

UN GRADIENT METABOLIQUE: RAPPORT SCOPOLAMINE/HYOSCYAMINE DANS LES FEUILLES DU *DUBOISIA MYOPOROIDES* EN FONCTION DE LEUR NIVEAU D'INSERTION ET DU STADE DE CROISSANCE

N. COUGOUL, E. MIGINIAC et L. COSSON

Laboratoire du Phytotron C.N.R.S., 91190-Gif-Sur-Yvette, France et Laboratoire de Physiologie Végétale, UER 59, Université P. et M. Curie, France

(Revisé reçu le 8 novembre 1978)

Key Word Index—*Duboisia myoporoides*; Solanaceae; metabolic gradient; development; hyoscine; hyoscyamine; scopolamine; tropane alkaloids.

Abstract—Hyoscine and hyoscyamine are the main alkaloids in the Australian plant *Duboisia myoporoides*. The ratio of hyoscine/hyoscyamine depends both on the developmental stage of the plant and on the position of the leaves on the stem; this ratio is considered as a 'metabolic gradient'. It is a permanent metabolic marker of a given physiological state.

INTRODUCTION

Le *Duboisia myoporoides* R.Br. (Solanaceae) n'est connu à l'état naturel que dans deux régions: la Nouvelle Calédonie et la Côte Est de l'Australie, entre Cairns au Nord et Sydney au Sud. Cet arbuste est exploité pour son contenu en alcaloïdes tropaniques: scopolamine et hyoscyamine. Il contient également des alcaloïdes du groupe de la pyridine: nicotine et nornicotine, ainsi que de nombreux alcaloïdes mineurs [1-4]. Romeike a montré [5, 6] que, chez le *Datura*, l'hyoscyamine est synthétisée dans les racines, migre vers les feuilles où elle est transformée en scopolamine par époxydation. Ce schéma métabolique a été adopté comme hypothèse de travail chez le *Dubiosia*.

Alors que chez les plantes de Nouvelle Calédonie, le rapport des deux alcaloïdes tropaniques (scopolamine/hyoscyamine) reste constant et supérieur à l'unité [7], chez les représentants australiens il évolue avec l'âge ontogénique de la plante [7-9]. Ce dernier résultat semble en contradiction avec les travaux de Barnard et Fine-more [10], Loftus Hills et col. [11], qui distinguent chez la population australienne deux types de plantes: le type 'Nord' provenant du Queensland, dans lequel la scopolamine est dominante et le type 'Sud', des alentours de Sydney, dans lequel l'hyoscyamine prédomine.

Chez le *Duboisia myoporoides* australien, Cossion [8] a montré que, dans un premier temps, la scopolamine est l'alcaloïde dominant dans toutes les feuilles et qu'au fur et à mesure du développement le rapport scopolamine/hyoscyamine diminue; finalement l'hyoscyamine devient prépondérante. Ce rapport présente la même évolution dans toutes les feuilles: il diminue durant l'ontogenèse, mais sa décroissance est plus rapide chez les jeunes feuilles. De plus, le prélèvement des boutures sur des plantes où l'hyoscyamine domine, permet la régénération d'un clone présentant à nouveau une phase durant laquelle la scopolamine est l'alcaloïde principal.

Le but du présent travail est d'étudier la cinétique de

l'arrêt de l'époxydation de l'hyoscyamine en scopolamine. Pour cela, des boutures ont été prélevées sur une plante contenant plus d'hyoscyamine que de scopolamine dans toutes ses feuilles. Après enracinement et restauration du métabolisme complet (époxydation de l'hyoscyamine en scopolamine), les bourgeons axillaires sont supprimés dès leur formation de façon à obtenir un axe feuillé unique. L'arrêt de l'époxydation le long de l'axe est suivi, durant la croissance, par le dosage de l'hyoscyamine et de la scopolamine dans les feuilles.

L'étude de la variation dans le temps des propriétés physiologiques a été essentiellement réalisée en observant l'évolution des capacités morphogénétiques d'organes ou de tissus, le plus souvent libérés des corrélations, à divers moments de l'ontogenèse de la plante, et fréquemment cultivés *in vitro*. Citons, par exemple, la mise en évidence du gradient axial de l'aptitude à fleurir des bourgeons néoformés chez le Tabac [12] ou la révélation de propriétés morphogénétiques latentes par des rameaux de diverses plantes [13]. Le présent travail aborde ce même problème par l'intermédiaire des variations du métabolisme des alcaloïdes tropaniques, substituant un critère chimique aux critères morphologiques traditionnels; il contribue ainsi à la caractérisation de l'état physiologique de quelques étapes de l'ontogenèse du *Duboisia myoporoides*.

RESULTATS

Relation entre croissance et rapport scopolamine/hyoscyamine

Les dosages commencent 105 jours après le bouturage (jour de l'individualisation des boutures); ils portent sur la totalité des feuilles et traduisent une diminution du rapport scopolamine/hyoscyamine, qui devient inférieur à l'unité après le 176 ème jour (graphique 1).

Etude du gradient métabolique

Une autre expérience a été réalisée sur un clone 215

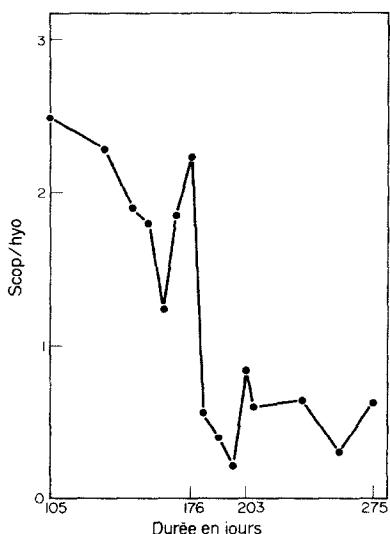


Fig. 1. Rapport scopolamine/hyoscyamine en fonction du temps.
Pour chaque point, le rapport est calculé à partir des résultats des dosages de scopolamine et d'hyoscyamine en chromatographie en phase gazeuse (précision de la méthode $\pm 5\%$), contenues dans la totalité des feuilles de 3 plantes (le 105 ème jour correspondant à l'individualisation des boutures enracinées).

jours après le bouturage. On a choisi 5 plantes aussi identiques que possible (hauteur; nombre de feuilles et surface foliaire; nombre de noeuds) et se rapprochant le plus de la moyenne du clone. Chaque plante est partagée en sept niveaux de même hauteur (15 cm) dont les feuilles sont traitées séparément.

Le rapport scopolamine/hyoscyamine (figuré sur le graphique No. 2) est du même ordre de grandeur (à 10 %

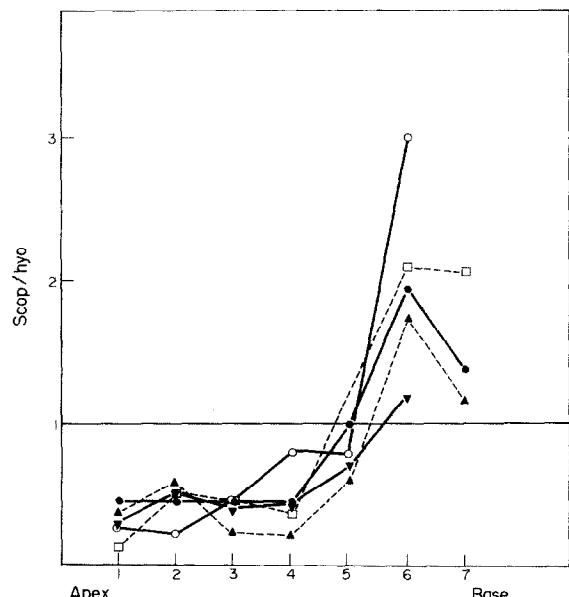


Fig. 2. Rapport scopolamine/hyoscyamine en fonction de la position des feuilles sur l'axe, pour 5 plantes aussi identiques que possible (précision de la méthode $\pm 5\%$ pour les dosages en chromatographie en phase gazeuse de chacun des alcaloïdes). Expérience réalisée 215 jours après le bouturage (un figuré différent pour chaque plante.)

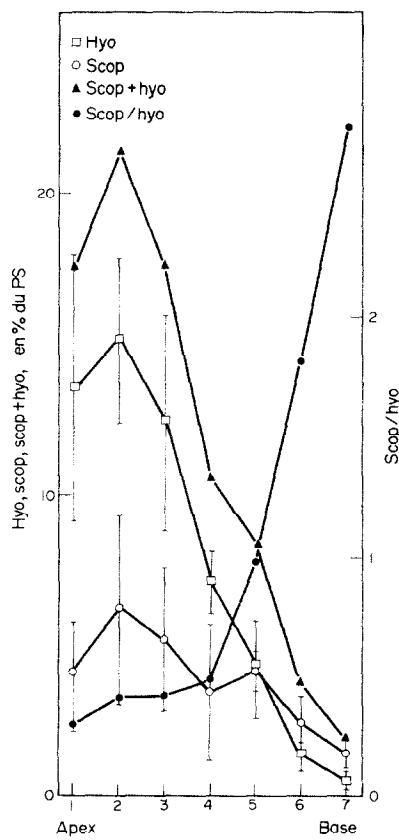


Fig. 3. Valeurs moyennes (scopolamine, hyoscyamine, scopolamine + hyoscyamine en % poids sec; scopolamine/hyoscyamine) obtenues sur 5 plantes en fonction de la position des feuilles sur l'axe, 215 jours après le bouturage.

près) dans les cinq plantes, pour les niveaux 1 à 5; les écarts relatifs sont toutefois plus importants pour les deux niveaux de base.

Pour les feuilles proches de la base, seules celles qui n'avaient pas un aspect sénescnt ont été prélevées. Ceci explique qu'au niveau 7 les dosages n'ont pas été réalisés que sur trois plantes et qu'il existe des différences dans les résultats obtenus aux niveaux 6 et 7. Malgré cela, le rapport scopolamine/hyoscyamine reste supérieur à l'unité pour les feuilles proches de la base.

L'évolution du rapport scopolamine/hyoscyamine et de la somme scopolamine + hyoscyamine et l'étude des moyennes sont présentées dans le graphique 3. La somme scopolamine + hyoscyamine augmente de la base à l'apex, l'ensemble des feuilles apicales et des niveaux 2 et 3 présentant un contenu maximal en alcaloïdes tropaniques. Le rapport scopolamine/hyoscyamine, par contre, augmente de l'apex vers la base.

DISCUSSION

Les résultats énoncés permettent de comprendre l'évolution de la teneur en alcaloïdes tropaniques chez le *Duboisia myoporoides* australien: la valeur du rapport scopolamine/hyoscyamine dépend à la fois du stade de développement atteint par la plante bouturée et de la position des feuilles sur l'axe de celle-ci.

De plus, les feuilles nouvellement formées contiennent

davantage d'alcaloïdes que les feuilles adultes, et cela même avant tout phénomène d'arrêt de l'époxydation. Dans les feuilles jeunes, l'hyoscyamine s'accumule préférentiellement à partir d'un certain stade de l'ontogenèse, alors que les feuilles adultes semblent conserver le métabolisme présent dans les premiers stades (scopolamine > hyoscyamine). L'évolution de la teneur en alcaloïdes tropaniques serait régulée au niveau des réactions d'époxydation. Elle serait sous la dépendance de nombreuses corrélations, notamment des corrélations racino-foliaires comme le prouve le retour au métabolisme des premiers stades de l'ontogenèse grâce au bouturage.

La portion de plante prélevée en vue du bouturage contient principalement de l'hyoscyamine; quand l'enracinement est réalisé, la scopolamine redevient transitoirement prédominante. Il y a donc rajeunissement et, même dédifférenciation biochimique. Les plantes issues de semis [8] et celles issues de la multiplication végétative ne montrent pas la même cinétique d'évolution du rapport: alors qu'au 462 ème jour après semis, la scopolamine domine encore dans les feuilles adultes prélevées à mi-hauteur de la plante, déjà au 215 ème jour après bouturage (graphique 2) des feuilles prélevées également à mi-hauteur sont à hyoscyamine dominante. Le bouturage ne permettrait donc qu'un rajeunissement bref dans le temps. L'étude du gradient, sur une même plante, permet de constater que la teneur en scopolamine varie beaucoup moins le long de l'axe que celle de l'hyoscyamine qui augmente fortement de la base vers l'apex (graphique 3). Dans les jeunes feuilles, la somme scopolamine + hyoscyamine est très élevée: son importance est due à la grande quantité d'hyoscyamine qui s'accumule sans se transformer.

La teneur en alcaloïdes tropaniques, à chaque instant, est un effet la résultante de la biosynthèse de l'hyoscyamine et de la scopolamine et de leur dégradation probable. Le fait qu'elle soit plus faible dans les feuilles basales que dans les feuilles nouvellement formées, prouve l'existence d'un premier gradient, celui de la somme scopolamine + hyoscyamine augmentant de la base vers l'apex. Ce gradient serait lié à la sénescence *sensu stricto* de la feuille considérée, bien qu'aucune sénescence ne soit décelable à partir de critères morphologiques.

A ce premier gradient, se superpose un second: celui du rapport scopolamine/hyoscyamine qui dépend à la fois du stade de développement de la plante et de la position des feuilles sur l'axe. Ce 'gradient métabolique'

étant sous la dépendance des corrélations existant dans la plante, peut être considéré comme 'un marqueur métabolique' d'un état physiologique donné.

EXPERIMENTAL

Le matériel végétal. Cette étude a été réalisée sur des boutures d'extrémités apicales de rameaux de *Duboisia myoporoides* australien (plante de 6 ans où l'hyoscyamine est l'alcaloïde dominant). Plante-mère et boutures sont cultivées en clairement naturel avec appoint de lumière incandescente pendant 16 hr à 22°, avec une humidité relative de 70%. Ces boutures sont mises à enracer en terrines (vermiculite).

Le temps 0 de l'expérience correspond au jour du bouturage. Le 105 ème jour de l'expérience, les boutures sont individualisées et rempotées. A partir de ce jour, chaque semaine, la hauteur de l'axe unique (les bourgeons axillaires étant supprimés au fur et à mesure de leur formation) et le nombre de feuilles sont notés afin de choisir pour le dosage des alcaloïdes, les boutures se rapprochant le plus de la moyenne des plantes du clone.

Etude des alcaloïdes. La technique employée pour l'extraction et la purification des alcaloïdes correspond à celle précédemment décrite [3]: stabilisation extractive par l'EtOH à ébullition et purification par le CHCl₃; analyse par chromatographie sur couche mince et dosage par chromatographie en phase gazeuse. Précision de la méthode ± 5%, chaque dosage étant fait trois fois.

BIBLIOGRAPHIE

- Coulsen, J. F. et Griffin, W. J. (1967) *Planta Med.* **15**, 459.
- Coulsen, J. F. et Griffin, W. J. (1968) *Planta Med.* **16**, 174.
- Cosson, L. et Vaillant, J. C. (1976) *Phytochemistry* **15**, 818.
- Barger, G., Martin, W. F. et Mitchell, W. (1937) *J. Chem. Soc. Pt II*, 1820.
- Romeike, A. (1961) *Bull. Soc. Fr. Phys. Veg.* **7**, 33.
- Romeike, A. (1963) *Abh. Dtsch. Akad. Wiss. Berlin* **4**, 179.
- Escudero Rubio, A. (1975) *Mém. D.E.A. Univ. Paris VI*.
- Cosson, L. (1976) *Etudes de Biologie Végétale*, p. 483. Hommage au Professeur P. Chouard. R. Jacques édit., Paris.
- Cougoul, N. (1977) *Mém. D.E.A. Univ. Paris VI*.
- Barnard, C. et Finomore, H. (1945). *J. Counc. Sci. Ind. Res. Aust.* **18**, 227.
- Loftus Hills, K., Trautner, E. M. et Rodwell, C. N. (1945) *J. Counc. Sci. Ind. Res. Aust.* **18**, 234.
- Aghion-Prat, D. (1965) *Physiol. Vég.* **3**, 229.
- Nozeran, R., Bancilhon, L. et Neville, P. (1971) in *Advances in Morphogenesis*, p. 1. Academic Press, New York.