

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE

وزارة التعليم العالي والبحث العلمي

MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE
SCIENTIFIQUE

المدرسة الوطنية العليا للفلاحة الحراش – الجزائر-

ECOLE NATIONALE SUPERIEURE AGRONOMIQUE EL-HARRACH –ALGER

En vue de l'obtention du diplôme de Master

Département : Productions végétales

Spécialité : Ressources génétiques et amélioration des productions végétales

THEME

Production de métabolites secondaires d'intérêt médicinaux à partir de tissus callogènes de *Calotropis procera* (Ait.)

Présenté par : Mlle. Khettabi Meriem

Soutenu le : 09/09/2018

Jury :

Président :	Mme. MEKLICHE L.	Pr.	ENSA.
Promotrice :	Mme. KHELIFI M.	Pr.	ENSA.
Examineurs :	Mr. MORSLI A.	M.C.A	ENSA.
	Mme. BENYAMMI N.	M.C.B	ENS Kouba.

Promotion : 2013/2018

Sommaire

I. Liste des abréviations	
II. Liste des tableaux	
III. Liste des figures	
IV. Liste des planches	
Introduction	1
<u>Synthèse bibliographique</u>	
<i>I. Calotropis procera</i>	3
1. Généralité	3
2. Classification botanique	4
3. Distribution géographique	4
3.1 Dans le monde	4
3.2 En Algérie	5
4. Description botanique	6
5. Usages et intérêts	7
5.1 En médecine traditionnelle	7
5.2 En écologie	8
6. Constituants chimiques	9
II. Reproduction et propagation	10
1. Méthodes traditionnelles	10
2. Méthodes modernes (culture <i>in vitro</i>)	10
2.1 Vitrosemis	10
2.2 Micropropagation	11
2.3 Callogenèse	12
III. Métabolites secondaires	13
IV. Flavonoïdes	15
1. Structure chimique	15
2. Biosynthèse des flavonoïdes	17
3. Extraction	18
4. Dosage	19
5. Principaux flavonoïdes isolés à partir de <i>Calotropis procera</i>	19
6. Intérêts des flavonoïdes	20
6.1. Pour la plante	20
6.2 Pour la santé humaine	20

I. Eliciteurs	21
1. Généralité	21
2. Classification des éliciteurs	21
2.1 Eliciteurs biotiques.....	22
2.2 Eliciteurs abiotiques.....	22
3. Facteurs affectant l'éllicitation	23
3.1 Concentration d'éliciteur	23
3.2 Durée du contact avec l'éliciteur	23
3.3 Composition du milieu nutritif.....	24
3. Effet des éliciteurs sur la production des métabolites secondaires	24
VI. <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	25
1. Caractéristiques de la bactérie.....	25
2. Structure génomique d' <i>Agrobacterium</i>	26
3. Mécanismes infectieux	27
4. Utilisation de l' <i>Agrobacterium tumefaciens</i> pour l'induction de la callogenèse	28

Matériels et méthodes

I. Objectifs du travail.....	30
II. Obtention des vitrosemis.....	30
1. Matériel végétal.....	30
2. Milieu de culture	30
3. Réalisation de la culture	32
3.1 Conditions d'asepsie	32
3.2 Désinfection des graines	32
3.3 Mise en culture.....	32
4. Paramètres étudiés.....	33
III. Micropropagation (fragmentation-élongation)	33
1. Matériel végétal.....	33
2. Milieu de micropropagation	33
3. Technique proprement dite.....	33
4. Paramètres étudiés.....	34
IV. Callogenèse (partie réalisée par OUARAS, Doctorat en cours)	34
1. Matériel végétal.....	34
2. Milieux de culture	34
3. Induction de la callogenèse	35
4. Repiquages	35

V. Elicitation des cals par l'acide salicylique	35
1. Matériel végétal.....	35
2. Milieux d'élicitation par l'acide salicylique.....	35
3. Mise en culture.....	36
4. Paramètres étudiés.....	36
VI. Extraction et dosage des phénols totaux	37
1. Extraction	37
2. Dosage.....	37
VII. Induction des cals par <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	38
1. Souches bactériennes.....	38
2. Culture et activation des souches	38
3. Mise en suspension des souches bactériennes.....	39
4. Infection des vitrosemis par <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	39
5. Isolement de cals induits	39
6. Paramètres étudiés.....	40
VIII. Analyses statistiques et représentation graphiques.....	40
IX. Protocoles expérimentaux.....	41
1. Micropropagation.....	41
2. Callognèse	42
3. Elicitation par l'acide salicylique	43
<u>Résultats et interprétation</u>	
I. Obtention des vitrosemis de <i>Calotropis procera</i>	44
1. Taux de contamination	44
2. Taux de germination.....	44
3. Développement des vitrosemis.....	44
3.1 Nombre moyen de feuilles par vitrosemis	44
3.2 Longueur moyenne des vitrosemis	45
II. Micropropagation (fragmentation-élongation)	47
1. Première subculture.....	47
2.1 Taux de contamination.....	47
2.2 Taux de reprise des microboutures	47
2. Effet des subcultures sur les paramètres de croissance	47
2.1 Longueur moyenne de la tige.....	47
2.2 Nombre moyen de feuilles par vitroplant	48
III. Elicitation par l'acide salicylique	51

1. Evolution du poids frais moyen	52
1.1 Cals issus des fragments d'hypocotyles.....	52
1.1.2 Après 15 jours d'élicitation	53
1.1.3 Après 21 jours d'élicitation	55
1.1.4 Aspects des différents cals	57
1.2 Cals issus des fragments de racines	58
1.2.2 Après 15 jours d'élicitation	59
1.2.3 Après 21 jours d'élicitation	61
1.2.4 Aspects des différents cals	63
1.3 Cals issus des fragments de feuilles	64
1.3.1 Après 7 jours d'élicitation	64
1.3.2 Après 15 jours d'élicitation	65
1.3.3 Après 21 jours d'élicitation	66
1.3.4 Aspects des différents cals	68
1.3 Analyses globales.....	69
2. Evolution du poids sec moyen (PSM).....	70
2.1 Cals issus des fragments d'hypocotyles	70
2.1.1 Après 7 jours d'élicitation	70
2.1.2 Après 15 jours d'élicitation	71
2.1.3 Après 21 jours d'élicitation	72
2.2 Cals issus des fragments de racines.....	74
2.2.1 Après 7 jours d'élicitation	74
2.2.2 Après 15 jours d'élicitation	75
2.2.3 Après 21 jours d'élicitation	76
2.3 Cals issus des fragments de feuilles	78
2.3.1 Après 7 jours d'élicitation	78
2.3.2 Après 15 jours d'élicitation	79
2.4 Analyses globales.....	81
IV. Extraction et dosage des phénols totaux des cals élicités	83
1. Cals issus des fragments d'hypocotyles	83
1.1 Après 7 jours d'élicitation.....	83
1.2 Après 15 jours d'élicitation	84
1.3 Après 21 jours d'élicitation	86
2. Cals issus des fragments de racines.....	87
2.1 Après 7 jours d'élicitation	87

2.2 Après 15 jours d'élicitation	89
2.3 Après 21 jours d'élicitation	90
3. Cals issus des fragments de feuilles	92
3.1 Après 7 jours d'élicitation	92
3.2 Après 15 jours d'élicitation	93
3.3 Après 21 jours d'élicitation	94
4. Analyses globales.....	96
V. Bilan de l'élicitation par l'acide salicylique	97
VI. Essai d'induction de la callogenèse par l' <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	98
1. Taux de contamination	98
2. Souche E14.....	98
2.1 Nombre moyen de cals par tige.....	98
2.2 Nombre moyen de cals par feuille.....	99
2.3 Nombre moyen de cals par vitrosemis	100
3. Souche C58	101
4. Aspects des différents cals	102

Discussion

I. Obtention de vitrosemis de <i>Calotropis procera</i>	104
1. Taux de germination.....	104
2. Développement des vitrosemis.....	104
II. Micropropagation (fragmentation-élongation)	104
III. Elicitation par l'acide salicylique	106
1. Croissance des cals : poids frais moyen et poids sec moyen.....	106
2. Dosage des phénols totaux	107
IV. Essai d'induction de la callogenèse via <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	109
Conclusion	112
Références bibliographiques.....	113

Annexes

Résumé