

# STIMULATION PAR LES CYTOKININES DE L'ACCUMULATION ALCALOÏDIQUE DANS DES SUSPENSIONS CELLULAIRES: IMPLICATION DE L'ETHYLENE COMME SECOND MESSAGER ?

## Résumé

Dans ce travail, nous avons cherché à savoir si l'éthylène pouvait être impliquée lors de la stimulation de la production alcaloïdique par les cytokinines dans les suspensions cellulaires de *Catharanthus roseus*. La stratégie expérimentale a été double: 1) modifier les teneurs en éthylène endogène en traitant les cellules par différents agonistes ou antagonistes de la voie de biosynthèse de l'éthylène, 2) soumettre les cellules à des apports exogène d'éthylène.

Les résultats obtenus montrent que les inhibiteurs de l'éthylène AVG,  $Co^{+2}$  bloquent partiellement la stimulation alcaloïdique dans les cellules traitées par les cytokinines alors que le précurseur de l'éthylène ACC n'a pas d'effet sur la production alcaloïdique dans les cellules non traitées par les cytokinines. En revanche, lorsque l'éthylène est apporté de manière exogène (traitement par l'éthéphon), la production alcaloïdique est multipliée par quatre.

**Mots clés :** *C.roseus*, éthylène, cytokinine, alcaloïdes indoliques.

## Abstract

In this work, we have investigated to know if the ethylene could be implied during the stimulation of the alkaloid production by cytokinins in cellular suspensions of *Catharanthus roseus*. The experimental strategy has been double: 1) to modify contents in ethylene endogene by processing cells by different agonists or antagonists of ethylene biosynthesis way, 2) to submit cells to contributions exogene of ethylene.

The obtained results show that the inhibiteurs of the ethylene AVG,  $Co^{+2}$  block partially the stimulation alkaloid in cells processed by the cytokinins while the precursor of the ethylene ACC has no effect on the alkaloid production in cells not processed by the cytokinins. On the other hand the ethylene is brought manner exogene (treated by the ethéphon), the alkaloid production is multiplied by four.

**Key words:** *Catharanthus roseus*, cytokinin, ethylene, alcaloïdes indolic.

## A. YAHIA

Institut des Sciences Naturelles  
Oum El Bouaghi - Algérie

## J. CRECHE

Faculté de Pharmacie  
EA -2160  
Tours - France

## S. RHOUATI

Institut de Chimie  
Université Mentouri  
Constantine (Algérie)

## ملخص

بحثنا في هذا العمل عما اذا كان باستطاعة الاثيلين التدخل عند تحفيز الانتاج القلويدي بواسطة السيبتوكينينات في المعلقات الخلووية ل *Catharanthus roseus*. ان الاستراتيجية التجريبية كانت مزدوجة: (1) تغيير كميات الاثيلين الداخلي بمعالجة الخلايا بواسطة منشطات و مثبطات مختلفة لطريق البناء الحيوي للاثيلين، (2) وضع الخلايا تحت اضافات خارجية للاثيلين.

بينت النتائج المتحصل عليها بأن مثبطات الاثيلين AVG,  $Co^{+2}$  تعيق جزئيا التحريض القلويدي في الخلايا المعالجة بالسيبتوكينينات في حين بان مسبق الاثيلين ACC ليس له اثر على الانتاج القلويدي في الخلايا غير المعالجة بالسيبتوكينينات, بالمقابل عند اضافة الاثيلين خارجيا (المعالجة بالا Ethéphon) فان الانتاج القلويدي يتضاعف الى اربع مرات.

**الكلمات المفتاحية:** *Catharanthus roseus*, السيبتوكينينات، الاثيلين، أندوليك القلويدي.

Les cytokinines contrôlent de nombreux aspects de la croissance et de la différenciation des végétaux et certains effets des cytokinines sont comparables au effets de l'éthylène [1]; de plus, on sait que les cytokinines peuvent stimuler la production d'éthylène [2].

Depuis plusieurs années, notre équipe étudie les mécanismes qui contrôlent la production des alcaloïdes indoliques dans des suspensions cellulaires de *Catharanthus roseus*.

Nous avons pu montrer que:

- 1/ Les cytokinines déclenchent la production alcaloïdique dans des souches non-productrices.
- 2/ la voie des terpènes est limitante pour les souches non-productrices [3, 4].

Le rôle de l'éthylène dans la stimulation de la biosynthèse de terpènes est bien connu, particulièrement au cours du mûrissement de fruits, et cette hormone intervient également dans la production de phytoalexines terpéniques (phytubérine, phytubérol, capsidiol) dans des cultures de tabac soumise à divers stress [5, 6].

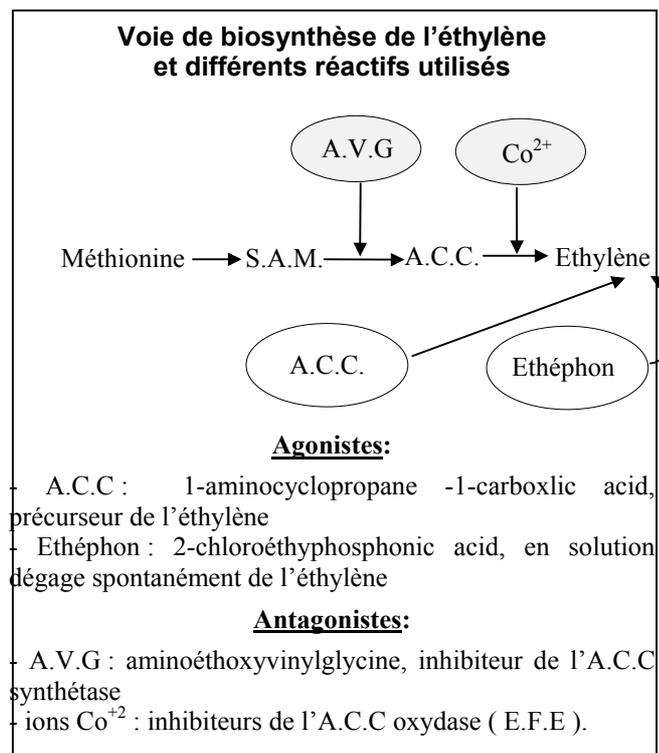
Dans ce travail, nous avons utilisé une double stratégie:

- 1/ modifier les teneurs en éthylène endogène en traitant les cellules par différents agonistes ou antagonistes de la voie de biosynthèse de l'éthylène.

2/ soumettre les cellules à des apports d'éthylène exogène (sous forme d'éthéphon) afin de comparer les effets des CK et de l'éthylène exogène sur l'accumulation des alcaloïdes.

Notre objectif était de rechercher une implication de l'éthylène lors de la stimulation de la production alcaloïdique par les cytokinines dans les suspensions cellulaires de *C. roseus*.

## MATERIEL ET METHODES



## MATERIEL VEGETAL

- 1/ Souche C20D (2,4 - D dépendant) de *C. roseus* (L) G. Don, Apocynacées [7].
- 2/ Milieu de culture : Milieu B5 [ 8].
- 3/ Repiquage du 1/10 ème dans des fioles de 250 ml à l'obscurité sous 24°C; agitation continue à 100 rpm.

## PROTOCOLE EXPERIMENTAL

- 1/ Les cellules ont été repiquées au temps  $t = 0$ , dans un milieu sans 2,4 -D.
- 2/ Les cellules ont été traitées par les différents réactifs au temps  $t = +3$  jours.
- 3/ Les cellules ont été récoltées au temps  $t = +7$  jours; elles ont été pesée, puis lyophilisées.

## DETERMINATION DES TENEURS EN ALCALOÏDES

L'ajmalicine produite majoritairement a été choisie comme marqueur de l'accumulation alcaloïdique.

Les teneurs en ajmalicine sont déterminées par spectrofluorodensitométrie après chromatographie d'un extrait méthanolique de poudre sèche sur couche mince de

gel de silice. Les plaques sont révélées par pulvérisation de C.A.S., séchées à l'étuve à 60°C pendant 30 min, avant d'être analysées ( Scanner CS920 , Shimadzu).

## RESULTATS

### Effets de différentes concentration en A.V.G. sur la croissance et l'accumulation de L'ajmalicine dans la souche C<sub>20</sub>D (Fig.1)

Les cellules repiquées, à  $t = 0$  dans un milieu sans 2,4-D ont été traitées à  $t = +3$  jours, avec l'A.V.G. à différentes concentrations (5, 10, 25  $\mu$ M), en présence ou non de benzyladénine (B.A) à 5  $\mu$ M. Les cultures sont arrêtées à  $t = +7$  jours. Les résultats concernant la croissance représentent la biomasse par fiole. Les données numériques correspondent à la moyenne de trois échantillons écart type.

Des essais ont été dupliqués.

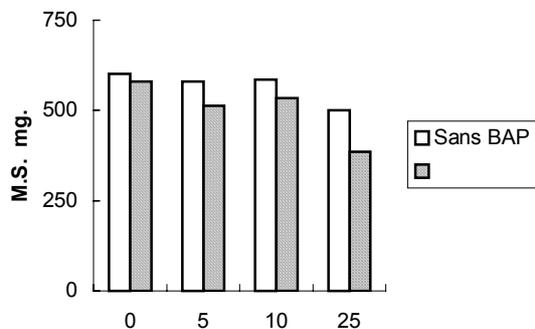
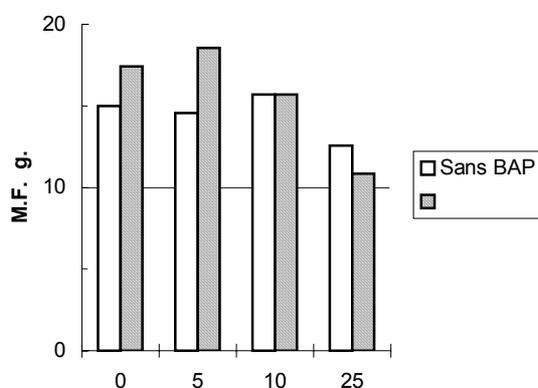


Figure 1.

**Effets des ions  $Co^{+2}$  sur la croissance et l'accumulation de l'ajmalicine dans la souche  $C_{20}D$  (Fig. 2)**

les cellules ont été traitées selon le même protocole que celui utilisé pour l'A.V.G. Les résultats sont exprimés en pourcentage par rapport au témoin. Les données représentent la moyenne de trois expériences.

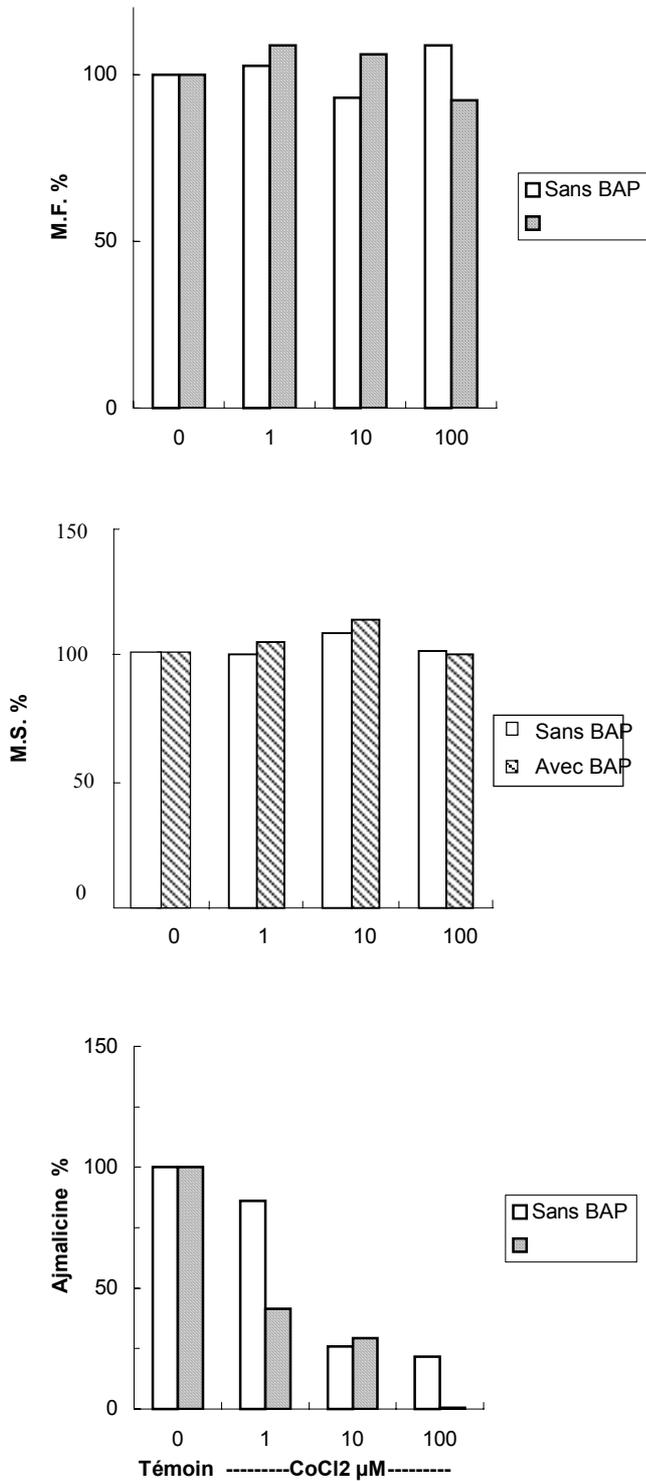


Figure 2.

**Effets de l'A.C.C sur la croissance et l'accumulation de l'ajmalicine dans la souche  $C_{20}D$  (Fig. 3)**

Les cellules ont été traitées comme précédemment. Les résultats exprimés en pourcentage par rapport au témoin correspondent à deux expériences indépendantes. La concentration en A.C.C. en  $10\mu M$ , déterminée lors d'expériences ultérieures, est la concentration optimale qui n'a pas d'effet sur la croissance des cellules.

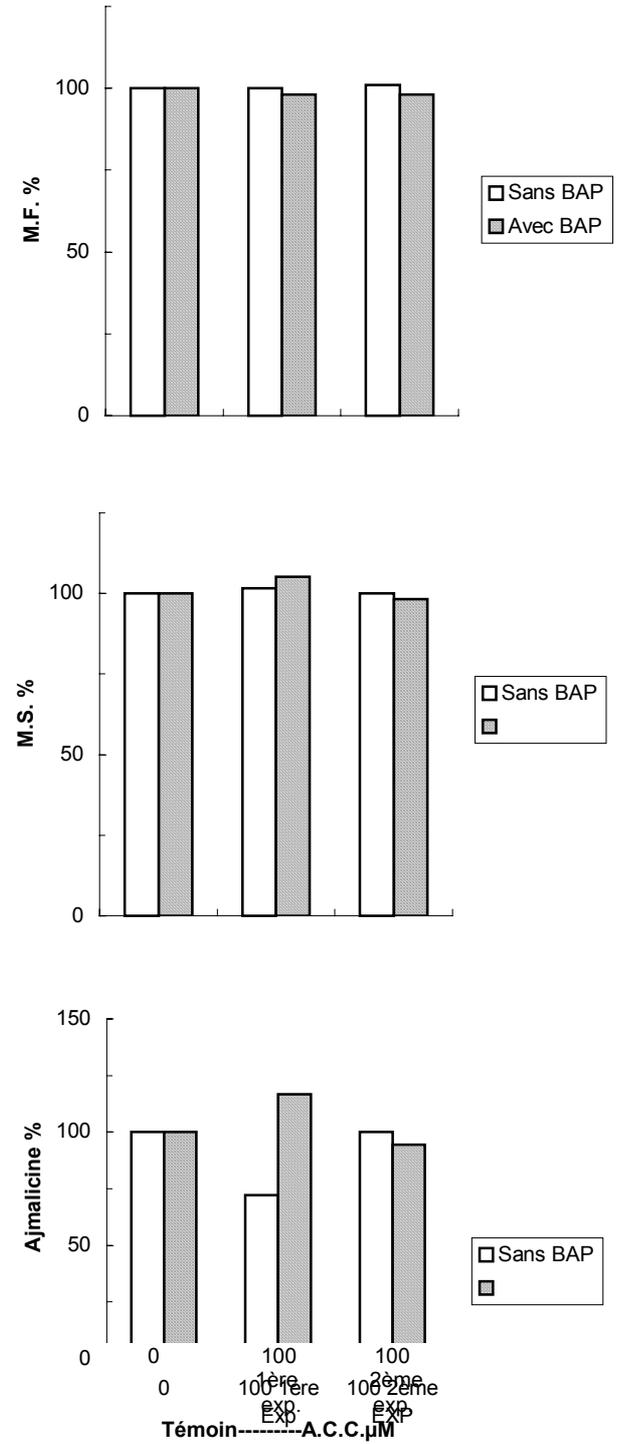


Figure 3.

### Effets de différentes concentration en éthéphon sur la croissance et l'accumulation de l'ajmalicine dans la souche C<sub>20</sub>D (Fig 4.)

Les cellules ont été repiquées à t = 0 dans un milieu sans 2,4-D puis traitées à t = +3 jours avec différentes concentration, en éthéphon en présence ou non de B.A à 5 µM. Les cultures ont été arrêtées à t = +7 jours. Nous avons vérifié dans des fioles témoins que la formation d'acide phosphorique qui a lieu au cours de la réaction libérant l'éthylène ne modifiait pas de manière importante le pH du milieu (pH= 0.2 unité).

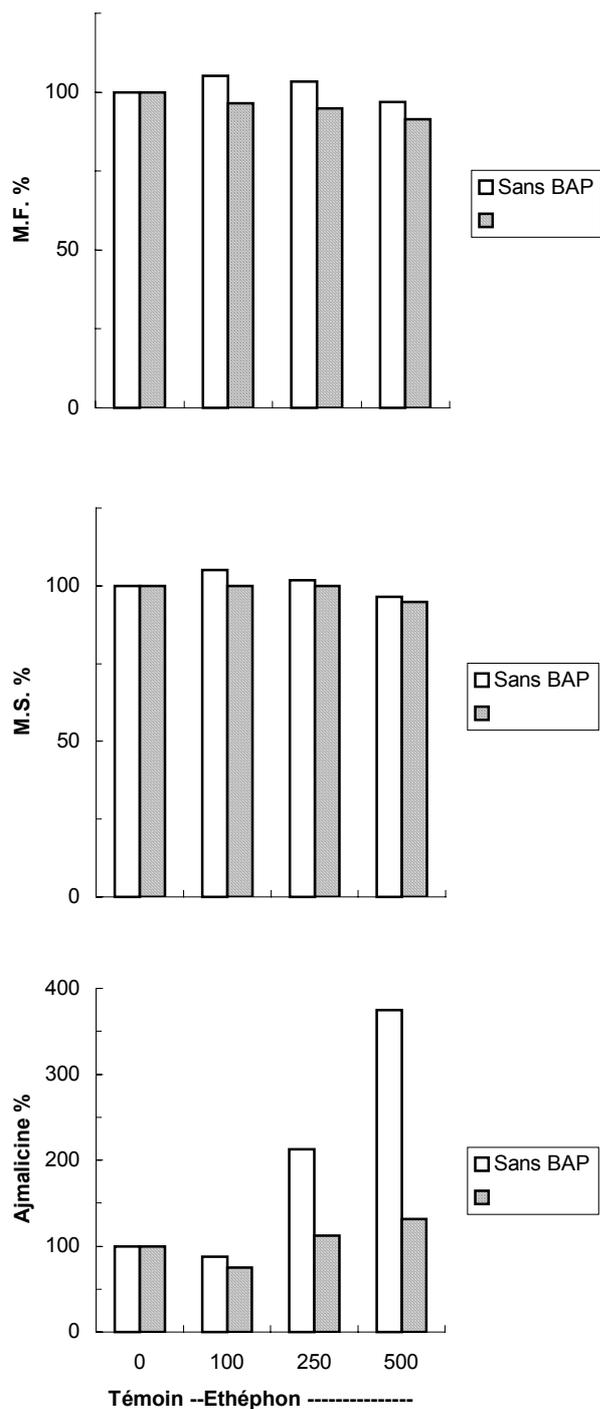


Figure 4.

### Cinétique d'action de l'éthéphon (500 µM) sur des cellules de la souche C<sub>20</sub>D cultivées avec ou sans BA (5 µM) (Fig.5)

Les cellules repiquées dans un milieu sans 2,4-D ont été traitées ou non avec la BA à t = + 3 jours. L'éthéphon a été ajouté stérilement dans les fioles respectivement 48h, 24h, et 6h avant l'arrêt des cultures.

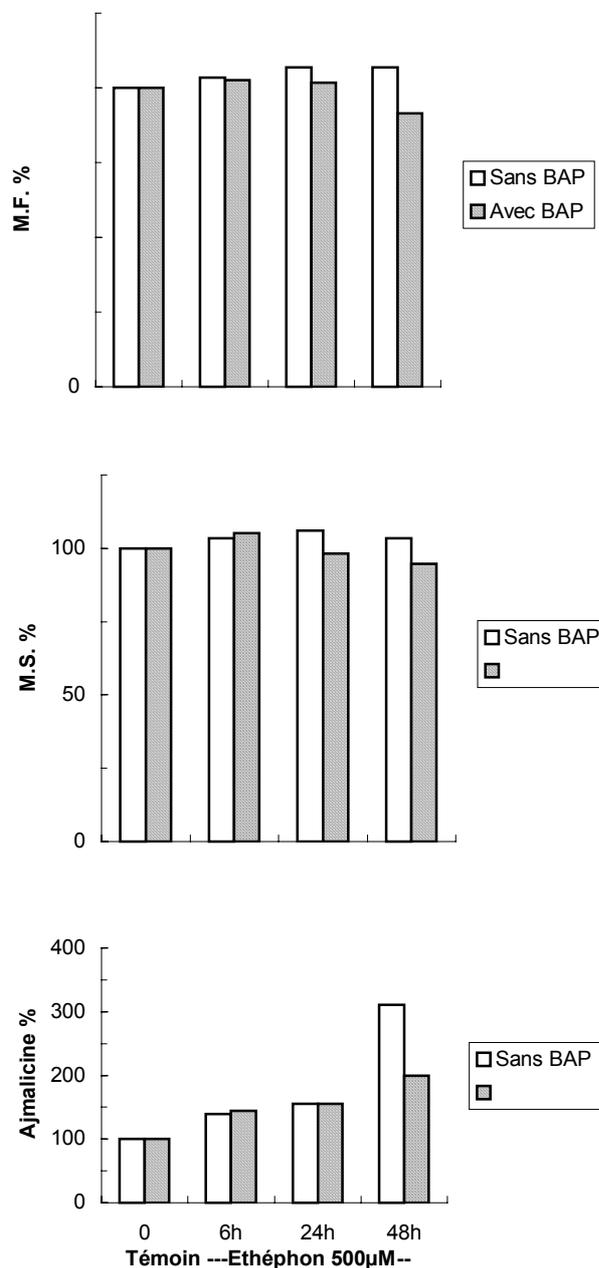


Figure 5.

### DISCUSSION

Les expériences réalisées ici avec des réactifs connus pour leurs actions antagonistes vis-à-vis de la biosynthèse de l'éthylène (A.V.G., Co<sup>+2</sup>) montrent que l'on peut bloquer partiellement l'accumulation des alcaloïdes indoliques

induite par les cytokinines. Il faut remarquer que certains de ces réactifs peuvent présenter des effets non spécifiques sur l'accumulation alcaloïdique, sans affecter la croissance des cellules. Par exemple, les ions  $\text{Co}^{+2}$  entre 1 et 100  $\mu\text{M}$  modifient peu la croissance; par contre, une concentration de 1  $\mu\text{M}$  est déjà inhibitrice vis-à-vis de l'accumulation alcaloïdique dans les cellules témoins.

L'action de l'A.V.G. est plus nette. A la dose de 5  $\mu\text{M}$ , l'accumulation alcaloïdique induite par la BA est réduite de plus de 50% sans effet notable sur la croissance des cellules et sur l'accumulation alcaloïdique dans les cellules témoins.

Cependant, deux expériences successives réalisées avec l'A.C.C., le précurseur de l'éthylène, ont donné des résultats contradictoires qui ne permettent pas de montrer un effet significatif de ce composé sur les cellules cultivées sans BA par rapport à celles induites par la BA [9, 10, 11].

Dans l'état actuel de nos travaux, il semble difficile d'affirmer que la stimulation de l'accumulation alcaloïdique induite par les cytokinines dans la souche C<sub>20</sub>D de *C. roseus* soit due à la production d'éthylène endogène par les cellules [1].

En revanche, les expériences consistant à soumettre les cellules à des apports d'éthylène exogène ont donné des résultats plus nets, en particulier avec l'éthéphon. Ce composé stimule très nettement la production des alcaloïdes indoliques dans les cellules C<sub>20</sub>D et cet effet est plus marqué en absence de BA. La dose optimale qui n'affecte pas la croissance des cellules se situe vers 500  $\mu\text{M}$ . Dans ces conditions, la production alcaloïdique est multipliée par quatre par rapport aux cellules témoin [12].

De plus, ce composé agit rapidement puisque son effet est significatif après seulement un temps d'action de 6 heures, ce qui confirme le découplage entre l'éthylène et les cytokinines dans notre modèle. En effet, nous avons montré par ailleurs que le temps d'action minimale pour les cytokinines était d'environ 48h.

Nous n'avons toutefois pas pu retrouver cet effet en soumettant les cellules à l'action de l'éthylène gazeux. En effet, ce type d'expérience nécessite la culture des cellules dans une ambiance confinée qui inhibe totalement les

capacités de biosynthèse des alcaloïdes chez *C. roseus*, certainement à cause d'une trop forte hypoxie [13].

Nos travaux s'orientent actuellement vers l'étude des effets de l'éthylène au niveau de la voie des terpènes qui est la voie limitante pour la biosynthèse des alcaloïdes indoliques chez *C. roseus*.

### **Abréviations**

AVG: aminoethoxyvinylglycine,  
ACC :1-amino cyclopropane-1carboxylic acid  
Ethéphon : 2- Chloroethylephosphonic acid.  
CAS : cérium ammonium sulfate.

### **REFERENCES**

- [1]- Cary A.J., Liu W., Howell S.H., *Plant Physiol.*, 107 (1995), pp.1075-1082.
- [2]- Abeles F.B., Morgan P.W., Salveit M.E., *Ethylène in plant biology*, Academic Press, New York, (1992).
- [3]- Décendit A., Liu W., Ouelhazi L., Doireau P., Mérillon J.M., Rideau M., *Plant Cell Rep.*, 11 (1992), pp.400-440.
- [4]- Doireau P., Mérillon J.M., Guillot A., Rideau M., Chénieux J.C., *Planta Medic.*, 53 (1987), pp.364-367.
- [5]- Uegaki R., Fujimori T., Kubos S., Katok., *Phytochemistry*, 19 (1980), pp.1543-1547.
- [6]- Milat M.L., Ricci P., Bonnet P., Blein J.P., *Phytochemistry*, 30 (1991), pp.2171-2173.
- [7]- Potier P., *Pour la Science*, 171 (1992), pp.8-9.
- [8]- Gamburg O.L., Miller R.A. Ojima K., *Exp. Cell Research*, 50 (1968), pp.151-158.
- [9]- Songstad D.D., Giles K.L., Park J., Novakovski D., Epp O., Friessen L., Roewer I., *Plant Cell Rep.*, 8 (1989), pp.463-466.
- [10]- Piatti T., Boller T., Brodelius P.E., *Phytochem.*, 30 (1991), pp.2151-2154.
- [11]- Kobayashi Y., Fukui H., Tabata M., *Plant Cell Rep.*, 9 (1991), pp.496-499.
- [12]- Cho G.H., Kim D.I., Pedersen H., Chin C.K., *Biotech. Prog.*, 4 (1988), pp.184-188.
- [13]- Wasternack C., Parthier B., *Plant Sciences*, 2 (1997), pp.302-307.