

# Biosynthèse de tropolones dans les cals et les suspensions cellulaires à partir d'ébauches foliaires de plantules de *Thuja plicata* Donn

Jean-Pierre Haluk\* et Cécile Roussel-Bousta

Laboratoire d'Études et de Recherches sur le Matériau Bois (LERMAB), Équipe de Chimie Organique, Biochimie Microbiologie, Université Henri Poincaré Nancy 1, UMR INRA 1093, ENSAIA-INPL, 2 avenue de la forêt de Haye, 54500 Vandœuvre-lès-Nancy, France

(Reçu le 26 juin 2001 ; accepté le 22 février 2002)

**Résumé** – Nous avons développé des cultures cellulaires de *Thuja plicata* Donn à partir de cals provenant d'ébauches foliaires de plantules cultivés sur milieu de Gamborg B5 enrichi en saccharose ou en glucose, complété de benzylaminopurine (BAP) et d'acide 1-naphtalène acétique (NAH) comme régulateurs de croissance. La synthèse de novo de la  $\beta$ -thujaplicine, tropolone naturelle majoritaire dans de nombreuses espèces de Cupressacées, est accélérée en présence d'éliciteur du type extrait de levure. L'extraction des tropolones intracellulaires est réalisée par broyage des cellules en présence d'acétate d'éthyle. La culture des cals en présence d'éliciteur et de saccharose à 2 % conduit à un rendement plus intéressant en tropolones (6,5 mg g<sup>-1</sup> de cal frais) comparativement à celui sans éliciteur (1,75 mg). L'utilisation de glucose à 2 % améliore également les rendements en tropolones (3,15 mg sans éliciteur et 8,1 mg avec éliciteur par g de cal frais). Les cultures de suspensions cellulaires de *Thuja plicata* réalisées à partir de cals montrent que la vitesse d'agitation de l'agitateur orbitalaire influence la biosynthèse des tropolones (maximum de 5,1 mg g<sup>-1</sup> de cellules fraîches à 120 rpm au bout de 14 jours de croissance contre 2 mg à 80 et 180 rpm).

red cedar / tropolones /  $\beta$ -thujaplicine / éliciteurs / cals / suspensions cellulaires

**Abstract** – Biosynthesis of tropolones from callus and suspension-cultured cells initiated from young seedlings of *Thuja plicata* Donn. *Thuja plicata* callus and cell cultures have been cultured in Gamborg B5 medium supplemented with saccharose or glucose, 1-naphthalene acetic acid (NAA) and benzylaminopurine (BAP) as growth regulators. The addition of elicitor as yeast extract to callus culture of *Thuja plicata* leads to an increase in the production of tropolones, typical heartwood constituents of *Cupressus* species. Calli cultured in a medium supplemented with saccharose 2% and yeast extract accumulate tropolones in about 6.5 mg g<sup>-1</sup> cell fresh weight, which is easily extracted from callus culture with ethylacetate. Without elicitation, the content of tropolones was only 1.75 mg g<sup>-1</sup> cell fresh weight. In a medium supplemented with glucose, the content of tropolone increases (8.1 mg with elicitation and 3.15 mg without elicitation). Cell cultures obtained from calli show an effect of the rotary shaker speed on the tropolones production (5.1 mg g<sup>-1</sup> at 120 rpm agitation and only 2 mg at 80 or 180 rpm).

red cedar / tropolones /  $\beta$ -thujaplicine / elicitors / callus / cell culture

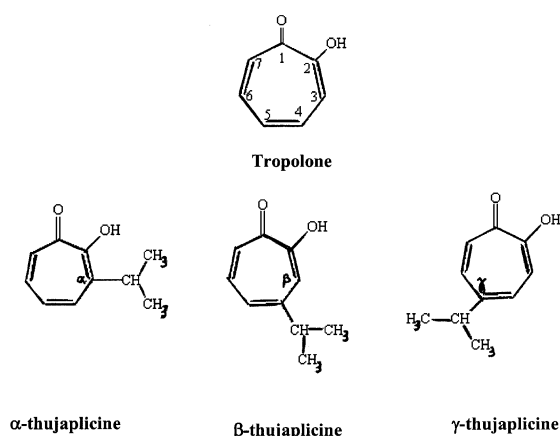
## 1. INTRODUCTION

De toutes les espèces d'essences exploitées par l'homme, le « Western Red Cedar » (*Thuja plicata* Donn) est probablement l'une des plus surprenantes. C'est en effet l'un des bois les plus légers et en même temps, l'un des plus durables. Légèreté et durabilité naturelle font de cette essence un bois approprié à nombre d'applications. Bien que ses couleurs chaudes en font un joli bois d'intérieur (lambris, plafond), ses qualités de résistance naturelle et de stabilité en font un bois idéal pour des applications extérieures (poteaux de vérandas, meubles de jardin, tours des piscines, planchers de terrasses, ...). Cependant, l'usage le plus fréquent auquel on le destine reste le bardage extérieur.

Originaire des régions humides et tempérées de la Côte Pacifique d'Amérique du Nord (Colombie britannique au Canada principalement, mais aussi des états de l'Orégon et du Washington aux États-Unis), c'est l'un des arbres les plus majestueux des forêts primaires du continent nord-américain. Il peut atteindre une hauteur de 70 m et un diamètre de 4 m. Pour les tribus indiennes de ces régions, il était tout simplement « l'arbre de vie » ; fendus en grandes planches, les arbres servaient à fabriquer les toits et les murs des habitations, et les troncs creusés servaient à la fabrication des canoës de haute mer.

Le Red Cedar est caractérisé par son exceptionnelle durabilité naturelle, due à une « huile » naturelle contenue dans ses fibres qui le protège contre les attaques de

\* Correspondance et tirés à part  
Tél. : (33) 03 83 27 71 44 ; e-mail : haluk.jp@free.fr



**Figure 1.** Structure chimique de la tropolone (2-hydroxy-2,4,6 cycloheptatriène-1-one) et des 3 isomères thujaplicines.

champignons et d'insectes [1]. Il passe ainsi pour être pratiquement imputrescible hors sol, même sans entretien. En contact avec le sol, il se conserve pendant 15 à 25 ans [15].

Les constituants chimiques principaux du Red Cedar (cellulose, hémicelluloses, lignine) sont très voisins de ceux d'autres résineux, tels que le sapin Douglas et l'épicéa [16]. Cependant, la grande différence entre le Red Cedar et les autres résineux se situe au niveau de la teneur et de la structure des extractibles (10 à 15 % de la matière sèche) qui sont responsables de l'odeur, de la couleur et de la durabilité du bois. Ces extractibles sont composés par exemple de tropolones, également présentes chez d'autres espèces de Cupressacées [10], et de lignanes [4] qui sont spécifiques du Red Cedar [7]. Très récemment, des auteurs ont déterminé la nature chimique des chromophores principaux responsables de la couleur typique brune orangée du Red Cedar ; il s'agirait d'un polymère résultant de la condensation des lignanes du type acide plicatique spécifique de cette essence [14].

Les molécules responsables de la durabilité naturelle du Red Cedar sont constituées par les tropolones ayant une structure cyclique de base du type ène-ol-one à 7 atomes de carbone [1]. Les tropolones naturelles sont des molécules possédant une chaîne isopropylique latérale supplémentaire placée en position  $\alpha$ ,  $\beta$  ou  $\delta$  par rapport au groupement hydroxyle ; elles sont appelées  $\alpha$ ,  $\beta$  ou  $\delta$  thujaplicines (figure 1). La molécule la plus abondante est constituée par la  $\beta$ -thujaplicine encore appelée hinokitiol par les japonais.

La  $\beta$ -thujaplicine montre une activité biocide vis-à-vis d'un grand nombre de microorganismes, tels que les bactéries et les champignons [1, 25]. De part leurs propriétés antifongiques et bactéricides, les tropolones ont un impact important dans le domaine de la pharmacologie : la  $\beta$ -thujaplicine est à la base de nouveaux composés antitumoraux actifs sur les cellules cancéreuses in vitro [31]. Les tropolones sont déjà utilisées en cosmétique au Japon comme antibactériens et antifongiques ; elles sont largement présentes également dans des lotions pour cheveux et dans les dentifrices [21]. La  $\beta$ -thujaplicine montre aussi des effets cytotoxiques sur des cellules de mammifères [13] et possède des activités chélatrices vis-à-vis des espèces oxygénées réactives [2] et inhibitrices de certaines enzymes [3].

Les tropolones peuvent être extraites du bois par utilisation de solvants organiques au Soxhlet ou par entraînement à la vapeur. L'emploi plus récent des fluides supercritiques tels que le  $\text{CO}_2$  permet une forte amélioration du rendement, un gain de temps, une meilleure sélectivité d'extraction et l'absence de dégradation des extraits [19]. D'autres équipes de chercheurs se sont intéressées à la synthèse chimique des tropolones, notamment des thujaplicines, mais celle-ci reste encore fastidieuse [18]. Ce sont surtout d'autres dérivés de tropolones qui sont synthétisés avec un bon rendement, comme des éthers de tropolones, par alkylation de la tropolone commerciale [28].

Une autre démarche pour l'obtention des thujaplicines est la préparation de cultures cellulaires in vitro. Il a été montré que la culture de cals in vitro à partir de plantules de *Cupressus lusitanica* M. permet d'obtenir la  $\beta$ -thujaplicine, dont le rendement est amélioré en présence d'éliciteurs fongiques ou d'extrait de levure [12, 26]. Le passage à une culture en suspension sur milieu liquide augmente encore le rendement en  $\beta$ -thujaplicine [29]. Les extraits bruts obtenus après broyage des cellules sur mortier en présence d'acétate d'éthyle possèdent une activité antifongique importante, sans avoir besoin de procéder à une purification ultérieure de la  $\beta$ -thujaplicine. Il est important de signaler également que la nature du milieu de croissance a une influence sur la teneur en tropolones synthétisées par les cals ou les suspensions cellulaires. Ainsi, des suspensions cellulaires de *Calocedrus formosana* F. [22] produisent davantage de  $\beta$ -thujaplicines sur un milieu de Gamborg B5 [9] que sur un milieu de Murashige et Skoog [20].

L'objectif de ce travail a été de vérifier la biosynthèse de tropolones naturelles, et plus particulièrement des thujaplicines, au cours de la croissance de cals de Red Cedar obtenus à partir de plantules âgées de 4 mois, puis de celle de suspensions cellulaires. Cette nouvelle approche a été envisagée pour l'application des propriétés antifongiques des tropolones naturelles en préservation du bois.

## 2. MATÉRIELS ET MÉTHODES

### 2.1. Milieu de culture de base solide pour la croissance des cals

Il est constitué par le milieu de Gamborg [12] pH = 5,5 enrichi avec 2 % de glucose ou de saccharose et avec différents éliciteurs (extrait de levure à 1 % (p/v), filtrat de culture de *Coriolus versicolor* à 3 % (v/v), chitosane à 10 %). Ce milieu est complété par une addition d'auxine (acide 1-naphtalène acétique  $10^{-5}$  M) et de cytokinine (6-benzylaminopurine  $10^{-8}$  M) comme régulateurs de croissance [26]. L'agar pour l'obtention du milieu solide est remplacé par le gellane (Kelcogel F) à 0,25 % (p/v). Le milieu est ensuite stérilisé à l'autoclave à 120 °C sous pression de 1 bar pendant 20 min, puis coulé dans des boîtes de Pétri [24].

Les graines de *Thuja plicata* ont été fournies par la Société Vilmorin (La Ménitry, France). Afin de conserver leur viabilité elles sont stockées à 4 °C et à l'obscurité. Avant germination, elles sont trempées quelques secondes dans de l'éthanol distillé puis rincées abondamment avec de l'eau distillée stérile. Elles sont ensuite laissées un jour dans un flacon d'eau distillée stérile afin de permettre une reprise en humidité des graines. Une solution d'hypochlorite de calcium 3 % est préparée, filtrée, puis utilisée juste après la préparation

car elle présente un pouvoir désinfectant plus efficace. Les graines sont laissées pendant 15 min dans la solution ainsi préparée, puis rincées 3 fois à l'eau distillée stérile. Ensuite, les graines sont séchées entre des carrés de feuilles de papier filtre stériles. On dépose aseptiquement avec une pince stérile une à deux graines de *Thuja plicata* par tube de culture contenant le milieu nutritif gélosé. La germination des graines est obtenue au bout de 10 jours dans une chambre de culture thermostatée à 27 °C avec alternance quotidienne de lumière et d'obscurité respectivement de 10 et de 14 heures. On obtient des plantules de 3,5 cm de hauteur au bout de 4 mois.

Les fragments d'ébauches foliaires stériles de Red Cedar âgés de 4 mois sont découpés puis placés aseptiquement dans les boîtes de Pétri. La culture des tissus est effectuée à l'obscurité dans une salle thermostatée à 27 °C. Au bout de 18 jours, on observe la formation de petits cals ; afin de poursuivre leur croissance, le milieu doit être renouvelé toutes les 3 à 4 semaines. Au cours de cette phase, on élimine les parties de cals qui n'ont pas proliféré et on conserve la partie renflée traduisant une division cellulaire.

## 2.2. Milieu de culture liquide pour la croissance des suspensions cellulaires

Il est identique à celui des cultures de cals, mais sans gellane. Le pH du milieu est ajusté à 5,5 avec une solution de soude N. Les cals divisés en petits fragments sont déposés aseptiquement dans des erlenmeyers contenant le milieu de culture stérile, lesquels sont ensuite placés sur une plaque d'agitation à l'obscurité et à 27 °C. Nous avons testé deux types de systèmes d'agitation : une plaque (shaker) à mouvement orbitalaire, soumise à 3 vitesses d'agitation (80, 120 et 180 rpm) et un bain-marie thermostaté à agitation horizontale.

## 2.3. Estimation de la croissance de la masse cellulaire

Elle est effectuée par pesée des cellules à l'état frais à différents temps de croissance pendant 4 semaines. Les cellules sont récoltées par filtration sous vide sur membrane Millipore (0,22 µ), puis lavées à l'eau distillée directement sur la membrane filtrante et pesées pour la détermination de la matière fraîche. Tous les essais ont été effectués simultanément en trois exemplaires.

## 2.4. Extraction des métabolites à partir des cals et des suspensions cellulaires

Elle est effectuée par broyage des cellules dans un mortier en présence d'acétate d'éthyle (EtOAc, 10 ml g<sup>-1</sup> de matière fraîche). Cette extraction est renouvelée 3 fois. Après concentration à sec sous vide de l'extrait organique à l'évaporateur rotatif, les extraits sont conservés à 4 °C sous azote et à l'obscurité.

## 2.5. Caractérisation chromatographique des tropolones

Elle est réalisée sur couches minces de Kieselgel G60 recouvrant une feuille d'aluminium. Le solvant de migration est constitué par le mélange : dichlorométhane/méthanol (90 : 10, v/v), et la révélation des tropolones est effectuée par pulvérisation de FeCl<sub>3</sub> à 1 % [17]. Le témoin commercial de β-thujaplicine provient de la firme TCI America et la tropolone commerciale est un échantillon Sigma. Les R<sub>f</sub> de la β-thujaplicine et de la tropolone sont respectivement dans ce solvant de 0,80 et 0,70, et leur coloration rouge orange et vert gris.

## 2.6. Détermination qualitative et quantitative des tropolones par spectrographie UV

Elle est effectuée sur les extraits secs EtOAc de cals et de suspensions cellulaires repris dans l'éthanol. Le maximum d'absorbance

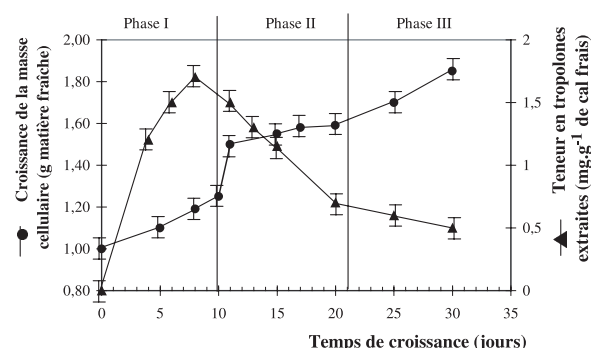


Figure 2. Évolution de la croissance des cals de *Thuja plicata* et de la biosynthèse des tropolones pendant 30 jours (sans éliciteur).

(λ<sub>max</sub>) de la thujaplicine commerciale se situe à 230 nm (caractéristique du groupement carbonyle lié à une structure non aromatique), et d'autres absorbances plus faibles sont visibles à 320 et 350 nm. La courbe d'étalonnage de la β-thujaplicine commerciale est obtenue en mesurant l'absorbance à 230 nm de différentes concentrations de solutions réalisées à partir du témoin β-thujaplicine (concentrations comprises entre 0 et 10 mg L<sup>-1</sup> dans l'éthanol). Tous les essais ont été effectués simultanément en trois exemplaires.

## 3. RÉSULTATS

### 3.1. Biosynthèse des tropolones dans les cultures de cals de Red Cedar

#### 3.1.1. Milieu de croissance sans éliciteur

Les résultats (valeur moyenne de trois mesures pour chaque point) sont présentés dans la figure 2. Les courbes obtenues peuvent être divisées en 3 phases :

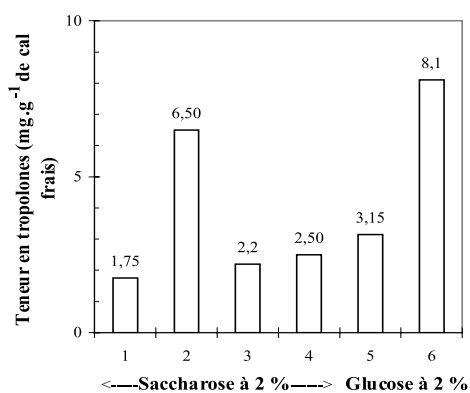
Phase I : au cours de cette phase de 10 jours, on observe une augmentation de la masse cellulaire de 1 à 1,5 g en poids frais et la biosynthèse des tropolones est active et maximale à 9 jours (1,75 mg g<sup>-1</sup> de cal frais).

Phase II : la croissance cellulaire est pratiquement stationnaire jusqu'à 20 jours, tandis que la teneur en tropolones chute jusqu'à 0,7 mg g<sup>-1</sup> de cal frais.

Phase III : la croissance cellulaire reprend jusqu'à 1,8 g de cal frais, alors que la biosynthèse des tropolones décroît beaucoup plus faiblement jusqu'à 0,5 mg g<sup>-1</sup> de cal frais.

Au cours de la phase I, on observe donc simultanément une faible augmentation de la masse cellulaire et une biosynthèse de tropolones active à l'intérieur des cellules. Il est possible que le seuil de biosynthèse à 9 jours inhibe la croissance cellulaire et conduise à la phase stationnaire de croissance II.

La nette diminution de la teneur intracellulaire en tropolones au cours de la phase II pourrait être expliquée, soit par un relargage dans le milieu de culture, soit par une biodégradation. Aucune référence dans la littérature ne mentionne ces hypothèses. La recherche des tropolones au sein du milieu



**Figure 3.** Comparaison de la teneur en tropolones au bout de 9 jours de croissance des cals de *Thuja plicata* en présence de différents éliciteurs. (1 : sans éliciteur ; 2 : avec extrait de levure ; 3 : avec extrait de *Coriolus versicolor* ; 4 : avec chitosane ; 5 : sans éliciteur avec glucose ; 6 : avec extrait de levure et glucose).

gélosé s'est avérée difficile, mais par contre elle devrait être facilitée au cours de l'utilisation de suspensions cellulaires en milieu liquide.

### 3.1.2. Milieu de croissance en présence d'éliciteurs

Les teneurs en tropolones obtenues au maximum de biosynthèse (9 jours) sont reportées dans la *figure 3* (moyenne de 3 essais simultanés). Sans éliciteur, l'utilisation de glucose plutôt que de saccharose permet pratiquement de doubler la production de tropolones (essais 1 et 5). Un éliciteur d'origine fongique (filtrat de culture de *Coriolus versicolor*) et le chitosane d'origine commerciale (polysaccharide extrait de la paroi cellulaire de champignon) augmentent faiblement la biosynthèse des tropolones en présence de saccharose (essais 3 et 4), tandis que l'utilisation d'un extrait de levure commercial multiplie presque par 4 la teneur en tropolones (essai 2).

On peut observer aussi que les meilleurs résultats sont obtenus avec un milieu de croissance contenant 2 % de glucose additionné d'extrait de levure (essai 6) ; avec cet éliciteur, la teneur en tropolones obtenue avec le glucose (8,1 mg de tropolones mg<sup>-1</sup> de cal frais) est supérieure à celle obtenue en présence de saccharose (6,50 mg).

### 3.2. Biosynthèse des tropolones dans les suspensions cellulaires de Red Cedar

La comparaison des résultats concernant la biosynthèse des tropolones obtenus avec les deux systèmes d'agitation (plaque d'agitation orbitaire et bain-marie thermostaté muni d'un va-et-vient) a permis de privilégier la plaque d'agitation orbitaire et d'optimiser la vitesse d'agitation à 120 rpm.

La croissance cellulaire en erlenmeyers de 250 mL (80 mL de milieu de Gamborg B5 additionné de 2 % de saccharose, sans éliciteur et avec un inoculat de 1 g de cal) et la biosynthèse des tropolones ont été suivies pendant 4 semaines. Les résultats sont présentés dans la *figure 4*. Le profil général des courbes est sensiblement identique à celui obtenu dans le cas des cals, mais la distinction des trois phases est cependant moins nette.

À partir de 1 g de cal frais, l'augmentation de la matière fraîche cellulaire est relativement faible au bout de 14 jours de croissance (1,5 g), mais on observe à ce stade une teneur maximale en tropolones (5,10 mg g<sup>-1</sup> de matière fraîche), soit trois fois plus que dans le cas des cals (maximum de 1,75 mg g<sup>-1</sup> de cal au bout de 9 jours de croissance et en absence d'éliciteur).

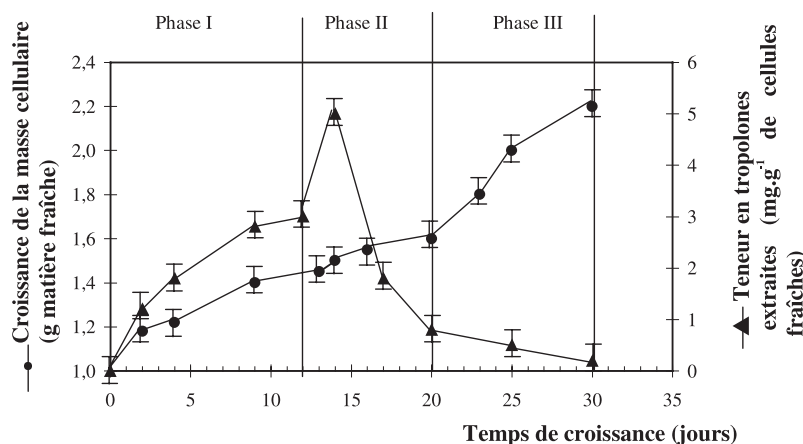
Par ailleurs, nous avons pu remarquer que l'apport de glucose en remplacement du saccharose ne favorise pas une augmentation de la teneur en tropolones comme dans le cas des cals. À teneur équivalente en sucre (2 %), la biosynthèse des tropolones est supérieure de 15 % en présence de saccharose. En effet, la teneur en tropolones obtenue est de 5,1 mg g<sup>-1</sup> en présence de saccharose à 2 % (*figure 4*), alors qu'elle n'est que de 4,35 mg g<sup>-1</sup> en présence de glucose à 2 % en l'absence d'éliciteur. Le doublement de la teneur en glucose (soit 4 %) n'a pratiquement aucun effet sur la teneur en tropolones (4,40 mg g<sup>-1</sup>) dans les suspensions cellulaires. L'influence des éliciteurs n'a pas encore été vérifiée.

### 3.3. Caractérisation spectrale des extraits EtOAc à partir des cals et des suspensions cellulaires de Red Cedar

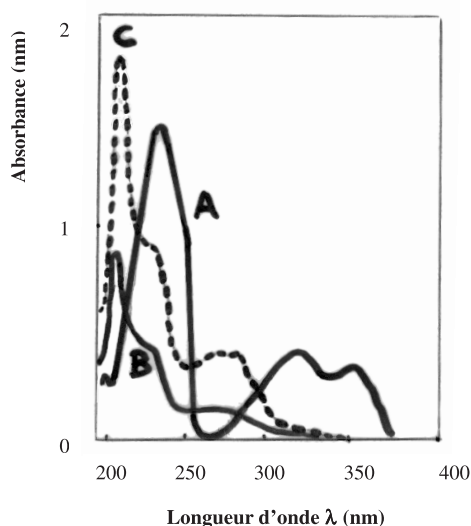
En 1948, Erdtman et Gripenberg [5, 6] avaient effectué les spectres d'absorption UV des thujaplicines  $\alpha$ ,  $\beta$  et  $\delta$  en solution dans l'éthanol, après extraction à partir du bois de *Thuja plicata* Donn. Leur maximum d'absorption est très voisin et se situe vers 230 nm, avec deux autres faibles absorbances à 320 et 350 nm. La  $\beta$ -thujaplicine commerciale (TCI America) utilisée dans notre travail présente un spectre très comparable (*figure 5*, courbe A) ; on observe un maximum d'absorption intense à 230 nm (caractéristique du groupement carbonyle conjugué à une double liaison) suivi par deux absorbances de plus faible intensité à 320 et 358 nm. Les extraits bruts de cals et de suspensions cellulaires de Red Cedar présentent un spectre UV très voisin (*figure 5*, courbes B et C) avec un maximum d'absorption vers 210 nm et un épaulement vers 230 nm identique au maximum d'absorption de la  $\beta$ -thujaplicine témoin. La confirmation de la présence de cette tropolone est vérifiée par chromatographie sur couches minces de Kieselgel G.60 d'extraits EtOAc de cals et de suspensions cellulaires de *Thuja plicata*. On peut remarquer en outre l'existence d'un épaulement à 280 nm, caractéristique de la présence de substances phénoliques. Ces dernières seraient vraisemblablement responsables de la coloration brune des cals observable après 2 mois de croissance, résultant d'une activité polyphénoloxydasique ou peroxydasique. Leur présence est également confirmée par chromatographie sur couches minces de silice après pulvérisation d'un révélateur spécifique des composés phénoliques : la paranitraniline diazotée.

## 4. DISCUSSION

La présence de tropolones naturelles du type  $\alpha$ ,  $\beta$  et  $\delta$  thujaplicine avait déjà été mise en évidence dans le bois de Red Cedar en 1948 [5, 6]. Dans la présente étude, la  $\beta$ -thujaplicine a été identifiée pour la première fois dans des cals et des cultures de suspensions cellulaires de *Thuja plicata* Donn. Cette tropolone a été également mise en évidence dans des cultures cellulaires d'autres Cupressacées, telles que *Calocedrus*



**Figure 4.** Évolution de la croissance des suspensions cellulaires de Red Cedar en milieu liquide et de la biosynthèse des tropolones pendant 30 jours (vitesse d'agitation : 120 rpm ; source carbonée : saccharose à 2 %, sans ajout d'éliciteur).



**Figure 5.** Spectre UV de la  $\beta$ -thujaplicine commerciale (A) et des extraits EtOAc de cals (B) et de suspensions cellulaires (C) de Red Cedar en solution dans l'éthanol.

*formosana* [22]. Il est remarquable d'observer que des cultures cellulaires indifférenciées accumulent de la  $\beta$ -thujaplicine, alors que la teneur de cette tropolone est relativement faible dans le bois du végétal intact.

La production de tropolones du type thujaplicine (surtout  $\beta$ ) dans les cultures cellulaires de *Thuja plicata* Donn. n'est pas corrélée avec la croissance cellulaire ; en effet, le maximum de biosynthèse des tropolones est obtenu dans les cals au bout de 9 jours avec une croissance cellulaire encore faible (figure 2). Ensuite, la croissance augmente faiblement après une phase stationnaire, alors que la teneur en tropolones chute très rapidement. Y-a-t-il biodégradation intracellulaire des thujaplicines par un mécanisme inconnu après 9 jours de croissance

dans les cals et 15 jours dans les cultures de suspensions cellulaires ? Aucun élément dans la littérature n'apporte actuellement de réponse à cette question.

Nous avons montré également l'influence de deux facteurs importants sur la production de tropolones par les cals et les suspensions cellulaires : le substrat carboné (glucose et saccharose) et la présence d'un éliciteur d'origine différente (extrait fongique à partir de *Coriolus versicolor*, extrait de levure, chitosane). Dans notre étude, l'extrait de levure constitue l'éliciteur le plus efficace pour la production de  $\beta$ -thujaplicine. L'extrait de levure doit donc contenir un éliciteur favorisant l'accumulation de cette tropolone qui semble agir comme une phytoalexine monoterpénoïde dans les cultures cellulaires de Cupressacées (*Cupressus lusitanica*, *Thuja plicata*, ...).

Certains auteurs ont montré que l'acétate de potassium accroît la production de  $\beta$ -thujaplicine, et pensent que l'acétate est probablement le précurseur de base de la biosynthèse de la  $\beta$ -thujaplicine [23, 32]. Très récemment, des auteurs japonais ont prouvé par des expériences de marquage avec le [2- $^{14}\text{C}$ ] mévalonate que ce dernier est incorporé dans la  $\beta$ -thujaplicine synthétisée de novo dans les cultures de *Cupressus lusitanica* [27] mais les structures des intermédiaires sont encore inconnues.

Dans notre travail, le milieu de culture de base ne contient pas d'acétate, mais du nitrate de potassium ( $3 \text{ g L}^{-1}$ ) comme macroélément minéral majeur pour la préparation du milieu. Cette composition mériterait d'être modifiée, afin de vérifier l'influence de la concentration en acétate sur la production de  $\beta$ -thujaplicine.

On sait aussi que la source d'azote affecte la formation des métabolites secondaires [8, 30]. Dans notre étude, le nitrate de potassium ( $3 \text{ g L}^{-1}$ ) et le sulfate d'ammonium ( $134 \text{ mg L}^{-1}$ ) constituent les sources d'azote retenues, mais il serait peut être nécessaire de vérifier la production de  $\beta$ -thujaplicine dans les cellules de *Thuja plicata* en fonction de la valeur du rapport  $\text{NO}_3^-/\text{NH}_4^+$ .

Enfin, il faut signaler l'importance de la source carbonée, constituée surtout par le saccharose dans le milieu de Gamborg

(20 g L<sup>-1</sup>). Nous avons pu montrer une augmentation voisine de 15 % en tropolones dans les suspensions cellulaires de *Thuja plicata* lorsque la concentration en saccharose est doublée (40 g L<sup>-1</sup>). Comme pour les cultures de *Calocedrus formosana* [22], une forte concentration en saccharose tend à favoriser la biosynthèse des tropolones, alors que la croissance de la masse cellulaire tend à diminuer.

Par contre, l'utilisation du glucose pour les cultures de suspensions cellulaires de *Thuja plicata* ne favorise pas la production de  $\beta$ -thujaplicine en solution et même le doublement de la teneur en glucose (de 20 à 40 g L<sup>-1</sup>) n'a pratiquement aucun effet sur la teneur en tropolone. Ce résultat est très différent avec l'utilisation de cals ; en effet, en absence d'éliciteur et avec une concentration identique en glucose et en saccharose (20 g L<sup>-1</sup>), on observe une teneur de 3,15 mg de tropolones g<sup>-1</sup> de cal frais en présence de glucose, alors qu'elle n'est que de 1,75 mg en présence de saccharose. Le résultat est identique en présence de l'éliciteur extrait de levure (8,1 mg de tropolones avec le glucose contre 6,5 mg en présence de saccharose).

L'optimisation des conditions de culture des cellules de *Thuja plicata* mérite d'être poursuivie en raison de leurs multiples activités biologiques. Outre les activités antifongique et antitermite mises en évidence au laboratoire sur les extraits EtOAc contenant de la  $\beta$ -thujaplicine [11, 24], d'autres auteurs ont pu montrer également des activités antioxydantes et inhibitrices de tyrosinase sur des extraits bruts de *Cupressus lusitanica* [29].

**Remerciements :** Le témoin commercial de  $\beta$ -thujaplicine (TCI America) a été offert gracieusement par Monsieur S. Kermasha, Professeur à l'Université McGill de Montréal (Canada).

## RÉFÉRENCES

- Anderson A.B., Scheffer T.C., Duncan C.G., On the decay retardant properties of some tropolones, *Science* 137 (1962) 859–860.
- Arima Y., Hatanaka A., Tsukihara S., Fujimoto K., Fukuda K., Sakurai H., Scavenging activities of  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\delta$ -thujaplicins against active oxygen species, *Chem. Pharm. Bull.* 45 (1997) 1881–1886.
- Bohme G., Schonfeld P., Kuster U., Kung W., Lyr H., The multifunctional actions of  $\beta$ -thujaplicin on the oxidative energy transformations as a consequence of its lipophilic and chelating properties, *Acta Biol. Med. Germ.* 39 (1980) 1153–1163.
- Barton B.M., MacDonald B.F., The chemistry and utilisation of western Red Cedar, Canadian For. Ser. Pub. 1023 Ottawa, Canada, 1971.
- Erdtman H., Gripenberg J., Antibiotic substances from the heartwood of *Thuja plicata* Donn., *Nature* 4097 (1948) 719.
- Erdtman H., Gripenberg J., Antibiotic substances from the heartwood of *Thuja plicata* Donn. II. The constitution of  $\delta$ -thujaplicin, *Acta Chem., Scand.* 2 (1948) 625–638.
- Fengel D., Wegener G., Extractives : phenolic compounds in: W. de Gruyter (Ed.), *Wood chemistry, ultrastructure, reactions*, Berlin, New York (1984) pp. 194–197.
- Fujita Y., Hara Y., Ogino T., Suga C., Production of shikonin derivatives by cell suspension culture of *Lithospermum erythrorhizon*, *Plant Cell Rep.* 1 (1981) 59–60.
- Gamborg O.L., Miller R.D., Ojima K., Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells, *Plant Physiol.* 66 (1968) 205–211.
- Haluk J.P., Roussel C., Caractérisation et origine des tropolones responsables de la durabilité naturelle des Cupressacées. Application potentielle en préservation du bois, *Ann. For. Sci.* 57 (2000) 819–829.
- Haluk J.P., Roussel C., Comparaison des activités antifongiques et antitermites de tropolones commerciales et d'extraits cellulaires de Red Cedar. Application en préservation du bois, *Récents Progrès en Génie des procédés (matière biologique et systèmes vivants)*, No. 87, Vol. 15 (2001) 25–31.
- Inada S., Tsutsumi Y., Sakai K., Elicitor of the  $\beta$ -thujaplicin accumulation in callus of *Cupressus lusitanica*, *J. Fac. Agr. Kyushu Univ.* 38 (1993) 119–126.
- Inamori Y., Tsujibo H., Ohishi H., Ishii F., Mizugaki M., Aso H., Ishida N., Cytotoxic effect of hinokitiol and tropolone on the growth of mammalian cells and on blastogenesis of mouse splenic T cells, *Biol. Pharm. Bull.* 16 (1993) 521–523.
- Johansson C.I., Saddler J.N., Beatson R.P., Characterization of the polyphenolics related to the colour of western Red Cedar (*Thuja plicata* Don.) heartwood, *Holzforschung* 54 (2000) 246–254.
- Kernéis H., Le western Red Cedar, un géant au bois léger et durable, *Bois Mag.* 1 (2000) 11–14.
- Lewis H.F., The significant chemical components of western hemlock, Douglas-fir, Western Red cedar, loblolly pine and black spruce, *Tappi* 33 (1950) 299–301.
- Mac Lean H., Gardner J.A.F., Analytical method for thujaplicins, *Anal. Chem.* 28 (1956) 509–512.
- Miyashita M., Hara S., Yoshikoshi A., A regiospecific synthesis of  $\beta$ -thujaplicin (hinokitiol) from 2-isopropanol, *J. Org. Chem.* 52 (1987) 2602–2604.
- Moret D., Utilisation de biomolécules d'origine végétale à activité biocide élevée comme agents de substitution des produits chimiques toxiques de préservation du bois, DEA Sciences du Bois, Université Henri Poincaré, Nancy I, 1997.
- Murashige T., Skoog L., A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture, *Physiol. Plantarum* 15 (1962) 473–497.
- Okabe T., Saito K., Otomo V., Antimicrobial activity and safety of hinokitiol, *Fragrance J.* 17 (1989) 74–79 (in Japanese).
- Ono M., Asai T., Watanabe H., Hinokitiol production in a suspension culture of *Calocedrus formosana* Florin, *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 62 (1998) 1653–1659.
- Richards J.H., Ferretti L.D., Tropolone biogenesis, *Biochem. Biophys. Research Commun.* 2 (1960) 107–110.
- Roussel-Bousta C., Utilisation de biomolécules à activité biocide élevée comme agents de préservation du bois. Application à la rosine de tall-oil et aux tropolones naturelles, Thèse de Doctorat de l'Université Henri Poincaré (Technologies industrielles, Sciences du bois), Nancy I, 2000.
- Saito K., Okabe T., Fukui T., Ynamori Y., Antibacterial activity of hinokitiol against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). II. Applications to the disinfections of hospital environments, *Mokuzai Gakkaishi* 43 (1997) 882–891 (in Japanese).
- Sakai K., Kusaba K., Tsutsumi Y., Shiraishi T., Secondary metabolites in cell culture of woody plants. III. Formation of  $\beta$ -thujaplicin in *Cupressus lusitanica* callus cultures treated with fungal elicitors, *Mokuzai Gakkaishi* 40 (1994) 1–5.
- Sakai K., Yamaguchi T., Itose R., Biosynthesis of a heartwood tropolone,  $\beta$ -thujaplicin, *Mokuzai Gakkaishi* 43 (1997) 696–698.
- Tamburtin-Thumin I., Crozet M.P., Barrière J.C., A convenient method for the alkylation of tropolone derivatives and related  $\alpha$ -cetohydroxy compounds, *Synthesis* 7 (1999) 1149–1154.
- Yamaguchi T., Fijita K., Sakai K., Biological activity of extracts from *Cupressus lusitanica* cell culture, *J. Wood Sci.* 45 (1999) 170–173.
- Yamakawa T., Kato S., Ishida K., Kodama T., Minoda Y., Production of anthocyanins by *Vitis* cells in suspension culture, *Agric. Biol. Chem.* 47 (1983) 2185–2191.
- Yamato M., Mashigaki R., Sakai J., Kawasaki Y., Tsukagoshi S., Synthesis and antitumor activity of tropolones derivatives, *J. Med. Chem.* 30 (1987) 117–120.
- Zhao-Jian K., Fujita K., Sakai K., Production of  $\beta$ -thujaplicin in *Cupressus lusitanica* suspension cultures fed with organic acids and monoterpenes, *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 65 (2001) 1027–1032.