115) breast cancer and PC-3 (DSMZ code ACC465) prostate cancer cell lines were obtained from the American Type Culture Collection (ATCC; Manassas, VA, USA) and maintained in our laboratory as described previously [40].

3.4. Extraction of Plant Material

3.4.1. For Nuclear Magnetic Resonance (NMR) Analysis

Fifteen (for chloroform extraction) and nine (for aqueous extraction) independent samples, of infected and non-infected plants were randomly constituted by mixing material harvested from plants. Each sample was ground in liquid nitrogen and freeze-dried. Three hundred milligrams aliquots of each sample were transferred into centrifuge tubes. Five milliliters of chloroform or water were added to the tube followed by rapid vortexing and sonication for 30 min. The material was then centrifuged at 3000 rpm for 15 min. The extraction was repeated 2 times and the combined extracts were transferred

into a 25-mL round bottom flask and dried with a rotary vacuum evaporator (40 °C for chloroform and 70 °C for water). The residue was dissolved in 1 mL of CDCl₃ or D₂O, respectively, and subjected to ¹H-NMR analysis.

3.4.2. Chromatgraphic Fractionnaltion of LG and Non-Infected (NI) Extracts for Antiproliferative Activity Measurment

Each of LG or NI material was grinded in liquid nitrogen, freeze-dried, and extracted 3 times with 500 mL of water, hexane, methanol, or chloroform (analytical grade Chemlab, Belgium). Subsequently, the chloroformic dry crude extract (2320 mg), obtained from 1.03 kg of LG material, was subjected to two successive automated flash chromatography systems (CombiFlash[®] Rf 200 psi from Teledyne isco[®], Lincoln, NE, USA). The column was filled with a normal phase silica gel (4 g silica RediSep[®] Rf columns from Teledyne isco[®], Lincoln, NE, USA). For the first flash chromatography, the column was eluted by a binary gradient mobile phase composed of dichloromethane: methanol (from 0% to 40% of methanol) at a flow rate of 15 mL/min and resulted in the isolation of seven fractions that were used in cell proliferation bioassays (see below). Two fractions (F2 and F3) were selected for a second flash chromatographic fractionation using the same column but with a different mobile phase composed of dichloromethane: methanol (from 10% to 30% methanol) at a flow rate of 10 mL/min. The 3 sub-fractions collected from F2 and the 5 sub-fractions collected from F3 were tested in the cell proliferation bioassay. For proliferation bioassay, LG and NI extracts as well as the chromatographic fractions were dissolved at a concentration of 1 mg/mL in DMSO and adjusted to 10% DMSO (v/v) with culture medium before to be subjected to proliferation inhibition assay at appropriate concentrations of the tested samples.

3.5. ¹H-NMR-Based Metabolomic Analysis of Tobacco Extracts

All spectra were recorded on a Brüker AV-300 NMR spectrometer operating at a proton NMR frequency of 300.13 MHz. For each sample, 128 scans were recorded following the conditions described by Choi [30]. The resulting spectra were automatically phased, baseline-corrected and manually calibrated at 0.0 ppm using residual solvent signals in MestReNova v8.0.2 (Mestrelab Research, Santiago de Compostela University, Santiago de Compostela, Spain).

3.6. Data Analysis

The ¹H-NMR spectra were aligned and automatically reduced to ASCII files using MestReNova. The data were reduced to integrated regions of equal width (0.04 ppm) over the region δ 0.0 to 12.0 ppm and normalized to the total spectral area in order to suppress trivial separation based on variations in amount of sample. The regions δ 7.26 and δ 4.1–5.3 ppm that correspond to solvents residual signals were excluded from all spectra used for analysis of chloroformic and aqueous extracts, respectively, in order to not compromise the analysis. Principal component analysis (PCA) and orthogonal projections to latent structures discriminant analysis (OPLS-DA) were performed with the SIMCA-P+ software, version 12.0.1 (Umetrics, Umeå/Malmö, Sweden). The degree of separation for each group of data was determined from the scores plot, and the signals that contribute to the

composition were obtained from the factor loadings plot. A covariance matrix, generated by the mean-centered method without scaling (subtraction of the column mean from each data point), was used for analysis. OPLS-DA was carried out between *R. fascians*-infected and non-infected tobacco plants to identify metabolites affected by infection. To facilitate interpretation of OPLS-DA a predictive component was calculated after removing the variation explained by orthogonal components and, correlation coefficient [p(corr)] were computed for each bin and represented by S-plot. Metabolites (bins) showing p(corr) > 0.5 were then considered significant. For all plots, a hostelling 95% confidence ellipse was drawn. Metabolites indicated in Table 3 and Figure 7b were assigned on the basis of chemical shifts and identified from spectral databases and bibliographic search for the chemical shifts of pure compounds putatively present in the ¹H-NMR spectra of the extracts [21,30].

3.7. Gas Chromatography and Mass Spectrometry GC-MS Analysis

GC-MS analyses were performed on a Thermo ITQ 900 system (Thermo Fisher Scientific Inc., Hudson, NH, USA) equipped with an Agilent DB5 capillary column of 30 m × 0.25 mm with a phase thickness of 0.25 μ m (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA). The injector temperature was set to 250 °C, the transfer line to 250 °C and the source to 150 °C; the temperature program was 40 °C for 1 min, 9 °C/min increase rate up to 130 °C, followed by a 2 °C/min increase rate to 230 °C as described by Hamm [23]. The carrier gas was helium, with a column head pressure of 10 psi. The chloroformic and commercially available cembrene (Accros Organics, Geel, Belgium) samples (50 μ g/mL) were injected in the splitless mode (2 μ L injected, 1 min). The mass spectrometer was operated in electron-impact mode (EI) at 70 eV, in the scan range *m/z* 29–400.

3.8. Antiproliferative Activity by MTT Assay

The colorimetric MTT viability assay (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5 diphenyltetrazolium bromide; Sigma, Diegem, Belgium) was used to determine the overall growth level of each cell line at 72 h as described previously [41] (n = 3 with 6 replicates for each concentration).

4. Conclusions

In 1997, Vereecke *et al.* have shown that the chemical composition of ethanolic and aqueous extracts from tobacco LG was drastically changed compared to NI tissue. Chlorogenic acid was abundant both in LG and NI tissue, but caffeic acid and another cinnamoyl analog were new in LG. The most pronounced product induced in LG was identified as 7-methyl esculin (7-*O*-methyl-6-*O*- β -D-glucopyranosyl coumarin). It was the first report of the occurrence of this coumarin derivative in tobacco. Since 7-Methyl esculin barely affected the growth of *R. fascians* and was not catabolized, the authors postulate that 7-methyl esculin might locally influence plant cell division, providing appropriate and optimal environmental and nutritional conditions to establish the ecological niche of the invading bacteria. More recently, we have shown that tobacco LG extracts have antioxidant and anti-inflammatory activities [19], as compared to NI plant extracts. All together these study support the occurrence of dramatic metabolic changes in *R. fascians* infected tissues that remain largely

unexplored and therefore incite us to better explore LG as a resource for new compounds with promising potential for drug development.

In this study and in order to get a global view of these metabolic changes, non-targeted metabolomic analysis of aqueous and chloroform extracts of LG and NI tobacco was carried out by ¹H-NMR coupled to PCA and OPLS-DA. Aqueous extract profiling exhibits modifications mainly in the primary metabolites and in some polyphenolics. Certainly, the synthesis of primary metabolites seems to be a quite general mechanism observed during plant-pathogen interactions and the tobacco cell response is probably not specific to *R. fascians* infection suggesting a role of these compounds in the established the ecological niche which is the standing goal of the invading bacteria. Unexpectedly, main modifications occurring in LG chloroformic extract concern secondary metabolites, and GC-MS evidenced alterations in the diterpenoids family, including the cembrenoid family that is known to have antiproliferative activity against cancer cells. A bio-guided fractionation of LG chloroformic crude extract yield to semi-purified fractions, which show antiproliferative activity in glioblastoma U373 cells with an IC₅₀ value between 14.0 and 2.4 μ g/mL. Experiments are now in progress to isolate the active compounds, elucidate it's (their) structure(s) and investigate the mechanism of action of such compounds as an antiproliferative compounds against human cancer cells.

Acknowledgments

O.M.V. is a Post-doctoral Researcher of the F.R.S.-F.N.R.S. (Fonds de la Recherche Scientifique, Belgium). The authors gratefully thank the Belgian National Fund for Scientific Research (FNRS) (FRFC 2.4.593.09).

Conflict of Interest

The authors declare no conflict of interest.

References

- 1. Agrios, G.N. Plant Pathogens and Disease: General Introduction. In *Encyclopedia of Microbiology*, 3rd ed.; Schaechter, M., Ed.; Elsevier Inc.: Oxford, UK, 2009; pp. 613–646.
- Hayward, A.; Stone, G. Oak gall wasp communities: Evolution and ecology. *Basic Appl. Ecol.* 2005, 6, 435–443.
- 3. Bailey, R.; Schönrogge, K. Host niches and defensive extended phenotypes structure parasitoid wasp communities. *PLoS Biol.* **2009**, *7*, e1000179.
- 4. Barash, I.; Manulis-Sasson, S. Recent evolution of bacterial pathogens: The gall-forming Plantoea Agglomerans case. *Annu. Rev. Phytopathol.* **2009**, *47*, 133–152.
- 5. Stes, E.; Vandeputte, O.M. Successful bacterial coup d'État: How *Rhodococcus fascians* redirects plant development. *Annu. Rev. Phytopathol.* **2011**, *49*, 69–86.
- Lamien, C.E.; Meda, A. Inhibition of fowlpox virus by an aqueous acetone extract from galls of *Guiera senegalensis* J.F. Gmel (Combretaceae). J. Ethnopharmacol. 2005, 96, 249–253.

- Kaur, G.; Athar, M. *Quercus infectoria* galls possess antioxidant activity andabrogates oxidative stress-induced functional alterations in murine macrophages. *Chem. Biol. Interact.* 2008, 171, 272–282.
- Heo, J.; Park, J. Wisteria floribunda gall extract inhibits cell migration in mouse B16F1 melanoma cells by regulating CD44 expression and GTP-RhoA activity. J. Ethnopharmacol. 2005, 102, 10–14.
- Vandeputte, O.; Oden, S. Biosynthesis of auxin by the Gram-positive phytopathogen *Rhodococcus fascians* is controlled by compounds specific to infected plants. *Appl. Environ. Microbiol.* 2005, 71, 1169–1177.
- 10. Pertry, I.; Václavíková, K. *Rhodococcus fascians* impacts plant development through the dynamic *fas*-mediated production of a cytokinin mix. *Mol. Plant Microbe Interact.* **2010**, *23*, 1164–1174.
- 11. Simón-Mateo, C.; Depuydt, S. The phytopathogen *Rhodococcus fascians* breaks apical dominance and activates axillary meristems by inducing plant genes involved in hormone metabolism. *Mol. Plant Pathol.* **2006**, *7*, 103–112.
- 12. Depuydt, S.; Trenkamp, S. An integrated genomics approach to define niche establishment by *Rhodococcus fascians. Plant Physiol.* **2009**, *149*, 1366–1386.
- 13. Vereecke, D.; Messens, E. Patterns of phenolic compounds in leafy galls of tobacco. *Planta* **1997**, *201*, 342–348.
- 14. Zotchev, S.B. Marine actinomycetes as an emerging resource for the drug development pipelines. *J. Biotechnol.* **2012**, *158*, 168–175.
- 15. Solecka, J.; Zajko, J. Biologically active secondary metabolites from Actinomycetes. *Cent. Eur. J. Biol.* **2012**, *7*, 373–390.
- 16. Ksouri, R.; Ksouri, W.M. Medicinal halophytes: Potent source of health promoting biomolecules with medical, nutraceutical and food applications. *Crit. Rev. Biotechnol.* **2012**, *32*, 289–326.
- Savoia, D. Plant-derived antimicrobial compounds: Alternatives to antibiotics. *Future Microbiol.* 2012, 7, 979–990.
- 18. Zhao, K.; Penttinen, P. The diversity and anti-microbial activity of endophytic Actinomycetes isolated from medicinal plants in Panxi plateau, China. *Curr. Microbiol.* **2011**, *62*, 182–190.
- Nacoulma, A.P.; Compaoré, M. *In vitro* antioxidant and anti-inflammatory activities of extracts from *Nicotiana tabacum* L. (Solanaceae) leafy galls induced by *Rhodococcus fascians*. *J. Phytopathol.* 2012, *160*, 617–621.
- Kueger, S.; Steinhauser, D. High-resolution plant metabolomics: From mass spectral features to metabolites and from whole-cell analysis to subcellular metabolite distributions. *Plant J.* 2012, 70, 39–50.
- Qin, X.; Dai, Y. Metabolic Fingerprinting by ¹HNMR for discrimination of the two species used as *Radix Bupleuri*. *Planta Med.* 2012, 78, 926–933.
- 22. Graham, S.F.; Amigues, E. Application of NMR based metabolomics for mapping metabolite variation in European wheat. *Metabolomics* **2009**, *5*, 302–306.
- Hamm, S.; Lesellier, E. Optimization of headspace solid phase microextraction for gas chromatography/mass spectrometry analysis of widely different volatility and polarity terpenoids in olibanum. J. Chromatogr. A 2003, 1018, 73–83.

- Cui, H.; Zhang, S.T. Gene expression profile analysis of tobacco leaf trichomes. *BMC Plant Biol.* 2011, 11, 76–86.
- 25. Quaglia, M.; Fabrizi, M. Role of pathogen-induced volatiles in the *Nicotiana tabacum-Golovinomyces cichoracearum* interaction. *Plant Physiol. Biochem.* **2012**, *52*, 9–20.
- 26. Huang, J.; Cardoza, Y.J. Differential volatile emissions and salicylic acid levels from tobacco plants in response to different strains of *Pseudomonas syringae*. *Planta* **2003**, *217*, 767–775.
- 27. Seo, S.; Seto, H. A diterpene as an endogenous signal for the activation of defense responses to infection with tobacco mosaic virus and wounding in tobacco. *Plant Cell* **2003**, *15*, 863–873.
- 28. Shah, J. Plants under attack: Systemic signals in defense. Curr. Opin. Plant Biol. 2009, 12, 459-464.
- Wiklund, S.; Johansson, E. Visualization of GC/TOF-MS-based metabolomics data for identification of biochemically interesting compounds using OPLS class models. *Anal. Chem.* 2008, 80, 115–122.
- 30. Choi, Y.H.; Kim, H.K. NMR metabolomics to revisit the tobacco mosaic virus infection in *Nicotiana tabacum* leaves. *J. Nat. Prod.* **2006**, *69*, 742–748.
- 31. Fernie, A.R. The future of metabolic phytochemistry: Larger numbers of metabolites, higher resolution, greater understanding. *Phytochemistry* **2007**, *68*, 2861–2880.
- 32. Peluffo, L.; Lia, V. Metabolic profiles of sunflower genotypes with contrasting response to *Sclerotinia sclerotiorum* infection. *Phytochemistry* **2010**, *71*, 70–80.
- 33. Berger, S.; Sinha, A.K. Plant physiology meets phytopathology: Plant primary metabolism and plant–pathogen interactions. *J. Exp. Bot.* **2007**, *58*, 4019–4026.
- Nouar, H.E.; Vereecke, D. Screening for differential gene expression in *Atropa belladonna* leafy gall induced following *Rhodococcus fascians* infection. *Eur. J. Plant Pathol.* 2003, 109, 327–330.
- Vandeputte, O.; Oukouomi Lowe, Y. The tobacco *Ntann12* gene, encoding an annexin, is induced upon *Rhodococcus fascians* infection and during leafy gall development. *Mol. Plant Pathol.* 2007, 8, 185–194.
- 36. Dixon, R.A. Natural products and plant disease resistance. Nature 2001, 411, 843-847.
- Fiamegos, Y.C.; Kastritis, P.L. Antimicrobial and efflux pump inhibitory activity of caffeoylquinic acids from *Artemisia absinthium* against gram-positive pathogenic bacteria. *PLoS One* 2011, 6, e18127.
- 38. Baraka, H.N.; Khanfar, M.A. Bioactive natural, biocatalytic, and semisynthetic tobacco cembranoids. *Planta Med.* **2011**, *77*, 467–476.
- Rajaonson, S.; Vandeputte, O.M. Virulence quenching with a prenylated isoflavanone renders the Malagasy legume *Dalbergia pervillei* resistant to *Rhodococcus fascians*. *Environ. Microbiol.* 2011, 13, 1236–1252.
- 40. Debeir, O.; Megalizzi, V. Videomicroscopic extraction of specific information on cell proliferation and migration *in vitro*. *Exp. Cell Res.* **2008**, *314*, 2985–2998.
- 41. Bury, M.; Girault, A. Ophiobolin A induces paraptosis-like cell death in human glioblastoma cells by decreasing BKCa channel activity. *Cell Death Dis.* **2013**, *4*, doi:10.1038/cddis.2013.85.

© 2013 by the authors; licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution license (http://creativecommons.org/licenses/by/3.0/).

RÉSULTAT 2

« *In vitro* antioxidant and antiinflammatory activities of *Nicotiana tabacum* L. (Solanaceae) leafy gall extracts induced by *Rhodococcus fascians* » Aminata P. Nacoulma, Moussa Compaoré, Manuella de Lorenzi, Martin Kiendrebeogo

and Odile G. Nacoulma

Journal of Phytopathology, 160 (11-12):617-621 (2012).

Les galles sont largement présentes dans le règne végétal et sont utilisées dans les médecines traditionnelles à travers le monde entier. Les remèdes traditionnels à base de galles, utilisés dans le traitement de pathologies diverses et variées en Chine, en Inde et dans les pays africains, donnent des résultats efficaces. Afin de proposer les galles comme nouvelles sources de composés bioactifs, des investigations phytochimiques et biologiques ont été effectuées sur la galle feuillée du tabac, modèle expérimental reproductible « *in vitro* ».

Les analyses phytochimiques ont permis d'évaluer le taux de composés phénoliques et de flavonoïdes des différents extraits (méthanol/eau ; chloroforme et hexane) de galle feuillée *versus* plante non infectée. Les extraits ont ensuite été investigués pour leurs activités antibactériennes (diamètre d'inhibition de croissance), antioxydantes (anti-radicalaire DPPH, réduction ferrique FRAP) et anti-inflammatoire (inhibition de la lipoxygénase).

Les résultats phytochimiques indiquent, pour les extraits analysés de plante infectée, une augmentation significative des phénoliques totaux (120 à 307 %) dans l'extrait polaire (méthanol/eau) et une diminution nette du taux de flavonoïdes totaux (20 à 42,5 %) dans l'ensemble des échantillons analysés. Ces observations reflètent clairement une altération métabolique dans la plante infectée qui se traduit i) par la production de composés phénoliques connus pour être des composés de défense des plantes, et ii) par une réduction des flavonoïdes qui sont souvent des composés à caractère antibactérien. Une modification du profil phytochimique d'un extrait peut se traduire par une modification conséquente des propriétés biologiques de l'extrait.

L'activité antibactérienne des extraits a été investiguée en utilisant la méthode de mesure des diamètres d'inhibition de croissance bactérienne. Les résultats obtenus ne montrent pas de modification significative de l'activité sur la croissance des souches bactériennes étudiées (Annexe 2). Cette observation pourrait être corrélée avec la réduction du taux de flavonoïdes totaux observée précédemment par les analyses phytochimiques, dont certains composés sont connus pour avoir un caractère antibactérien. Ces observations sont par conséquent en accord avec l'hypothèse de formation d'une niche écologique pour la bactérie au sein de la galle feuillée.

Le caractère antioxydant des extraits de galles feuillées a ensuite été investigué par différentes méthodes. Le pouvoir réducteur des extraits (mesuré par la méthode FRAP), l'activité antiradicalaire (utilisant le radical DPPH) et l'inhibition de l'activité de la lipoxygénase (15-LOX) ont été évalués. Les résultats obtenus montrent que le profil antioxydant de la plante infectée est caractérisé par l'augmentation de l'activité anti-radicalaire de l'extrait chloroformique, l'augmentation du pouvoir réducteur et celle de l'activité inhibitrice de lipoxygénase dans l'extrait polaire. Ces résultats peuvent être corrélés avec les altérations en composés phénoliques évoquées précédemment. Ces composés, connus pour leurs propriétés antioxydantes, interviennent dans les mécanismes généraux de défense des plantes infectées dans le but de protéger l'hôte contre les éventuelles atteintes oxydatives induites lors des infections bactériennes.

D'une manière générale, l'impact de la reprogrammation métabolique sur les modifications des propriétés biologiques de la plante infectée indique que l'interaction entre *R*. *fascians* et *N. tabacum* induit i) une amélioration du profil antioxydant et anti-inflammatoire des extraits de la galle feuillée certainement liée à l'activation d'un mécanisme de défense général de la plante provoquant la synthèse de métabolites secondaires de type phénolique et; ii) une diminution du caractère antibactérien par inhibition de la synthèse des flavonoïdes certainement due au processus d'établissement d'une niche écologique pour la bactérie au sein de la galle.

Cette étude de l'impact de la reprogrammation métabolique induite dans les pathosystèmes végétaux, permet de valider l'utilisation de certaines galles végétales dans les remèdes traditionnels mais aussi de suggérer les « pathosystèmes végétaux » comme sources potentielles de composés bioactifs d'intérêt thérapeutique contre diverses pathologies en médecine moderne. Université Libre de Bruxelles (ULB), Brussels, Belgium

In vitro Antioxidant and Anti-inflammatory Activities of Extracts from *Nicotiana tabacum* L. (Solanaceae) Leafy Galls Induced by *Rhodococcus fascians*

AMINATA P. NACOULMA¹, MOUSSA COMPAORÉ², MANUELLA DE LORENZI¹, MARTIN KIENDREBEOGO² and ODILE G. NACOULMA² Authors' addresses: ¹Laboratory of Toxicology, Institute of Pharmacy, Université Libre de Bruxelles (ULB), Boulevard du Triomphe, B-1050, Brussels, Belgium; ²Laboratoire de Biochimie et de Chimie Appliquées, UFR/SVT, Université de Ouagadougou Boulevard Charles de Gaulle, 09 BP 848, Ouagadougou 09, Burkina Faso (correspondence to Aminata P. Nacoulma. E-mail: anacoulm@ulb.ac.be)

Received April 19, 2012; accepted June 26, 2012

Keywords: Nicotiana tabacum, Rhodococcus fascians, leafy galls, anti-inflammatory activity, antioxidant capacity

Abstract

Plant galls are widely distributed, and their extracts are used in traditional medicine worldwide. Traditional remedies containing extracts of plant galls in China, India and some African countries have effective in the treatment of various pathologies. To open a new promising procedure for screening bioactive compounds from plant galls, standardized plant materials were generated in vitro and used for phytochemical and biological investigations. Methanol aqueous chloroform and hexane extracts of Nicotiana tabacum leafy galls induced by Rhodococcus fascians were used to evaluate phenolic and flavonoid contents, and to investigate antioxidant activity by 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl radical scavenging and ferric reducing antioxidant/power assays and anti-inflammatory activity by the lipoxygenase inhibition assay. Infection by R. fascians modifies significantly the phytochemical profile of N. tabacum as well as its biological properties. The total polyphenolic content was increased (120-307%), and that of flavonoids was reduced (20-42.5%). Consequently, antioxidant and antiinflammatory activities of non-infected tobacco extracts are significantly modified compared to plants treated with leafy gall extracts. This shows that infection by R. fascians favoured the production of anti-inflammatory and antioxidant compounds in N. tabacum. The study indicates the benefit of plant galls used in traditional medicines against various pathologies.

Introduction

Plant galls are abnormal growths of various shapes growing in tissues of plant organs. The gall is a tumour formed by plant in response to external aggression (micro-organisms and insects) (Agrios 2009). The interaction involves a chemical communication between host and the pathogen in the case of micro-organisms. Modifications observed in the host

are specific to the causative agent, which through its genetic heritage is responsible for the composition of metabolites, anatomy and morphology of galls formed (Goethals et al. 2001). In general, galls have many functions but may simply be a niche to protect and ensure the survival of the inducing species (Hayward and Stone 2005; Bailey et al. 2009). Plant galls have always been used by humans in various fields. In Europe, the galls of oak leaves (Quercus robur, Q. petraea and Q. pubescens) caused by the wasp Andricus kollari were used for their high concentration in tannins and especially used to prepare a high-quality black ink obtained by mixing gall powder with iron sulphate and sap of cherry (Burgaud et al. 2010). In modern therapy, they are used in medicine for their astringent activity for antidiarrhoeal or haemostatic preparations. The galls are also of particular use in traditional medicine in China and some African countries. In Burkina Faso, for example, Guiera senegalensis galls were used in the treatment of pox, measles and avian pox (Lamien et al. 2005), and Balanites aegyptiaca (L.) galls were then used to treat sickle cell disease, whooping cough and brucellosis in cattle (Meda et al. 2010). In traditional medicine, gall extracts are commonly used for many of their pharmacological properties (Nacoulma 1996). Chemical composition is greatly dependent on gall inducers (Bailey et al. 2009). These structures are therefore crucial in the search of new molecules for use in therapy of certain diseases such as cancer, diabetes and bacterial infections (Kaur et al. 2004, 2008; Heo et al. 2005). Plant biotechnology offers tools to generate galls in vitro by infection of plants with bacteria that can induce plant tumour (Barash and Manulis-Sasson 2009). In this study, we used the leafy galls produced in vitro after the interaction between the phytopathogenic bacterium Rhodococcus fascians and Nicotiana tabacum (L.) as an experimental standardized model

and a reproducible source of therapeutic molecules. R. fascians is a Gram-positive bacteria belonging to the Actinomycetes order causing leafy galls in infected plants (Crespi et al. 1992). The virulence of the bacteria was related to the presence of plasmid genes controlling the synthesis of 'cytokinin-like' substances (Temmerman et al. 2000; Maes et al. 2001) and chromosomal genes responsible for the synthesis of auxins (Vandeputte et al. 2005). Leafy gall formation is therefore the result of a process that begins with an interaction which induces an alteration in apical dominance and activation of axillary meristem proliferation to form multiple buds at the site of infection (de Oliveira-Manes et al. 2001; Simón-Mateo et al. 2006). When the gall is formed, meristematic activity continues, but apical dominance is restored (Vereecke et al. 2000). Infected plant and gall observations showed that Rhodococcus/plant interactions could provide interesting new therapeutic molecules for the treatment of cancer, oxidative stress and inflammatory pathologies. In our study, we screened the impact of infection on biological activities of extracts from infected plants or non-infected plants. Aqueous methanol, chloroform and hexane extracts of leafy gall and non-infected plants were used to evaluate total phenolics and flavonoid contents, antioxidant and anti-inflammatory activities.

Materials and Methods

Chemical material

Folin-Ciocalteu reagent, sodium phosphate monobasic (NaH_2PO_4) , sodium phosphate dibasic (Na_2HPO_4) , 2,2-diphenyl-1aluminium trichloride $(AlCl_3)$ picrylhydrazyl (DPPH), gallic acid, trichloroacetic acid and lipoxygenase were purchased from Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim, Germany. Sodium carbonate, potassium hexacyanoferrate [K₃Fe(CN)₆], ascorbic acid, quercetin and ferric chloride were supplied by Prolabo, Paris, France, and all solvents were analytical grade and were purchased from VWR Belgium. DMSO (dimethyl sulfoxide), Murashige and Skoog medium and linoleic acid were supplied from GIBCO-Invitrogen (Merelbecke, Belgium) or Sigma, Belgium.

Plant material and bacterial infection

Tobacco plants (*Nicotiana tabacum L.*) were aseptically grown from sterile seeds on solid half-MS medium (Murashige and Skoog 1962) supplemented with 3% sucrose, in a growth chamber at 23°C. Four-week-old plants were injured, and apical buds were infected with 10 μ l of *R. fascians* strain D188. The leafy galls were harvested as was the plant material used in our investigation. Leafy galls were crushed and stored at -80°C. Uninfected tobacco plants were harvested after 12 weeks, to be at the same development stage, ground and stored at -80°C for extraction use.

Extraction of plant materials

Non-infected tobacco plants and leafy galls were extracted by maceration (methanol aqueous) and suc-

cessive extractions with increasing polarity of solvents (hexane and chloroform). Crude extracts obtained from the hexane, chloroform and aqueous methanol used for the bioactivity screening were evaporated to dryness and the residues dissolved with DMSO and methanol for antioxidant, anti-inflammatory activities and phytochemical investigations.

Phytochemical investigations

Total polyphenolic content determination

Polyphenolic contents were evaluated using the Folin– Cioccalteu method (Lamien-Meda et al. 2008). Briefly, 100 μ l of extract and 500 μ l of reagent of Folin –Ciocalteu (0.2N) were mixed and incubated for 5 min, following by adding 400 μ l of aqueous sodium carbonate solution (75 g/l). After incubation in the dark, the absorbencies were read at 760 nm (Cecil, 2041, England). Gallic acid (0–200 mg/l) was used as standard to establish the calibration curve (y = 0.0095x, $r^2 = 0.99$), and the results were expressed as mg equivalent of gallic acid per 100 mg (mg GAE/ 100 mg) of extract.

Total flavonoid content determination

Total flavonoid content was estimated using the Dowd method according to the study by Lamien-Meda et al. (2008). A plant extract (500 μ l) was added to 500 μ l of AlCl₃ (2% in methanol). Absorbance was read at 415 nm after 10-min incubation at room temperature. The standard calibration curve (y = 40.23x, $r^2 = 0.99$) was plotted using quercetin (0–50 mg/l), and the results were expressed as mg quercetin equivalent per 100 mg (mgQE/100 mg) of extract.

Biological investigations

Antioxidant capacity

2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) radical scavenging assay: The DPPH radical scavenging activity of extracts was determined as described by Lamien-Meda et al. (2008). Briefly, 750 μ l of sample was added to 1.5 ml of freshly prepared DPPH (20 mg/l in methanol). After 15 min of incubation in the dark at room temperature, the absorbencies were read at 517 nm against a blank sample consisting of 1.5 ml of DPPH solution and 750 μ l of methanol. Ascorbic acid (0–100 μ g/ml) was used to establish the standard curve (y = -0.0036x + 0.41, $r^2 = 0.97$). The results were expressed as μ mol of ascorbic acid equivalent per gram (μ MAAE/g) of extract, and quercetin and gallic acid were used as positive compounds.

Ferric reducing antioxidant/power assay: The ability of the extracts to reduce iron (III) was measured as described by Lamien-Meda et al. (2008). In brief, 500 μ l of plant extract or ascorbic acid (0–100 μ g/ml) was mixed with 1.25 ml of phosphate buffer (0.2 M, pH 6.6) and 1.25 ml of 1% potassium hexacyano-ferrate [K₃Fe(CN)₆] aqueous solution. After 30 min of incubation at 50°C, 1.25 ml of 10% trichloroacetic acid was added and the mixture was centrifuged (ALC

Centrifuge 4206, Maurepas, Cedex, France) for 10 min (201 g). The upper layer of the solution (0.625 ml) was then mixed with 125 μ l of FeCl₃ solution (0.1% in H₂O) and 625 μ l of H₂O. The absorbencies were recorded at 700 nm, and ascorbic acid was used to produce the calibration curve. The iron (III) reducing activity was expressed in μ mol ascorbic acid equivalents per gram (μ molAAE/g) of extract. Quercetin and gallic acid were used as positive control.

Lipoxygenase inhibition activity

The lipoxygenase (LOX) activity was adapted and measured as described previously by Compaoré et al. (2011) in borate buffer (0.2 M, pH 9.00) at 234 nm after addition of 15-LO from Sigma Belgium, by using linoleic acid (134 μ M) as a substrate. The final enzyme concentration was 167 U/ml. Tested substances (final concentration, 100 μ g/ml) were added as DMSO solutions. The enzyme solution was stored on ice, and controls were monitoring for 3 min to ensure that enzyme activity was constant. Quercetin, a well-known inhibitor of 15-LOX, was employed as a positive control. The per cent inhibition of LOX activity was calculated as follows: % inhibition = $(A-B)/A \times 100$, where A = absorbance at 234 nm without a sample and B = absorbance at 234 nm with an extract sample or quercetin.

Statistical analysis

Assays were run in triplicate and data presented as mean value \pm standard deviation from multiple independent tests. The nonparametric analysis methods such as Kruskall–Wallis and Mann–Whitney tests were used in STATISTICA 7 (StatSoft Inc.,Tulsa, OK, USA) to compare and evaluate the significance of differences between samples.

Results

Total phenolic and flavonoid contents

Polyphenol and flavonoid contents of methanol aqueous and chloroform extracts from infected and noninfected *N. tabacum a*re shown in Table 1. Flavonoid content was decreased significantly in *N. tabacum*infected extracts (aqueous methanol or chloroform) compared with non-infected *N. tabacum* extracts (P < 0.05). In contrast, a significant increase was notified in polyphenol contents of *N. tabacum*-infected methanol aqueous extracts (P < 0.05). However, in chloroform extract, polyphenols content was similar in N. *tabacum* infected and non-infected (P > 0.05).

Antioxidant capacity

The antioxidant activity of methanol aqueous, chloroform and hexane extracts of infected (gall) and noninfected N. tabacum were evaluated by their DPPH scavenging activity and iron III reduction power. Infection caused a non-significant increase (P > 0.05)in anti-DPPH compounds from aqueous methanol and hexane (Table 2). In contrast, chloroform extracts showed a significant increase in DPPH scavenging activity (P < 0.05). In the same way, a significant increase in compounds with iron reduction power was observed only in methanol aqueous extract (P < 0.05). Hexane extract showed similar but less antioxidant capacity. This indicates that the R. fascians/N. tabacum interaction improves the antioxidant capacity of N. tabacum and mainly affects secondary metabolism of non-polar antioxidant molecules than polar antioxidants. All extracts were presented a little antioxidant than references compounds.

Lipoxygenase inhibition activity

The anti-inflammatory activity of methanol aqueous and chloroform extracts of *N. tabacum* gall and noninfected plant was evaluated through their lipoxygenase inhibition activity. Data from Table 2 indicate that infection by *R. fascians* improved methanol aqueous extract inhibition of lipoxygenase. Unfortunately, noninfected tobacco chloroform extract activity was decreased. These observations are both statistically significant (P < 0.05). Interestingly, chloroform extract from non-infected plant and quercetin showed a similar lipoxygenase inhibition effect.

Discussion

Polyphenols are known to be the first mechanism of defence of plants, early activated during microorganisms injury (Jacobo-Velazquez et al. 2011). *Rhodococcus fascians* infection induced an increase of c. 120–307% in total phenolic content and a decrease in flavonoid content (20–42.5%). Thus, in previous studies, it was demonstrated that infected *N. tabacum* synthesized some polyphenolic compounds that inhibited *R. fascians* growth (Vereecke et al. 1997). The significant decrease in flavonoid level could be due to their conversion to other compounds such as tannin.

Table 1 Total polyphenolic content of infected and non-infected samples of *Nicotiana tabacum*

Extracts	Phenolic conten	olic contents (mg GAE/100 mg) Flavonoid		ontents (mg QE/100 mg)	
	Infected plants	Non-infected plants	Infected plants	Non-infected plants	
Aqueous/methanol Chloroform	$86.0 \pm 1.7^{*}$ 3.0 ± 0.53	$28.8 \pm 0.59 * \\ 2.62 \pm 0.59$	$8.5 \pm 0.15^*$ $6.3 \pm 0.06^*$	$\begin{array}{c} 20.22 \pm 0.78 * \\ 30.93 \pm 0.52 * \end{array}$	

The results are represented as the mean \pm SD (n = 4).

Mg GAE/100 mg: gallic acid equivalent/100 mg of extract; mgQE/100 mg: quercetin equivalent/100 mg of extract. *P < 0.05.

Extracts	Radical scavenging activity (µmol AAE/g of extract)		Fe ³⁺ reducing of	power (µmol AAE/g extract)	Lipoxygenase inhibition activity (% inhibition) at 100 μ g/ml		
	Infected plants	Non-infected plants	Infected plants	Non-infected plants	Infected plants	Non-infected plants	
Aqueous/methanol	2206 ± 3	2179 ± 10.5	1383 ± 5*	1181 ± 5*	42.35 ± 3.19 *	21.53 ± 1.68*	
Chloroform	$2179 \pm 5^*$	$1104 \pm 5^*$	1176 ± 6	1152 ± 15	$27.66 \pm 0.38*$	$57.39 \pm 0.16*$	
Hexane	893 ± 3	772 ± 4	947 ± 9	953 ± 4	NT	NT	
Gallic acid	$29\ 274\pm 95$		$18\ 783\ \pm\ 180$		NT		
Quercetin	$14\ 345\ \pm\ 17$		$14\ 782\ \pm\ 29$		52.30 ± 0.93		

Table 2									
Antioxidant and lipoxygenase	inhibition ca	pacities of	f infected	and	non-infected	samples	of	Nicotiana	tabacum

The results are represented as the mean \pm SD (n = 3).

AAE/g of extract: ascorbic acid equivalent/g of extract.

NT, non-tested.

*P < 0.05.

Flavonoids are also known to have antimicrobial activities (Cushnie and Lamb 2005); our negative results on some bacteria growth (data not show) are correlated with the decrease in flavonoids content and could suggest that *R. fascians* growth activity was not modulated by flavonoid-related antibacterial defence. However, in *Agrobacterium tumefaciens*-induced plant crown gall, flavonoids played a key role in the establishment and maintenance of plant tumours (Schwalm et al. 2003). In the same way as *A. tumefasciens* infection, auxins were involved in the *R. fascians* interaction symptoms occurred (Stes et al. 2011); metabolic changes observed in flavonoid content could therefore indicate an activation of plant inducible response that tended to block bacteria auxin-mediated effects.

Reactive oxygen species (ROS) are known to play a key role in the origin and the development of human diseases such as cancer, cardiovascular diseases and inflammatory diseases (Reuter et al. 2010) as in plant defences (Liu et al. 2010; Nanda et al. 2010). As antioxidant molecules are able to react with ROS, they are useful in the prevention of cell damaging and related diseases (Fraga et al. 2010). Both antioxidant activities evaluated by DPPH and FRAP assays were involved with the total phenolic content of infected tobacco plant extract. The significant DPPH radical scavenging level suggests an increase of ROS production (c. 101-197%) with reducing abilities (102–117%) in plant infected by R. fascians. A similar observation was found in a previous study with wound vegetable (Fernando Reyes et al. 2007).

Lipoxygenases (LOXs) are a family of key enzymes in the biosynthesis of leukotrienes that have a main role in the physiopathology of inflammation. Inhibition of LOXs is an important target of medical research due to its implication in several pathologies (i. e. cancer, cardiovascular and inflammatory diseases). LOX are known to be sensitive to antioxidants, which inhibit lipid peroxidation. Various natural antioxidant products included phenolic compounds and flavonoids have been described to inhibit LOXs activity. An inhibition of lipoxygenases by antioxidants can be also attained via chelating of its non-haem-bound iron (Lin et al. 2001; Madeswaran et al. 2011) or by reduction of its ferric form (Gutierrez-Lugo et al. 2004), suggesting a competitive, non-competitive or mixed kind of LOX inhibition. Our results elucidate the possible contribution of the ferric reducing power effect of infected tobacco methanol aqueous extract on lipoxygenase inhibitory mechanism. The anti-inflammatory activity of this extract could then be explained by the increase in total phenolic compounds in infected plants. The infected tobacco chloroform extract, which showed a decrease in flavonoids content, could also be correlated to the low inhibition of LOX activity.

Hence, the infection of *N. tabacum* by *R. fascians* might be a valuable source of active compounds for the treatment of antioxidant- and inflammatory-related diseases even if the crude extracts capacity noticed is weaker compared to pure standards used in this study as positive controls (quercetin and gallic acid).

References

- Agrios GN. (2009) *Plant Pathogens and Disease: General Introduction*, 3rd edn. Encyclopedia of Microbiology. p. 613–646.
- Bailey R, Schönrogge K, Cook JM, Melika G, Csóka G, Thuróczy C, Stone GN. (2009) Host niches and defensive extended phenotypes structure parasitoid wasp communities. *PLoS Biol* 7:e1000179.
- Barash I, Manulis-Sasson S. (2009) Recent evolution of bacterial pathogens: the gall-forming *Plantoea agglomerans* case. Ann Rev Phytopathol 47:133–152.
- Burgaud C, Rouchon V, Wattiaux A, Bleton J, Sabot PR. (2010) Determination of the Fe(II)/Fe(III) ratio in iron gall inks by potentiometry: A preliminary study. J Electroanalyt Chem 650: 16–23.
- Compaoré M, Lamien CE, Lamien-Meda A, Vlase L, Kiendrebeogo M, Ionescu C, Nacoulma OG. (2011) Antioxidant activities, Xanthine Oxidase and Lipoxygenase Inhibitory Activities and Phenolics of *Bauhinia rufescens* Lam. (Caesalpiniaceae). *Nat Prod Res* 25:1777–1788.
- Crespi M, Messens E, Caplan A, Van Montagu M, Desomer J. (1992) Fasciation induction by the phytopathogen *Rhodococcus fascians* depends upon a linear plasmid encoding a cytokinin synthase gene. *EMBO J Nature Publishing Group* 11:795.
- Cushnie TPT, Lamb AJ. (2005) Antimicrobial activity of flavonoids. Int J Antimicrobial Agents 26:343–356.
- Fernando Reyes L, Emilio Villarreal J, Cisneros-Zevallos L. (2007) The increase in antioxidant capacity after wounding depends on the type of fruit or vegetable tissue. *Food Chem* **101**:1254–1262.
- Fraga CG, Galleano M, Verstraeten SV, Oteiza PI. (2010) Basic biochemical mechanisms behind the health benefits of polyphenols. *Mol Aspects Medicine* 31:435–445.
- Goethals KD, Vereecke M, Jaziri M, Van Montagu M, Holsters M. (2001) Leafy gall formation by *Rhodococcus fascians*. Ann Rev Phytopathol **39**:27–52.
- Gutierrez-Lugo MT, Deschamps JD, Holman TR, Suarez E, Timmermann BN. (2004) Lipoxygenase inhibition by anadanthoflavone, a new flavonoid from the aerial parts of *Anadenanthera colubrina. Planta Med* **70**:263–265.
- Hayward A, Stone G. (2005) Oak gall wasp communities: evolution and ecology. *Basic Appl Ecol* **6**:435–443.
- Heo J, Park J, Lee J, Kwon TK, Kim S, Chung S, Lee S. (2005) Wisteria floribunda gall extract inhibits cell migration in mouse B16F1 melanoma cells by regulating CD44 expression and GTP-RhoA activity. J Ethnopharmacol 102:10–14.
- Jacobo-Velazquez DA, Martinez-Hernandez GB, Del CRS, Cao CM, Cisneros-Zevallos L. (2011) Plants as biofactories: physiological role of reactive oxygen species on the accumulation of phenolic antioxidants in carrot tissue under wounding and hyperoxia stress. J Agric Food Chem 59:6583–6593.
- Kaur G, Hamid H, Ali A, Alam MS, Athar M. (2004) Antiinflammatory evaluation of alcoholic extract of galls of Quercus infectoria. J Ethnopharmacol 90:285–292.
- Kaur G, Athar M, Alam MS. (2008) *Quercus infectoria* galls possess antioxidant activity and abrogates oxidative stress-induced functional alterations in murine macrophages. *Chem-Biol Inter* 171:272–282.
- Lamien CE, Meda A, Mans J, Romito M, Nacoulma OG, Viljoen GJ. (2005) Inhibition of fowlpox virus by an aqueous acetone extract from galls of *Guiera senegalensis* J. F. Gmel (Combretaceae). J Ethnopharmacol 96:249–253.
- Lamien-Meda A, Lamien CE, Compaoré MMH, Meda NTR, Kiendrebeogo M, Zeba B, Millogo JF, Nacoulma OG. (2008) Polyphenol content and antioxidant activity of fourteen wild edible fruits from Burkina Faso. *Molecules* 13:581–594.
- Lin J, Tsai SH, Lin-Shiau SY. (2001) Antiinflammatory and antitumor effects of flavonoids and flavanoids. *Drugs of the Future* 26:145–157.
- Liu X, Williams CE, Nemacheck JA, Wang H, Subramanyam S, Zheng C, Chen MS. (2010) Reactive oxygen species are involved in plant defense against a gall midge. *Plant Physiol* 152:985–999.
- Madeswaran A, Umamaheswari M, Asokkumar K, Sivashanmugam T, Subhadradevi V, Jagannath P. (2011) In Silico docking studies of lipoxygenase inhibitory activity of commercially available flavonoids. J Computational Methods Mol Design, 1:65–72.
- Maes T, Vereecke D, Ritsema T, Cornelis K, Thu HN, Montagu MV, Holsters M, Goethals K. (2001) The ATT locus of *Rhodococ*cus fascians strain D188 is essential for full virulence on tobacco

through the production of an autoregulatory compound. *Mol Microbiol* **42**:13–28.

- Meda RNT, Meda A, Kiendrebeogo M, Lamien CE, Millogo-Rasolodimby J, Nacoulma OG. (2010) In vitro antioxidant, xanthine oxidase and acetylcholinesterase inhibitory activity of *Balanites aegyptiaca* (L.). *Pakistan J Biol Sci* 13:362–368.
- Murashige T, Skoog F. (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco cultures. *Physiol Plant* 15:473–497.
- Nacoulma OG. (1996). Plantes Médicinales et Pratiques Médicales Traditionnelles au Burkina-Faso: Cas du Plateau Central. Ouagadougou, Burkina Faso, University of Ouagadougou, PhD Thesis.
- Nanda AK, Andrio E, Marino D, Pauly N, Dunand C. (2010) Reactive oxygen species during plant-microorganism early interactions. *J Integr Plant Biol* 52:195–204.
- de Oliveira-Manes C, Van Montagu M, Prinsen E, Goethals K, Holsters M. (2001) De novo cortical cell division triggered by the phytopathogen Rhodococcus fascians in tobacco. *Mol Plant-Microbe Interactions* 14:189–195.
- Reuter S, Gupta SC, Chaturvedi MM, Aggarwal BB. (2010) Oxidative stress, inflammation, and cancer: How are they linked? *Free Radical Biol Medicine* **49**:1603–1616.
- Schwalm K, Aloni R, Langhans M, Heller W, Stich S, Ullric CI. (2003) Flavonoid-related regulation of auxin accumulation in *Agrobacterium tumefaciens*-induced plant tumor. *Planta* 218:163–178.
- Simón-Mateo C, Depuydt S, De Oliveira-Manes C, Cnudde F, Holsters M, Goethals K, Vereecke D. (2006) The phytopathogen *Rhodococcus fascians* breaks apical dominance and activates axillary meristems by inducing plant genes involved in hormone metabolism. *Mol Plant pathol* 7:103–112.
- Stes E, Vandeputte OM, El Jaziri M, Holsters M, Vereecke DA. (2011) Successful Bacterial Coup d'État: How *Rhodococcus fascians* redirects plant development. *Ann Rev Phytopathol* **49**:69–86.
- Temmerman WI, Vereecke D, Dreesen R, Montagu MV, Holsters M, Goethals K. (2000) Leafy gall formation is controlled by fasR, an AraC-Type Regulatory Gene in *Rhodococcus fascians*. J Bacteriol 182:5832–5840.
- Vandeputte O, Oden S, Mol A, Vereecke D, Goethals K, El Jaziri M, Prinsen E. (2005) Biosynthesis of auxin by the Gram-positive phytopathogen *Rhodococcus fascians* is controlled by compounds specific to infected plant tissues. *Appl Environ Microbiol* **71**:1169–1177.
- Vereecke D, Messens E, Klarskov K, De Bruyn A, Van Montagu M, Goethals K. (1997) Patterns of phenolic compounds in leafy galls of tobacco. *Planta* 201:342–348.
- Vereecke D, Burssens S, Simo C. (2000) The *Rhodococcus fascians*plant interaction: morphological traits and biotechnological applications. *Planta* **210**(32):241–251.

RÉSULTAT 3

« Potent antiproliferative cembrenoids accumulate in tobacco upon infection with *Rhodococcus fascians* and trigger unusual microtubule dynamics in human glioblastoma cells»

Aminata P. Nacoulma, Véronique Megalizzi, Laurent R. Pottier, Manuella De lorenzi, SylvianeThoret, Joëlle Dubois,Olivier M. Vandeputte, Pierre Duez, DannyVereecke, Mondher El Jaziri

(PLOS ONE, soumis)

Nacoulma et al., 2013b

Lorsque des plantes interagissent avec des phytopathogènes tels que l'Actinomycète R. fascians, leur développement morphogénétique est modifié (formation d'une hyperplasie nommée galle feuillée) et, le métabolisme des tissus hyperplasiques résultants diffère significativement de celui des plantes non-infectées. Cependant, bien que les biotransformations bactériennes soient utilisées en développement de molécules bioactives, à notre connaissance, de telles hyperplasies ne sont pas systématiquement étudiées pour la recherche de composés pharmacologiquement actifs. Nos travaux sur l'analyse de divers extraits d'hyperplasies du tabac induites par *R. fascians* ont fourni une sous-fraction (F3.1.1) qui inhibe la prolifération de cellules de glioblastome U373 avec une IC₅₀ de 4,5 μ g/mL contrairement à la fraction F2.3 (IC₅₀ de 2,4 µg/mL) qui perd son activité suite au sous-fractionnement. En utilisant la vidéomicroscopie combinée à la cytométrie de flux et à l'immunofluorescence, nous avons montré que la fraction F3.1.1 augmente la durée de la division cellulaire et cause des déformations morphologiques du noyau ainsi qu'une augmentation de la taille des cellules U373. À de plus hautes concentrations (10 et 50 µg/mL) on observe une polyploïdie et une légère apoptose. Une analyse plus approfondie de cette fraction F3.1.1 par chromatographie gazeuse couplée à la spectrométrie de masse a permis de montrer qu'il s'agit d'un mélange d'isomères de la famille des cembrènoïdes. Bien que les molécules de cette famille soient connues pour leur activité antiproliférative, nous avons pu montrer, en utilisant la F3.1.1 et le cembrène, seul composé commercialisé de cette famille, que cette inhibition de la prolifération cellulaire était liée à un effet original qui porte sur la dynamique des microtubules. De plus, nous avons montré que les anomalies cellulaires induites par F3.1.1 sont causées par une désorganisation bien particulière du cytosquelette avec la présence simultanée, au sein de la même cellule de microtubules fragmentés et d'agrégats de

microtubules fortement organisés, différente de celle provoquée par la colchicine, le paclitaxel, des mélanges en différentes proportions de ces deux composés, ou encore par une molécule hybride, le colchitaxel. Nos résultats indiquent, dans leur ensemble, que les cembrènoïdes de F3.1.1 ont un mode d'action unique et sont capables de moduler la dynamique des microtubules et ainsi leur stabilité.

2	with Rhodococcus fascians and trigger unusual microtubule dynamics in
3	human glioblastoma cells
4	
5	Aminata P. Nacoulma ¹ , Veronique Megalizzi ^{1,*} , Laurent R. Pottier ² , Manuella De lorenzi ¹ ,
6	SylvianeThoret ³ , Joëlle Dubois ³ ,Olivier M. Vandeputte ⁴ , Pierre Duez ² , DannyVereecke ⁵ ,
7	Mondher El Jaziri ⁴
8	
9	¹ Laboratoire de Toxicologie, Faculté de Pharmacie, Université Libre de Bruxelles, CP 205/1, Boulevard du
10	Triomphe, B-1050 Brussels, Belgium
11	² Laboratoire de Pharmacognosie, de Bromatologie et de Nutrition Humaine, Faculté de Pharmacie, Université
12	Libre de Bruxelles, CP 205/9, Boulevard du Triomphe, B-1050 Brussels, Belgium
13	³ ICSN-CNRS-UPR 2301, Avenue de la Terrasse, 91190 Gif-sur-Yvette, France
14	⁴ Laboratoire de Biotechnologie Végétale, Faculté des Sciences, Université Libre de Bruxelles, 12 Rue des
15	Professeurs Jeener et Brachet, B-6041 Gosselies, Belgium
16	⁵ Department of Plant Production, University College Ghent, Ghent University, Valentin Vaerwyckweg 1, 9000
17	Gent, Belgium
18	

Potent antiproliferative cembrenoidsaccumulate in tobacco upon infection

20

When plants interact with particular phytopathogens, such as the Actinomycete Rhodococcus 21 22 fascians, their development is modified and the metabolism of the resulting hyperplastic tissues differs significantly from that of the uninfected plant. However, although bacterial 23 24 biotransformation is often used in drug development, such hyperplasias are apparently not systematically screened for pharmacologically active compounds. Our previous analysis of 25 26 chloroformic extract of leafy galls induced on tobacco by *R. fascians* yielded fraction F3.1.1 which inhibited proliferation of glioblastoma U373 cells with an IC₅₀ of 4.5 μ g/mL. Using 27 28 time-lapse videomicroscopy imaging, combined with flow cytometry and 29 immunofluorescence analysis, F.3.1.1 was shown to increase cell division duration, cause 30 nuclear morphological deformations and cell enlargement, and, at higher concentrations, karyokinesis defects leading to polyploidization and apoptosis. Gas chromatography coupled 31 32 to mass spectrometry revealed that F3.1.1 consisted of a mixture of isomers belonging to the 33 cembrenoids. The cellular defects induced by F3.1.1 were caused by a peculiar cytoskeletal disorganization, with the occurrence of fragmented tubulin and strongly organized 34 microtubule aggregates within the same cell. Colchicine, paclitaxel, and cembrene also 35 affected U373 cell proliferation and karyokinesis, but the induced microtubule rearrangement 36 was very different from that provoked by F3.1.1. Altogether our data indicate that the 37 38 cembrenoid isomers in F3.1.1 have a unique mode of action and are able to simultaneously modulate microtubule polymerization and stability. 39

- 40
- 41

42 Keywords: leafy gall, cembrenoid family, cell division, human cancer lines, polyploidy,
43 microtubule rearrangement

45 Introduction

46

Rhodococcus fascians is a phytopathogenic Actinomycete that incites the 47 48 development of so-called leafy galls (LGs) on a wide range of plant hosts. LG formation results from a reprogramming of plant cell fate and plant morphogenesis, leading to the de 49 50 novo generation of shoot meristems and the activation of existing dormant shoot meristems, respectively (for a recent review see Stes et al., 2011). Although, a LG consequently 51 52 originates from the abundant proliferation of adventitious shoots, intriguingly, their further 53 development is arrested soon after they are formed, unless the bacteria are killed [1].LG are viewed as the ecological niche of *R. fascians* [2] and as plant structures where metabolism is 54 55 modified to contribute to symptom development [1]. Phytohormones, mainly cytokinins but 56 also auxins, produced by *R. fascians* are at the basis of symptom induction on the host plants, but the reason for the subsequent developmental blockage is currently unknown. LG can 57 therefore be viewed as chemical interfaces where cell cycle activating and inhibiting 58 59 compounds are produced.

Here, based on the knowledge that the hormone composition, but also the primary and 60 secondary metabolism of the plant changes during LG development [1], we have previously 61 demonstrated that particular LG-specific compounds might have a biological activities 62 including antioxidant and anti-inflammatory [3]. LG tissues can also constitute a source of 63 64 anti-tumoral compounds to reduce proliferation activity of human cancer cell lines[submitted]. The detected antiproliferative activity was investigated by analyzing the cell 65 cycle duration, the cell growth, the ploidy levels, the occurrence of apoptosis, and the 66 organization of the cytoskeleton. We identified the chemical nature of bioactive compounds 67 that belongs to cembrenoid type diterpenes and compared their activity to that of cembrene a 68 commercially available and structurally related compound. Moreover, active compounds 69

showed marked effects on cytoskeletal architecture, where tubulin network is particularly altered. Cembrenoid structures might constitute a potential alternative for further development of new anti-tubulin drugs. Our results are discussed in the context of putative advances in anti-cancer therapeutics research.

74

75 **Results and discussion**

76

LG tissues contain potent compounds that affect the proliferation of different human
 cancer cell lines.

79

80 The occurrence of antiproliferative activity in LGs and NIPs was previously assessed 81 (submitted), and in our results mainly the chloroformic extract of LGs exhibited a distinct 82 antiproliferative activity against all tested cell lines. A bio-guided fractionation of active sub-83 fraction of this crude chloroformic extract yielding to crystallized fraction F3.1.1 (7 mg), 84 which proved to have an IC₅₀ value of $4.5 \pm 0.3 \mu g/mL$ (Figure 1).



Figure 1: Crude chloroformic extract and sub-fraction F3.1.1. of *N. tabacum* (leafy galls (LG)
and non-infected plants (NIP)) with antiproliferative activity against the glioblastoma U373

cell growth. Cells were treated for 72 h with increasing concentrations of the crude chloroformic extract. The data are represented as the mean \pm SEM (n = 6).

90

91

92 The antiproliferative activity of F3.1.1 is caused by its cytostatic effect increasing the 93 cell division duration.

94

95 To get insight into its mode of action, control and F3.1.1-treated (4 μ g/mL \approx IC₅₀) U373 cells 96 were imaged by videomicroscopy at different time points over a period of 72 h (Figure 2a), permitting the extraction of information on several aspects of cell division [4, 5]. As shown in 97 98 Figure 2b, the cell proliferation rate, measured as cell global growth, increased steadily with 99 time, but, compared to the controls, that of F3.1.1-treated cells was 20 % lower after 24 h and 48 h, and 25 % lower after 72 h. Because dividing cells can easily be distinguished from non-100 101 dividing ones by their bright and round appearance (Figure 2a), it is possible to deduce the 102 cell division duration from the *in vitro* cell imaging [4, 5]. As shown in Figure 2c, the 103 average duration of a cell division over a period of 72 h of F3.1.1-treated cells was 9 min longer than that of control cells. Together these observations confirm the antiproliferative 104 activity of fraction F3.1.1 on U373 cells and indicate that it has a cytostatic effect, although it 105 106 cannot be ruled out that F3.1.1 also exhibits some cytotoxicity.

107 Next, the impact of F3.1.1 at 4 μ g/mL on the cell cycle of U373 cells was analyzed 108 further by flow cytometry. After 24 h of growth, no differences were observed between 109 F3.1.1-treated and control cells (Figure S1a). However, after 48 h of growth, compared to the 110 control, the proportion of cells in the G2/M phase was 10 % higher in F3.1.1-treated cultures 111 (Figure 2d) and after 72 h, 60 % of the F3.1.1-treated cells were in the G0/G1 phase, 112 compared to only 45 % of the control cells (Figure 2e). Altogether, these data indicate that F3.1.1 hampers or retards the progression of the U373 cell population through the cell cycle,
which supports the observed increase in cell division duration (Figure 2c).

Finally, to establish whether F3.1.1 functions cytostatic rather than cytotoxic, cell 115 116 apoptosis was evaluated. Therefore, U373 cells were treated with 4-IBP, a known inducer of apoptosis, or with $4 \mu g/mL$ F3.1.1 for 72 h and then the cell cycle phase distribution was 117 118 analyzed by flow cytometry (see Methods). No pre-G1 population, indicative for apoptosis, was detected in F3.1.1-treated cells after 72 h, whereas 19 % of the 4-IBP-treated cells were 119 120 in this phase (Figure S1b). This observation clearly shows that at $4 \mu g/mL$ F3.1.1 has a 121 cytostatic and no cytotoxic effect on U373 cells. When the concentration of F3.1.1 was increased to 10 μ g/mL ($\approx 2 \times$ IC₅₀), its antiproliferative activity was already clear after 12 h 122 123 of growth, no increase in cell proliferation was recorded with time, and the global growth rate 124 after 48 h was 80 % lower than that of the control (Figure 2f). However, with increasing concentrations, F3.1.1 also affected the ploidy level of the U373 cells. Already after 12 h of 125 growth with 10 µg/mL of F3.1.1, the fraction of polyploid cells doubled compared to the 126 127 control and upon incubation with 50 μ g/mL ($\approx 10 \times IC_{50}$), this even increased to 31 % (Figures 2g and S2). Moreover, flow cytometric quantification of the proportion of cells in 128 129 the pre-G1 phase showed that whereas 10 µg/mL of F3.1.1 did not cause apoptosis, a concentration of 50 µg/mL did exhibit some level of cytotoxicity (Figures 2g and S2). 130



131

Figure 2: Analysis of cell division-related processes in control (Ct) and F3.1.1-treated U373 cells. Treatments with F3.1.1 were done at 4 μ g/mL in a-e. (a) *In vitro* cell imaging by video microscopy after 24 h, 48 h and 72 h of growth. (b) *In vitro* cell global growth following 24 h, 48 h and 72 h of culture. The represented data are the mean ± SEM (n = 6). (c) Cell

division duration over a time period of 72 h of growth in control (Ct) and treated cells (F.3.1.1). (d, e) Cell proportion in the different cell cycle phases at 48 h (d) and 72 h (e) for control (Ct) and F3.1.1-treated cells. The represented data are the mean \pm SD (n = 3). (f) *In vitro* cell global growth at 12 h, 24 h, and 48 h of incubation with 10 µg/mL F3.1.1. The data represented are the mean \pm SD (n = 3). (g) The occurrence of apoptopic cells (pre-G1 phase) and polyploid cells after 12 h of growth on 10 µg/mL or 50 µg/mL of F3.1.1. The represented data are the mean \pm SD (n = 4).

143

144 Fraction F3.1.1 contains a mixture of diterpenes belonging to the cembrenoid family.

145

146 To elucidate the identity of the bioactive compound, fraction F3.1.1 was submitted to GC-MS and ¹H NMR analysis. The GC chromatogram revealed that F3.1.1 consisted of a mixture of 147 compounds with different retention times (Figure 3a). Unexpectedly, the mass spectra 148 149 recorded for each of the peaks in the spectrum was almost identical, albeit that the relative 150 abundance of the mass signals slightly differed for each compound (Table S1). Typically, such GC-MS results indicate that the compounds in F3.1.1 are closely related isomers, 151 explaining the spontaneous crystallization observed in fraction F3.1 (Figure 1a). Moreover, 152 exploratory GC-MS analyses of total chloroformic LG and NIP extracts under particular 153 chromatographic conditions revealed that LGs were highly enriched in diterpenoids (our 154 155 unpublished data). Based on these data we postulated that the compounds in F3.1.1 could be macrocyclic diterpenes of the cembrenoid family [6-9]. 156



Figure 3: GC-MS analysis of fraction F3.1.1. (a) GC chromatogram of fraction F3.1.1. (b)Mass spectrum of the peak eluted at 68.43 min.

160

157

Indeed, cautious examination of the fragmentation pattern of the peak at retention time 68.43 min (Figure 3b) and comparison with those of cembrene, incensole and incensoleoxide (Table S2; Figure 4a), suggested that it belonged to the incensole family. Analysis of its principal mass fragmentation pattern combined with the predicted presence of a double bond at δ 5.35 ppm by ¹H NMR of the F3.1.1 mixture (data not shown), allowed the proposition of its putative structure (designated structure **1**; Figure 4b). The high similarity in the fragmentation patterns for all the compounds in fraction F.3.1.1 (Table S1), implies that they are close isomers of structure **1** that only differ from each other in the position of the double bond or in the allocation of the hydroxy groups.

Cembrenoids are commonly found in the plant and animal kingdom [8]. They are 170 known inhibitors of plant growth and fungal spore germination and are reported to have 171 172 insecticide, antimicrobial, antioxidant and anticancer activities [8-10]. In tobacco, cembrenoid biosynthesis is confined to trichome glands [11, 12]. LGs originate from the 173 proliferation of shoots and R. fascians infection also leads to an increased generation of 174 175 trichomes (see illustration in the abstract) [1]. Therefore, the detection of antiproliferative activity in LG tissue might be a consequence of the overrepresentation of biosynthetic 176 tissues. However, it cannot be ruled out that ectopic expression of the cembrenoid 177 biosynthetic pathway occurs upon infection with R. fascians. 178





Figure 4: Chemical structure of known cembrenoids and proposed structure of the compound in F3.1.1. (a) Structure of incensole, incensole oxide and cembrene. (b) Hypothetical structure 1 and three possible routes of its fragmentation. The structure is proposed based on the mass spectrum (EI 70 eV) of the compounds present in F3.1.1.

To test whether the biological activity of F3.1.1 could be attributed to the presence of cembrenoids, the effect of cembrene, the only commercially available cembrenoid, on U373 cells was assessed. First, the IC_{50} of cembrene for cell proliferation was determined by MTT

188 assay means to be $4 \mu g/mL$ (data not shown) and then, based on phase-contrast time-lapse image series, cell proliferation and cell division duration were analyzed in more detail. At the 189 IC₅₀, compared to the control, the proliferation rate of cembrene-treated cells was reduced by 190 191 20 % and 30 % after 24 h and 48 h of growth, respectively (Figure 5a), whereas cells treated with F3.1.1 at its IC₅₀ exhibited 44 % and 30 % lower proliferation rates at these time points 192 (Figure 5b). Deduction of the average cell division duration time showed that compared to 193 194 the control, cembrene prolonged a cell division event by 15 min over a 48 h period of growth 195 (Figure 5c), whereas this was 12 min for F3.1.1 treatment (Figure 5d). Thus, the effects of 196 cembrene and F3.1.1 are largely comparable.





treated U373 cells. Cells were treated with 4 μ g/mL of F3.1.1 or cembrene. (a, b) *In vitro* cell global growth after 24 and 48 h of culture of (a) cembrene- and (b) F3.1.1-treated cells. (c, d) Cell division duration over a time period of 48 h of growth in (c) cembrene- and (d) F.3.1.1treated cells. The data are represented as the mean \pm SD (n = 3).

F3.1.1 affects the tubulin/microtubule dynamics in a very peculiar fashion different from that of colchicine, paclitaxel and cembrene

204

To understand the cause of the cytostatic effect of F3.1.1 at 4 μ g/mL, the cytoskeleton and nuclei of F3.1.1-treated and control U373 cells were visualized *via* immuno-and DAPIstaining, respectively. Although no clear differences were observed in the actin network, F3.1.1treatment did seem to affect cell shape and size (Figure 6a). The latter finding was confirmed by flow cytometry using electronic volume (EV) as a measure. The control cells showed two distinct sub-populations (90 and 150 EV), while the entire population upon treatment with F3.1.1 shifted to the largest cell size (Figure 6b).

212 At 4 μ g/mL, F3.1.1 also affected the nuclear morphology. Whereas control cells had 213 smooth and round or oval nuclei, in F3.1.1-treated cells irregularly shaped nuclei occurred frequently (Figure 6a). Moreover, the occasional observation of nuclei linked by chromatin 214 215 bridges in the treated cells indicated that F3.1.1 might interfere with the dynamics of the 216 mitotic spindle thus affecting karyokinesis and resulting in incomplete cell segregation [13]. Analysis of the videomicroscopy image sequences allows the get information on the different 217 218 steps culminating in cytokinesis, including karyokinesis (Figure S3a). Careful examination of 219 these images of F3.1.1-treated cells clearly demonstrated the occurrence of karyokinesis 220 defects (Figure S3b) and quantification of the karyokinesis duration time revealed that this 221 process was extended by 6.5 min compared to the control (Figure S3c). Altogether these data imply that the tubulin/microtubule organization might be the target of the cembrenoid 222 compounds present in F3.1.1. 223

Therefore, the microtubule network was examined by α/β -tubulin immunostaining. The control cells exhibited a homogenous and rather diffuse staining, but, in the F3.1.1treated cells the immunostaining occurred both in dots and around nuclei in bright foci,

227 signifying the simultaneous occurrence of fragmented tubulin and organized microtubules, respectively, in single cells (Figure 6c). These findings suggest a profound and unique 228 alteration in the tubulin/microtubule dynamics, which explains the cytotoxicity of F3.1.1 at 229 50 µg/mL and the higher proportion of polyploid cells in these treated U373 populations 230 231 (Figure 2g). Indeed, microtubule stability is known to determine cell death after mitotic exit [14, 15]. Accordingly, it is tempting to postulate that the sub-population of F3.1.1-treated 232 cells that cannot form a mitotic spindle because of the disrupted microtubules possibly escape 233 mitosis reconstituting a tri- or tetraploid G1 population, whereas other cells likely remain in 234 235 mitotic arrest leading to an obligatory entry into apoptosis.





Figure 6: Cytological analysis of control (Ct) and F3.1.1-treated U373 cells. All treatments with fraction F3.1.1 were done at 4 μ g/mL for 72 h. (a) F-actin filament immunostaining with phalloidin conjugated to Alexa Fluor 488 (red) and visualization of nuclei with DAPI staining (blue). Arrows indicate irregularly shaped nuclei. (b) Flow cytometry analysis of the cell size distribution of the entire cell population as measured by electronic volume (EV). (c) Cytoskeleton immunostaining for F-actin (red) and with anti- α/β -tubulin antibodies for the microtubule arrangement (green). The scale is the same in all panels (bar = 20 μ m).

244 To get insight into its mechanism of action, the effect of F3.1.1 on the cytology of U373 cells was compared to that of colchicine and paclitaxel, two cytotoxic compounds 245 246 known to alter cell division by inhibiting α/β -tubulin polymerization [15, 16] or by promoting microtubule assembly [15], respectively. Treatment of U373 cells for 24 h with 247 10 μ g/mL of F3.1.1 (\approx 2 x IC₅₀) caused a more pronounced effect on the nuclear morphology 248 than obtained at the IC₅₀. Indeed, a defective karyokinesis was evident not only by the 249 occurrence of nuclei linked by chromatin bridges resulting in polyploid cells, but also of 250 251 nuclei that deteriorated to micronuclei (Figure 7). These nuclear defects were associated with a severe disorganization of the microtubule network, which consisted of both fragmented 252 253 tubulin and densely organized microtubules localized in multiple aggregates dispersed 254 throughout the cell (Figure 7). Colchicine treatment at $2 \times IC_{50}$ for 24 h did not cause any apparent nuclear damage, but a comparable treatment of the U373 cells with paclitaxel 255 resulted in nuclei linked by chromatin bridges, micronuclei and polyploidy, similar to what 256 was observed with the higher F3.1.1 concentrations (Figure 7). Interestingly, the effect of 257 colchicine and paclitaxel treatment on the cytoskeleton was not comparable to that induced 258 259 by F3.1.1. Whereas colchicine caused a complete depolymerization of the microtubules, paclitaxel treatment leads to an extensive tubulin polymerization around the centrosome 260 (Figure 7). Thus, the cytology of F3.1.1-treated U373 cells suggests a combined effect of 261 262 colchicine and paclitaxel, leading simultaneously to the inhibition α/β -tubulin polymerization and the interference with microtubule depolymerization. However, the microtubule 263 arrangement obtained after F3.1.1 treatment also differed significantly from that reported for 264 cells treated with colchitaxel, a synthesized compound coupling colchicine and paclitaxel 265 266 structures, or with mixtures of different concentrations of colchicine and paclitaxel [17]. Thus, based on these data, it seems unlikely that the particular effect caused by F3.1.1 267

treatment results from the fact that it is a mixture of compounds, rather F3.1.1 appears tohave a different mode of action than colchicine and paclitaxel.



270

Figure 7: Tubulin and nuclei visualization in U373 cells treated with F3.1.1 (10 μ g/mL), colchicine (16 nM), paclitaxel (13 nM) or cembrene (8 μ g/mL). In the DAPI panel of the F3.1.1, paclitaxel or cembrene-treated cells, the red arrow indicates a nucleus that is deteriorated to micronuclei, the arrowhead points to two nuclei linked by a chromatin bridge, and the arrow to the nucleus of a polyploid cell. In the panels with the merged pictures, the arrows show the cells that are enlarged in the lower panels. Bar = 20 μ m.

277

Finally, the effect of F3.1.1 was compared to that of cembrene. Recent *in silico* conformational analysis suggested that cembrene could dock both into the paclitaxel and the colchicine binding sites of tubulin, although the predicted affinity for the colchicine binding site was greater [18].Experimental support for this prediction came from *in vitro* tubulin 282 polymerization assays using purified sheep brain tubulin. Because cembrene has a very low solubility (estimated LogP ~ 7 by ALOGPS 2.1), we could only assess its inhibition of 283 tubulin polymerization (ITP) for a maximum concentration of 3.3 µg/mL. Although 284 285 cembrene did not inhibit tubulin polymerization at 0.6 µg/mL, at 3.3 µg/mL its ITP activity was in the same range as that of colchicine,33 % and 40 %, respectively (Table 1). Then, the 286 287 effect of cembrene treatment at $8 \mu g/mL$, $(2 \times IC_{50})$ for a 24 h-period on U373 cells was analyzed in greater detail. Unlike colchicine, but similar to paclitaxel and F3.1.1, the 288 289 cembrene-treated cells showed nuclei linked by chromatin bridges leading to polyploidy(Figure 7). Moreover, cembrene treatment prolonged the karyokinesis duration 290 291 time by 3 min compared to control cells (Figure S3c). Just like F3.1.1, cembrene did not 292 affect the actin network (Figure S4), but it did modify the cell shape (Figure 7). Although cembrene caused fragmentation of the microtubule network, comparable to that observed 293 with colchicine, it did not provoke localized microtubule aggregations as obtained by F3.1.1 294 295 treatment (Figure 7).

Compounds	Tested concentrations (µg/mL)	ITP activity (%)
Cembrene	0.6 3.3	0 33
Colchicine	0.6 3.3 6.6	25 40 66
Paclitaxel	5.7	0

Table 1: Inhibition of Tubulin Polymerization (ITP) assay with cembrene, colchicine and paclitaxel.

296

297

Altogether, these results indicate that although F3.1.1, colchicine, paclitaxel and cembrene have partially overlapping effects on the behavior of U373 cells, importantly, the 300 simultaneous occurrence in a single cell of fragmented microtubules and aggregates of 301 polymerized tubulin seems to be specific for F3.1.1. Thus, F3.1.1 apparently combines the 302 activities of a depolymerizing and a stabilizing agent into a single molecule. We speculate 303 that this particular effect of F3.1.1 results from its equal affinity for both the colchicine and 304 the paclitaxel binding sites of tubulin.

305

306 Concluding remarks

307

308 The importance of microtubules in cell division but also in organelle transport, cell shape maintenance and motility, make them important targets for cancer drugs. For instance, agents 309 310 that affect microtubule depolymerization, such as taxoids (paclitaxel and docetaxel), are 311 currently used with positive results in ovarian, breast and non-small cell lung cancer therapies [19]. However, the development of resistance in tumors to tubulin-binding agents, such as 312 313 paclitaxel, caused by mutations in β -tubulin is one of the most significant obstacles for successful treatment[20]. Therefore, the identification of new molecules, such as the 314 315 cembrenoids in fraction F3.1.1, that target the microtubule dynamics by a different mechanism could provide a better understanding of the molecular basis of resistance to 316 tubulin-binding agents and importantly, may contribute to the improvement of therapies 317 318 targeting microtubule organization.

The unique features of the LG cembrenoids and their peculiar mode of action on the tubulin/microtubule dynamics illustrate that plant pathologies are worth exploring for novel potential anti-cancer agents.

323 Methods

324

325 Plant material and bacterial infection

326

The growth conditions for *R. fascians* strain D188 and tobacco plants (*Nicotiana tabacum L.* cv. Petit Havana), as well as the infection procedure of 4-week-old *in vitro* tobacco plantlets were done as described by Rajaonson *et al.* (2011)[21].Developed leafy galls (LG) were harvested eight weeks after infection; non-infected plants (NIPs) after twelve weeks of growth.

332

333 Extraction of plant material

334

335 The chloroformic dry crude extract (2320 mg), obtained from 1.03 kg of LG material, was subjected to two successive automated flash chromatography systems (CombiFlash® Rf 200 336 psi from Teledyne isco®, Lincoln, USA). The column was filled with a normal phase silica 337 338 gel (4 g silica RediSep® Rf columns from Teledyne isco®, Lincoln, USA) using a binary gradient mobile phase composed of dichloromethane:methanol (from 0 % to 40 % of 339 methanol) at a flow rate of 15 mL/min and a second mobile phase composed of 340 dichloromethane:methanol (from 10 % to 30 % methanol) at a flow rate of 10 mL/min and 341 flash chromatography are performed to give sub-fractions among which sub-fraction F3.1 is 342 343 crystallized in methanol at 4 °C giving 7 mg of sub-fraction F3.1.1.

344

345

346

347

349 Established cell lines

350

The human U373 (ATCC code HTB-17) glioblastoma cancer cell line were obtained from the American Type Culture Collection (ATCC; Manassas, VA, USA) and maintained in our laboratory as described previously[4]

354

355 Samples preparation for proliferation bioassay

356

357 For proliferation bioassay, LG and NIP extracts as well as the chromatographic fractions were dissolved at a concentration of 1 mg/ml in DMSO and adjusted to 10% DMSO (v/v) 358 359 with culture medium before to be subjected to proliferation inhibition assay at appropriate 360 concentrations of the tested samples. The final concentration of DMSO in the cell cultures was 1% (v/v). For the control treatment, DMSO 1% (v/v) was used. All tested cancer cell 361 lines have been previously cultured in medium supplemented with DMSO 5% (v/v, final 362 363 concentration) without any modifications in their growth levels when compared to cells cultured in DMSO-free medium (data not shown). 364

365

366 Cell proliferation bioassay

367

The colorimetric MTT viability assay (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5 diphenyltetrazolium bromide; Sigma, Belgium) was used to determine the overall growth level of each cell line at 72 h as described previously[22](n = 6 for each concentration).

371

372

- 374 Video microscopy
- 375

A phase-contrast video microscopy analysis was performed as previously described. [4].

- 378 Determination of global growth rate and cell division duration
- 379

Based on the image sequences acquired *via* videomicroscopy from control and treated cell cultures after 24, 48 or 72 h of growth, the global growth rate was calculated between the number of cells in the last and first frame of the image sequences. All cell counts were done in triplicate or sextuplicate using an interactive computer tool [4]

The same set of images was used to evaluate the cell division duration. With a custom division detector developed to measure the duration of cellular divisions over a 48 h or 72 h period. Therefore, global cell counts on different images extracted from time-lapse sequences and which provided the number of cell division that had occurred after a time-period in the different treatments [4]. All experiments were performed in triplicate or sextuplicate.

389

Flow cytometric analysis of the cell cycle phases distribution and cell size distribution in
 U373 cell cultures

392

Cells were washed in phosphate-buffered saline (PBS) and fixed in cold ethanol 70% (v/v) in PBS for at least 24 h at -20 °C. Fixed cells were washed with PBS and stained with a PBS solution containing propidium iodine (PI) (50 μ g/mL) and RNAse (1 mg/mL) for 30 min, in the dark at 37 °C. Subsequently, the cells were incubated at 4° C and the DNA content was analyzed through a Cell Lab Quanta SC flow cytometer (Beckman Coulter, USA)[22].For each condition analyzed, 10 000 cells were counted. All experiments were performed in triplicate or quadruplicate.

400 Analyses of cytoskeleton organization and nuclear morphology

401

To display the cytoskeleton organization and the nuclear morphology, treated and control 402 403 U373 cells were fixed 20 min with formaldehyde 4 % (pH 7.6) on coverslips and 404 immunostained: 2 h with anti- α/β -tubulin antibodies (Santa Cruz Biotechnology, at dilution 1/50), followed by 1 h incubation with a secondary antibody conjugated to the Alexa Fluor 405 406 594 fluorochrome, then 1 h with fluorescent phalloïdin conjugated to the Alexa Fluor 488 407 fluorochrome (Molecular Probes, Invitrogen), and finally with DAPI, visualizing respectively 408 tubulin, actin, and DNA (nuclei). The coverslips were then mounted on microscope slides 409 with 20 µL polyvinyl alcohol mounting medium containing DABCO®, an antifading agent (Fluka, Sigma-Aldrich, USA). Three coverslips per experimental condition were analyzed 410 and three pictures were taken for each coverslip (with the same exposure time) using an 411 412 AxioCamHRm fluorescent microscope (Zeiss, Germany).

413

414 GC-MS analysis

415

416 GC-MS analyses were performed on a Thermo ITQ900 (Thermo Fisher Scientific Inc©, USA) mass spectrometer equipped with an electron-impact (EI) source used at 70 eV in the 417 scan range m/z 29–400. The chromatography was done on a Rxi-5 Sil MS capillary column 418 419 (Restek Corporation, USA) with helium as carrier gas at a column head pressure of 10 psi. The sample was introduced into the capillary column by splitless injection (2 µL of sample at 420 50 µg/mL, 1 min). The injector temperature was set to 250 °C and the gradient temperature 421 scheme was as follows: 40 °C for 1 min, 9 °C/min increase rate up to 130 °C, and 2 °C/min 422 increase rate up to 230 °C. The temperatures of the transfer line and the source were 250 °C 423 and 150 °C, respectively. 424

426

Tubulin polymerization inhibition assay

427

To measure the effect of cembrene, colchicine and paclitaxel on the tubulin assembly rate, 428 appropriate quantities of the compounds were dissolved in DMSO and 1 µL thereof was 429 430 added to 150 µL-aliquots of the tubulin solution heated to 37 °C as previously described [23]. 431 432 **Statistical analysis** 433 The data obtained from independent groups were compared by the nonparametric Kruskal-434 435 Wallis test (more than two groups) and subsequently, control and treated conditions were compared using the nonparametric Mann-Whitney test (Statistica 7, StatSoft Inc., USA). For 436 437 the cell global growth where the data are expressed as logarithmic values, graphical data were presented as the mean values \pm SEM (n = 6) or SD (n < 6). 438

440	Author information
441	
442	Corresponding Author
443	*E-mail: <u>vmegaliz@ulb.ac.be</u>
444	
445	Author Contributions
446	A.N. and V.M. performed the major part of the experiments of this study. M.D.L. performed
447	plant material and bacterial infection. L.P. performed structure identification. S.T. and J.D.
448	performed ITP analysis. D.V., M.E.J., A. N., O. M. V. and V.M. co-wrote the paper. M.E.J.,
449	P.D. and V.M. supervised scientific work.
450	
451	Notes
452	The authors declare no competing financial interests.
453	
454	Acknowledgments
455	
456	O.M.V. is a post-doctoral researcher of the F.R.SF.N.R.S. (Fonds de la Recherche
457	Scientifique, Belgium). The authors gratefully thank the Belgian National Fund for Scientific
458	Research (FNRS) (FRFC 2.4.593.09).
459	

- 460 **References**
- 461
- 462 [1] E. Stes, O.M. Vandeputte, M. El Jaziri, M. Holsters and D. Vereecke, "A successful
 463 bacterial coup d'état: How *Rhodococcusfascians* redirects plant development". *Ann. Rev.*464 *Phytopathol*.vol 49, pp. 69-86, 2011.
- 465 [2] L. Forizs, S. Lestrade, A. Mol, J.F. Dierick, C. Gerbaux, B. Diallo, M. El Jaziri, M.
- Baucher and O.M. Vandeputte, "Metabolic shift in the phytopathogen *Rhodococcusfascians*in response to cell-free extract of infected tobacco plant tissues". *Curr. Microbiol.* vol. 58,
 pp. 483-487, 2009.
- 469 [3] A. P. Nacoulma, M. Compaoré, M. de Lorenzi, M. Kiendrebeogo and O. G. Nacoulma,
- 470 "In vitro Antioxidant and Anti-inflammatory Activities of Extracts from Nicotiana tabacum
- 471 L. (Solanaceae) Leafy Galls Induced by *Rhodococcus fascians*", *Journal of Phytopathology*,
- 472 vol. 160, pp.617–621, 2012.
- [4] O. Debeir, V. Megalizzi, N. Warzee, R. Kiss, and C. Decaestecker, "Videomicroscopic
 extraction of specific information on cell proliferation and migration *invitro*". *Exp. Cell Res.*vol. 314, pp. 2985-2998, 2008.
- 476 [5] Megalizzi, V. (2011) Implication des récepteurs sigma et de leurs ligands dans la biologie
- 477 descancers. PhD Thesis, Université Libre de Bruxelles.
- 478 http://theses.ulb.ac.be/ETDdb/collection/available/ULBetd-07042011-
- 479 121707/unrestricted/TheseVMegacorps.pdf.
- 480 [6] S. Hamm, J. Bleton, J. Connan and A. Tchapla, "A chemical investigation by headspace
- 481 SPME and GC-MS of volatile and semi-volatile terpenes in various olibanum samples".
- 482 *Phytochemistry*. vol. 66, pp. 1499–1514, 2005.
- 483 [7] I. Wahlberg and C.R. Enzell, "Tobacco isoprenoids". *Nat. Prod. Rep.*vol. 4, pp. 237-276,
 484 1987.

- [8] H.N. Baraka, M.A. Khanfar, J.C. Williams, E.M. El-Giar and K.A. El Sayed, "Bioactive
 natural, biocatalytic, and semisynthetic tobacco cembranoids". *Planta Med*.vol. 77, pp. 467476, 2011.
- 488 [9] A. Moussaieff, N.A. Shein, J. Tsenter, S. Grigoriadis et al. "Incensole acetate: a novel
- 489 neuroprotective agent isolated from Boswellia carterii. J. Cereb". Blood Flow Metab.vol. 7,

490 pp. 1341-1352, 2008.

- 491 [10] K.L. Lin, P.C. Tsai, C.Y. Hsieh, L.S. Chang and S.R. Lin, "Antimetastatic effect and
- 492 mechanism of ovatodiolide in MDA-MB-231 human breast cancer cells". Chem. Biol.
- 493 Interact. vol. 194, pp. 148-158, 2011.
- 494 [11] Z. Guo, and G.J. Wagner, "Biosynthesis of cembratrienols in cell-free extracts from
 495 trichomes of *Nicotiana tabacum*". *Plant Sci*.vol. 110, pp. 1-10, 1995.
- 496 [12] H. Cui, S.T. Zhang, H.J. Yang, H. Ji, and X.J. Wang "Gene expression profile analysis
 497 of tobacco leaf trichomes". *BMC Plant Biol*.vol. 11, pp. 76-86, 2011.
- 498 [13] C.D. Capo-Chichi, K.Q. Cai, J.R. Testa, A.K. Godwin, and X.X. Xu, "Loss of GATA6
- leads to nuclear deformation and aneuploidy in ovarian cancer". *Mol. Cell Biol*.vol. 29, pp.
 4766–4777, 2009.
- 501 [14] M.E. Bekier, R. Fischbach, J. Lee and W.R. Taylor, "Length of mitotic arrest induced by
- microtubule-stabilizing drugs determines cell death after mitotic exit". *Mol. Cancer Ther.*vol. 8, pp. 1646-54, 2009.
- [15] N. Kwiatkowski, X. Deng, J. Wang, L. Tanet al., "Selective aurora kinase inhibitors
 identified using a taxol-induced checkpoint sensitivity screen". ACS Chem. Biol.vol. 7, pp.
 185-196, 2012.
- [16] R.A. Keates and G.B. Mason, "Inhibition of microtubule polymerization by the tubulincolchicine complex: inhibition of spontaneous assembly". *Can. J. Biochem*.vol. 59, pp. 361370, 1981.

- 510 [17] K. Bombuwala, T. Kinstle, V. Popik, S.O. Uppal, J.B. Olesen, J. Viña and C.A.
- Heckman, "Colchitaxel, a coupled compound made fom microtubule inhibitors colchicine
 and paclitaxel". *Beilstein. J. Org. Chem.*vol. 2, no 13, 2006.
- 513 [18] H.E. Villanueva and W.N. Setzer, "Cembrene diterpernoids: conformational studies and
 514 molecular docking to tubulin". *Rec. Nat. Prod.*vol. 4, pp. 115-123, 2010.
- 515 [19] S.J. Clarke and L.P. Rivory, "Clinical pharmacokinetics of docetaxel". *Clin.*516 *Pharmacokinet*.vol. 36, pp. 99-114, 1999.
- 517 [20] M. Kavallaris, "Microtubules and resistance to tubulin-binding agents". *Nat. Rev.*518 *Cancer* vol. 10, pp. 194-204, 2010.
- 519 [21] S. Rajaonson, O.M. Vandeputte, D. Vereecke, M. Kiendrebeogo, et al., "Virulence
- 520 quenching with a prenylated isoflavanone renders the Malagasy legumeDalbergia pervillei
- resistant to *Rhodococcus fascians*". *Environ. Microbiol*.vol. 13,pp. 1236-52, 2011.
- 522 [22] M. Bury, A. Girault, V. Megalizzi, S. Spiegl-Kreinecker, et al. "Ophiobolin A induces
- 523 paraptosis-like cell death in human glioblastoma cells by decreasing BKCa channel activity".
- 524 *Cell death dis.*4, e; doi:10.1038/cddis.2013.85
- 525 [23] F. Zavala, D. Guenard, J.P. Robin and E. Brown, "Structure-antitubulin activity
- 526 relationship in steganacin congeners and analogues. Inhibition of tubulin polymerization in
- 527 *vitro* by (+/-)-isodeoxypodophyllotoxin". *E.J. Med. Chem.*vol. 23, pp. 546-549, 1980.

529 530 531	
530 531	
531	
532	
533	
534	
535	
536	
537 Associated content (Supplementary of	data)
538	
539	
540 Supporting Information	
541 This material referenced in the manuscript as Figures S1-S4 and Tables S1-S2.	

Potent antiproliferative cembrenoids accumulate in tobacco upon infection with *Rhodococcus fascians* and trigger unusual microtubule dynamics in human glioblastoma cells

Aminata P. Nacoulma¹, Veronique Megalizzi ^{1,*}, Laurent R. Pottier ², Manuella De lorenzi¹, Sylviane Thoret³, Joëlle Dubois ³, Olivier M. Vandeputte⁴, Pierre Duez², Danny Vereecke⁵, Mondher El Jaziri⁴

¹Laboratoire de Toxicologie, Faculté de Pharmacie, Université Libre de Bruxelles, CP 205/1, Boulevard du Triomphe, B-1050 Brussels, Belgium

- ²Laboratoire de Pharmacognosie, de Bromatologie et de Nutrition Humaine, Faculté de Pharmacie, Université Libre de Bruxelles, CP 205/9, Boulevard du Triomphe, B-1050 Brussels, Belgium
- ³ICSN-CNRS-UPR 2301, Avenue de la Terrasse, 91190 Gif-sur-Yvette, France

⁴Laboratoire de Biotechnologie Végétale, Faculté des Sciences, Université Libre de Bruxelles, 12 Rue des Professeurs Jeener et Brachet, B-6041 Gosselies, Belgium

⁵Department of Plant Production, University College Ghent, Ghent University, Valentin Vaerwyckweg 1, 9000 Gent, Belgium



Figure S1: Flow cytometry analysis of the relative cell cycle phase distribution of treated and control U373 cell cultures.

(a) Control (Ct) or treated cells with F3.1.1 at 4 μ g/mL (n = 3); (b) Apoptosis induced in cells treated with 4-IBP at 10 μ M (n = 3).



Figure S2: Flow cytometry analysis of U373 cells treated with higher concentrations of F3.1.1. As compared to control cells (Ct), a complete cell cycle disruption is observed with 10 μ g/mL and 50 μ g/mL of F3.1.1. A concomitant increase in polyploidy is observed in cells treated with 50 μ g/mL of F3.1.1 (overlap of four experiments n = 4).
Table S1: GC/MS analysis of the different peaks in the GC chromatogram of fraction F3.1.1

Retention time (min)								
Mass signals m/z (<i>relative abundance</i>)								
57.70	60.55	63.28	65.91	68.43	71.12	74.44	78.65	
41 (100)	41 (100)	41 (100)	41 (100)	41 (100)	41 (100)	41 (100)	41 (100)	
43 (61)	43 <i>(60)</i>	43 (66)	43 (61)	43 (66)	43 (72)	43 <i>(65)</i>	43 (65)	
57 (70)	57 <i>(</i> 63)	57 (66)	57 (71)	57 (73)	57 (72)	57 (72)	57 (71)	
71 <i>(</i> 65)	71 <i>(</i> 58)	71 <i>(64)</i>	71 <i>(</i> 65)	71 (70)	71 <i>(54)</i>	71 (76)	71 (72)	
85 <i>(46)</i>	85 (41)	85 <i>(45)</i>	85 <i>(49)</i>	85 <i>(52)</i>	85 (27)	85 (57)	85 <i>(55)</i>	
97 <i>(</i> 24)	97 (22)	97 (24)	97 (25)	97 (27)	97 (21)	97 (31)	97 (31)	
111 <i>(20)</i>	111 <i>(16)</i>	111 (20)	111 <i>(19)</i>	111 <i>(</i> 2 <i>1</i>)	113 <i>(12)</i>	111 <i>(</i> 27)	111 <i>(</i> 27)	
125 <i>(12)</i>	125 <i>(12)</i>	125 (13)	125 <i>(14)</i>	125 <i>(13)</i>	127 (10)	125 (17)	125 <i>(16)</i>	
207 (22)	207 (12)	207 (14)	207 (23)	207 (23)	207 (35)	207 (57)	207 <i>(54)</i>	

Table S2: Comparison of mass fragmentation between the F3.1.1 peak at 68.43 min, incensole, incensole oxide and cembrene

Mass signals m/z (<i>relative abundance</i>)							
F3.1.1 Rt (68.43 min)	Incensole ^a	Incensole oxide ^a	Cembrene ^b				
41 (100)	41 (37)	41 (16)	41 <i>(18)</i>				
43 (66)	43 (100)	43 (100)					
57 (73)	55 <i>(35)</i>	55 <i>(19)</i>					
	67 <i>(</i> 25)	67 <i>(12)</i>	67 <i>(24)</i>				
71 <i>(70)</i>	71 <i>(54)</i>	71 <i>(</i> 38)					
85 <i>(52)</i>	81 <i>(</i> 27)	81 <i>(28)</i>	79 (78)				
97 (27)	93 <i>(26)</i>	95 <i>(</i> 26)	91 <i>(100)</i>				
111 <i>(21)</i>	107 <i>(17)</i>	109 <i>(24)</i>	105 <i>(96)</i>				
105 (10)	105 (22)	105(10)	110 (04)				
125(13)	125 (32)	123 (19)	119 (94)				
140 (8)	130 (10)	137 (20)	133(00)				
156 (0)	156 (17)	151 (12)	159 (40)				
207 (23)		209 (6)	201 (54)				
253 (3)			257 (28)				
281 (5)			- (-)				
284 (1)	288 (1)						
308 (2)	306 (7)	321 <i>(4</i>)					
324 (1)							

^adata taken from ¹⁰

^bthe only commercially available cembrenoid



Figure S3: Analysis of videomicroscopic image sequences and karyokinesis duration in control and treated U373 cells.

(a) Triplicate of a representative image sequence of a dividing control cell with the green squares in the thumbnails indicating that part of the sequence that identifies a particular event such as (1) karyokinesis, (2) division with well-defined daughters, and (3) cytokinesis. (b) Two image sequences illustrating karyokinesis defects in cembrenoid-treated cells with the green squares in the thumbnails indicating that part of the sequence that identifies (1) the inability to distinguish cytokinesis, and (2) the inability to distinguish two daughter cells due to asynchronous division. (c) Average cell karyokinesis duration over a time period of 48 h in control (Ct) and treated cells with 4 μ g/mL cembrene or F.3.1.1. The number of cells undergoing karyokinesis is indicated (n). The statistical significance was evaluated as described in Methods.



Figure S4: Actin, tubulin and DNA visualization in U373 cells upon treatment with 8 µg/mL cembrene.

Immunostaining of untreated (Ct) and treated cells (2 x IC₅₀) after 24 h of incubation. Cells on coverslips were fixed and stained with anti- α/β -tubulin antibodies for tubulin (green), followed by phalloidin conjugated to Alexa Fluor 488 for actin (red) and/or with DAPI for DNA (blue). Arrows in the DAPI panel show nuclei linked by chromatin bridges.

DISCUSSION GÉNÉRALE

La plante s'adapte à son environnement en diversifiant son arsenal de métabolites secondaires et en reprogrammant les différentes voies de biosynthèse (Hartmann 2007 ; Aharoni and Galili 2011). Cette modulation métabolique lui assure sa survie dans un biotope en perpétuelle évolution. Ce constat présente un double intérêt, d'une part un intérêt fondamental lié à la compréhension des mécanismes de modulation métabolique et à la découverte de nouveaux composés et, d'autre part, un intérêt appliqué, dans la mesure où ces métabolites secondaires peuvent montrer une activité biologique et, par conséquent, être à l'origine du développement de composés utiles en pharmacie, en agronomie et également pour des problématiques environnementales (Croteau *et al.*, 2000 ; Cragg and Newman 2010). Dans le cadre de cette thèse nous avons focalisé notre attention sur les changements métaboliques qui s'établissent lors d'une interaction biotique entre les plantes et une bactérie phytopathogène, *R. fascians*.

Quel est le dialogue moléculaire établi lors de ce type particulier d'interaction et quelle application potentielle pouvons-nous en faire ?

C'est la question que nous nous sommes posée pour aborder cette intéressante approche d'exploration du métabolisme secondaire chez les végétaux, en particulier chez le pathosystème *tabac- R. fascians* utilisé comme modèle d'étude.

Le simple examen morphologique de la galle feuillée⁶ soulève une multitude de questions et d'observations. Nous avons tenté d'apporter quelques réponses par nos travaux.

- Pourquoi la bactérie n'envahit-elle pas toute la plante, et reste confinée au niveau de la galle feuillée?

A ce jour cette question reste sans réponse. Cependant, il reste plausible que les cellules végétales synthétisent des composés qui inhibent la prolifération bactérienne mais, malgré les différentes expériences entreprises par nous même et par d'autres équipes (Cornelis *et al.*, 2002), nous n'avons pas pu montrer l'existence d'une activité antibactérienne ou bactériostatique au niveau d'un extrait de galle feuillée (Nacoulma *et al.*, 2012). La plante ne semble pas produire des substances de défense antibactérienne. Cela paraît surprenant mais cette observation peut être corrélée avec i) une coopération de la plante à la mise en place de la niche écologique pour la bactérie au sein de la galle (Depuyt *et al.*, 2009) et ii) une non-perception des signaux de la bactérie comme éliciteur déclenchant une réaction de défense spécifique (Stes *et al.*, 2011). De plus, nous pourrions avancer l'hypothèse d'une inhibition de l'expression des gènes de virulence de la bactérie lorsqu'elle est dans la galle feuillée, sans toutefois altérer sa croissance. Des expériences sont actuellement en cours dans le Laboratoire de Biotechnologie Végétale afin de vérifier cette hypothèse.

⁶ Rappelons que la galle feuillée est induite au site de l'infection suite à une perturbation de l'homéostasie hormonale de la plante (Vandeputte *et al.*, 2005 ; Pertry *et al.*, 2010). Il n'y a pas de modification génétique de la plante par la bactérie (Stes *et al.*, 2011).

 Comment expliquer que les bactéries présentes dans la galle feuillée soient incapables de proliférer lorsque la galle est encore attachée à la plante hôte, alors qu'elles le sont dès que la galle feuillée est prélevée de la plante et mise en culture in vitro?

Cette question rejoint la précédente mais avec une information complémentaire qui consiste à postuler qu'un signal provenant de la plante serait responsable de l'inhibition de la prolifération bactérienne. La nature de ce signal reste encore à découvrir.

- Les cellules végétales constituant la galle feuillée sont-elles vivantes et métaboliquement actives?

La réponse est oui, puisque d'une part, une fois récupérées et placées sur un milieu de culture contenant un antibiotique, les bourgeons se développent et forment une plante entière (Jaziri *et al.*, 1997; Vereecke *et al.*, 2000) et, d'autre part, des études au niveau transcriptomique (Depuyt etal. 2009) et métabolomique (Nacoulma *et al.*, 2013a) montrent une activité métabolique lors de l'interaction. Au sein de la galle feuillée les deux organismes (cellule végétale et bactérie) cohabitent ensemble et cela n'est possible que si un équilibre métabolique global est mis en place, ce qui implique un dialogue métabolique concerté entre la cellule végétale et la bactérie. Clairement et en accord avec la littérature (Depuyt *et al.*, 2009 ; Stes *et al.*, 2011), les changements que nous avons observé au niveau du métabolisme primaire ne semblent pas être spécifiques à notre pathosystème, suggérant ainsi un rôle de ces composés dans l'établissement de la niche écologique qui est l'aboutissement de la colonisation recherchée par la bactérie pathogène. D'une manière inattendue, des modifications intéressantes sont observées au niveau des extraits apolaires, particulièrement une accumulation importante de composés diterpéniques

dans l'extrait de la galle feuillée par rapport à l'extrait de plantes non infectées. Cette observation met en évidence une activation des voies du métabolisme secondaire impliquant les diterpènes. De plus, cette altération de la voie de biosynthèse de diterpènes chez la galle feuillée confirme les résultats observés lors de l'analyse génomique (BINGO : Biological Network Gene Ontology) de l'interaction de *R. fascians-A. thaliana* réalisée par Depuyt *et al.*, (2009) dans laquelle ils montrent une activation de certains gènes impliqués dans la voie de biosynthèse de diterpènes, comme les gibbérellines. Bien que le rôle des gibbérellines en tant facteur de croissance chez les végétaux soit bien documenté, il est plausible que d'autres diterpènes soient également synthétisés et accumulés dans la galle feuillée. D'une manière générale, les terpénoides sont des métabolites secondaires connus pour leur rôle dans les mécanismes de défense des plantes contre les stress biotiques/abiotiques et les attaques de micro-organismes (Mazid *et al.*, 2011 ; Ahuja *et al.*, 2012).

- Les cellules végétales répondent-elles à cette invasion bactérienne par la synthèse de métabolites non spécifiques communément rencontrés dans d'autres pathosystèmes (composés phénoliques et flavonoïdes, notamment)? Si oui, ces composés ont-ils une activié biologique de type antioxydante ou anti-inflamatoire? (Reichling 2009; Mandal et al., 2010; Ramar and Ponnampalam 2010)

Nous avons contribué à répondre à cette question dans les Résultats 1 et 2 du présent manuscrit (Nacoulma *et al.*, 2012, Nacoulma *et al.*, 2013a). L'accumulation de substances phénoliques, observée au sein de la galle feuillée, n'est pas surprenante car, déjà en 1997, Vereecke *et al.*, ont montré l'accumulation de composés phénoliques dont un composé particulier, la 7-methyl

esculine, une coumarine qui n'est pas présente dans les tissus non-infectés de tabac.

D'après ces auteurs, ce composé ne montre pas une activité antibactérienne, mais pourrait avoir un rôle sur l'inhibition de la division cellulaire végétale. La reprogrammation métabolique observée suite à l'infection par *R. fascians* a induit des activités biologiques que nous n'observons pas dans les extraits de la plante non infectée. Ces modifications métaboliques permettraient la mise en place de conditions optimales au niveau environnemental (contrôle du niveau oxydatif) et nutritionnel (accumulation de métabolites primaires) au sein de la galle pour l'établissement de la niche écologique de la bactérie.

- Quel est le déterminisme du blocage de la prolifération des cellules végétales observé à maturité de la galle feuillée? Les composés présents dans la galle feuillée de tabac, capables d'affecter la prolifération des cellules végétales, pourraient-ils avoir un effet sur la prolifération de cellules humaines ?

Le Résultat 3 (Nacoulma *et al.*, 2013b) contribue à répondre à cette question par l'étude de l'activité antiproliférative des composés induits sur des lignées cancéreuses humaines. Notre étude de la reprogrammation métabolique du pathosystème tabac-*R. fascians* met en évidence une activation des voies du métabolisme secondaire impliquant notamment les diterpènes du tabac (cembrènoïdes). Cette observation est particulièrement intéressante car l'examen de la littérature nous indique que certains des cembrènoïdes du tabac présentent une activité antiproliférative sur des cellules végétales (Cutler *et al.*, 1977) et des cellules tumorales humaines (Baraka *et al.*, 2011, Lin *et al.*, 2011). Les résultats obtenus dans le cadre de ce travail sur plusieurs lignées cancéreuses humaines sont intéressants et nous avons poursuivi nos investigations par

l'identification du ou des composé(s) impliqué(s) et déterminé, au niveau cellulaire, la cible potentielle de cette activité antiproliférative sur la lignée tumorale U373.

Le fractionnement chromatographique bioguidé nous a permis d'obtenir un co-cristal (fraction F3.1.1) formé de composés diterpéniques de structures chimiques proches des cembrénoïdes de la famille des incensoles. Les résultats de la vidéomicroscopie, combinée à la cytométrie de flux et à l'immunofluorescence, nous ont montré que la fraction F3.1.1 augmente la durée de la division cellulaire, provoque des déformations morphologiques du noyau, une augmentation de la taille des cellules U373 et, à plus haute concentration, une polyploïdie et une légère apoptose.

Bien que les cembrénoïdes, d'une manière générale, soient connus pour leur activité antiproliférative (Baraka *et al.*, 2011 ; Lin *et al.*, 2011), nos résultats indiquent que l'inhibition de la prolifération cellulaire induite par la fraction F3.1.1 implique un effet bien particulier sur la dynamique des microtubules et du cytosquelette, avec la présence simultanée de microtubules fragmentés et d'agrégats cytoplasmiques de microtubules fortement organisés (Nacoulma *et al.*, 2013b). Le réarrangement des microtubules induit par F3.1.1 sur les cellules U373 résulte d'un double effet, i) une inhibition, comme la colchicine, de la polymérisation des α/β -tubulines et, ii) en même temps, et à d'autres endroits d'une même cellule, un effet contraire, une augmentation, comme le paclitaxel, de la polymérisation des α/β -tubulines. Cet effet des cembrènoïdes est absolument unique car une molécule hybride, le colchitaxel, ne provoque pas le même phénotype cytologique. Dans le cas du colchitaxel, l'orientation des microtubules est modifiée et une plus forte polymérisation semble se produire autour du centrosome (Bombuwala *et al.*, 2006).

Pour approfondir et affiner notre connaissance du mécanisme d'action des cembrènoïdes, nous avons réalisé une expérience de docking moléculaire *in silico* et il en ressort que les dérivés type incensole présents dans F3.1.1 (Nacoulma *et al.*, 2013b) se lient aussi bien dans le site de la colchicine que dans celui du paclitaxel, avec toutefois une différence, dans la mesure où le paclitaxel se lie *via* un lien hydrogène unique alors que, pour les dérivés type incensole présents dans F3.1.1, il semble y avoir deux liens hydrogènes (données préliminaires et non publiées). Ces observations sont similaires à celles rapportées par Villanueva and Setzer (2010) qui montrent également, par analyse conformationnelle *in silico*, que le cembrène et l'incensole se lient aux sites colchicine et paclitaxel de la tubuline. L'ensemble de nos données indique que les cembrènoïdes de F3.1.1 ont un mode d'action original et sont capables d'affecter la polymérisation des microtubules et ainsi leur stabilité (Nacoulma *et al.*, 2013b).

CONCLUSION

Ce travail s'inscrit dans une perspective visant à mieux comprendre le rôle central des métabolites secondaires dans la médiation des interactions écologiques entre plantes et bactéries pathogènes. Plus particulièrement, lorsque l'interaction ne conduit pas à la mort des cellules végétales, mais plutôt à l'établissement, au sein des cellules végétales hôtes, d'un environnement propice pour la survie de la bactérie.

L'ensemble des résultats présentés dans ce travail suggèrent que ce type d'interaction qui résulte d'une coévolution entre les organismes partenaires induit des échanges moléculaires mettant en œuvre des processus de reprogrammation morphologique et métabolique extrêmement contrôlés de la part des deux partenaires. Aussi bien le métabolisme primaire que secondaire de la plante sont réajustés dans le pathosystème étudié (*R. fascians*-plante). La littérature sur ce sujet, permet de dresser une succession d'étapes de reprogrammation en fonction des différents stades de l'interaction, allant depuis l'infection (contact entre partenaires) jusqu'à la maturation du symptôme et l'établissement de l'hyperplasie.

Nous avons focalisé notre attention sur les altérations métaboliques lorsque le symptôme est développé et la bactérie confinée dans sa niche ; cela devrait correspondre à un état d'équilibre où les deux partenaires partagent un même « *dialogue métabolique* ». Partant de l'hypothèse, bien vérifiée par ailleurs, que les plantes sont capables de moduler leur métabolisme secondaire en fonction des conditions environnementales (y compris les stress biotiques et abiotiques), les galles végétales pourraient représenter un réservoir de composés naturels nouveaux avec un potentiel d'activités biologiques originales.

C'est l'approche que nous avons abordée dans ce travail de thèse qui a abouti à compléter notre connaissance du changement du profil métabolique et, surtout, à découvrir une activité antiproliférative avec un mécanisme d'action original. Investiguer les métabolites des galles végétales, en général, apparaît comme une source prometteuse dans des programmes de « *drug discovery* ».

Les composés qui interagissent avec les microtubules sont prometteurs, non seulement comme agent anti-tumoraux (Cragg et al., 2009), mais également comme outils permettant une meilleure compréhension des rôles que jouent les microtubules au niveau des cellules eucaryotes (mitose, signalisation, mobilité) (Usui et al., 2004). La tubuline est une cible de choix en thérapeutique anticancéreuse, mais il existe des phénomènes de résistance qui altèrent les chimiothérapies antitubulines. Il est essentiel de prendre en compte les différents phénomènes de résistances liées aux mutations spécifiques de la tubuline (déjà décrits pour les taxoïdes (Orr et al. 2003)) dans la proposition de nouveaux candidats anti-tubuline. Notamment, les mécanismes de résistance au taxol sont souvent associés à des mutations spécifiques des isotypes α - et β - de la tubuline sur certains acides aminés (proline 172, leucine 215, phénylalanine 270, thréonine 274, arginine 282 et alanine 372 de la chaîne β mais aussi sérine 379 de la chaîne α qui altèrent la dynamique des microtubules et la liaison aux antitubulines (Orr et al., 2003). Cependant, comme nous l'avons démontré les cembrènoïdes isolés de la galle feuillée, par leur effet original, offrent un mécanisme original qui pourrait contribuer à déjouer les résistances aux taxoïdes actuellement observées. Ces composés apparaissent comme des candidats potentiels pour le développement de nouveaux composés anti-tumoraux qui ciblent la dynamique

tubuline/microtubule et, éventuellement, efficaces contre les cellules tumorales résistant aux traitements actuellement utilisés.

Nos recherches ont abouti à des résultats originaux mais également à toute une série de réflexions qui nous ont amenés à formuler des perspectives futures qui sont développées dans le chapitre suivant.

PERSPECTIVES

A ce stade du travail, nous pouvons structurer nos perspectives en trois points principaux:

- Le premier point concerne l'origine des incensoles dans la galle feuillée. D'où proviennent-ils?

La réponse n'est pas simple et mérite un travail conséquent. Comme le montre la figure 5 (Nacoulma *et al.*, 2013a), le profil en diterpènes est extrêmement complexe et probablement qualitativement et quantitativement différent de celui de l'extrait de la plante non-infectée. Nous nous proposons d'entreprendre une étude comparative détaillée des diterpènes dans la galle feuillée versus plante non-infectée. Par ailleurs, il n'est pas exclu que la bactérie présente dans l'hyperplasie puisse métaboliser certains diterpènes aboutissant à des structures responsables de cette activité antiproliférative que nous observons. Des expérimentations de biotransformation de certains cembrenoïdes par *R. fascians* pourraient être utiles pour clarifier l'implication potentielle de la bactérie dans la synthèse ou l'hémisynthèse de composés biologiquement actifs.

 Le deuxième point concerne la démonstration d'une activité *in vitro* mais aussi l'élucidation du mécanisme d'action des cembrènoïdes ciblant la dynamique des microtubules.

Pour ce faire, il est essentiel de purifier les composés de F3.1.1 afin d'élucider leurs structures. Il faudra aussi pouvoir disposer du(es) composé(s) isolé(s) de la galle feuillée et/ou d'analogues

proches en quantités suffisantes afin d'entreprendre des expérimentations appropriées. Chez le tabac, la biosynthèse des cembrènoïdes est confinée aux trichomes (Cui et al., 2011), un facteur limitant lorsqu'il s'agit d'obtenir les quantités suffisantes de composé pour réaliser une étude approfondie. Aussi, il faut garder à l'esprit qu'à ce jour, et malgré les nombreuses recherches effectuées, les composés proches du composé isolé (cembrénoïdes) ne sont pas disponibles dans le commerce. De ce fait, nous devons trouver des sources d'approvisionnement et/ou de production de ces composés d'intérêt. Nous avons déjà investigué d'autres sources potentielles d'incensoles (analogues du composé d'intérêt). Nos recherches ont abouti à l'identification d'espèces végétales synthétisant des incensoles et leurs dérivés ; il s'agit de différentes espèces de Boswellia, de Commiphora et de Cannarium, toutes appartenant à la famille des Burseraceae. La littérature indique que ces espèces contiennent dans leur résine de l'incensole et des dérivés proches, à des concentrations élevées (1 à 2 % (m/m) du poids sec) (Alemika et al., 2004; Mothana et al., 2011); ceux-ci qui peuvent servir (i) de base (précurseurs) pour réaliser l'hémisynthèse du composé d'intérêt et de nouveaux dérivés actifs proches et (ii) pour les études de biotransformation/bioconversion et d'élucidation de mécanisme d'action (voir perspective 1).

Dès lors que suffisamment de composés sont disponibles, il sera très utile d'affiner notre connaissance du mécanisme d'action original des cembrènoïdes. Il s'agit de démontrer et d'obtenir un modèle précis de la liaison entre la molécule d'intérêt et la tubuline. Pour atteindre cet objectif, nous pouvons proposer trois approches complémentaires:

 un test biochimique de polymérisation/dépolymérisation de la tubuline en présence du composé sélectionné suite aux tests *in vitro*. Ceci montrera l'affinité entre la tubuline et le cembrènoïde, en indiquant si le mécanisme par lequel l'activité antiproliférative s'exerce a lieu par inhibition, soit de polymérisation, soit de dépolymérisation de la tubuline ou par le biais d'un autre mécanisme à découvrir.

- du « *docking moléculaire* » grâce aux modèles de tubuline déjà existants dans la *Protein Data Bank* (co-cristallisé avec ses ligands : paclitaxel, colchicine, podophyllotoxine et vincristine) (Villanueva and Setzer 2010)
- L'obtention d'un modèle de référence *in silico* pour les cembrènoïdes, par la cocristallisation entre la tubuline et les molécules d'intérêt. Ce modèle permettra d'établir la preuve expérimentale directe de la liaison protéine-ligand et permettra d'apporter des informations consistantes quant aux relations structure-activité.
- La troisième perspective consiste à obtenir des composés dont les propriétés auront été améliorées par rapport aux activités antiprolifératives initiales, à la fois sur les cellules cancéreuses sensibles aux anti-tubulines usuels que sur les cellules cancéreuses rendues résistantes à une ou plusieurs molécules actuellement utilisées en chimiothérapie conventionnelle, telles que les taxoïdes et dérivés de la vincristine/vinblastine.

Une pharmaco-modulation sera rendue possible grâce à l'utilisation du modèle *in silico* obtenu par radio-cristallographie du complexe tubuline/cembrènoïde. Ces expériences de «*docking moléculaire* » devraient, d'une part, viser une amélioration des propriétés physicochimiques, telles que la solubilité et la biodisponibilité, et, d'autre part, se focaliser sur les acides aminés dont les mutations sont connues pour être impliquées dans la résistance aux anti-tubulines usuels. Dans ce cas, il sera utile de synthétiser certains des analogues choisis selon ces critères. Ce travail devrait nous permettre d'affiner notre compréhension théorique du mécanisme d'action anti-tubuline et fournir une série de composés spécifiquement conçus pour déjouer les résistances observées.

BIBLIOGRAPHIE

- Abdel-Lateif K., Bogusz D., Hocher V. (2012). The role of flavonoids in the establishment of plant roots endosymbioses with arbuscular mycorrhiza fungi, rhizobia and Frankia bacteria. Plant Signaling & Behavior. 7(6): 636-641.
- Agrawal A. (2007). Macroevolution of plant defense strategies. Trends in Ecology & Evolution, 22 (2):103-109.
- 3. Aharoni A. and Galili G. (2011) Metabolic engineering of the plant primary–secondary metabolism interface. Current Opinion in Biotechnology, 22:239–244.
- Ahuja I., Kissen R., Bones A. M.(2012) Phytoalexins in defense against pathogens. Trends in Plant science, 17(2):73-90.
- Alemika T.E., Onawunmi G.O., Olugbade T.A. (2004). Isolation and characterization of incensole from *Boswellia dalzielii* stem bark. Journal of Pharmacy and Bioresources. 1 (1): 7-11.
- Ayabe S., Uchiyama H., Aoki T., Akashi T. (2010). Plant Phenolics: Phenylpropanoids. Comprehensive Natural Products II (Chemistry and Biology) 1: 929-976.
- Babalola O.O. (2010). Beneficial bacteria of agricultural importance. Biotechnology Letters 32:1559–70.
- Baraka, H. N., Khanfar, M. A., Williams, J.C., El-Giar, E. M., El Sayed, K. A. (2011).
 Bioactive natural, biocatalytic, and semisynthetic tobacco cembranoids. Planta Medica 77: 467-476.

- Bari R., Jones J.D. (2009).Role of plant hormones in plant defense responses. Plant Molecular Biology. 69(4):473-88.
- Benderoth M., Textor S., Windsor A.J., Mitchell-Olds T., Gershenzon J. Kroymann J. (2006) Positive selection driving diversification in plant secondary metabolism. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 103: 9118-9123.
- Bhattacharya A., Sood P., Citovsky V. (2010). The roles of plant phenolics in defence and communication during *Agrobacterium* and *Rhizobium* infection. Molecular Plant Pathology. 11(5):705-19.
- Bombuwala K., Kinstle T., Popik V., Uppal S.O., Olesen J.B., Viña J., Heckman C.A. (2006). "Colchitaxel, a coupled compound made fom microtubule inhibitors colchicine and paclitaxel". Beilstein. Journal of Organic Chemistry. 2(13).
- Boyd L. A., Ridout C., O'Sullivan D. M., Leach J. E., Leung H. (2012). Plant–pathogen interactions: disease resistance in modern agriculture. http://dx.doi.org/10.1016/j.tig.2012.10.011. Trends in Genetics xx (2012) 1–8.
- Bruni R. and Sacchetti G. (2009). Factors Affecting Polyphenol Biosynthesis in Wild and Field Grown St. John's Wort (*Hypericum perforatum* L. Hypericaceae/Guttiferae). Molecules, 14: 682-725.
- Bury M., Girault A., Mégalizzi V., Spiegl-Kreinecker S., Mathieu V., Berger W., Evidente A., Kornienko A., Gailly P., Vandier C., Kiss R. (2013) Ophiobolin A induces paraptosislike cell death in human glioblastoma cells by decreasing BKCa channel activity. Cell death and disease. 2013, 4, e561; doi:10.1038/cddis.2013.85.

- Choi Y.H., Kim H.K., Linthorst H.J.M., Hollander J.G., Lefeber A.W.M., Erkelens C., Nuzillard J-M., Verpoorte R. (2006). NMR metabolomics to revisit the tobacco mosaic virus infection in Nicotianatabacum leaves. Journal of Natural Products 69: 742–74.
- Compaoré M., Lamien C.E., Lamien-Meda A., Vlase L., Kiendrebeogo M., Ionescu C., Nacoulma O.G. (2011) Antioxidant activities, Xanthine Oxidase and Lipoxygenase Inhibitory Activities and Phenolics of *Bauhinia rufescens* Lam. (Caesalpiniaceae). Natural Products Research. In press. DOI:10.1080/14786419.2011.559948.
- Cornelis K., Maes T., Jaziri M., Holsters M., Goethals K. (2002) Virulence genes of the phytopathogen *Rhodococcus fascians* show specific spatial and temporal expression patterns during plant infection. Molecular Plant-Microbe Interact 15:398–403.
- 19. Cragg G.M., Grothaus P.G., Newman D.J. (2009). Impact of Natural Products on Developing New Anti-Cancer Agents. Chemecal Review, Article ASAP. Publication Web
- 20. Cragg G. M. and Newman D. J. (2010). Comprehensive Natural Products II (Chemistry and Biology) 2 : 5-39.
- Crespi M., Messens E., Caplan A., Van Montagu M., Desomer J. (1992) Fasciation induction by the phytopathogen *Rhodococcus fascians* depends upon a linear plasmid encoding a cytokinin synthase gene. EMBO 11: 795.
- Croteau R., Kutchan T. M., Lewis N. G. (2000). Natural Products (Secondary Metabolites).
 Biochemistry & Molecular Biology of Plants, B. Buchanan, W. Gruissem, R. Jones, Eds.,
 American Society of Plant Physiologists.
- Cui H., Zhang S.T., Yang H.J., Ji H., Wang X.J. (2011) Gene expression profile analysis of tobacco leaf trichomes. BMC Plant Biology 11: 76-86.

- Cutler, H. G., Reid, W. W., Deletang, J. (1977). Plant growth inhibiting properties of diterpenes from tobacco. Plant Cell Physiology 18: 711-714.
- Dearing M. D., Foley W. J., McLean S. (2005). The influence of plant secondary metabolites on the nutritional ecology of herbivorous terrestrial vertebrates. Annual Review of Ecology Evolution and Systematics 36:169–89.
- Ghosh D. and P. Chattopadhyay (2012). Application of principal component analysis (PCA) as a sensory assessment tool for fermented food products. Journal of Food Science and Technology 49(3): 328–334.
- Debeir O., Megalizzi V., Warzee N., Kiss R., Decaestecker C. (2008) Videomicroscopic extraction of specific information on cell proliferation and migration *in vitro*. Experimental Cell Research 314: 2985-2998.
- de O. Manes C.-L., Van Montagu M., Prinsen E., Goethals K., Holsters M. (2001). De novo cortical cell division triggered by the phytopathogen *Rhodococcus fascians* in tobacco. Molecular Plant-Microbe Interactions 14: 189-195.
- Depuydt S., Trenkamp S., Fernie A. R., Elftieh S., Renou J-P., Vuylsteke M., Holsters M., Vereecke D. (2009). An Integrated Genomics Approach to Define Niche Establishment by *Rhodococcus fascians*. Plant Physiology 149:1366-1386.
- Depuydt S, Putnam M, Holsters M, Vereecke D. (2008). *Rhodococcus fascians*, an emerging threat for ornamental crops. In Floriculture, Ornamental and Plant Biotechnology: Advances and Topical Issues, ed. JA Teixeira da Silva, 5:480–89. London: Global Science Books.

- Dixon R.A., Achnine L., Kota P., Liu C.J., Reddy M.S.S., Wang L.J. (2002). The phenylpropanoid pathway and plant defence : a genomics perspective. Molecular Plant Pathology 3: 371–390.
- 32. Dodds P. N. and Rathjen J. P. (2010) Plant immunity: towards an integrated view of plant– pathogen interactions. Nature Reviews Genetics 11: 539-548.
- 33. Ferreyra F. M.L., Rius S.P., Casati P. (2012). Flavonoids: biosynthesis, biological functions, and biotechnological applications. Frontiers in Plant Science. 3222.
- Francis I., Gevers D., Karimi M., Holsters M., Vereecke D. (2007) Linear plasmids and phytopatho-genicity. In: Meinhardt F, Klassen R (eds) Microbial linear plasmids, Microbiology Mono-graphs, 7: 99–115. Springer, Berlin.
- Garcia-Brugger A., Lamotte O., Vandelle E., Bourque S., Lecourieux D., Poinssot B., Wendehenne D., Pugin A. (2006). Early Signaling Events Induced by Elicitors of Plant Defenses. Molecular Plant-Microbe Interactions, 19 (7):711–724.
- Glenn W. S., Runguphan W., S. E O'Connor. (2013). Recent progress in the metabolic engineering of alkaloids in plant systems. Current Opinion in Biotechnology, 24:354–365.
- Gupta V., Kumar M., Brahmbhatt H., Reddy C.R.K., Seth A., B. Jha (2011). Simultaneous determination of different endogenetic plant growth regulators in common green seaweeds using dispersive liquid–liquid microextraction method. Plant Physiology and Biochemistry, 49 (11): 1259-1263.
- Goethals K., Vereecke D., Jaziri M., Van Montagu M., Holsters M. (2001) Leafy gall formation by *Rhodococcus fascians*. Annual Review of Phytopathology 39:27–52.

- Gurgler V. and Seviour R. J. (2010) Systematics of Members of the Genus Rhodococcus (Zopf 1891) In: Alvarez H. M. (Ed) Biology of *Rhodococcus*, Microbiology Monographs vol 16:1-28, Springer, Berlin.
- 40. Hartmann T. (2007) From waste products to ecochemicals: Fifty years research of plant secondary metabolism. Phytochemistry 68: 2831–2846.
- Hématy K., Cherk C., Somerville S. (2009) Host–pathogen warfare at the plant cell wall.
 Current Opinion in Plant Biology, 12 (4): 406-413.
- 42. Henry G., Thonart P., Ongena M. (2012) PAMPs, MAMPs, DAMPs and others: an update on the diversity of plant immunity elicitors. Biotechnology, Agronomy, Society and Environment, 16(2), 257-268.
- Ivanov I., Heydeck D., Hofheinz K., Roffeis J., O'Donnell V. B., Kuhna H., Walther M. (2010) Molecular enzymology of lipoxygenases. Archives of Biochemistry and Biophysics 503:161–174.
- 44. Jaziri M., Goethals K. and Van Montagu M. (1997) Plant propagation and germplasm storage Brevet Européen, date de dépôt: le 10.03.1997, N°: EP/21.02.1997/97200513 N°: WO 98/36635.
- 45. Jones J. D. G. and Dangl J. L. (2006). The plant immune system. Nature 444:323-329.
- Kara D. (2009). Evaluation of trace metal concentration in some herbs and herbal teas by principal component analysis. Food Chemistry 114:347–354.
- 47. Kliebenstein D. J. and Osbourn A. (2012). Making new molecules evolution of pathways for novel metabolites in plants. Current Opinion in Plant Biology, 15: 415–423.

- Lamien-Meda A., Lamien C.E., Compaoré M.M.H., Meda N.T.R., Kiendrebeogo M., Zeba B., Millogo J.F., Nacoulma O.G. (2008) Polyphenol content and antioxidant activity of fourteen wild edible fruits from Burkina Faso. Molecules 13(3): 581-594.
- Lin, K. L., Tsai, P. C., Hsieh, C. Y., Chang, L. S., Lin, S. R. (2011). Antimetastatic effect and mechanism of ovatodiolide in MDA-MB-231 human breast cancer cells. Chemico-Biological Interactions 194: 148-158.
- 50. Maes T., Vereecke D., Ritsema T., Cornelis, K., Thu H. N., Montagu M. V., Holsters M., Goethals K. (2001) The att locus of *Rhodococcus fascians* strain D188 is essential for full virulence on tobacco through the production of an autoregulatory compound. Molecular Microbiology 42, 13-28.
- Mandal S.M., Chakraborty D., Dey S. (2010). Phenolic acids act as signaling molecules in plant-microbe symbioses. Plant Signal Behavior 5(4):359-68.
- Mavel S., Nadal-Desbarats L., Blasco H., Bonnet-Brilhault F., Barthélémy C., Montigny F., Sarda P., Emond P. (2013). ¹H – ¹³C NMR-based urine metabolic profiling in autism spectrum disorders. Talanta 114:95-102.
- Mazid M., Khan T.A., Mohammad F. (2011). Role of secondary metabolites in defense mechanisms of plants. Biology and Medicine, 3 (2): 232-249.
- Montesano M., Brader G. Palva E.T. (2003). Pathogen derived elicitors: searching for receptors in plants. Molecular Plant Pathology 4: 73-79.
- 55. Mothana R.A.A., Hasson S. S., Schultze W., Mowitz A., Lindequist U. (2011) Phytochemical composition and in vitro antimicrobial and antioxidant activities of essential oils of three endemic Soqotraen Boswellia species. Food Chemistry 126(3): 1149–1154.

- Moura J.C., Bonine C.A., de Oliveira FernandesViana J., Dornelas M.C., Mazzafera P. (2010). Abiotic and biotic stresses and changes in the lignin content and composition in plants. Journal of Integrative Plant Biology 52(4):360-76.
- 57. Nacoulma A. P., Compaoré M., De Lorenzi M., Kiendrebeogo M., Nacoulma O.G. (2012) *In vitro* Antioxidant and Anti-inflammatory Activities of Extracts from *Nicotiana tabacum* L. (Solanaceae) Leafy Galls Induced by *Rhodococcus fascian*. Journal of phytopathology 160 (11-12): 617–621.
- 58. Nacoulma A.P., Vandeputte O. M., De lorenzi M., El Jaziri M., Duez P. (2013a) Metabolomic-based study of the leafy gall, the ecological niche of the phytopathogen *Rhodococcus fascians*, as a potential source of bioactive compounds. International Journal of Molecular Science 14(6), 12533–12549.
- 59. Nacoulma A. P., Megalizzi V., Pottier L. R., De lorenzi M., Thoret S., Dubois J., Vandeputte O. M., Duez P., Vereecke D., El Jaziri M. (2013b) Potent antiproliferative cembrenoids accumulate in tobacco upon infection with *Rhodococcus fascians* and trigger unusual microtubule dynamics in hman glioblastoma cells. Plos One (soumis)
- Neilson E. H., Goodger J.Q.D., Woodrow I. E., Møller B. L. (2013) Plant chemical defense: at what cost?. Trends in Plant Science xx (2013) 1–9, http://dx.doi.org/10.1016/j.tplants.2013.01.001.
- Ncube B., Finnie J.F., Van Staden J. (2012). Quality from the field: The impact of environmental factors as quality determinants in medicinal plants. South African Journal of Botany 2:11–20.

- Nouar E., Vereecke D., Goethals K., Jaziri M., Baucher M. (2003). Screening for differential gene expression in Atropa belladonna leafy gall induced following Rhodococcus fascians infection. European Journal of Plant Pathology 109:327–30.
- O'Connor S. E. (2010) Alkaloids. Comprehensive Natural Products II (Chemistry and Biology) 1:977-1007.
- 64. Orr G.A., Verdier-Pinard P., McDaid H., Band Horwitz S. (2003). Mechanisms of Taxol resistance related to microtubules. Oncogene 22:7280–7295.
- 65. Pavarini D. P., Pavarini S. P., Niehues M., Lopes N. P. (2012). Exogenous influences on plant secondary metabolite levels. Animal Feed Science and Technology, 176 : 5–16.
- 66. Pertry I., Vaclavikova K., Depuydt S., Galuszka P., Spichal L., Temmerman W., Stes E., Schmulling T., Kakimoto T., Van Montagu M. C., Strnad M., Holsters M., Tarkowski P., Vereecke D. (2009). Identification of *Rhodococcus fascians* cytokinins and their modus operandi to reshape the plant. PNAS 106 (3): 929-934.
- 67. Pertry I., Václavíková K., Gemrotová M., Spíchal L., Galuszka P., Depuydt S., Temmerman W., Stes E., De Keyser A., Riefler M., Biondi S., Novák O., Schmülling T., Strnad M., Tarkowski P., Holsters M., Veree*cke D. (2010). Rhodococcus fascians* impacts plant development through the dynamic fas-mediated production of a cytokinin mix. Molecular Plant-Microbe Interactions 23 (9): 1164-1174.
- Putnam, M. L. and Miller M. L. (2007). "*Rhodococcus fascians* in Herbaceous Perennials." Plant Disease 91(9): 1064-1076.
- Raman A. (2011). Morphogenesis of insect-induced plant galls: facts and questions. Flora Morphology, Distribution, Functional Ecology of Plants, 206 (6): 517-533.

- Ramar P.S. and Ponnampalam G. (2010). Therapeutic Potential of Plants as Antimicrobials for Drug Discovery, Evidence-based Complementary and Alternative Medicine: eCAM, 7 (3): 283-294.
- 71. Reichling J. (2009). Plant–microbe interactions and secondary metabolites with antibacterial, antifungal and antiviral properties. Annual Plant Reviews, 39: 214–347.
- 72. Sels J., Mathys J., De Coninck B.M.A., Cammue B.P.A., De Bolle M.F.C. (2008). Plant pathogenesis-related (PR) proteins: A focus on PR peptides. Plant Physiology and Biochemistry 46: 941-950.
- 73. Sfeir J., Lefrançois C., Baudoux D., Derbré S., Licznar P. (2013). In Vitro Antibacterial Activity of Essential Oils against Streptococcus pyogenes. Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine, Article ID 269161, http://dx.doi.org/10.1155/2013/269161.
- Silva R. M. G., Brigatti J. G. F., Santos V. H. M., Mecina G. F., Silva L. P. (2013)
 Allelopathic effect of the peel of coffee fruit. Scientia Horticulturae, 158: 39-44.
- 75. Simón-Mateo C., Depuydt, S., De Oliveira-Manes C., Cnudde, F., Holsters, M., Goethals, K., Vereecke D. (2006) The phytopathogen *Rhodococcus fascians* breaks apical dominance and activates axillary meristems by inducing plant genes involved in hormone metabolism. Molecular plant pathology 7: 103–112.
- Spiteller D. (2008). Plant Defense Strategies. In Encyclopedia of Ecology; Jorgensen S. E. and Fath B. (Eds.), *Elsevier Inc Oxford*, pp. 2798-2811.
- 77. Stes E., Vandeputte O.M., El Jaziri M., Holsters M., Vereecke D. (2011). A Successful Bacterial Coup d'État: How *Rhodococcus fascians* redirects plant development. Annual Review of Phytopathology. 8 (49):69-86.

- 78. Tiwari R., Awasthi A., Mall M., Shukla A. K., Srinivas K.V.N. S., Syamasundar K.V., Kalra A. (2013). Bacterial endophyte-mediated enhancement of in planta content of key terpenoid indole alkaloids and growth parameters of *Catharanthus roseus*. Industrial Crops and Products 43: 306–310.
- Torres M. A., Jones J. D.G., Dangl J. L. (2006). Reactive Oxygen Species Signaling in Response to Pathogens. Plant Physiology, 141 (2): 373-378.
- 80. Tuomi J. (1992). Toward integration of plant defense theories. Trends in Ecology and Evolution, 7 (11) : 365-36.
- Usui T., Watanabe H., Nakayama H., Tada Y., Kanoh N., Kondoh M., Asao T., Takio K., Nishikawa K., Kitahara T., Osada H. (2004). The Anticancer Natural Product Pironetin Selectively Targets Lys352 of α-Tubulin. Chemistry and Biology, 11(6): 799–806.
- Vandeputte O., Oden S., Mol A., Vereecke D., Goethals K., El Jaziri M., Prinsen E. (2005) Biosynthesis of auxin by the Gram-positive phytopathogen *Rhodococcus fascians* is controlled by compounds specific to infected plant tissues. Applied and environmental Microbiology 71:1169.
- Vandeputte O., Vereecke D., Mol A., Lenjou M., Van Bockstaele D., El Jaziri M., Baucher M. (2007). Rhodococcus fascians infection accelerates progression of tobacco BY-2 cells into mitosis through rapid changes in plant gene expression. New Phytologist 175: 140-154.
- Vereecke D., Messens E., Klarskov K., De Bruyn A., Van Montagu M., Goethals K. (1997). Patterns of phenolic compounds in leafy galls of tobacco. Planta 201: 342–348.

- Vereecke D., Burssens S., Sim´on-Mateo C., Inz´eD., Van Montagu M., *et al.*, 2000. The *Rhodococcus fascians* –plant interaction: morphological traits and biotechnological applications. Planta 210:241–51.
- 86. Villanueva H.E. and Setzer W.N. (2010). Cembrene diterpernoids: conformational studies and molecular docking to tubulin. Records of Natural Products 4:115-123.
- Wang Y., Chen S., Yu O. (2011). Metabolic engineering of flavonoids in plants and microorganisms. Applied Microbiology and Biotechnology. 91(4):949-56.
- Wink M. (2003) Evolution of secondary metabolites from an ecological and molecular phylogenetic perspective. Phytochemistry, 64, 3-19.
- Wink M. (2009). Functions and Biotechnology of Plant Secondary Metabolites. Annual Plant Reviews 39: 1–20.
- 90. Wink M. (2011) Occurrence and function of natural products in Plants. In Phytochemistry and Pharmacognosy, John M. Pezzuto, Massuo J. Kato (Eds). Encyclopedia of Life Support Systems (EOLSS). http://www.eolss.net/Sample-Chapters/C06/E6-151-03-00.pdf

ANNEXE 1

Nicotiana tabacum L.

Nicotiana tabacum L. (solanaceae) est une des plantes les plus étudiée du point de vue de sa composition phytochimique et de ses activités pharmacologiques (Ross, 2005). Elle est également une des plantes les plus utilisées en biotechnologie végétale. Elle fait partie des plantes qui réagissent fortement et de façon reproductible à l'infection par *R. fascians* (Stes *et al.*, 2011) en exprimant le phénotype de la galle feuillée. Cette plante se présente comme le meilleur modèle pour étudier les altérations métaboliques induites suite à l'interaction avec *R. fascians*. Plus de 2500 métabolites secondaires appartenant au groupe des terpénoïdes, des alcaloïdes, et des composés phénoliques ont été identifiés, chez le tabac.

La plante



Communément appelé «tabac», le *N. tabacum* est une herbacée annuelle qui mesure de 50 cm à 1,5 m et pouvant atteindre 2,5 m dans certaines régions. Les feuilles sont entières, longue de 30 à 60 cm sur environ 10 à 20 cm de large. Elles sont alternes, sessiles, peu décurrentes, de forme ovale à lancéolée avec des pointes aigües et possèdent de trichomes. De couleur vert pâle, elles sont visqueuses et exhalent une odeur légèrement âcre due à la nicotine, qui est un alcaloïde volatile fortement odorant. La tige est dressée, sa section est circulaire et visqueuse au touché. Elle se ramifie surtout au niveau de son extrémité supérieure. Le tabac a une racine, de type pivotant, longue et fibreuse. Selon la variété, la coloration des fleurs varie énormément: vert-jaune, blanche ou rose et forment une inflorescence en panicules lâches. La formule florale est S5 P(5) E5 <u>C</u>(2) ce qui signifie qu'elle possède un calice composé de 5 sépales non soudées, une corolle de 5 pétales colorées soudées, un androcée de 5 étamines et un gynécée à 2 carpelles soudée avec un ovaire supère. Chaque pied porte des fleurs des deux sexes qui font de cette plante un hermaphrodite. La pollinisation entomophile est faite par l'intermédiaire des insectes. Le fruit est une capsule qui renferme plusieurs petites graines (Ross 2005)

Classification botanique

Selon la classification phylogénétique des Angiospermes APG III (2009).

Règne: *Plantae* Division: Angiosperme (Magnoliophyta) Classe: Dicotylédones vraies (Magnoliopsida) Groupe Astéridées Sous-groupe: Lamiidées Ordres: Solanales Famille: solanaceae Genre: *Nicotiana* Espèce: *N. tabacum* L. (1753)

Composition phytochimique

Le tabac est l'une des plantes les plus étudiées du point de vue phytochimique et plus de 2500 métabolites secondaires appartenant au groupe des terpénoïdes, des alcaloïdes, et des composés phénoliques ont été identifies, (Nugroho et Vepoorte, 2002).

Les terpénoïdes

Les terpénoïdes constituent le plus grand groupe de composés du tabac et sont responsables de différentes propriétés pharmacologiques. Certains d'entre eux ont des propriétés de régulation de la croissance et de défense de la plante, tandis que d'autres sont utilisés pour leur potentiel aromatique. La plus part des classes de terpénoïdes sont produit par le tabac, c'est le cas des tétraterpènes (carotènes, lutéine, violaxanthine), des triterpènes et stérols triterpéniques (acide bétulinique, campestérol, sitostérol, cycloartenol), des diterpènes (cembrenoïdes, labdanoïdes, sclaréol) ainsi que des sesquiterpènes (capsidiol, phytuberol, rishitine) (Ross 2005). Certains composés de ces deux derniers groupes sont des «phytoalexines».

Les alcaloïdes

Après les terpénoïdes, c'est le groupe des composés du tabac le plus étudié. On y trouve des molécules très toxiques, avec des activités physiologiques importantes exploitées dans l'industrie du tabac pour améliorer le goût et favoriser l'addiction à la cigarette. Les alcaloïdes les plus courant du tabac sont la (nor)-nicotine, l'anabasine et l'anatabine (Nugroho et Vepoorte, 2002)

Les composés phénoliques

Ce sont des composés universels du règne végétal: tanins, anthocyanes et flavonoïdes. Les flavonoïdes et anthocyanes sont à l'origine de la coloration des fleurs, des fruits et de certaines feuilles. Ils interviennent dans la protection contre les rayonnements ultraviolets. Contrairement

aux anthocyanes, les flavonoïdes ne sont pas colorés mais joue un rôle de co-pigment contribuant à la coloration des fleurs. Les flavonoïdes rencontrés dans le tabac sont, entre autre, des glycosides de quercétine et de kaempferol (Ross 2005).



Figure 1 : Exemples de quelque composés chimiques identifiés chez *Nicotiana tabacum* L. On retrouve des terpénoïdes (aristolochene [1], germacrène [4], (2,7,11)-cembrene-(4,6)-diol [7]), des alcaloïdes (nicotine [2], anabasine [5]), des flavonoïdes (quercétine [3], kaempférol [6]) et des stéroïdes triterpéniques (β -sitostérol [8]).

<u>Usages</u>

Originaire d'Amérique latine, le tabac entre dans la préparation de formules en médecines traditionnelles. Les feuilles séchées étaient fumées lors des rites initiatiques et souvent brulées pour un usage insecticide. Les décoctées des feuilles sont utilisés comme anti douleurs, émétiques, sédatifs et narcotiques tandis que des préparations à base d'extraits dans l'huile de palme sont utilisées dans la prévention des calvities (Desmarchelier *et al.*, 1996; Hirschmann et Rojas De Arias, 1992). Actuellement, l'exploitation de cette plante est plutôt industrielle dans la production de cigarette et en biotechnologie pour la recherche fondamentale.

Propriétés pharmacologiques

Du fait de cette richesse en métabolites secondaires, plusieurs activités biologiques ont été déjà investiguées à partir d'extraits de *N. tabacum* L. Des activités insecticides, des activités antibactériennes, des activités antifongiques et des activités anti-convulsivantes (Leifertova et Lisa, 1979 ; Adesina, 1982 ; Akinpelu et Obuotor, 2000) ont été attribuées à différents extraits totaux de tabac. En outre les extraits d'alcaloïdes totaux de tabac ont montré une activité sur l'inhibition de la synthèse d'aldostérone (Skowronski et Feldman, 1994) tandis que d'autres études évoquent l'activité anti-inflammatoire des diterpènes du tabac (Martins *et al.*, 2011). Les cembrenoïdes du tabac sont aussi connus pour leur action d'antagonistes non compétitifs du récepteur nicotinique de l'acétylcholine (Ferchmin *et al.*, 2009) pour leur potentiel antitumoral et antimigratoire sur plusieurs lignées tumorales humaines (El Sayed *et al.*, 2008 ; Baraka *et al.*, 2011) ainsi que pour leur effet sur la surexpression des pompes à efflux (P-gp) (Abuznait *et al.*, 2011).

Références

- Abuznait A. H., Qosa H., O'Connell N. D., Akbarian-Tefaghi J., Sylvester P. W., El Sayed K. A., Kaddoumi A. (2011).Induction of expression and functional activity of Pglycoprotein efflux transporter by bioactive plant natural products . Food and Chemical Toxicology, 49(11):2765-2772.
- 2. Adesina S. K. (1982) Studies on some plants used as anticonvulsants in Amerindian and African traditional medicine. Fitoterapia 53: 147–162.
- 3. Akinpelu, D. A. and E. M. Obuotor. (2000). Antibacterial activity of *Nicotiana tabacum* leaves. Fitoterapia 1(2):199–200.
- 4. Baraka, H. N., Khanfar, M. A., Williams, J.C., El-Giar, E. M., El Sayed, K. A. (2011). Bioactive natural, biocatalytic, and semisynthetic tobacco cembranoids. Planta Med 77: 467-476.
- 5. Desmarchelier C., Gurni A., Ciccia G., Giuletti A. M.(1996). Ritual and medicinal plants of the Ese'ejas of the Amazonian rainforest (Madre de Dios, Peru). J Ethnopharmacology 52(1): 45–51.
- El Sayed K. A., Laphookhieo S., Baraka H. N., Yousaf M., Hebert A., Bagaley D., Rainey F. A., Muralidharan A., S.Thomasa and G. V. Shaha. (2008). Biocatalytic and semisynthetic optimization of the anti-invasive tobacco (1S,2E,4R,6R,7E,11E)-2,7,11-cembratriene-4,6-diol. Bioorganic and Medicinal Chemistry 16:2886–2893.
- Ferchmin P. A., Pagán O. R., U. Henning, Szeto A. C., Hann R. M., Eterović V. A. (2009) Actions of octocoral and tobacco cembranoids on nicotinic receptors. Toxicon, 54 (8)1174-1182, Dec 2009 doi:10.1016/j.toxicon.2009.02.033.
- 8. Hirschmann G. S., and Rojas De Arias A. (1992). A survey of medicinal plants of Minas Gerais, Brazil. J Ethnopharmacology 29(2): 159–172.
- 9. Leifertova I., and M. Lisa. (1979). The antifungal properties of higher plants affecting some species of the genus *Aspergillus*. Folia Pharm (Pragues) 2: 29–54.
- Martins A. H., Santiago E. A., Olivera Y. V., Alves J. M., Ford B. D., Xu Z., Ferchmin P. A., Eterovic V. A. (2011). A cembranoid protects the brain against transient middle cerebral artery occlusion. Biochemical Pharmacology, 82(8):1044.
- 11. Ross I.A. (2005) Medicinal Plants of the World, vol. 3: Chemical Constituents, Traditional and 8 Modern Medicinal Uses. Humana Press Inc., Totowa, NJ : 623 pp.
- 12. Skowronski, R. J., and D. Feldman. (1994). Inhibition of aldosterone synthesis in rat adrenal cells by nicotine and related constituents of tobacco smoke. Endocrinology 134(5): 2171–2177.
- Stes E., Vandeputte O.M., El Jaziri M., Holsters M., Vereecke D. (2011). A Successful Bacterial Coup d'État: How *Rhodococcus fascians* redirects plant development. Annual Review of Phytopathology. 8 (49):69-86.

ANNEXE 2

Profil terpénique des extraits chloroformiques de galles feuillées versus tabac non infecté (non publié).

Le profil des extraits chloroformiques de galles feuillées (LG) et de plantes de tabac non infectées (NI) a été effectué sur plaque chromatographique de silice. Les plaques ont été observées à la lumière du jour, à 254 nm – 366 nm et après révélation à la vanilline-sulfurique.



Dépôt: 50 µg de chaque extrait chloroformique
L'analyse des plaques CCM révèle une diminution de certains composés dont les pigments chlorophylliens (plaque avant pulvérisation et à 254 nm), une diminution probablement des xanthophylles et ou caroténoïdes (plaque à 366nm) ainsi qu'une augmentation de composés fluorescents (triterpènes et ou stéroïdes) (Wagner 1996). La révélation à la vanilline sulfurique nous donne le profil terpénique des extraits et nous pouvons observer un profil quasi identique (aspect qualitatif) mais quantitativement assez différents car il semble que certains composés ne sont présents que dans l'un des extraits.

Référence :

 Wagner H. and S. Bladt (1996) Plant Drug Analysis: A Thin Layer Chromatography Atlas 2nd ed. Springer, Berlin, Germany. 384 pages

ANNEXE 3

Résultats de l'activité antibactérienne par mesure du diamètre d'inhibition (non publié)

L'émergence de nouvelle de souches bactériennes multi-résistantes aux antibiotiques rend indispensable la recherche de nouvelles molécules antimicrobiennes provenant de sources diverses (végétaux, micro-organismes). L'évaluation de l'activité antibactérienne des extraits de N. tabacum L. infecté et non infecté par R. fascians a été faite par la détermination des diamètres d'inhibition de croissance bactérienne (Table 1). Les extraits ayant une zone d'inhibition ≥ 5 (c'est-à-dire 13 mm diamètre du filtre inclus) sont considérés comme ayant une activité antibactérienne potentielle. Tous les extraits testés ont été inactifs sur l'ensemble des souches bactériennes malgré la forte concentration utilisée (200 µg/disque). Les extraits de plantes infectées, comparés aux plantes non infectées, montrent une légère amélioration de l'activité antibactérienne qui n'est toutefois pas significative sur le panel de bactéries testées. Par contre, les souches ont été sensibles aux antibiotiques de référence tels l'ampicilline (10µg), la gentamicine (5µg) et la ciprofloxacine (5µg) qui ont présenté des activités inhibitrices nettement supérieures de celles des extraits (Table 2). Les diamètres d'inhibition des extraits de plantes infectées et de plantes non infectées comparés aux effets des antibiotiques commerciaux indiquent que ces extraits ne sont pas exploitables pour la recherche de composés antibactériens (résultats négatifs pour tous les extraits au test de micro-dilution).

<u>Table 1</u> :	Activité	antibactérienne	des	extraits	de	plantes	infectées	versus	plantes	non
infectées.										

Diamètre d'inhibition (mm)							
	Plantes infectées			Plantes non- infectées			
	Méthanol aqueux	Chloroforme	Hexane	Méthanol aqueux	Chloroforme	Hexane	
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538	10	11	ND	9	9	ND	
<i>Bacillus cereus</i> ATCC 13061	9	9	ND	ND	ND	ND	
Escherichia coli ATCC 25922	13	9	ND	9	ND	ND	
<i>Proteus mirabilis</i> ATCC 35659	12	13	ND	ND	ND	ND	
Salmonella thyphimirium ATCC 13311	9	9	ND	ND	ND	ND	

ND : aucun diamètre d'inhibition n'a pu être mesuré

Table 2 : Activité antibactérienne d'antibiotiques de référence.

Diamètre d'inhibition (mm)

	А	Antibiotiques de référence					
	Ampicilline	Ciprofloxacine	Gentamycine				
Staphylococcus aureus	16	20	31				
ATCC 6538	10	35					
Bacillus cereus	ND	22	22				
ATCC 13061	ND	32	52				
Escherichia coli	10	20	22				
ATCC 25922	19	28	23				
Proteus mirabilis	24	26	20				
ATCC 35659	24	30	20				
Salmonella							
thyphimirium	12	41	36				
ATCC 13311							

ND : aucun diamètre d'inhibition n'a pu être mesuré

ANNEXE 4

Chromatogrammes en chromatographie gazeuse (TIC)

Extraits chloroformiques totaux





➢ Sous fraction F3.1.1

