



Revue semestrielle – Université Ferhat Abbas Sétif 1

REVUE AGRICULTURE



Induction de la calogénèse sur différents types d'explants de *Calotropisprocera* (L.) ait *in vitro*

Ouaras N. E. I.¹, Khelifi-Slaoui M.¹, Khelifi L. I.

¹Laboratoire de Ressources Génétiques et Biotechnologies (L-RGB) Ecole Nationale Supérieure Agronomique d'Alger (ENSA).

E-mail : ouaras_nour90@yahoo.fr

ARTICLE INFO

RÉSUMÉ

Mots clés :

Calotropisprocera,
balance hormonale (2,4-D/FAP), taux de callogénèse, surface moyenne

Calotropisprocera (L.) Ait est une plante médicinale appartenant à la famille des Asclepiadaceae, très répandue en Afrique intertropicale et en Asie, dans les régions semi-arides. Connue dans le sud de l'Algérie sous le nom de « Krenka ». Elle représente un grenier de composés actifs, qui ont de multiples propriétés pharmacologiques et ce à travers toutes les parties de la plante. Parmi ces composés : les Alcaloïdes, les Cardenolides et les Flavonoïdes. En effet, l'objectif de notre travail consiste, en première étape, à explorer les voies de leur production *in vitro* et à optimiser leurs teneurs. Les tissus différenciés ou cals représentent l'une des voies biotechnologiques pour la production de métabolites secondaires. Ainsi, on a étudié l'effet de l'obscurité et de la lumière, ainsi que sept équilibres hormonaux de type 2,4-D/FAP sur l'induction de la callogénèse sur 2 types d'explants (fragments d'hypocotyles et de racines) issus de vitrosemis préalablement obtenus. A la 4^{ème} semaine, les taux de callogénèse pour la plupart des traitements a été de 100% sauf pour les traitements : M₀ et M₀' (0% pour les deux types d'explants), M₁' (26,66%) et M₁ (46,66%) pour les fragments de racines, M₂' (60%) et (73,33%) pour les fragments d'hypocotyles et de racines respectivement et M₂(40%) et (50%) dans le cas des fragments d'hypocotyles et de racines respectivement. La meilleure surface moyenne des cals a été obtenue sur le milieu M₅ (75,9mm² et 129,66 mm²) pour les fragments d'hypocotyles et de racines respectivement.

Introduction

Les plantes médicinales constituent les principales sources de médicaments; en effet la plupart des médicaments actuellement disponibles sont dérivés directement ou indirectement de celles-ci (ANIL K. S. and al., 2011), parmi ces plantes, le *Calotropisprocera* (Ait) R. Br. (Asclepiadaceae), est un arbuste xerophytique (HASSAN et al., 2015) d'environ deux mètres de haut (ABBASSI K. and al., 2004). Il est communément retrouvé dans les tropiques d'Asie, d'Amérique du sud, d'Afrique et du Moyen Orient (GOMAH N., 2013). En Algérie (localement appelé "Krenka"), l'espèce est assez commune dans les lits des oueds du Sahara, surtout dans les oasis (BABA AISSA F., 2011). L'arbuste constitue une source prometteuse de molécules anti-cancer, anti-inflammatoire, anti-microbienne, anti-diarrhéique et pleins d'autres propriétés (ROHIT S. et al., 2012). En effet, il contient différentes classes de métabolites secondaires comme les esters norditerpenic, carbonates organiques, cysteineproteaseprocerain, alcaloïdes, flavonoïdes, stérols et de nombreux cardenolides (ROHIT S. et al., 2012). La production de métabolites secondaires des plantes grâce à la technologie de culture de tissus a été une approche reconnue depuis le début des années 1950 (PANKAJ K. T. et al., 2012). L'utilisation la plus commune de culture de cals est la production de métabolites secondaires bien connues, d'origine naturelle, comme une alternative à leur extraction directe à partir de la plante mère, particulièrement dans le cas des

molécules non synthétisées chimiquement (MCDONALD K. A. and al., 1995). L'objectif de ce travail est d'établir un protocole d'induction de callogenèse *in vitro* chez *Calotropisprocera* en considérant quelques facteurs pouvant influencer celle-ci.

Matériel et Méthodes

A/Matériel biologique: les graines ont été collectées à partir de plants de *Calotropisprocera* poussant naturellement dans la région d'Adrar (Sahara Algérien)

B/Méthodes:

1- Stérilisation des graines :

Les graines ont été placées dans une solution d'hypochlorite de sodium 12° pendant 5 minutes, puis ont été rincées 3 fois dans l'eau distillée stérile pour une durée de deux minutes à chaque fois

2- Germination et obtention de vitroplants :

Après stérilisation, les graines ont été transférées dans le milieu MS (MS; Murashige and Skoog, 1962), et ont été placées dans la chambre de culture à $24\pm 2^\circ\text{C}$ avec une photopériode de 16 heures de lumière et de 8 heures d'obscurité.

3-Induction de cals:

a-Traitements préparés: le milieu utilisé pour l'induction de cals est le milieu MS. Le pH a été ajusté entre 5,6 et 5,8. Tous les traitements ont été supplémentés de saccharose (20g/l), d'agar (7g/l) et de régulateurs de croissance (hautement résistants aux températures élevées) incluant une auxine 2,4-Dichlorophenoxyacetic acide et une cytokinine: 6-furfurylamino purine (FAP) à différentes concentrations (7 traitements). Ces milieux ont été autoclavés à 120°C pendant 20 minutes. Après autoclavage, les milieux ont été versés dans des boîtes de pétries (90x10mm) sous hotte biologique à flux laminaire et ont été laissés pour la gélification.

b-Inoculation: les vitroplants âgés de 30 jours ont été utilisés comme source d'explants. Ils ont été découpés sous hotte biologique à flux laminaire, afin d'obtenir des fragments d'hypocotyles et de racines (de 0,5 cm de longueur). Les explants ont été inoculés dans les différents traitements préalablement préparés (à raison de cinq explants dans chaque boîte de pétrie). Pour chaque type d'explant, six boîtes de pétrie ont été utilisées, trois d'entre elles ont été incubées dans l'obscurité alors que les trois autres ont été exposées à la lumière fluorescente (avec une photopériode de 16h de lumière dans les 24heures) et sont toutes déposées dans la chambre de culture à $24\pm 2^\circ\text{C}$. Après 4 semaines, Le taux d'induction de la callogenèse a été déterminé et la surface moyenne des cals a été mesurée.

NB: Mn: désigne le traitement incubé dans l'obscurité;

M'n: désigne le traitement exposé à la lumière

4- Détermination du taux d'induction de la callogenèse :

La réactivité des explants (en pourcentage) représente le nombre total d'explants présentant un début de callogenèse par rapport au nombre total d'explants inoculés.

5- Détermination de la surface moyenne des cals :

Le développement des cals a été estimé par la surface moyenne en mm^2 qui représente la somme totale des surfaces de cals par rapport au nombre d'explants réactifs.

6- Analyse statistiques des données :

Les différents paramètres étudiés sont comme suit : deux types d'explants (hypocotyles et racines), deux photo-environnements: obscurité totale et photopériode de 16h de lumière et 8h d'obscurité et sept différents milieux. Le dispositif expérimental utilisé est la randomisation totale. L'analyse de la variance est effectuée à l'aide du logiciel SPSS Statistics 17.0. Cette analyse est complétée par le test de Tukey pour la comparaison des moyennes.

Résultats et discussion :

1/Taux d'induction de la callogenèse :

Les cals sont des tissus amorphes qui constituent une masse cellulaire dédifférenciée et inorganisée (George et al. 2008). Ils peuvent être utilisés comme une source de matériel pour des études biochimiques et moléculaires, et pour la production de suspensions cellulaires, de protoplastes, de l'organogénèse, de l'embryogénèse somatique et de métabolites secondaires (Hall R. D., 1991).

Selon la **Figure 1**. Le taux d'induction de la callogénèse chez les explants de racines est amélioré dans l'obscurité. En effet, il passe de 26,66% dans le milieu M₁' à 46,66% dans le milieu M₁. GEORGE et al., 2008 ont mentionné que les cals dont les cellules se divisent dans des milieux exempts de cytokinines, sont capables de les produire naturellement. De plus, TAVAKKOL A. R. et al. (2011) ont rapporté que les auxines et les cytokinines sont largement utilisées pour l'induction de la callogénèse et que le taux des auxines naturelles augmente dans l'obscurité. D'autres part, les taux d'induction de la callogénèse chez les explants d'hypocotyles et de racines ont été améliorés en présence de la lumière (40% et 50% dans le milieu M₂ quant au milieu M₂' ils sont de l'ordre de 60% et 73,33%) (Figure 1.). En effet, TAVAKKOL A. R. et al. (2011) ont observé que la lumière avait un effet positif sur l'induction de la callogénèse pour les explants d'hypocotyles chez le Colza.

Le meilleur taux d'induction (100%) a été obtenu dans les milieux où le 2,4-D a été utilisé en combinaison avec le FAP. En effet, TAVAKKOL R. et al. (2011) ont trouvé que l'utilisation du 2,4-D était très efficace particulièrement en combinaison avec la cytokinine BA.

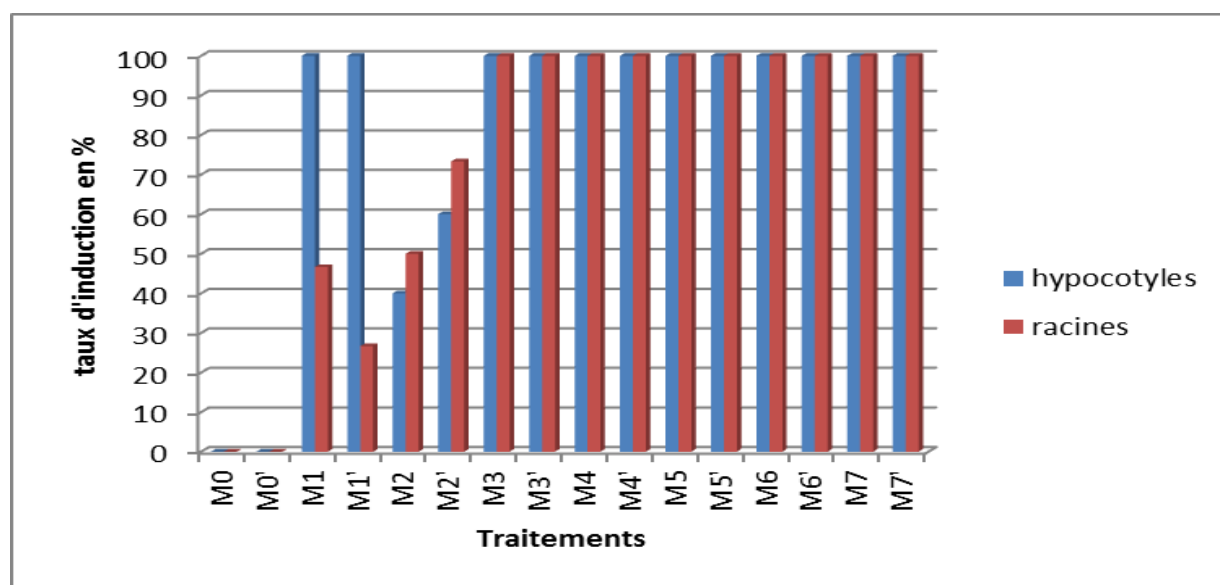


Figure 1. Taux d'induction de callogénèse obtenus sur les différents milieux avec les deux types d'explants.

2/ Surface moyenne:

Tous les facteurs (différents milieux, type d'explant et type de photoenvironnement) avaient un effet très hautement significatif sur la surface moyenne des cals, individuellement. Cependant, ils avaient un effet hautement significatif lorsqu'ils étaient combinés (**tableau 1.**)

Afin de caractériser la croissance des cals de *Calotropisprocera*, la surface moyenne a été mesurée. Après un mois de culture, la surface moyenne la plus élevée a été obtenue avec le milieu M₅ pour les deux types d'explants (hypocotyles 75,9 mm² et racines 129,66 mm²). Selon la **Figure 2**. dans la plupart des traitements, les surfaces moyennes des cals misent dans l'obscurité ont été meilleures par rapport à celles obtenues avec les cals exposés à la lumière. Différents facteurs peuvent influencer la croissance de cellules telles que le milieu de culture, l'origine de l'explant, les régulateurs de croissance et les conditions environnementales (GALAZ-AVALOSR. M. et al., 2012). En effet, GEORGE E.F. et al. (2008) ont rapporté que les cals de quelques espèces peuvent être initiés et croître dans l'obscurité, alors que les tissus d'autres espèces peuvent croître mieux en présence de la lumière, ils ont mentionné aussi, que les cals de quelques espèces ne peuvent pas croître en présence de la lumière ou leurs croissances peuvent être sévèrement inhibées par celle-ci.

D'autre part, les surfaces moyennes de cals obtenues à partir d'explants de racines ont été plus élevées par rapport aux explants d'hypocotyles, pour la plupart des traitements. Plusieurs parties d'une plante peuvent avoir un potentiel ultime de prolifération *in vitro*, mais, il est fréquent que la callogénèse est établie beaucoup plus facilement dans certains organes plutôt que dans d'autres (GEORGE E.F. et al., 2008).

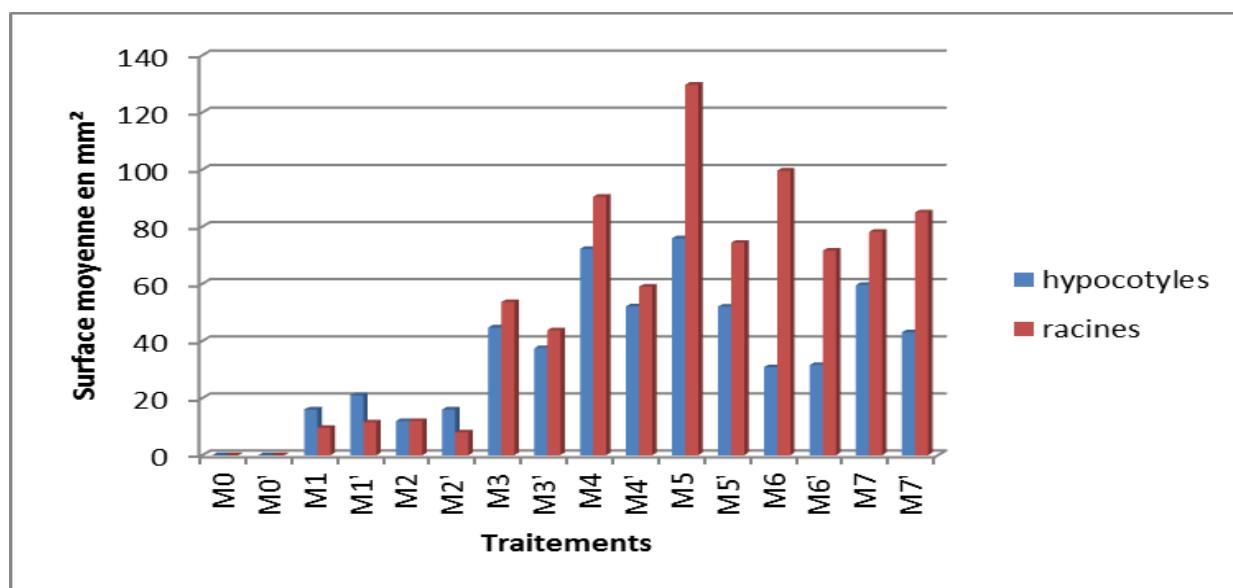


Figure 2. Surfaces moyennes obtenues dans les différents milieux avec les deux types d'explants

Tableau 1. Analyse de la variance pour les effets du Traitement, du Photoenvironnement et du Type d'explant sur la surface moyenne des cals

Source de variation	DF	Mean Square
Traitement	6	10372,908***
Photoenvironnement	1	3370,600***
Type d'explant	1	7337,881***
Traitement* Photoenvironnement	6	713,067***
Traitement*Type d'explant	6	1628,865***
Photoenvironnement* Type d'explant	1	336,400*
Traitement*photoenvironnement*Type d'explant	6	268,644**
Erreur	56	82,794
Total	84	

Conclusion:

En conclusion, nous avons établi un protocole d'induction de la callogenèse simple et efficient à partir d'explants d'hypocotyles et de racines issus de vitro plants de *Calotropisprocera*. A la 4eme semaine, le taux d'induction de la callogenèse était de 100% pour la plupart des traitements et les meilleures surfaces moyennes ont été obtenues avec le traitement M₅ (75,9mm² et 129,66 mm²) pour les fragments d'hypocotyles et de racines respectivement. La présente étude consiste en un rapport initial pour l'établissement de cals chez *Calotropisprocera* et il est en court de développement.

Références bibliographiques

ABBASSI K., ATAY KADIRI Z. et GHAOUT S. (2004) Activité biologique des feuilles de *Calotropisprocera* (Ait. R. Br) sur le criquet pèlerin (Schistocercagregaria, Forsk. 1775). Zool. Baetica 15, 153-166.

ANIL K. S., RAJEEV K. AND RAJANDEEP K. (2011) PHARMACOGNOSTICAL ASPECTS OF *CALOTROPIS PROCERA* (Ait.) R. Br. International Journal of Pharma and Bio Sciences 2, 480-488.

BABA AISSA F. (2011) Encyclopedie Des Plantes Utiles. Elmarifa, BEO Alger. 496p.

GALAZ-AVALOS R.M., AGUILAR-DIAZ S., XOOL-GONZALEZ P. A., HUCHIN-MAY S. M. and LOYOLA-VARGAS M. V. " Callus, Suspension Culture, and Hairy Roots. Induction, Maintenance and Characterization" In : LOYOLA-VARGAS V. M. and OCHOA-ALEJO N. Plant Cell Culture Protocols, Methods in Molecular Biology, Vol. 877. Springer.

GEORGE E.F., HALL M.A., DE KLERK, G.J. (2008) Plant Propagation by Tissue Culture 3rd Edition, Vol. 1. Springer, Dordrecht, The Netherlands. 501 p.

GOMAH N. (2013) Antimicrobial activity of *Calotropisprocera*Ait. (Asclepiadaceae) and isolation of four flavonoid glycosides as the active constituents. World J MicrobiolBiotechnol 29, 1255–1262.

Premier Séminaire International sur: Systèmes de Production en Zones Semi-arides. Diversité Agronomique et Systèmes de Cultures. M'sila, 04 et 05 Novembre 2015

- HALL R. D. (1991) The initiation and maintenance of callus cultures of carrot and tobacco. In: Lindsey K (ed) Plant tissue culture manual. Supplement 3. Kluwer, The Netherlands, 1–19
- HASSAN L. M., GALAL T. M., FARAHAT E.A. and EL-MIDANY M. M. (2015) The biology of *Calotropisprocera* (Aiton) W. T. Trees 29, 311-320.
- KAREN A. MCDONALD, ALAN P. JACKMAN, JOHN E. THORUP, AND ABHAYA M. DANDEKAR (1995) Plant Callus as a Source of Biochemicals. Applied Biochemistry and Biotechnology 54, 95-108.
- PANKAJ K. T., SHIKHA A., SANJEEV K., VINEETA T. and DIPAK K. M. (2013) Callus culture and *in vitro* biosynthesis of cardiac glycosides from *Calotropis gigantea* (L.) Ait. In Vitro Cell. Dev. Biol.-Plant 49, 455–460.
- ROHIT S., GULAB S. T., BHAGWAN S. S., ASHISH S., MUKESHWAR P., ANJANA S. AND PRAKASH S. B. (2012) Therapeutic Potential of *Calotropisprocera*: A giant milkweed. Journal of Pharmacy and Biological Sciences 4, 42-57.
- TAVAKKOL A. R., ANGOSHTARI R. and KALANTARI S. (2011) Effects of light and different plant growth regulators on induction of callus growth in rapeseed (*Brassica napus* L.) genotypes. Plant Omics Journal 4(2), 60-67.