

Biomasse et contenu alcaloïdique de cals induits par hormones et par *Agrobacterium tumefaciens* sur différents explants de trois solanacées alcaloïdifères

Callogénèse induite par hormone et bactéries

AMDOUN Ryad^a *; HADJIMI Ghania^b ; KHELIFI-SLAOUI Magda^b ; AMROUNE Samia^b ; et KHELIFI Lakhdar^b

^a Institut National De Recherche Forestière (INRF). Bp 37 chéraga - Bainem. Alger

^b Ecole Nationale Supérieure Agronomique, ENSA-Alger..

* Auteur correspondant : AMDOUN R.

Email : amdoun2006@yahoo.fr

Résumé :

Ce travail vise l'étude de la biomasse et du contenu alcaloïdique de cals induits par hormones et par souches d'*Agrobacterium tumefaciens* sur différents explants de *Datura stramonium*, *D. tatula* et *Hyoscyamus albus*. Les résultats montrent dans l'ensemble que *Agrobacterium tumefaciens* est plus efficace que les hormones pour l'induction de cals ayant une biomasse et un contenu en alcaloïdique élevés. La souche E17 est la plus performante des trois souches testées (C58, E2X).

Mots clés : *Agrobacterium tumefaciens* - alcaloïdique tropanique – cals – hormones – *solanaceae*

1. Introduction

La culture de cellules végétales représente une voie intéressante de production de métabolites secondaires d'intérêts qui parfois ne peuvent être produits par les microorganismes ou par la synthèse chimique (Mulabagal et Tsay, 2004). La production de ces métabolites par des procédés biotechnologiques à partir des cellules végétales donne en général de faible rendement (Giri et Narasu, 2000).

La production est souvent confrontée à un problème majeur qui est la faible expression des gènes responsables des voies de biosynthèse de ces molécules au niveau des cellules végétales (Alfermann et Reinhard, 1980). Cependant, la culture de cals *in vitro* pour la production de métabolites secondaires donne des résultats prometteurs (Anjum *et al.* 2017 ; Azeez *et al.*, 2017 ; Mohiuddin *et al.*, 2018). Un niveau alcaloïdique élevé, par rapport à la plante mère, a été observé chez des tumeurs

induites par *Agrobacterium tumefaciens* (crown gall) isolées des tiges de *Datura metel* et *D. tatula* (Cosson et Kuntzmann-Cougoul, 1979). En effet, les tumeurs induites par les souches B₆ et T₃₇ présentent un taux alcaloïdique 5 à 10 fois plus élevé que les tiges saines pour la souche B₆ et 2 fois plus élevé pour la souche T₃₇ (Cosson et Kuntzmann-Cougoul, 1979). L'induction de cals par des souches d'*Agrobacterium tumefaciens* pourrait donc être une alternative intéressante pour la production d'alcaloïdes par voies biotechnologiques.

Ce travail vise l'étude de la biomasse et du contenu alcaloïdique de cals induits par des hormones et par *Agrobacterium tumefaciens* sur différents explants chez trois solanacées alcaloïdifères.

2. Matériel et Méthodes

2.1. Induction de cals par hormones

Les cals sont induits sur milieu MS (Murashige et Skoog, 1962) à partir de différents explants (feuille, hypocotyle et racine) issus de vitro semis de *D. stramonium*, *D. tatula* et d'*H. albus* âgés de 02 mois. Le milieu MS est supplémenté avec 0,2 mg d'ANA et 0,02 mg de BAP. La culture est conduite à une température de $26 \pm 1^\circ\text{C}$ et une photopériode de 16 h de lumière/8 h d'obscurité (Demeyer *et al.*, 1992).

2.2. Induction de cals par des souches d'Agrobacterium tuméfaciens

Trois souches d'*Agrobacterium tuméfaciens*, C₅₈, E₂X et E₁₇ sont utilisées pour l'induction de cals à partir d'hypocotyles de *D. tatula* issus de vitro semis âgés de 02 mois. L'infection se fait selon le protocole adopté par Amdoun *et al.* (2009). Les explants sont mis à raison de 04 explants par boîte de Pétri à l'obscurité et à une température de $26 \pm 1^\circ\text{C}$.

Les cals qui se développent sur le site d'infection sont excisés et stérilisés dans une solution contenant 500 mg de céfotaxime durant une heure afin d'éliminer les bactéries. Après trois rinçages à l'eau distillée stérilisée. Les cals sont fractionnés et multipliés sur le milieu MS sans hormones contenant 250 mg/l de céfotaxime. La concentration de la céfotaxime est réduite graduellement jusqu'à une culture sans antibiotique. La culture est conduite à une température de $26 \pm 1^\circ\text{C}$ et une photopériode de 16h de lumière/8h d'obscurité.

2.3. Détermination de la biomasse et extraction des alcaloïdes

La biomasse est mesurée avec une balance de précision. Le poids sec des cals est obtenu après séchage à l'étuve pendant 48 h à 40°C . Les alcaloïdes ont été extraits en utilisant la méthode décrite par Amdoun *et al.* (2009).

2.4. Traitements statistiques

L'analyse de la variance et le test de Newman & Keuls au seuil de 5 % sont utilisés pour traiter les résultats obtenus. Les moyennes suivies de la même lettre alphabétique ne sont pas significativement différentes.

3. Résultats et discussion

3.1. Résultats

Les résultats de l'analyse de la variance de la biomasse et du contenu en H & S sont résumés dans le tableau 1.

3.1.1. Biomasse des cals induits

L'analyse de la variance de la biomasse des cals induits par hormones sur les différentes espèces montre une différence très hautement significative à la 4^{ème} semaine de culture (Tableau 1). Le meilleur résultat est observé pour *D. tatula* et *H. albus* avec 0,11 g/cal soit environ 04 fois plus que la biomasse des cals de *D. stramonium* (Fig. 1).

Tableau 1 : Tableau d'analyse de la variance de la biomasse et du contenu en H & S.

Source	Somme des carrés	Ddl	Carré moyen	F	Probabilité
BIOMASSE					
Espèce	0,049	2	0,025	91,76	0,000***
Résidu	0,006	22	0,0003		
Explant	0,001	2	0,001	1,91	0,171
Résidu	0,006	22	0,0003		
Souche	0,055	3	0,018	21,37	0,000***
Résidu	0,007	8	0,001		
CONTENU H & S					
Espèce	1,074	2	0,537	6,70	0,005**
Résidu	1,762	22	0,080		
Explant	2,918	2	1,459	18,22	0,000***
Résidu	1,762	22	0,080		
Souche	2,066	3	0,689	129,30	0,000***
Résidu	0,043	8	0,005		

Les étoiles (*, **, ***) indiquent le degré de signification des effets observés.

Cependant, on ne note pas de différence statistiquement significative entre les biomasses de cals induits par hormones sur les différents explants (feuilles, hypocotyles, racines) (Tableau 1).

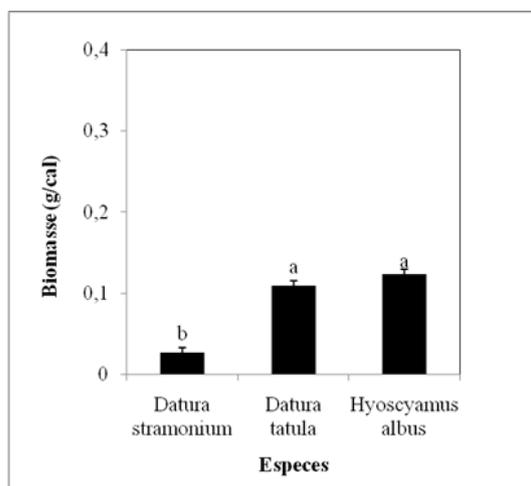


Figure 1 : Biomasse des cals induits par hormones chez trois solanacées après 04 semaines de culture.

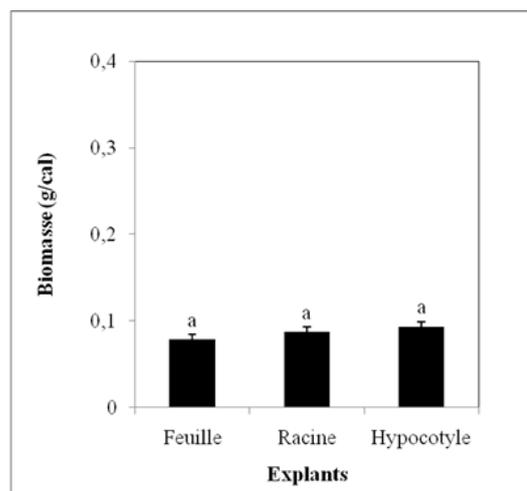


Figure 2 : Biomasse des cals induits par hormones sur différents explants après 04 semaines de culture.

Ce sont les cals induits par les souches bactériennes qui présentent les biomasses les plus importantes, avec en tête la souche E₁₇ suivi de E_{2X} et C₈₅ qui forment le groupe homogène b. La biomasse des cals induits par la souche E₁₇ est trois fois plus élevée que la biomasse des cals induits par les hormones (témoin) (Fig.3).

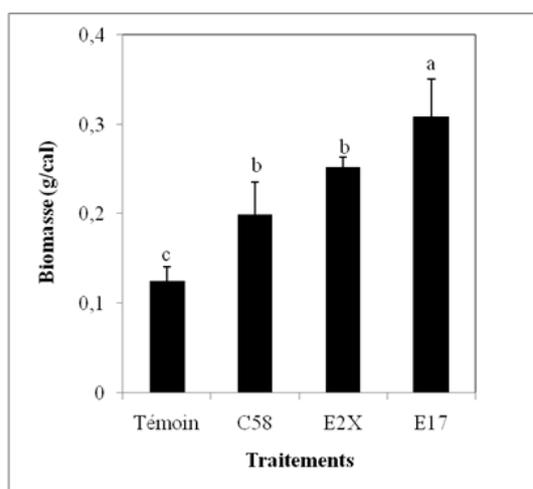


Figure 3 : Biomasse des cals induits par les souches C58, E2X et E17 d'*Agrobacterium tumefaciens* et par les hormones (témoin) à partir des hypocotyles de *D. tatula* après 04 semaines de culture.

3.1.2. Contenu en alcaloïdes des cals induits

L'analyse de la variance du contenu en hyoscyamine + scopolamine (H&S) des cals induits par hormones à la 4^{ème} semaine de culture montre une différence hautement significative par rapport aux espèces et très hautement significative par rapport aux différents explants (Tableau 1). Avec 1,37 mg /g MS, les cals d'*H. albus* sont les plus riches en H&S (Fig. 4). Les cals induits à partir de racines sont les plus riches avec une teneur de 1,56 mg/g MS (Fig. 5).

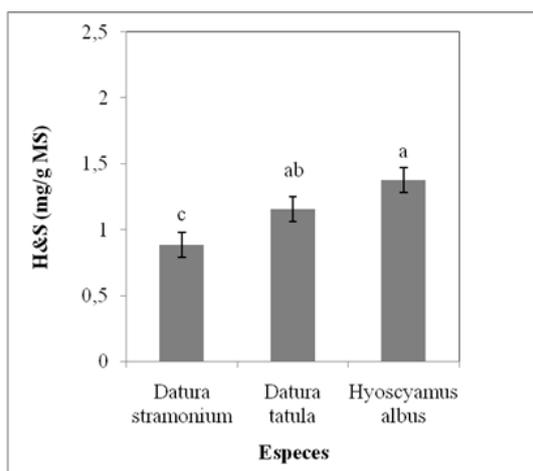


Figure 4 : Contenu en H&S des cals induits par hormones chez trois solanacées après 04 semaines de culture.

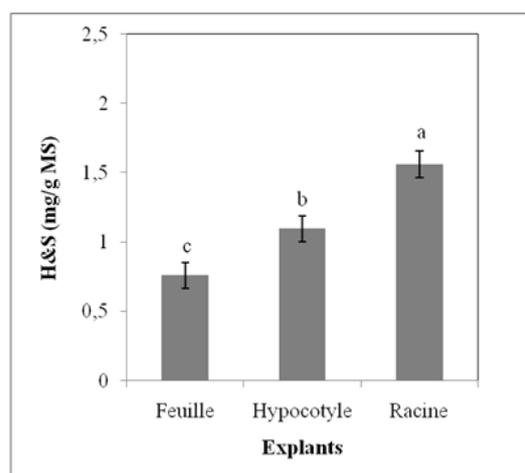


Figure 5 : Contenu en H&S des cals induits par hormones sur différents explants après 04 semaines de culture.

L'ANOVA révèle une différence très hautement significative entre la teneur en H&S des cals induits par souches bactériennes et ceux induits par hormones (Tableau 1). Le meilleur résultat est observé pour la souche E17 (Fig. 6). Les cals induits par cette dernière, présentent presque le double du contenu des cals induits par hormones (Témoin). Cependant, le contenu en H&S des cals induits par les souches E2X et C58, ne diffère pas de celui des cals témoins (Fig. 6).

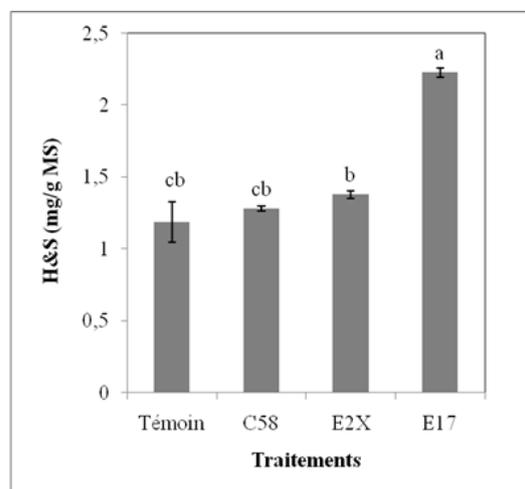


Figure 6 : Contenu en H&S des cals induits par les souches C58, E2X et E17 d'*Agrobacterium tumefaciens* et par hormones (témoin) sur les hypocotyles de *D. tatula* après 04 semaines de culture.

3.2. Discussion

L'influence du génotype (espèce) sur l'obtention de cals ayant une biomasse élevée est importante. D'après Demeyer *et al.* (1992), la biomasse la plus élevée des cals induits par hormones (2,4 D + 0,1 BAP) a été observée chez *D. tatula* par rapport à *D. Chalybea*, *D. godronii*, *D. inermis* et *D. stramonium*. Le même résultat est observé dans notre étude. Le *D. tatula* semble être une espèce performante en matière de propriétés de croissance des cals qu'elle donne *in vitro* sous l'influence des hormones. Bien qu'à des degrés d'influence divers selon les souches, l'*Agrobacterium tumefaciens* est plus efficace que les hormones pour induire des cals avec une biomasse élevée. Dans cette étude, les cals induits par la souche E₁₇ présentent la biomasse la plus élevée. Ceci pourrait être expliqué par le fait que le T-DNA du plasmide Ti de l'*A. tumefaciens* provoque une hyperauxinie entraînant une hyperplasie et l'hypertrophie des cellules conduisant à la multiplication des cellules tumorales (Nester *et al.*, 1984).

Les tumeurs de crown gall induites par les souches B₆ et T₃₇ d'*A. tumefaciens* chez *Datura metel* et *D. tatula* présentent un taux alcaloïdique (H&S), par rapport aux tiges saines, 5 à 10 fois plus important pour la souche B₆ et 2 fois plus pour la souche T₂₇ (Cosson et Kuntzmann-Cougoul, 1979). Dans notre cas, le contenu des cals induits par la souche E₁₇ est presque le double de celui des cals induits par hormones à partir des hypocotyles de *D. tatula*. L'effet du type de souche est donc déterminant sur le contenu alcaloïdique des cals. Ceci pourrait être expliqué par la compétence morphologique subséquente des galls formées de la souche en question. La morphologie tumorale est déterminée par la synthèse différentielle d'auxines et/ou des cytokinines qui diffère d'une souche à une autre. On peut avoir des tératomes (excroissances spontanées) si la souche est virulente ou des tumeurs mal organisées dans le cas contraire (Petit *et al.*, 1983). En effet, la teneur en withanolide était la plus élevée dans les tératomes obtenus sur des vitros semis chez *Withania somnifera* (Ray et Jha, 1999). Le plasmide Ti pourrait influencer l'activation du métabolisme secondaire responsable de la biosynthèse

des alcaloïdes (Cosson et Kuntzmann-Cougoul, 1979). Cette activation est la résultante d'une dérégulation physiologique qui peut provoquer au niveau de la tumeur soit une exaltation de la biosynthèse des alcaloïdes ou, un appel important de métabolites nécessaires à la biosynthèse des alcaloïdes (Goldmann, 1977 ; Cosson et Aaron, 1978 in Cosson et Kuntzmann-Cougoul, 1979).

Il sera utile d'étudier les propriétés de croissance et les teneurs en alcaloïdes d'une suspension cellulaire établie à partir de cals induits par la souche E₁₇ pour pouvoir juger de l'opportunité d'utiliser ce type de matériel végétal pour la production des alcaloïdes par voies biotechnologiques.

4. Remerciements

Nos vifs remerciements vont à Mme. KRIMI, Z. Professeur à l'université Saad Dahleb (Blida) pour nous avoir fourni les souches bactériennes.

5. Références

- Anjum, S., Abbasi, B.H., Hano, C. Trends in accumulation of pharmacologically important antioxidant-secondary metabolites in callus cultures of *Linum usitatissimum* L. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*. 2017, Vol. 129, n°1, p. 73-87.
- Alfermann, W.A., Reinhard, E. Biotransformation by plant tissue cultures. In: Sala, F., Parisi, B., Cella, R., Ciferri, O. *Plant cell cultures: results and perspectives.* (eds). Elsevier/North Holland, *Biomedical Press*. 1980, p. 399-404.
- Amdoun, R., Khelifi, L., Khelifi-Slaoui, M., Amroune, S., Benyoussef, E.H., Thi, D.V., Gontier, E. Influence of minerals and elicitation on *Datura stramonium* L. tropane alkaloid production: modelization of the *in vitro* biochemical response. *Plant science*. 2009, vol .177, n°2, p. 81-87.
- Azeez, H., Ibrahim, K., Pop, R., Pamfil, D., Harta, M., Bobiş, O. Changes induced by gamma ray irradiation on biomass production and secondary metabolites

- accumulation in *Hypericum triquetrifolium* Turra callus cultures. *Industrial Crops and Products*. 2017, vol. 108, p. 183-189.
- Cosson, L., Kuntzmann-Cougoul, N. La régulation du métabolisme des alcaloïdes tropaniques (hyoscyamine + scopolamine) chez le *Duboisia myoporoides* et les *Datura* cultivées en conditions contrôlées. *Herba Hungarica*. 1979, vol. 18, n°3, p. 135 - 141.
- Demeyer, K., Vanhaste, F., Van De Velde, H., Dejaegere R. Introductory study for optimisation of growth and alkaloid production by cell cultures of *Datura stramonium* L. *Acta Horticulturae*. 1992, vol. 306, p. 210-218.
- Giri, A., Narasu, M.L. Transgenic hairy roots: recent trends and applications. *Biotechnology Advances*. 2000, vol. 18, p. 1–22.
- Mohiuddin, Y.G., Nathar, V.N., Aziz, W.N., Gaikwad, N.B. Induction of Callus and Preliminary Phytochemical Profiling from Callus of *Artemisia absinthium* L. and *Artemisia pallens* Wall. *International Journal of Current Trends in Science and Technology*. 2018, vol. 8, n° 2, p. 20236-20241.
- Mulabagal, V., Tsay, H.S. Plant cell cultures - an alternative and efficient source for the production of biologically important secondary metabolites. *International journal of applied science and engineering*. 2004, vol. 1, n° 2, p. 29-48.
- Murashige, M., Skoog, T.A. Revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiologia plantarum*. 1962, vol. 15, p. 473–497.
- Nester, E.W., Milton, P., Amasino, R.M., Yanofsky, M.F. Crown gall: a molecular and physiological analysis. *Annual Review of Plant Physiology*. 1984, vol. 35, p. 87-413.
- Petit, A., David, C., Dahl, G.A., Ellis, J.G., Guyon, P. Further extension of the opine concept: plasmids in *Agrobacterium rhizogenes* cooperate for opine degradation. *Molecular and General Genetics MGG*. 1983, vol. 190, p. 204-214.
- Ray, S., Jha, S. Withanolide synthesis in cultures of *Withania somnifera* transformed with *Agrobacterium tumefaciens*. *Plant Science*. 1999, vol. 146, p. 1-7
- Verpoorte, R., Van Der Heijden, R., Hoge, J.H.C, Ten Hoopen H.J.G. Plant cell biotechnology for the production of secondary metabolites. *Pure and Applied Chemistry*. 1994, Vol. 66, N°10/11, p. 2307-2310.