



CONFÉDÉRATION SUISSE

OFFICE FÉDÉRAL DE LA PROPRIÉTÉ INTELLECTUELLE

⑤① Int. Cl.³: C 12 P 17/18
C 12 N 5/02
C 07 D 489/02

Brevet d'invention délivré pour la Suisse et le Liechtenstein

Traité sur les brevets, du 22 décembre 1978, entre la Suisse et le Liechtenstein

⑫ FASCICULE DU BREVET A5

⑪

644 634**⑫** Numéro de la demande: 2200/80**⑫** Date de dépôt: 20.03.1980**③①** Priorité(s): 21.03.1979 CA 324565**⑫** Brevet délivré le: 15.08.1984**⑫** Fascicule du brevet
publié le: 15.08.1984**⑦③** Titulaire(s):
Canadian Patents and Developments Limited,
Ottawa/Ontario (CA)**⑦②** Inventeur(s):
Friedrich Constabel, Saskatoon/Saskatchewan
(CA)
Wolfgang W. G. Kurz, Saskatoon/Saskatchewan
(CA)
W. H. John Tam, Saskatoon/Saskatchewan (CA)**⑦④** Mandataire:
Kirker & Cie SA, Genève**⑤④ Procédé pour la production de codéine.**

⑤⑦ La production de codéine a été réalisée à partir de cultures de cellules modifiées provenant des plantes *Papaver somniferum* L. ou *Papaver setigerum* DC. Ces cultures de cellules ont été contraintes de produire des cellules polyploïdes cyto-différenciées qui sont considérablement plus grosses que les cellules normales, non différenciées. En présence de ces cellules polyploïdes, la production de codéine est réalisée.

REVENDECATIONS

1. Procédé de production de la codéine à partir de cultures de cellules végétales, caractérisé en ce que:

a) on prépare un inoculum de cellules des variétés de *Papaver somniferum* L. ou *Papaver setigerum* DC., sélectionnées pour former, par culture des cellules dans un milieu nutritif convenant pour la culture des cellules végétales, qui devient à croissance limitée, des cellules polyploïdes cytodifférenciées capables de produire de la codéine, lesdites cellules cytodifférenciées étant plus grosses que les cellules non différenciées;

b) on inocule un milieu nutritif convenant pour les cultures de cellules végétales avec lesdites cellules d'inoculum et on laisse ces cellules se multiplier jusqu'à ce qu'au moins un composant nutritif essentiel devienne limitateur de croissance;

c) on laisse la culture à croissance limitée subir une cytodifférenciation, formant ainsi lesdites cellules polyploïdes;

d) on accumule la codéine dans ladite culture contenant des cellules cytodifférenciées, et

e) on recueille la codéine de la culture résultante.

2. Procédé selon la revendication 1, caractérisé en ce que le milieu nutritif est du type MS, ER ou B5, comme décrit dans les tableaux 1 et 2 du présent exposé.

3. Procédé selon la revendication 2, caractérisé en ce que le milieu contient une source d'azote organique ajoutée pour le stade de multiplication.

4. Procédé selon la revendication 1, caractérisé en ce que la matière nutritive source d'azote devient limitatrice de croissance.

5. Procédé selon la revendication 1, caractérisé en ce que la variété est une variété *Papaver somniferum* L. sélectionnée.

6. Procédé selon la revendication 1, caractérisé en ce que les grosses cellules cytodifférenciées forment au moins 10% du total de la population des cellules.

7. Procédé selon la revendication 6, caractérisé en ce que les cellules cytodifférenciées ont un diamètre moyen d'au moins 100 µ.

8. Procédé selon la revendication 1, caractérisé en ce que l'inoculum provient de tissu de plantules.

9. Procédé selon la revendication 1, caractérisé en ce que l'inoculum provient de parties florales ou de pollen.

10. A titre de moyen pour la mise en œuvre du procédé selon la revendication 1, une culture de cellules de *Papaver somniferum* L. ou de *Papaver setigerum* DC., caractérisée en ce que la culture a sa croissance limitée par épuisement de matières nutritives de croissance et en ce qu'au moins 10% des cellules sont cytodifférenciées en formant de grosses cellules polyploïdes.

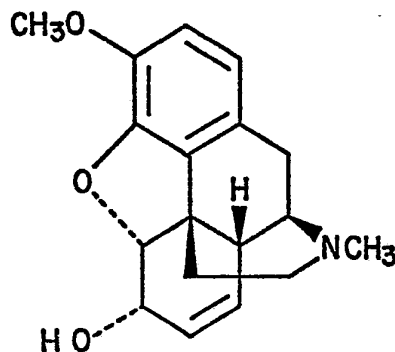
11. Culture selon la revendication 10, caractérisée en ce que de 10 à 50% ou plus du total des cellules sont de grosses cellules polyploïdes.

12. Culture selon la revendication 10, caractérisée en ce que les cellules proviennent de *Papaver somniferum* L. cv Marianne.

Selon la présente invention, l'alcaloïde codéine, du groupe du morphinane, est produit et recueilli à partir de certaines cultures de cellules végétales. Il a été trouvé que des cultures de cellules sélectionnées, comprenant une nouvelle forme de cellules cytodifférenciées, produisent de la codéine.

L'opium contient jusqu'à environ 15% de morphine anhydre. La codéine, qui est l'éther 3-méthyle de la morphine, est présente dans l'opium en concentration atteignant environ 2,5%, et on la prépare ordinairement par méthylation de la morphine. L'espèce commune de pavot à opium est *Papaver somniferum* L., mais *P. setigerum* DC. est aussi connu comme fournissant un produit opiacé contenant de la codéine. La codéine possède des propriétés antitussives et analgésiques avec peu d'action narcotique et on l'utilise nor-

malement sous forme de sulfate. La codéine est le 7,8-didéhydro-4,5 α-époxy-3-méthoxy-17-méthylmorphinan-6αol ($C_{18}H_{21}NO_3$), poids moléculaire 299,36, et est un membre du groupe d'alcaloïdes du morphinane. D'autres membres de ce groupe comprennent la thébaïne ($C_{19}H_{21}NO_3$), qui est le précurseur biosynthétique immédiat de la codéine, et la morphine ($C_{17}H_{19}NO_3$) qui, comme la codéine, est une drogue ayant une utilité médicinale. La formule développée de la codéine est la suivante:



Ces dernières années, les techniques de culture des cellules végétales se sont développées au point où des cultures de cals ayant la capacité de produire des cellules végétales spécialisées peuvent être maintenues *in vivo*. Les cellules végétales cultivées *in vitro* conservent l'information génétique de la plante d'origine, c'est-à-dire que, après induction, elles peuvent développer des racines et des pousses ou produire des métabolites spécifiques de l'espèce ou de la variété en question. Par conséquent, des cultures de cellules provenant de *Papaver somniferum* L. et *P. setigerum* DC. peuvent être considérées comme étant une source potentielle de morphinanes, les alcaloïdes du pavot. Le problème rencontré dans l'exploitation de ce potentiel est de créer des conditions cytophysiologiques permettant la réalisation de ce potentiel biosynthétique des cultures de cellules de *Papaver*. Des cultures de tissus de cals provenant de pavots à opium ont été réalisées et, récemment, les alcaloïdes présents dans ces tissus de cals ont été identifiés. Ces tissus de cals fournissent des alcaloïdes du type benzophénanthridine, protopine et aporphine, mais non les alcaloïdes du type morphinane qui étaient présents dans les plantes d'origine. Voir Furuya *et al.*, «Phytochemistry», 11, 3041-3044, 1972, et Ikuta *et al.*, «Phytochemistry», 13, 2175-2179, 1974. Dans des expériences de biotransformation où des alcaloïdes ont été ajoutés à des cultures de tissus de cals provenant de *Papaver somniferum* L., ces cultures se sont montrées dépourvues du pouvoir de métaboliser la réticuline-(RS) en thébaïne, codéine et morphine, mais pouvaient métaboliser la (-)-codénone en (-)-codéine. Voir Furuya *et al.*, «Phytochemistry», 17, 891-893, 1978. Ainsi, les cultures de cals antérieures, provenant du pavot à opium, se sont montrées incapables de synthétiser la codéine ou la morphine. Une variété d'une espèce différente de pavots, *Papaver bracteatum* Lindl. (dont on sait qu'elle contient de la thébaïne) a été utilisée pour en tirer des tissus de cals (à partir des têtes de semences) et on a constaté que ces tissus fournissaient de faibles quantités de thébaïne (0,1% de thébaïne par rapport au poids sec de tissus de têtes de semences). Voir le brevet US N° 4114314 du 19 septembre 1978. La technique antérieure n'a pas réalisé la production directe de codéine à partir de cultures cellulaires.

Conformément à la présente invention, on a découvert que des cultures de cellules sélectionnées provenant des pavots à opium *P. somniferum* L. ou *P. setigerum* DC. peuvent être adaptées à la production de codéine à partir de substances nutritives de base. Une nouvelle culture de cellules contenant des cellules polyploïdes cytodifférenciées aptes à produire de la codéine a été préparée.

L'invention a pour objet un procédé pour la production de codéine à partir de cultures de cellules végétales, comprenant les opérations suivantes:

a) on prépare un inoculum de cellules de variétés de *Papaver somniferum* L. ou *Papaver setigerum* DC. sélectionnées pour former, par culture des cellules dans un milieu nutritif approprié pour la culture de cellules végétales qui devient à croissance limitée, des cellules polyploïdes cytodifférenciées capables de produire de la codéine, lesdites cellules cytodifférenciées étant plus grosses que les cellules non différenciées.

b) on inocule un milieu nutritif convenant pour les cellules végétales avec lesdites cellules d'inoculum et on laisse ces cellules se multiplier jusqu'à ce qu'au moins un composant nutritif essentiel devienne limitateur de croissance;

c) on laisse cette culture limitatrice de croissance subir une cytodifférenciation, formant ainsi lesdites cellules polyploïdes;

d) on accumule la codéine dans ladite culture contenant des cellules cytodifférenciées, et

e) on recueille la codéine de la culture résultante.

Cette invention englobe aussi, à titre de moyen pour la mise en œuvre du procédé, la culture réalisée dans l'étape c.

Dans le dessin annexé, on montre l'état de culture de cellules à croissance limitée et cytodifférenciées pour les cellules de *Papaver somniferum* L. Les cellules polyploïdes cytodifférenciées sont montrées en A et les cellules non différenciées en B, ces dernières étant en général agglomérées.

Notre expérience avec des cultures de *Papaver*, ainsi qu'avec d'autres souches cellulaires provenant de plantes médicinales, montre que les conditions cytophysiologiques favorables à la production de métabolites nécessitent un certain degré de différenciation. En général, la quantité de métabolites accumulés est d'autant plus grande que le pourcentage de cellules différenciées est plus élevé. Comme la différenciation et la division cellulaires s'excluent mutuellement, une participation extrême des cellules à la différenciation devrait empêcher une culture de proliférer. La différenciation des cellules peut être induite par un déclin des facteurs limitateurs de croissance, par exemple l'azote, les hydrates de carbone, les hormones de croissance. Au cours du temps, une culture parvient à un moment où un facteur limitateur de croissance se trouve épuisé, et la croissance par division cellulaire est remplacée par une différenciation des cellules.

Dans les cultures de cellules de *Papaver somniferum* L. à croissance limitée, on a constaté que cette différenciation fournit des cellules géantes qui sont polyploïdes et qui forment des protubérances sur les agrégats de cellules non différenciées et plus petites. Dans ces cultures, l'apparition de ces cellules coïncide avec la production de codéine. On pense que les cellules géantes sont le site d'accumulation de la codéine. Une similitude entre les cellules géantes et les laticifères (grosseur, polyploïdité, apparition de multinucléation, pigmentation) est suggérée. La sélection initiale de souche cellulaire pour la formation de codéine peut, par conséquent, être une sélection fondée sur l'aptitude à la cytodifférenciation, spécifiquement à la formation de cellules géantes comme décrit.

N'importe quelle culture de cellules provenant d'explants (inocula) de *Papaver somniferum* L. ou de *P. setigerum* DC. choisie pour la facilité avec laquelle elle se cytodifférencie après induction au moyen des conditions de culture décrites peut être utilisée conformément à l'invention.

Bien que le potentiel biosynthétique de cellules cultivées *in vitro* puisse être capté pour assurer la synthèse et l'accumulation de métabolites spécifiques à l'espèce, le taux de production et la quantité de produits sont, au moins en partie, déterminés par le génotype d'une lignée cellulaire spécifique. Ainsi, au moyen d'une sélection pour une cytodifférenciation donnant de nombreuses cellules géantes, des lignées cellulaires douées de qualités supérieures pour la production de métabolites peuvent être obtenues. Une technique possible pour faire varier le génotype d'un matériel végétal serait l'induction de mutations dans les cellules et la sélection de lignées cellulaires mutantes d'après leur capacité à subir une cytodifférenciation en cellules géantes, accompagnée d'un accroissement du taux de synthèse et d'accumulation de la codéine.

La partie du pavot à opium dont proviennent les explants ou cellules initiales peut varier, c'est-à-dire que des cellules de jeunes plants, de parties florales, de têtes de semences, de feuilles, de tiges, de racines, etc., peuvent être utilisées pour faire démarrer la culture initiale de cellules. De préférence, les cellules proviennent de jeunes plants ou de parties florales comprenant des microspores. Les cellules de jeunes plants (explants hypocotyles), les cellules de têtes de semences ou les cellules d'anthères sont particulièrement préférées. Ces cellules peuvent être maintenues sur divers milieux nutritifs de culture de cellules végétales et servent d'inoculum. Pour la production de codéine, ces cellules sont inoculées dans un milieu de culture approprié, et on laisse les cellules se multiplier en présence de lumière. Afin de développer les cellules polyploïdes cytodifférenciées nécessaires à la mise en œuvre de l'invention, il convient de laisser le milieu s'appauvrir en au moins une substance nutritive nécessaire à la croissance, c'est-à-dire qu'elles deviennent limitatrices de la croissance. Dans ces conditions limitatrices, nous avons trouvé que la cytodifférenciation se produit, conduisant à l'apparition de grandes cellules polyploïdes. Ces cellules polyploïdes sont plus grandes que les cellules initiales (non différenciées) et paraissent le plus souvent fixées à la surface d'amas ou d'agglomérats de cellules plus petites.

Les milieux nutritifs utilisés pour la culture, la cytodifférenciation (et la production ultérieure de codéine) peuvent être les mêmes que ceux utilisés pour la culture initiale ou inoculum, ou être différents. On peut utiliser n'importe quel bon milieu de culture pour cellules végétales, dans lequel une ou plusieurs des substances nutritives nécessaires à la croissance des cellules est en proportion telle qu'elle s'épuise avant les autres, afin que le milieu devienne limitateur de croissance. Des exemples de milieux appropriés sont donnés dans les tableaux 1 et 2. D'autres détails sur de tels milieux et leur préparation sont donnés dans l'ouvrage «Plant Tissue Culture Methods», O.L. Gamborg et L.R. Wetter, Editors, 1975 (édité par National Research Council of Canada, Prairie Regional Laboratory, Saskatoon, Saskatchewan, Canada S7N 0W9).

Tableau 1

Composition de milieux à base de sels minéraux pour la culture de tissus et cellules végétales

Macronutriments	MS		ER		B5	
	mg/l	mM	mg/l	mM	mg/l	mM
NH ₄ NO ₃	1650	20,6	1200	15,0	—	—
KNO ₃	1900	18,8	1900	18,8	2500	25
CaCl ₂ · 2H ₂ O	440	3,0	440	3,0	150	1,0
MgSO ₄ · 7H ₂ O	370	1,5	370	1,5	250	1,0
KH ₂ PO ₄	170	1,25	340	2,5	—	—
(NH ₄) ₂ SO ₄	—	—	—	—	134	1,0
NaH ₂ PO ₄ · H ₂ O	—	—	—	—	150	1,1

Tableau I (suite)

Micronutrients	MS		ER		B5	
	mg/l	μM	mg/l	μM	mg/l	μM
KI	0,83	5,0	—	—	0,75	4,5
H ₃ BO ₃	6,2	100	0,63	10	3,0	50
MnSO ₄ · 4H ₂ O	22,3	100	2,23	10	—	—
MnSO ₄ · H ₂ O	—	—	—	—	10	60
ZnSO ₄ · 4H ₂ O	8,6	30	—	—	—	—
ZnSO ₄ · 7H ₂ O	—	—	—	—	2,0	7,0
Zn · Na ₂ EDTA	—	—	15	37	—	—
Na ₂ MoO ₄ · 2H ₂ O	0,25	1,0	0,025	0,1	0,25	1,0
CuSO ₄ · 5H ₂ O	0,025	0,1	0,0025	0,01	0,025	0,1
CoCl ₂ · 6H ₂ O	0,025	0,1	0,0025	0,01	0,025	0,1
Na ₂ · EDTA	37,3	100	37,3	100	37,3	100
FeSO ₄ · 7H ₂ O	27,8	100	27,8	100	27,8	100
Saccharose	30 000	—	40 000	—	20 000	—
pH	5,7	—	5,8	—	5,5	—

Tableau 2

Quantités et espèces de vitamines, hormones et compléments utilisés avec les milieux à base de sels minéraux pour les cultures sur gélose et en suspension

Composé	MS	ER	B5
	mg/l	mg/l	mg/l
Inositol	100	—	100
Acide nicotinique	0,5	0,5	1,0
Pyridoxine · HCl	0,5	0,5	1,0
Thiamine · HCl	0,1	0,5	10,0
Glycine	2,0	2,0	—
IAA	1-30	—	—
NAA	—	1,0	—
Kinétine	0,04-10	0,02	0,1
2,4-D	—	—	0,1-2,0

Il est préférable de choisir les meilleurs milieux tant pour la culture initiale et la préparation de l'inoculum que pour la croissance, la cytodifférenciation et la production ultérieure de codéine. Nous avons trouvé avantageux de fortifier le milieu, spécialement pour l'étape de croissance, avec des sources d'azote organiques, telles que l'hydrolysate de caséine, le lait de coco, et avec une cytokinine, chacun avantageusement dans des limites de concentration allant d'environ 0,1 à 5 ppm. Normalement le milieu contient une source de carbone, une source d'azote, des sources de Ca, Mg, P, S et K, et des oligo-éléments, des vitamines et des phytohormones. Bien que l'acide 2,4-dichlorophénoxyacétique soit la phytohormone généralement ajoutée, il peut être remplacé par l'acide 1-naphtalénacétique ou l'acide 3-indolacétique, généralement en proportions d'environ 0,1 à 2 mg/l.

L'entretien des cellules est obtenu aisément par transfert dans un milieu frais ou par reconstitution du milieu à intervalles d'environ 1 à 4 semaines. Ces cellules en croissance peuvent fournir l'inoculum ou, lorsqu'on les laisse dans un milieu qui devient limitateur de croissance et qu'on leur permet de se cytodifférencier après la cessation de la croissance, alors la codéine peut être accumulée et recueillie. Les températures usuelles pour les cultures de cellules végétales conviennent ici également (par exemple entre environ 20 et 40 °C) pour la préparation de l'inoculum, la croissance et l'accumulation de codéine. Le laps de temps s'écoulant entre l'inoculation et l'état limi-

25 tateur de croissance est en général d'environ 1 à 3 semaines, suivant la quantité d'inoculum, le milieu et les conditions de croissance.

L'état limitateur de croissance dans ces milieux conduit au développement de cellules polyploïdes cytodifférenciées, comme montré en A dans le dessin. Ces cellules polyploïdes sont en général environ 5 à 10 fois plus grosses, ou davantage, que les cellules non différenciées, et ont des diamètres moyens d'au moins environ 100 μ. On a observé des cellules géantes allongées dont la grande dimension atteignait 1000 μ ou plus. Les cellules non différenciées sont diploïdes, contrairement à ces cellules cytodifférenciées polyploïdes. Des observations microscopiques répétées ont révélé que les grandes cellules polyploïdes s'agglomèrent fréquemment autour d'amas ou d'agregats de cellules non différenciées, par exemple comme montré en A et B respectivement dans le dessin. Comme ces cellules polyploïdes ont toujours été observées lorsque de la codéine était produite, on pense qu'elles coïncident avec la synthèse de la codéine et sont nécessaires à cette synthèse. Au moins environ 10% du total des cellules devraient être de ce type polyploïde pour l'accumulation de codéine.

On laisse la culture à croissance limitée accumuler de la codéine sous la lumière. En général, cette accumulation de codéine prend environ 15 à 30 d, après quoi le taux de production décline, mais cela dépend de nombreux facteurs. Ensuite, on recueille la codéine, par exemple par extraction dans un solvant organique approprié, puis, si désiré, on l'isole de l'extrait. Parmi les solvants organiques appropriés, on peut citer l'acétate d'éthyle, le chloroforme, le méthanol, l'éthanol et l'isopropanol. Les techniques chromatographiques conviennent très bien pour isoler la codéine des matières extraites, comme cela est connu.

Exemple:

Préparation de la culture de cellules

Des semences de *Papaver somniferum* L. cv Marianne ont été stérilisées en surface et on les a fait germer sur du papier-filtre humide dans des capsules. Des hypocotyles de plantules âgées de 5 à 6 d ont été explantés sur du milieu nutritif B5 (comme dans les tableaux 1 et 2) contenant 1 mg/l d'acide 2,4-dichlorophénoxyacétique et qui était solidifié au moyen de 0,6% de gélose. Ce milieu avait un pH de 5,5 avant la stérilisation à l'autoclave. Au bout de 6 semaines, les hypocotyles explantés ont produit des cals, une croissance néoplastique, de 3 à 10 mm de diamètre. Le cal a été transféré sur du milieu B5 frais additionné de 1 g/l d'hydrolysate de caséine et de 2 mg/l de kinétine (milieu I-B5C). La matière calleuse a été subcultivée toutes les quatre semaines en utilisant de petits morceaux de cal comme inocu-

lum. Au bout de six mois de subculture, on a transféré la matière calleuse dans du milieu liquide 1-B5C et, de là, on l'a subculti-
vée en lots de 50 ml dans des fioles Delong de 250 ml sur des secoueuses
giratoires (150 tr/min). La suspension résultante de cellules et
d'agrégats cellulaires a été transférée dans du milieu 1-B5C frais une
fois par semaine. La croissance de toutes ces cultures a été effectuée
sous une lumière permanente de 800-1000 lx à 25-28° C. Pour la pro-
duction de biomasse et la cytodifférenciation de la culture, condui-
sant à la formation de codéine, on a recueilli l'inoculum de ces cultu-
res en suspension (sur des filtres stériles) et on a incubé environ 2 g
de masse cellulaire avec environ 300 ml de milieu 1-B5C dans des
récipients de 1 l.

Les cultures en lots de 50 ml qui étaient transférées à intervalles
d'une semaine consistaient principalement en petits agrégats de cel-
lules d'un diamètre allant jusqu'à environ 1 mm. Ces agrégats ren-
fermaient parfois moins de 5% de cellules de grande taille (diamètre
moyen > 100 µ) contenant un ou plusieurs noyaux polyploïdes (ces
cellules n'étaient pas à croissance limitée et étaient incapables de
produire de la codéine). Ces agrégats avaient une pigmentation
variant du brun foncé au blanc. Lorsqu'on a laissé ces cultures (ou
les cultures de production de 300 ml) devenir complètement à crois-
sance limitée, une cytodifférenciation conduisant à l'apparition de
cellules géantes en nombres croissants s'est produite. Environ de 10
à 50%, ou plus, des cellules peuvent être de ce type géant.

Un arrangement de cellules typique provenant de l'une des cultu-
res de 300 ml différenciées, à croissance limitée, est montrée dans le
dessin, où A désigne les cellules géantes et B les cellules normales. Ce
dessin est fondé sur plusieurs microphotographies.

Isolement de la codéine

Après incubation et accumulation de codéine dans le milieu 1-
B5C pendant trois semaines, on a extrait le milieu (300 ml) avec de
l'acétate d'éthyle (2 × 50 ml), tandis qu'on traitait les cellules avec
du méthanol bouillant (150 ml). On a réuni les extraits méthanol-
iques et d'acétate d'éthyle et on les a évaporés, ce qui a laissé une
matière jaunâtre à brun clair, que l'on a redissoute dans un mélange
acétate d'éthyle/HCl 1N (1/1) (2 × 50 ml). Les deux couches ont été
recueillies séparément. On a lavé la solution dans l'acétate d'éthyle
avec du HCl 1N (10 ml), on a recueilli les liqueurs de lavage et on les
a réunies à la couche acide obtenue précédemment. On a traité la
solution acide avec du bicarbonate de sodium jusqu'à pH 7,5-8,0 et
on a filtré. Après filtration, on a extrait le filtrat avec de l'acétate
d'éthyle (2 × 25 ml) et on a réuni ces extraits avec l'extrait dans
l'acétate d'éthyle obtenu précédemment. L'évaporation a fourni une
matière jaunâtre à brun (98 mg) que l'on a purifiée par chromato-
graphie sur couche mince, sur des plaques de gel de silice (0,25 mm)
en utilisant EtOAc/MeOH/NH₄OH (85/10/5) pour le développe-
ment et CHCl₃/MeOH (8/2) comme éluant. Cela a fourni une codéine
de pureté raisonnable (1,2 mg) ayant le même R_f(0,22) que de la
codéine authentique, lorsqu'elle a été cochromatographiée sur
couche mince comme ci-dessus (p.f. 146-148° C non corrigé, litt. 154-
155°). Le rendement a été d'environ 0,15% par rapport au poids sec
des cellules (722,2 mg). Les valeurs trouvées au spectromètre de
masse ont également servi à identifier la codéine produite.

Le spectre de masse a présenté un ion moléculaire à m/e 299, cor-
respondant à C₁₈H₂₁NO₃, la formule brute de la codéine, et a été
identique à celui de la codéine authentique.

