

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية

République Algérienne Démocratique et Populaire

وزارة التعليم العالي والبحث العلمي

Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique

المدرسة الوطنية العليا للفلاحة الحراش – الجزائر

Ecole Nationale Supérieure 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* (Ait.)

Présenté par : Mr. HADOUELHADJ Dahmane

Soutenu le 28/ 09 /2017

Jury :

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

Sommaire

- I. Liste des abréviations
- II. Liste des tableaux
- III. Liste des figures
- IV. Liste des planches

INTRODUCTION GENERALE.....	1
----------------------------	---

Synthèse bibliographique

I. Calotropis procera	3
1.1 Généralités	3
2. Position systématique	3
3. Biotope et distribution géographique	4
4. Caractéristiques botaniques.....	5
5. Intérêts et utilisations.....	7
5.1 En médecine traditionnelle	7
5.2 En médecine moderne	7
5.3 En écologie	10
6. Contenu en métabolites secondaires.....	10
II. Propagation de Calotropis procera	11
1. Méthodes traditionnelles	11
2. Méthodes <i>in vitro</i>	11
2.1 Vitrosemis.....	11
2.2 Callogenèse.....	12
2.2.1 Généralités	12
2.3 Intérêts des cals.....	14
2.4 Callogenèse chez <i>Calotropis procera</i>	14
III. Métabolites secondaires	15
1. Définition	Erreur ! Signet non défini.
2. Classification des métabolites secondaires.....	15
3. Les composés phénoliques.....	15
3.1 Flavonoïdes.....	16
3.2 Structure	17
3.3 Classification des flavonoïdes.....	17
3.4 Biosynthèse	19
3.5 Extraction.....	20
3.6 Dosage	20

3.7	Intérêts médicinales	20
4.	Flavonoïdes dans les tissus callogènes	21
IV.	Elicitation	22
1.	Définition	22
2.	Eliciteur	22
3.	Classification des éliciteurs.....	22
3.1	Eliciteurs abiotiques	22
3.2	Eliciteurs biotiques	22
3.3	Eliciteurs exogènes et endogènes	23
4.	Optimisation de la production de métabolites secondaires par élicitation.....	24

Matériels et méthodes

I.	Obtention des vitrosemis	27
1.	Matériel végétal	27
2.	Milieu de culture	27
3.	Mise en culture.....	29
3.1	Conditions d'asepsie.....	29
3.2	Stérilisation des graines.....	30
3.3	Mise en culture.....	30
4.	Paramètres étudiés	30
II.	Callogenèse.....	30
1.	Matériel végétal	30
2.	Milieus de callogenèse	31
3.	Paramètres étudiés	31
4.	Repiquage.....	32
III.	Elicitation des cals par l'extrait de levure.....	32
1.	Matériel végétal	32
2.	Milieus d'élicitation par l'extrait de levure	32
3.	Mise en culture.....	33
4.	Paramètres étudiés	33
IV.	Extraction et dosage des phénols totaux et des flavonoïdes totaux	33
1.	Extraction.....	33
2.	Dosage	33
2.1.	Phénols totaux.....	33
2.2.	Flavonoïdes totaux	34
V.	Analyses statistiques et représentation graphiques	34

VI. Protocoles expérimentaux	35
1. Callogenèse.....	35
2. Elicitation	35

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	38
2.1 Différentes combinaisons hormonales.....	40
Aspects des cals obtenu	42
2.2 Différents types d'explants.....	43
3. Evolution du poids frais des cals.....	44
3.1 Avant le premier repiquage.....	44
3.1.1 Cals issus de fragments d'épicotyles	44
3.1.2 Cals issus de fragments d'hypocotyles	45
3.1.3 Cals issus de fragments de racines	47
3.1.4 Cals issus de fragments de feuilles	48
3.1.5 Aspects des cals obtenus.....	50
3.1.6 Analyse statistique globale.....	51
3.2 Premier repiquage.....	51
3.2.1 Cals issus de fragments d'épicotyles	51
3.2.2 Cals issus de fragments d'hypocotyles	53
3.2.3 Cals issus de fragments de racines	54
3.2.4 Cals issus de fragments de feuilles	55
3.2.5 Analyse statistique globale.....	57
3.2.6 Aspects des cals obtenus.....	58
3.3 Bilan récapitulatif des analyses statistiques globales du PFM des cals avant et après le 1 ^{er} repiquage :	59
3.4 Elicitation par l'extrait de levure.	60
3.4.1 Poids frais moyen	60

a.	Cals issus de fragments d'épicotyles	60
i.	Après 17 jours d'élicitation.....	60
ii.	Après 35 jours d'élicitation.....	61
iii.	Analyse statistique après 17 et 35 jours d'élicitation	62
b.	Cals issus de fragments feuilles	63
i.	Après 17 jours d'élicitation.....	63
ii.	Après 35 jours d'élicitation.....	64
iii.	Analyse statistique après 17 et 35 jours d'élicitation	65
c.	Analyses globales.....	65
3.4.2	Poids sec moyen (PSM)	66
a.	Cals issus de fragments d'épicotyles	66
i.	Après 17 jours d'élicitation.....	66
ii.	Après 35 jours d'élicitation.....	67
iii.	Analyse statistique après 17 et 35 jours d'élicitation	68
b.	Cals issus de fragments de feuilles	69
i.	Après 17 jours d'élicitation.....	69
ii.	Après 35 jours d'élicitation	70
iii.	Analyse statistique après 17 et 35 jours d'élicitation	71
c.	Analyse globale.....	71
d.	Aspects de différentes cals.....	72
4.	Taux de nécrose.....	74
4.1	Avant le repiquage.....	74
4.2	Après le repiquage.....	74
4.3	Elicitation par l'extrait de levure	74
4.3.1	Après 17 jours.....	74
4.3.2	Après 35 jours.....	74
5.	Aspects des cals (couleur et texture)	74
III.	Extraction et dosage des phénols totaux et des flavonoïdes totaux des cals élicités	82
1.	Phénols totaux (PT)	82
1.1	Cals issus de fragments d'épicotyles	82
1.1.1	Après 17 jours d'élicitation.....	82
1.1.2	Après 35 jours d'élicitation.....	83
1.1.3	Analyse statistique après 17 et 35 jours d'élicitation	84
1.2	Cals issus de fragments de feuilles	85
1.2.1	Après 17 jours d'élicitation.....	85
1.2.2	Après 35 jours d'élicitation.....	86

1.2.3	Analyse statistique après 17 et 35 jours.....	87
1.3	Analyse globale.....	88
2.	Flavonoïdes totaux	89
2.1	Cals issus de fragments d'épicotyles	89
2.1.1	Après 17 jours d'élicitation.....	89
2.1.2	Après 35 jours d'élicitation.....	90
2.1.3	Analyse statistique après 17 et 35 jours d'élicitation	91
2.2	Feuilles.....	92
2.2.1	Après 17 jours d'élicitation.....	92
2.2.2	Après 35 jours d'élicitation.....	93
2.2.3	Analyse statistique après 17 et 35 jours d'élicitation	94
2.3	Analyse globale.....	95

Discussion générale

I.	Obtention de vitrosemis de <i>Calotropis procera</i>	96
1.	Taux de germination.....	96
2.	Développement des vitrosemis.....	96
II.	Callogenèse.....	96
1.	Taux de réactivité des explants	96
2.	Evolution du poids frais moyen des cals avant et après le 1 ^{er} repiquage	98
3.	Taux de nécrose.....	99
4.	Aspects et couleur des cals.....	100
III.	Elicitation par l'extrait de levure	100
1.	Croissance des cals : poids frais moyen et poids sec moyen	100
2.	Dosage des phénols totaux et flavonoïdes totaux	101
	Conclusion générale.....	105
	BEBLIOGRAPHIE	108

Annexe

Résumé

Résumé

Calotropis procera est une plante médicinale qui contient plusieurs métabolites secondaires notamment les alcaloïdes, les stéroïdes, les cardénolides et les flavonoïdes. Dans le but de produire ces métabolites *in vitro*, la callogenèse a été induite sur quatre types d'explants (fragments d'épicotyles, hypocotyles, racines, feuilles) issus de vitrosemis âgé de 30 jours. Les explants ont été cultivés sur milieu MS avec six combinaisons hormonales 2-4D/BAP sous photopériode (16h Lum/8h Obs) et dans l'obscurité totale.

Ainsi, après 35 jours de culture (avant le 1^{er} repiquage) les cals issus des fragments d'épicotyles et de feuilles ont donné les meilleurs PFM (1070,03 mg et 826,2 mg respectivement). En outre, les meilleurs PFM ont été obtenu sur milieu M2 (0,5 mg/l 2-4D, 0,4 mg/l BAP) avant et après le 1^{er} repiquage. Par ailleurs, ce sont les cals issus des fragments d'épicotyles et de feuilles et le milieu M2 qui ont été retenus pour l'élucation par l'extrait de levure. Ainsi, deux concentrations ont été testées : C1 (100 mg/l) et C2 (200 mg/l) en plus de témoin sans extrait de levure. Après 17 jours d'élucation, les meilleurs PFM (398 mg) et PSM (33,1mg) ont été enregistrés sur les cals avec la concentration C1. Après 35 jours d'élucation les meilleurs résultats ont été obtenu sur les cals du milieu C0 pour ceux issus des fragments d'épicotyles et sur les concentrations C1 et C2 pour les cals issus des fragments de feuilles. Par ailleurs, après 17 et 35 jours d'élucation, l'extrait de levure n'a pas eu d'effet significatif sur les teneurs des cals d'épicotyles en PT. Par contre, pour ceux des feuilles c'est C1 qui a donné les meilleurs teneurs. Cependant, il a influencé significativement les teneurs en FT sur les milieux C1 (pour les cals de feuilles) et C2 (pour les cals d'épicotyles) où les meilleures teneurs ont atteint 18,5 mg/g d'extrait et 14,08 mg/g d'extrait respectivement.

Mots clé : 2,4-D, BAP, Callogenèse, *Calotropis procera*, Extrait de levure, Flavonoïdes totaux, PFM, Phénols totaux, PSM.

Summary

Calotropis procera is a medicinal plant that contains several secondary metabolites including alkaloids, sterols, cardenolides and flavonoids. In order to produce these metabolites *in vitro*, callogenesis was induced on four types of explants (fragments of epicotyls, hypocotyls, roots, leaves) derived from 30-day vitrosomes. Explants were grown on MS medium with six hormonal combinations 2-4D / BAP under photoperiod (16h L / 8h D) and in total darkness.

Thus, after 35 days of culture (before the first transplanting), the calluses obtained from the fragments of epicotyls and leaves gave the best results (1070,3 mg and 826,2 mg respectively). In addition, the best ASW were obtained on M2 medium (0.5 mg / l 2-4D, 0.4 mg / l BAP) before and after the first subculture. In addition, the calluses from the epicotyl and leaf fragments and the M2 medium were retained for elicitation by the yeast extract. Thus, two concentrations were tested: C1 (100 mg / l) and C2 (200 mg / l) in addition to control without yeast extract. After 17 days of elicitation, the best ASW (398 mg) and ADW (33,1 mg) were recorded on the calli with the C1 concentration. After 35 days of elicitation, the best results were obtained on the calli of the C0 medium for those resulting from the fragments of epicotyls and on the concentrations C1 and C2 for the calli obtained from the leaf fragments. Moreover, after 17 and 35 days of elicitation, the yeast extract did not have a significant effect on the levels of PT epicotyl calluses. On the other hand, for those of the leaves it is C1 which gave the best grades. However, it significantly influenced FT levels on C1 media (for callus calli) and C2 (for epicotyl callus), where the highest levels reached 18.5 mg / g of extract and 14.08 mg / g of extract respectively.

Keywords : 2,4-D,BAP, *Calotropis procera*, Callogenesis, , total Phenols, total Flavonoids, yeast extract.

ملخص

عشائر باسق هو نبتة طبية تحتوي على العديد من الأيض الثانوية بما في ذلك قلويدات، ستيروول، كاردينوليدس وفلافونويد. من أجل إنتاج هذه الأيض في المختبر، تم تحريض كالجينييسيس على أربعة أنواع من الإكسلنتس (شظايا من إبيكوتيلز، هيبوكوتيلز، جذور، أوراق) المستمدة من 30 يوما فيتروسوميس. وقد زرع المستكشفات على الوسط MS مع ستة مجموعات الهرمونية 2-4D / BAP / باب تحت التصوير الضوئي (16سا ض / 8سا ظ) وفي الظلام الدامس.

وهكذا، بعد 35 يوما من الثقافة الفرعية (قبل الزرع الأول)، أعطى كالي من شرائط الأبيكوتيل والأوراق أفضل متوسط الأوزان الطازجة (1070.03 ملغ و 826.2 ملغ على التوالي). وبالإضافة إلى ذلك، تم الحصول على أفضل وسط الطازجة على وسط M2 (BAP ملغ / لتر 0,4، 2,4-D ملغ / لتر 0,5) قبل وبعد الثقافة الفرعية الأولى. وبالإضافة إلى ذلك، تم الاحتفاظ بالنسخ من شظايا الأبيكوتيل والورق والوسط M2 لاستخلاص من خلاصة الخميرة. وهكذا، تم اختبار تركيزتين (100 ملغ / لتر C1 و 200 ملغ / لتر C2) بالإضافة إلى السيطرة دون استخراج الخميرة. بعد 17 يوما من الاستخلاص، تم تسجيل أفضل متوسط وزن (398 مجم) ومتوسط الوزن الجاف (33.1 مجم) على النسيج مع تركيز C1. بعد 35 يوما من الاستخلاص، تم الحصول على أفضل النتائج على كالي الوسط C0 لتلك الناتجة عن شظايا من إبيكوتيلز وعلى تركيزات C1 و C2 على كالي التي تم الحصول عليها من شظايا الأوراق. وعلاوة على ذلك، بعد 17 و 35 يوما من الاستخلاص مستخلص الخميرة لم يكن لها تأثير كبير على مستويات الفينول الكلي إبيكوتيل الكالس. من ناحية أخرى، بالنسبة لتلك من الأوراق هو C1 الذي أعطى أفضل الدرجات. ومع ذلك، فقد أثرت بشكل معنوي على محتويات الفلافونويد الكلية على C1 و C2، حيث وصلت أعلى المستويات 18.5 ملغم / غ من المستخلص و 14، 08 ملغ / غ من المستخلص على التوالي.

الكلمات المفتاحية، الفينولات، الفلافونيدات، 2,4-D، BAP، عشائر باسق، كالي. مستخلص الخميرة .