

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-

Mémoire

En vue de l'obtention du diplôme de Master

Département : Productions végétales

Spécialité : Ressources génétiques et amélioration des productions végétales

THEME

Essai de production de métabolites secondaires d'intérêt médicinal à partir de tissus callogènes de *Calotropis procera L.*

Présenté par : Mlle. OUAFI Ouiza

Soutenu le 01/ 12 /2016

Jury:

Président	Mr. KHELIFI L.	Pr.	ENSA
Promotrice	Mme. KHELIFI M.	Pr.	l'ENSA
Examineurs	Mr. MORSLI A.	M.C.A	ENSA
	Mme. BENYAMMI R.	M.A.A	ENS Kouba.

Promotion : 2011-2016

Sommaire

I.	Liste des abréviations	
II.	Liste des tableaux	
III.	Liste des figures	
IV.	Liste des planches	
Introduction générale		1
<u>Synthèse bibliographique</u>		
I.	<i>Calotropis procera Ait</i>	3
1.	Généralités	3
2.	Position systématique.....	3
3.	Origine et répartition géographique.....	4
4.	Caractéristiques botaniques.....	5
5.	Intérêts et utilisations.....	6
	5.1 En médecine traditionnelle.....	6
	5.2 En écologie.....	7
6.	Contenu en métabolites secondaires.....	7
II.	Propagation de <i>Calotropis procera</i>	8
1.	Méthodes traditionnelles.....	8
2.	Méthodes <i>in vitro</i>	8
	2.1 Vitrosemis.....	8
	2.2 Callogenèse.....	9
	2.2.1 Généralités.....	9
	a. Initiation de cals.....	9
	b. Facteurs influençant la callogenèse.....	9
	c. Caractéristiques des cals.....	10
	d. Intérêts des cals.....	11
	2.2.2 Callogenèse chez <i>Calotropis procera</i>	11
III.	Métabolites secondaires	12
IV.	Flavonoïdes	12
1.	Structure.....	13
2.	Biosynthèse.....	13
3.	Extraction.....	14
4.	Dosage.....	15
5.	Intérêts médicinales.....	15
V.	Elicitation	15
1.	Définition.....	15
2.	Eliciteurs.....	16
3.	Classification des éliciteurs.....	16

3.1. Eliciteurs abiotiques.....	16
3.2. Eliciteurs biotiques.....	16
3.3. Eliciteurs exogènes et endogènes.....	16
3.4. Eliciteurs et productions de métabolites secondaires.....	17
VI. <i>Agrobacterium tumefaciens</i>.....	18
1. Généralités sur la bactérie.....	18
2. Taxonomie d' <i>Agrobactérie tumefaciens</i>	18
3. Structure du génome de la bactérie C58.....	18
4. Caractéristique du plasmide Ti.....	19
5. Processus de pathogenèse.....	20
5.1. Adhésion bactérie-plante.....	21
5.2. Activation des gènes vir.....	21
5.3. Insertion de l'ADN-T dans le génome de la cellule végétale.....	22
6. Utilisation de l' <i>Agrobacterium tumefaciens</i> pour l'induction de la callogénèse.....	22

Matériels et méthodes

I. Rappel de l'objectif du travail.....	24
II. Obtention des vitrosemis.....	24
1. Matériel végétal.....	24
2. Milieu de culture.....	24
3. Mise en culture.....	25
3.1. Conditions d'asepsie.....	25
3.2. Stérilisation des graines.....	26
3.3. Mise en culture.....	26
4. Paramètres étudiés.....	26
5. Callogénèse.....	26
1. Matériel végétal.....	26
2. Milieux de culture.....	26
3. Induction de la callogénèse.....	27
4. Paramètres étudiés.....	27
6. Elicitation des cals par le saccharose.....	28
1. Matériel végétal.....	28
2. Milieux de culture et concentrations de saccharose testées.....	28
3. Mise en culture.....	29
4. Paramètres étudiées.....	29
7. Extraction et dosage des phénols totaux et des flavonoïdes totaux.....	29
1. Extraction.....	29
2. Dosage.....	29
2.1. Phénols totaux.....	29
2.2. Flavonoïdes totaux.....	30

8. <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	30
1. Matériel biologique.....	30
2. Activation des souches.....	30
3. Mise en suspension des souches bactériennes.....	31
4. Inoculation et co-culture de la plante avec les bactéries.....	31
5. Paramètres étudiés.....	32
9. Analyses statistiques et représentations graphiques	33
10. Protocoles expérimentaux	33
1. Callogenèse.....	34
2. Elicitation par le saccharose.....	35
3. Infection par <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	36

Résultats et interprétations

I. Obtention des vitrosemis de <i>Calotropis procera</i>	37
1. Taux de contamination.....	37
2. Taux de germination.....	37
3. Développement des vitrosemis.....	37
3.1. Nombre moyen de feuilles par vitrosemis.....	37
3.2. Longueur moyenne des vitrosemis.....	38
II. Callogenèse	38
1. Taux de contamination.....	38
2. Taux de réactivité des explants.....	37
2.1. Différentes combinaisons hormonales.....	40
2.2. Différents types d'explants.....	42
3. Evolution de la surface moyenne des cals et du poids frais.....	43
3.1. Avant le premier repiquage.....	43
3.1.1. Surface moyenne (SM).....	43
a. Cals issus de fragments de racines.....	43
b. Cals issus de fragments de feuilles.....	45
c. Cals issus de fragments d'hypocotyles.....	46
d. Analyse statistique globale.....	47
3.1.2. Poids frais moyen (PFM).....	48
a. Cals issus de fragments de racines.....	47
b. Cals issus de fragments de feuilles.....	49
c. Cals issus de fragments d'hypocotyles.....	50
d. Analyse statistique globale.....	51
3.2. Premier repiquage.....	51
3.2.1. Surface moyenne.....	51
a. Cals issus de fragments de racines.....	51
b. Cals issus de fragments de feuilles.....	52
c. Cals issus de fragments d'hypocotyles.....	53
d. Analyse statistique globale.....	55
3.2.2. Poids frais moyen.....	55
a. Cals issus de fragments de racines.....	55
b. Cals issus de fragments de feuilles.....	56
c. Cals issus de fragments d'hypocotyles.....	57
d. Analyse statistique globale.....	58

3.2.3. Bilan récapitulatif des analyses statistiques globales de la SM et du PFM des cals avant et après le 1 ^{er} repiquage.....	60
3.3. Deuxième repiquage.....	61
3.3.1. Cals issus de fragments de feuilles.....	61
3.3.2. Cals issus de fragments d'hypocotyles.....	61
3.4. Elicitation des cals par le saccharose.....	64
3.4.1. Poids frais moyen (PFM).....	64
a. Cals issus de fragments de feuilles.....	64
b. Cals issus de fragments d'hypocotyles.....	65
3.4.2. Poids sec moyen (PSM).....	66
a. Cals issus de fragments de feuilles.....	66
b. Cals issus de fragments d'hypocotyles.....	67
4. Organogenèse.....	70
4.1. Avant le premier repiquage.....	70
4.2. Premier repiquage.....	70
4.3. Deuxième repiquage.....	71
4.4. Cals d'élicitation par le saccharose.....	71
5. Taux de nécrose.....	71
5.1. Avant et après le repiquage.....	71
5.2. Elicitation par le saccharose.....	71
6. Aspects des cals (couleurs et textures).....	72
6.1. Avant le premier repiquage.....	74
6.2. Avant le deuxième repiquage.....	75
6.3. Après le deuxième repiquage.....	76
6.4. Aspects et couleurs des cals après élicitation.....	76
III. Extraction et dosage des phénols totaux et des flavonoïdes totaux.....	77
1. Phénols totaux (PT).....	77
1.1. Cals issus de fragments de feuilles.....	77
1.2. Cals issus de fragments d'hypocotyles.....	78
2. Flavonoïdes totaux.....	79
2.1. Cals issus de fragments de feuilles.....	79
2.2. Cals issus de fragments d'hypocotyles.....	80
IV. Bilan de l'élicitation par le saccharose.....	82
V. Essai d'induction de la callogenèse par <i>Agrobacterium tumefaciens</i>.....	83

Discussion générale

I. Obtention de vitrosemis de <i>calotropis procera</i>.....	85
1. Taux de germination.....	85
2. Développement des vitrosemis.....	85
II. La callogenèse.....	85
1. Taux de réactivité des explants.....	85
2. Evolution de la surface moyenne et du poids frais des cals avant et après le 1 ^{er} repiquage.....	86
3. Sélection des meilleurs traitements et explants pour le deuxième repiquage et l'élicitation par le saccharose.....	88

4. Organogenèse.....	88
5. Taux de nécrose.....	88
6. Aspect des cals.....	89
III. Elicitation par le saccharose.....	89
1. Poids frais moyen et poids sec moyen des cals élicités.....	89
2. Dosage des phénols totaux et des flavonoïdes totaux.....	90
IV. Essai d'induction de la callogenèse via <i>Agrobacterium tumefaciens</i>.....	91
.....	91
Conclusion générale.....	92
Références bibliographiques.....	94
Annexes	

Résumé

Calotropis procera est un arbuste xérophyte qui est très riche en métabolites secondaires, avec de multiples propriétés pharmacologiques comme les alcaloïdes, les stérols, les cardénolides et les flavonoïdes. Afin d'explorer les voies de la production *in vitro* de ces derniers et d'optimiser leur teneur chez *Calotropis procera*, des vitrosemis ont été obtenus sur milieu MS sans hormones, ces derniers ont été coupés en trois types d'explants (fragments de : racines, feuilles et hypocotyles) sur lesquels la callogenèse a été induite en utilisant sept combinaisons hormonales (2,4D/FAP) sous photopériode (16h Lum. / 8h Obs.) et dans l'obscurité totale. L'intensité de la callogenèse a été variable selon le type d'explant, la combinaison hormonale et aussi selon la photopériode et l'obscurité totale. Ainsi, avant le premier repiquage ce sont les cals issus d'explants d'hypocotyles qui ont donné les meilleurs résultats. Les milieux M2 (0,2 mg/l 2,4D et 0,3mg/l FAP) et M3 (0,3 mg/l 2,4D et 0,3 mg/l FAP) ont montré les meilleures surfaces moyennes, en outre le meilleur poids frais moyen (PFM) a été enregistré sur milieu M2. Après le premier repiquage, les fragments de feuilles et d'hypocotyles ont montré les meilleures SM et les meilleurs PFM sur milieux M2 et M5 (0,5 mg/l 2,4D et 0,3 mg/l FAP). Après le deuxième repiquage, seuls les cals issus des fragments de feuilles sous photopériode et d'hypocotyles dans l'obscurité totale sur milieux M2 et M5 qui ont été retenus pour être élicités par le saccharose où quatre concentrations ont été testées (0 g/l=C0, 20 g/l=C1, 60 g/l=C2, 80 g/l=C3). Les cals des fragments de feuille du traitement T2 sur C2 ont montré les PFM et PSM les plus élevés. Par ailleurs, ce sont les cals des fragments d'hypocotyles du traitement T5' sur C0 qui ont enregistré les teneurs les plus élevés en phénols totaux (397,7 mg/g d'extrait) et (10,45 mg/ g d'extrait) sur C3. Quant à l'essai d'induction de la callogenèse via *Agrobacterium tumefaciens* sur trois types d'explants (fragments de : racines, feuilles et apex) a malheureusement été négatif.

Mots clé : 2,4-D, *Agrobacterium tumefaciens*, Callogenèse, *Calotropis procera*, FAP, Flavonoïdes totaux, PFM, Phénols totaux, PSM et SM.

Abstract

Calotropis procera is a shrub that is very rich in secondary metabolites, with multiple pharmacological properties such as alkaloids, sterols, cardenolides and flavonoids. In order to explore the routes of *in vitro* production of the latter and to optimize their content in *Calotropis procera*, plantlets were obtained on hormone-free on MS medium, the latter were cut into three types of explants (fragments of roots, leaves and hypocotyls) on which callogenesis was induced using seven hormonal combinations (2,4D / FAP) Under photoperiod (16h Light / 8h Dark.) and in total darkness. The intensity of the callogenesis varied according to the type of explant, the hormonal combination and also according to photoperiod and total darkness. Thus, before the first transplanting, calluses from hypocotyl explants gave the best results. M2 media (0.2 mg/l 2.4D and 0.3 mg/l FAP) and M3 (0.3 mg/l 2.4D and 0.3 mg/l FAP) showed the best average surfaces, and the best mean weight was recorded on M2 medium. After the first transplanting, the fragments of leaves and hypocotyls showed the best AS and the best ASW on M2 and M5 media (0.5 mg/l 2.4D and 0.3 mg/l FAP). After the second subculture, only calli from leaf fragments under photoperiod and hypocotyls in total darkness on media M2 and M5 which were retained to be elicited by sucrose, where four concentrations were tested (0 g / l = C0, 20 g / l = C1, 60 g / l = C2, 80 g / l = C3). The calli of the leaf fragments of the T2 treatment on C2 showed the highest ASW and ADW. The highest levels of total phenols (397.7 mg / g of extract) and (10.45 mg / g of the extract) were recorded in the calluses of the hypocotyl fragments of the T5 'treatment on C0. Extract) on C3. The test for the induction of callogenesis with *Agrobacterium tumefaciens* on three types of explants (fragments of roots leaves and apex) was unfortunately negative.

Keywords : 2,4-D, ADW, *Agrobacterium tumefaciens*, AS, ASW, *Calotropis procera*, Callogenesis, FAP, total Phenols and total Flavonoids

ملخص

عشار باسق هو شجيرة غنية جدا بالمركبات الثانوية، مع الخصائص دوائية متعددة كما القلويدات ، والفلافونيدات . لاستكشاف إنتاج هذه المركبات وتحسين محتواها في عشار باسق، والحصول على نبات أنبوبي على وسط MS دون هرمونات، وأنها قطعت إلى ثلاثة أنواع من إكسبلنتس (شظايا: الجذور والأوراق و فوق الفلقية) الذي كان المستحث على الكالس باستخدام سبع مجموعات الهرمونية (D / FAP2.4) الضوئية (6 ساعة ضوء / 8 ساعة ظلام). كانت شدة الكالس متغيرة تبعاً لنوع الإكسبلنتس ، والجمع بين الهرمونات وأيضاً فترة الإضاءة والظلام الدامس. وهكذا، قبل عملية الزرع الأولى هي النسيج من إكسبلنتس الأوراق و فوق الفلقية الذي أعطى أفضل النتائج. وأظهر الوسط M2 و M3 أفضل السطوح المتوسطة، كما كان أفضل الوزن الطازج على M2. بعد عملية الزرع الأول، أظهرت أجزاء من أوراق الشجر والأوراق و فوق الفلقية أفضل مساحة متوسطة على M2 و M5 (0.5 D2.4 و 0.3 FAP). بعد عملية الزرع الثاني، فقط الأوراق فوق الفلقية في ظلام دامس على البيئات M2 و M5 التي تم اختبارها لاستخلاصها من السكروز حيث تم اختبار أربعة تركيزات (0 غرام / لتر = C0، 20 جم / لتر = C1، 60 جم / لتر = C2، 80 جم / لتر = C3). أظهر الكالس أحسن مساحة متوسطة للعلاج T2 C2 وأعلى وزن جاف متوسط. وعلاوة على ذلك، الأوراق فوق الفلقية للكالس T5 من 'على C0 التي سجلت أعلى مستويات من إجمالي الفينول (397.7 ملغم / ز استخراج) و (10.45 ملغم / غم من استخراج) في C3. أما بالنسبة لتحريض الكالس عبر الأجرعية المورمة اختبار ثلاثة أنواع من إكسبلنتس (الجذور والأوراق وقمة) كانت سلبية للأسف.

الكلمات المفتاحية: عشار باسق، المستحث على الكالس ، 2,4-D، FAP، مم، وجم، مجموع الفينولات، مجموع فلافونيدات والأجرعية المورمة.