

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 médicinal 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

Synthèse bibliographique

<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

Résumé

Calotropis procera est une plante médicinale d'importance considérable en raison de ses composants pharmaceutiques actifs, en particulier les polyphénols.

En effet, l'objectif de notre travail a consisté, en première étape, à obtenir des vitrosemis sur milieu MS sans hormones. Ensuite, la micropropagation à partir des vitrosemis âgés de 30 jours. Ainsi, la culture des graines a abouti à des vitrosemis d'une longueur moyenne de 12,5 cm. Cependant, le développement des microuboutures obtenues après micropropagation a montré que les potentialités des vitroplants s'épuisent au fur et à mesure des subcultures.

En deuxième étape, des cals issus des fragments d'hypocotyles, de racines et de feuilles préalablement obtenus dans l'obscurité totale sur les milieux BD3 (0,5mg/l 2,4-D et 0,3mg/l BAP) et BD4 (0,5mg/l 2,4-D et 0,4 mg/l BAP) ont été retenus pour l'élicitation par l'acide salicylique. En outre, deux traitements ont été testés : T1 (50 µM/l) et T2 (100 µM/l) en plus du témoin sans acide salicylique. Ainsi, les cals issus des fragments de feuilles sur le milieu BD4 et avec 50 µM/l ont montré les meilleurs PFM (1493 mg) et PSM (112,33 mg) après 21 jours d'élicitation par l'acide salicylique. Par ailleurs, ce sont les cals issus des fragments de racines sur le milieu BD3 et avec T0 qui ont enregistré les teneurs les plus élevées en phénols totaux (34,19 mg/g d'extrait brut), après 15 jours de culture.

Enfin, dans le but d'induire la callogénèse sur les vitrosemis de *Calotropis procera*. Ces derniers ont été infectés avec 3 dilutions de la suspension bactérienne de deux souches d'*Agrobacterium tumefaciens* : les souches E14 et C58. Ainsi, le meilleur nombre moyen de cals a été enregistré avec la souche E14 sur D2 (0,10) et D3 (0,15) (5 cal/vitrosemis). Ces cals ont été repiqués sur milieu MS solide et ont montré une bonne aptitude de croissance. Cependant, avec la souche C58, une légère callogénèse a été observée mais avec des taux très faibles.

Mots clé : 2,4-D, AS, *Agrobacterium tumefaciens*, BAP, Callogénèse, *Calotropis procera*, Elicitation, micropropagation, PFM, Phénols totaux, PSM, Souches E14 et C58.

Abstract

Calotropis procera is a medicinal plant of considerable importance because of its active pharmaceutical components, especially polyphenols.

Indeed, the objective of our work was, in the first step, to obtain vitrosemis on MS medium without hormones. Then, micropropagation from 30-day vitrosomes. Thus, the seed culture resulted in vitrosemis of an average length of 12.5 cm. However, the development of microuboutures obtained after micropropagation has shown that the potential of vitroplants are depleted as subcultures.

In the second stage, calli obtained from hypocotyl fragments, roots and leaves previously obtained in total darkness on BD3 media (0.5mg / l 2,4-D and 0,3mg / l BAP) and BD4 (0.5 mg / l 2,4-D and 0.4 mg / l BAP) were selected for elicitation with salicylic acid. In addition, two treatments were tested: T1 (50 µM / l) and T2 (100 µM / l) in addition to the control without salicylic acid. Thus, calli resulting from leaf fragments on BD4 medium and with 50 µM / l showed the best ASW (1493 mg) and ADW (112.33 mg) after 21 days of elicitation with salicylic acid. Moreover, it is the calli resulting from the root fragments on the medium BD3 and with T0 which recorded the highest levels of total phenols (34.19 mg / g of crude extract), after 15 days of culture.

Finally, in order to induce callogenesis on vitrosemis of *Calotropis procera*. The latter were infected with 3 dilutions of the bacterial suspension of two strains of *Agrobacterium*

tumefaciens : strains E14 and C58. Thus, the best average number of calli was recorded with strain E14 on D2 (0.10) and D3 (0.15) (5 callus / vitrosemos). These calli were subcultured on solid MS medium and showed good growth ability. However, with strain C58, a slight callogenesis was observed but with very low levels.

Key words : 2,4-D, ADW, ASW, AS, *Agrobacterium tumefaciens*, BAP, Callogenesis, *Calotropis procera*, Elicitation, micropropagation, Total Phenols, Strains E14 and C58.

ملخص

عشار باسق هو نبات طبي ذو أهمية كبيرة بسبب مكوناته الدوائية النشطة، وخاصة البوليفينول. في الواقع، الهدف من عملنا هو، في الخطوة الأولى الحصول على نبات انبوبي على وسط دون هرمونات. ثم، الإكثار الدقيق من نبات انبوبي عمره 30 يوم. وهكذا، أدت ثقافة البذور إلى الحصول على نباتات انبوية يبلغ متوسط طولها 12.5 سم. ومع ذلك، فقد أظهر تطوير الميكروبوتورات التي تم الحصول عليها بعد الإكثار الدقيق بان إمكانات النبات الانبوبي يستنفذ مع الثقافات الفرعية. في مرحلة ثانية، كالي من شرائط: الجذور والأوراق وفوق الفلجية سبق الحصول عليها في ظلام دامس على وسط BD3 (0,5mg/l 2,4-D et 0,3 mg/l BAP) و BD4 (0.5mg/l 2,4-D et 0,4 mg/l BAP) تم الاحتفاظ بها لاستنباطها بحمض الساليسيليك. بالإضافة إلى ذلك، تم اختبار اثنين من العلاجات T1 (50 µM/l) و T2 (100 µM/l) بالإضافة إلى السيطرة بدون حمض الساليسيك. وهكذا، فإن الكالي الناتج عن شظايا ورقة على وسط BD4 مع 50 ميكرو لتر/ل أظهر أعلى وزن طازج متوسط (1493 مغ) ووزن جاف متوسط (112.33 مغ) بعد 21 يوما من الاستنباط بحمض الساليسيك. وعلاوة على ذلك، فإن الكالي الناتج عن شظايا الجذور على وسط BD3T0 التي سجلت أعلى مستويات من إجمالي الفينول (34.19 مغ/غ زاستخراج) بعد 15 يوم من الثقافة. وأخيرا من أجل تحريض الكالس على مستوى النباتات الانبوية ل *Calotropis procera* تم اصابتها ب3 تخفيفات للتعليق البكتيري لسلاطين ل *Agrobacterium tumefaciens* : C58 و E14 على D2 (0.10) و D3 (0.15) (5 كالس/أنبوب نباتي).
ثما تم زرعها على وسط MS صلب وأظهرت قدرة نمو جيدة.
لكن مع السلالة تم ملاحظة ظهور الكالس ولكن مع مستويات منخفضة .
الكلمات المفتاحية: عشار باسق , الاستنباط , الإكثار الدقيق , وزن جاف متوسط , وزن طازج متوسط , حمض الساليسيك , 2,4-D, *Agrobacterium tumefaciens*, BAP,