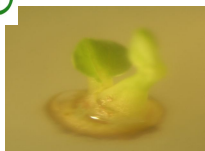


ESSAIS DE MULTIPLICATION IN VITRO PAR ORGANOGENESE INDIRECTE D'UNE PLANTE MEDICINALE *ARISTOLOCHIA LONGA* L.



*Saïdi F., *H.S. Cherif, * H. Metidji, ** C. Chaouia, * Rouibi A.,
*R. Mohamed Said, *M.S. Hamaidi, ** M.S. Adulhussain

* Faculté des Sciences Agronomiques Vétérinaire et Biologiques, Université Saad
Dahleb – Blida (Algérie), Département de Biologie

** Faculté des Sciences Agronomiques Vétérinaire et Biologiques, Université Saad
Dahleb – Blida (Algérie), Département d'Agronomie

Résumé: Nous tenons à signaler que les résultats sur l'organogénèse indirecte est une suite logique au travail que nous avons déjà réalisé et qui s'articule autour de l'organogénèse directe. Les deux travaux se complètent. Ainsi, nous précisons que les protocoles expérimentaux sont identiques. Les fragments du matériel végétal et les conditions de culture concernant la photopériode sont différents. Le présent travail a porté sur l'étude de la multiplication d'une plante médicinale *Aristolochia longa* L. par la technique de la culture in vitro par voie indirecte. L'analyse des résultats ont abouti à la détermination d'une méthodologie pour une meilleure désinfection des explants. L'utilisation de $HgCl_2$ à 0.6 g/l pendant 10min est plus efficace que l'hypochlorite de calcium. Les essais pratiqués ont révélé que les cals peuvent apparaître au bout de 40 jours à l'obscurité et dans un milieu de culture MS contenant 20g de saccharose, 0.1g/l d'acide ascorbique et les hormones de croissance BAP/ANA (1/1 mg/l), BAP/AIB (1/1mg/l), BAP/AIA (1/1mg/l) et Kinétine/AIA (1/1). L'apparition des bourgeons démarre à partir du 60^{ème} à 70^{ème} jours. Alors que, l'élongation est plus favorable sur le milieu MS sans hormone ou additionné à 1 mg/l GA_3 . L'induction des racines est plus efficace sur le milieu MS sans hormone. Dans l'étape de l'acclimatation, 75% des plantules obtenues ont pu survivre dans la tourbe plus de 1 mois.

Mots clés : organogénèse indirecte, plante médicinale, hormones de croissance

INTRODUCTION

Aristolochia longa L., plante médicinale herbacée localement connue sous le nom de Barrastam. Elle est fortement utilisée actuellement en médecine populaire Algérienne pour son effet anti-cancérigène. Elle appartient à la famille des Aristolochiaceae. Elle est localisée principalement au centre du pays. Actuellement, *Aristolochia longa* L. est connue plus particulièrement pour son principe actif,

l'acide aristolochique. Ce dernier a la capacité d'augmenter le pouvoir phagocytaire des globules blancs, d'où les propriétés cicatrisantes de cette plante. Elles peuvent être mises à profit au cours du traitement des fistules, ulcère, furonculoses, acnés rebelles et bien d'autres maladies. Ce travail représente et pour la première fois en Algérie, la multiplication et la conservation de cette espèce. Nous présenterons une approche biotechnologique des différentes étapes de la micropropagation par voie indirecte.

- Détermination d'un protocole efficace de la stérilisation des différents explants utilisés.
- L'initiation de la callogenèse, la multiplication des cals par fragmentation et l'induction de la caulogénèse et de la rhizogénèse à partir des explants de feuilles.
- Essais d'acclimatation des plantules obtenues.

MATERIEL ET METHODES

Matériel végétal: L'étude a porté sur les jeunes feuilles d'*Aristolochia longa* L. Les échantillons sont récoltés au niveau de la station de Chréa (BLIDA). Cette récolte s'est effectuée sur deux périodes courant mai 2007 et fin juillet 2007. L'expérimentation de la culture in vitro a été réalisée dans le laboratoire de l'ENARP (Bab El-Ezzouar).

Méthodes

1. Stérilisation du matériel végétal: Deux tests ont été réalisés pour la stérilisation des échantillons. Nous avons fait varier les concentrations en l'hypochlorite de calcium et ceux du chlorure mercurique. Toutes les étapes de désinfection ont lieu sous la hotte à flux laminaire

L'ensemble des expériences est résumé dans le tableau I :

Tableau I

Protocole de stérilisation I

	Désinfectant	Concentration	Temps de trempage
	Rinçage à l'eau courante		
	Bénomyl	1 g/l	30 min
	Ethanol	70%	30 secondes
Test 1	Hypochlorite de calcium Ca (OCI ₂)	3 mg/l	15 min
		5 mg/l	
		8 mg/l	
		11 mg/l	
Test 2	Chlorure mercurique HgCl ₂	0.2 mg/l	10 min
		0.35 mg/l	
		0.5 mg/l	
		0.8 mg/l	
	Rinçage 5 fois à l'eau distillée stérile		

L'eau distillée qui sert à la préparation des solutions désinfectantes et de rinçage, la verrerie et les pinces sont stérilisées à l'autoclave à une température de 120 ° C pendant une heure.

2. Milieu de culture: Tous les milieux utilisés dans cette étude sont stérilisés à autoclavage à 120°C, sous une pression de 1 bar pendant 20 minutes,

après ajustement du pH dont la valeur est de 5.7 à 5.8 soit avec du NaOH ou avec du HCl, selon le milieu, acide ou basique.

Le milieu de culture de base utilisé est celui de Murashige et Skoog (1962) (MS), qui comporte :

- *Sels minéraux* : Les macro-éléments MS; Les micro-éléments MS; Le Fer –EDTA
- *Vitamines de Morel*
- *Antioxydant* : Acide ascorbique ((0.1g/L)
- *Source de carbone* : Mannitol (20g/l)
- *Gélification* : l'agar-agar 7g/l
- *Les régulateurs de croissance*:

Pour obtenir des plantules à partir de fragments de plants, nous avons utilisé la technique de micropropagation par voie indirecte

2.1. Phase de callogenèse :

Tous les vitro-plants obtenus passent par la phase de callogenèse. Nous avons utilisé des fragments de feuilles de 0.25 cm². Les combinaisons hormonales utilisées entre les auxines et les cytokinines ont la même concentration (tableau II).

Tableau II

Combinaisons hormonales d'organogenèse indirecte

Première combinaison : BAP + auxines	
M ₁	1 mg/l BAP + 1 mg/l AIA
M ₂	1 mg/l BAP + 1 mg/l AIB
M ₃	1 mg/l BAP + 1 mg/l ANA
M ₄	1 mg/l BAP + 1 mg/l 2.4-D
Deuxième combinaison : Kinétine + auxines	
M ₅	1 mg/l Kin + 1 mg/l AIA
M ₆	1 mg/l Kin + 1 mg/l AIB
M ₇	1 mg/l Kin + 1 mg/l ANA
M ₈	1 mg/l Kin + 1 mg/l 2.4-D

2.2. Phase d'élongation

Nous avons établi des balances hormonales Gibbérelline / cytokinines (tableau III) dans le but de mettre en évidence leur influence sur l'allongement des pousses et des entre-nœuds de vitro-plants obtenus à partir des deux types d'organogenèse directe et indirecte.

Une meilleure élongation de ces derniers permet une bonne fragmentation des vitro-plants issus de l'introduction primaire. Le milieu de base utilisé est proposé par Murashige et Skoog (1962) (tableau III)

Tableau III

Balances hormonales du milieu d'élongation.

	Gibbérelline (GA ₃)	Cytokinines
M ₁	Sans hormones	
M ₂	1 mg/l GA ₃	0.5 mg/l BAP
M ₃	1 mg/l GA ₃	1 mg/l BAP
M ₄	1.5 mg/l GA ₃	0.5 mg/l BAP
M ₅	1 mg/l GA ₃	----

2.3. Phase d'enracinement

Cette étape se caractérise par la naissance de racines sur les tiges feuillées obtenues au stade de la multiplication. La rhizogenèse, comme tout phénomène d'organogenèse, est déclenchée par des interactions entre les hormones de croissance.

En effet, la différence majeure se situe principalement au niveau de l'équilibre hormonal qui se fera cette fois en faveur des auxines. Le milieu de base MS sans hormone et additionné aux quatre combinaisons hormonales entre le GA₃ et l'effet des auxines ont été testés (tableau IV).

Tableau IV

Balances hormonales du milieu d'enracinement

	Gibbérelline (GA ₃)	Cytokinines
M ₁	Sans hormones	
M ₂	0.5mg/l GA ₃	1mg/l 2.4 D
M ₃	0.5 mg/l GA ₃	1 mg/l AIA
M ₄	0.5 mg/l GA ₃	1 mg/l ANA
M ₅	0.5 mg/l GA ₃	1mg/l AIB

2.4. Acclimatation

Il s'agit de la dernière étape qui consiste à acclimater progressivement aux conditions externes les micro-plantules enracinées. Nous commençons en premier lieu, par l'élimination de la gélose de la base des plantules par un lavage à l'eau. Celle-ci contient un fongicide (bénomyl à 1g/l) car le milieu qui subsiste sur les racines favorise le développement de micro-organismes.

Les pousses enracinées sont transférées vers des gobelets contenant soit de la tourbe préalablement stérilisée à 120°C pendant 2 heures soit de la tourbe avec de la perlite. Les parties aériennes des plantes sont recouvertes par un cache en plastique transparent de manière à les maintenir dans un environnement qui avoisine 100 % d'humidité relative.

3. Conditions de culture: Les échantillons sont introduits dans des tubes à essais (20 x 2 cm) ou dans des boîtes de Pétri. Ils sont installés dans deux chambres de culture :

Chambre 1 : La température : 27 °C. ±2 ; La photopériode : 16 heures de lumière et 8 heures d'obscurité

Chambre 2 : La température : 27 °C ±2; La photopériode : 24 heures d'obscurité.

RESULTAT ET DISCUSSION

1. Stérilisation du matériel végétal

La stérilisation du matériel végétal avant la mise en culture est délicate. Les substances stérilisantes utilisées doivent avoir un double effet :

- Eviter l'infection due à la propagation des bactéries et des champignons.
- Eviter le traumatisme des tissus qui pourrait conduire à leur nécrose et à la mort. (Bouderrah, 1988).

Deux désinfectants ont été utilisés avec une variation des concentrations en hypochlorite de calcium et de chlorure mercurique. Les résultats obtenus, sont illustrés dans le graphe suivant (figure1) :

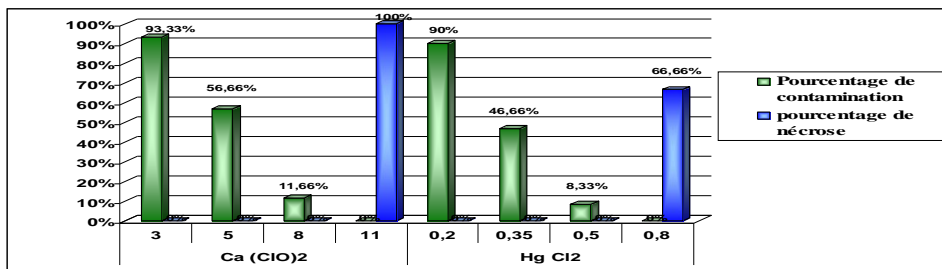


Figure 1. Effet de Ca(ClO)₂ et HgCl₂ sur le taux de contaminations

Ainsi, les résultats montrent que le taux de contamination peut diminuer jusqu'à 8,33 %, par l'utilisation de HgCl₂ à 0,5 mg/l pendant 10 minutes. L'hypochlorite de calcium à 8 mg/l pendant 15 minutes peut abaisser le taux de contamination jusqu'à 11,66 %. Nous avons remarqués aussi, que le taux de contaminations diminuait au fur et à mesure du transfert des explants d'un milieu à l'autre.

Les autres tests se sont avérés inefficaces à cause de :

- Pourcentage élevé de contaminations (93,33% pour Ca(ClO)₂ à 3 mg/l contre 90% HgCl₂ à 0,2 mg/l).
- Au niveau des fragments apparition des noircissements ayant favorisé la formation des nécroses (l'hypochlorite de calcium à doses supérieures à 8 mg/l et chlorure mercurique à 0,8 mg/l) (figure 13).

Les travaux menés par Gautheret (1959), Auge (1989) et Bajaj (1989) sur la stérilisation du matériel végétal, ont montré que le chlorure mercurique est un produit stérilisant très efficace pour la destruction des micro-organismes. Il doit être utilisé à des doses très faibles, suivi par de rinçages successifs soigneusement faits, car son élimination est difficile. Il a la possibilité de pénétrer dans les tissus, favorisant la formation de nécroses. Cela a été constaté lors de notre travail, par diminution des taux de contaminations et l'apparition des nécroses au fur et à mesure que nous augmentions la concentration.

Au contraire, l'hypochlorite de calcium est utilisé à des concentrations plus élevées et des durées plus longues car il ne pénètre pratiquement pas à l'intérieur des tissus.

Afin d'obtenir des plantules à partir des fragments d'*Aristolochia longa* L., nous avons tenté d'établir un protocole qui vise à obtenir des bourgeons avec passage par les cals .

2. Phase de callogenèse

Les explants utilisés pour l'induction des cals sont des fragments de feuilles avec une surface de 0,25 cm². Ces derniers sont repiqués sur le milieu de base MS additionné aux différentes combinaisons hormonales avec la même concentration.

Les explants étudiés sont introduits dans deux chambres de culture

Chambre 1 : La photopériode : 16 heures de lumière et 8 heure d’obscurité

Chambre2 : La photopériode : 24 heures d’obscurité.

2.1. Effet des différentes combinaisons hormonales sur le pourcentage des cals

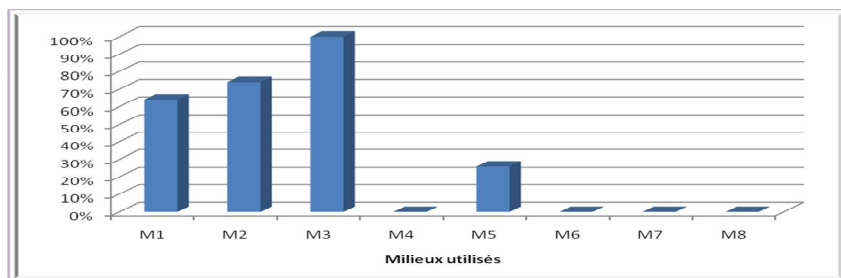


Figure 2. Effet des combinaisons hormonales sur l’apparition des cals

D’après les résultats, nous constatons que le pourcentage des cals obtenus sur le milieu M₃ (100%) est nettement supérieur à celui obtenu pour le milieu M₁ (64%) et M₂ (74%). Le milieu M₄ n’a donné aucun résultat.

Les résultats montrent que seul milieu qui contient les hormones de croissance : la Kinétine (1mg/l) et l’AIA (1mg/l) a pu induire l’apparition des cals. Les trois milieux M₆, M₇ et M₈ n’ont aucun effet.

Par ailleurs, tous les explants qui ont été introduits dans la chambre de culture 1 n’ont pas poussé. Ils ont brunis et se sont desséchés après 40 jours d’introduction et cela pour toutes les combinaisons hormonales

D’après les résultats obtenus, nous pouvons déduire que les différentes combinaisons hormonales ainsi que leurs concentrations n’ont pas le même effet sur l’aptitude à la callogenèse.

2.2. Effet des différentes combinaisons hormonales sur le poids des cals

Les mesures ont été faites sur les milieux ayant initié la formation des cals. Les milieux sont M₁, M₂, M₃ et M₅. L’évolution du poids frais des cals (figure 3) est suivie pendant 80 jours après l’introduction primaire

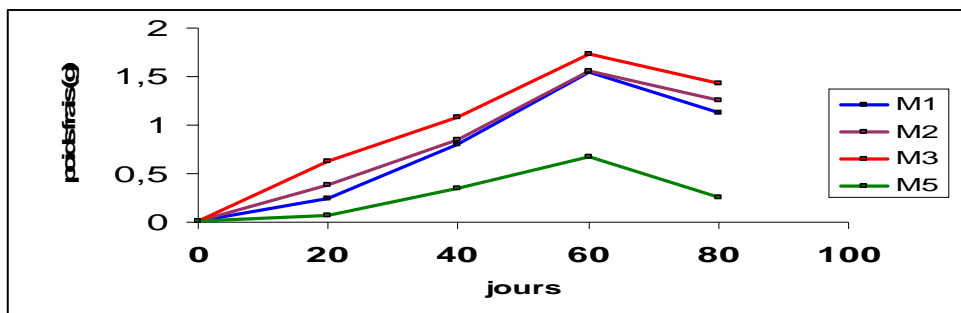


Figure 3. Evolution de la callogenèse exprimée en poids frais de feuilles sur les milieux de culture

Les résultats obtenus montrent que, la croissance des cals est continue pendant toute l'expérience. Elle atteint son maximum après 60 jours de culture pour les quatre types de milieux de culture. Au-delà, le poids frais chute pour tous les milieux. Le poids frais le plus élevé des cals est obtenu sur le milieu M₃, avec une valeur maximale de $(1.727 \pm 0.35 \text{ g})$.

Nous avons remarqué que l'évolution du poids frais des cals sur les milieux M₁ et M₂ est presque identique. Il atteint la valeur maximale après 60 jours de l'introduction primaire avec $(1,545 \pm 0.153)$ pour le milieu M₁ et $(1,553 \pm 0.235)$ pour le milieu M₂. Alors que le milieu M₅ présente un pouvoir callogenèse nettement plus faible comparé aux autres milieux.

Les résultats de l'analyse de la variance, nous permettent de dire que la variance interfactorielle présente une action très hautement significative sur le poids frais moyen des cals. Par conséquent, les différentes combinaisons en régulateurs de croissance entraînent un effet très hautement significatif sur le poids frais des cals.

Après 40 jours de mise en culture, selon le test de NEWMAN et KEULS au seuil de signification $\alpha=5\%$, trois groupes homogènes se dégagent (A, B et C) (tableau V).

Tableau V

Effet des hormones de croissance sur le poids frais des cals

Milieu	M1	M2	M3	M5
Moyenne (g)	0.817 ± 0.218	0.805 ± 0.068	1.069 ± 0.334	0.313 ± 0.294
Intervalle de confiance	[0.782 – 0.852]	[0.794 – 0.815]	[1.016 – 1.122]	[0.267 – 0.360]
Groupe homogène	A	A	B	C

2.3. Effet des différentes combinaisons hormonales sur la texture et la couleur des cals. Les cals issus des feuilles diffèrent par leur couleur et leur texture selon les milieux et les conditions de culture dans lesquelles ils se trouvent.

❖ Aspect des cals à l'obscurité

Concernant les feuilles, la callogenèse débute au niveau du contour de l'explant. Elle progresse le long des nervures et s'étale finalement sur le limbe. Les explants des feuilles mis à l'arbi de la lumière, ont donné des cals de couleur beige blanchâtre, ou brune. La texture est friable, parfois peu compacte selon les milieux de culture (Tableau VI).

Tableau VI

Couleur et texture des cals à l'obscurité

Milieu	Couleur	Texture
M1	Beige, blanchâtre ou brunâtre	Granuleuse et friable
M2	Blanchâtre ou beige	Granuleuse, compacte ou parfois friable
M3	Beige, jaunâtre ou brun	Noduleuse, friable, parfois peu compacte
M5	Beige ou brun	Dure et friable

Après 60 jours à l'obscurité, quelque soit la composition du milieu de culture, les cals deviennent pulvérulents et virent au brun. Lorsqu'ils sont transférés à la chambre de culture 1, ils gardent le même aspect sans aucun changement notable.

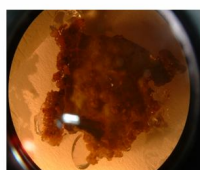
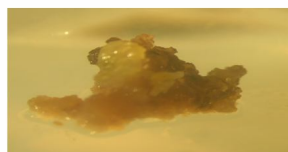


Figure 4. Début de formation des cals

Figure 5. Aspect des cals issus des milieux M₁ et M₂ à l'obscuritéFigure 6. Aspect des cals issus du milieu M₃ à l'obscuritéFigure 7. Aspect des cals issus du milieu M₅ à l'obscurité

❖ Aspect des cals à la lumière

Après 20 jours de leur introduction primaire, les explants ayant initié des cals sont transférés dans la chambre de culture 1. L'aspect des cals issus changent selon les milieux de culture (Tableau VII).

Tableau VII

Couleur et texture des cals à la lumière

Milieu	Couleur	Texture
M1	Verdâtre ou brunâtre	Granuleuse et friable
M2	Verdâtre, blanchâtre ou brune	Friable et Granuleuse
M3	Verdâtre, beige foncé	Noduleuse, friable parfois dure
M5	Brunes	Desséchés et friable

Nous remarquons ainsi que les cals exposés à la lumière changent d'aspect. Ceux des milieux M₁, M₂ et M₃, présentent une couleur beige-vert à blanc-vert, avec une texture noduleuse de consistance molle. Ce type de cals caractérise morphologiquement les cals non embryogènes. Ces derniers sont aptes à être conduit vers une organogenèse bien définie, car la couleur verte indique la présence d'une initiation de bourgeons c'est-à-dire des cals caulogènes.

Cependant, le milieu M₅ donne des cals dont la couleur est brune et le développement est réduit. Ils finiront par se dessécher. Ces caractéristiques indiquent la présence de cellules mortes.

Après 40 jours de leur introduction primaire, les cals sont fragmentés et repiqués sur le même milieu initial. Quelque soit le type du milieu de culture, après 3 à 4 transferts, les cals deviennent durs et la couleur vire vers le brun et parfois au noir. Ils montrent un aspect poudreux.

Après un mois de culture dans la chambre 1, les cals issus des milieux M₁, M₂, M₃ vont développer des bourgeons qui s'étalent sur toute la surface des tubes. Ils débutent la formation des bourgeons qui donnent par la suite de petites tiges. Ces petites tiges sont transférées vers le milieu d'allongement pour assurer une bonne elongation aux poussées qui seront enracinées par la suite.

D'après nos résultats, nous constatons que l'aptitude à la callogenèse diffère non seulement en fonction des milieux de culture utilisés mais aussi selon les conditions de culture.

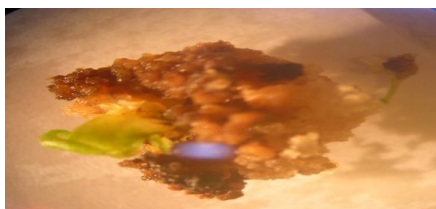


Figure 8. Aspect des cals issus des milieux M1, M2 et M3 à la lumière



Figure 9. Aspect des cals issus du milieu M₅ à la lumière



Figure 10. Développement de bourgeon issu du cal (loupe Gx4.5)

D'après Lutz (1985) et Nozeran (1985), l'initiation de la callogenèse semble être due au bouleversement du comportement des explants. Il est essentiellement lié aux coupures des corrélations entre l'explant et la plante mère, ainsi qu'à son nouvel environnement.

En outre, d'après Margara (1969), les fragments de tige peuvent présenter une callogenèse abondante à l'obscurité continue. Mais ils ne forment jamais de bourgeon. En plus, après plusieurs semaines de séjour à l'obscurité, les cals transférés à la lumière paraissent avoir perdu leur aptitude initiale à la caulogénèse. Dans l'aspect biochimique, Thorpe (1978), montrent une augmentation de l'activité peroxydasique au cours de la formation de cals issus de différents explants. La perte de l'activité caulogène d'un cal d'*Arabidopsis* (cultivé trop longtemps sur 2,4-D) correspond à une perte graduelle de l'activité peroxydasique. La récupération de la capacité organogénétique, requiert une reprise de l'activité de la plupart des isoenzymes (Negrutiu, 1979)

Cet accroissement de l'activité peroxydasique préalable à l'initiation des bourgeons végétatifs pourrait être l'indication d'une réduction du niveau auxinique endogène (Gasper, 1978). Par ailleurs, lorsque le cal provient d'un fragment d'organe contenant des tissus divers (feuille, tige et apex), on constate souvent l'aptitude particulière à la caulogénèse chez certains catégories de tissus (cambium, parenchyme vasculaire ou libérien) (Margara, 1989)

CONCLUSION

Au terme de ce travail, l'objectif que nous nous étions proposé au départ a été atteint, au moins en partie, puisque nous avons pu mettre au point un protocole complet de la micropropagation de *Aristolochia longa* L. in vitro.

Les résultats obtenus lors de nos essais et ceux obtenus sur d'autres essais relatifs à la stérilisation du matériel végétal ont montré l'importance de la

désinfection pour l'obtention d'une culture stérile. Dans nos essais, Les contaminations les plus courantes observées ont été d'origine fongique et bactérienne. La détermination d'une méthode de désinfection ou le taux de contamination est très faible (8.33%) est basés sur l'utilisation de la chlorure mercurique à une concentration de 0.5 mg/l pendant 10 minutes. Il avère plus efficace que l'hypochlorite de calcium.

En ce qui concerne la micropropagation par voie indirecte, pour l'induction des cals à partir des explants de feuilles sur le milieu MS avec des variations hormonales, nous pouvons conclure que :

La variabilité de la callogenèse vis-à-vis des explants dépend deux facteurs. En premier lieu le type et la concentration des hormones de croissance utilisées. Et en deuxième, de conditions de culture plus précisément la photopériode. Ces résultats mettent en évidence la grande aptitude de la callogenèse dans le milieu MS contenant 1 mg/l BAP + 1 mg/l ANA, cultivé pendant 20 jours à l'obscurité. Cependant, la phase de l'allongement a montré que le transfert des vitro-plants obtenus sur un milieu sans hormone ou additionné à 1 ml/l de GA₃ peut donner une très bonne élongation. Ce qui concerne la phase de l'enracinement, le milieu sans hormone a pu induire l'apparition des racines.

REFERENCES

1. Auge R. et al., 1989, La culture in vitro et des applications horticoles, Lavoisier.p.225.
2. Bajaj Y.P .S, 1997, Biotechnology in Agriculture and Forestry: High-tech and Micropropagation, édition Springer, pp. 133.
3. Bouderrah M, 1988, Comparaison de deux modes de vitropropagation à partir de vitrosemis d'*Eucalyptus camaldulensis* provenance lake albacutya
4. Gaspar Th, Kevers. C, Debergh. R., 1987, Vitrification: morphological, physiological and ecological aspects, in: cell and tissue culture in forestry, Volume1, General Principles and Biotechnology, édition: Bonga, Dordrecht, pp.152-166.
5. Gautheret. R.J., 1959, La culture des tissus végétaux, techniques et réalisations édition Masson, pp.863.
6. Lutz A., 1985, L'expression de la variabilité morphologique après régénération dans les cultures de tissus et de cellules, Bulletin Scientifique Botanique 132, France, pp.35-50.
7. Margara J ., 1989« Bases de la multiplication végétative, Les méristèmes et l'organogenèse » INRA, Paris, p 260.
8. Negrutiu T, Jacobs, Gaspar Th., 1979, Leaf formation from *arabidopsis callus*, Z.P. Pflanzenphysiol. 91, pp.119-126.
9. Thorpe T.A, Gaspar Th., 1978, Changes in isoperoxidases during shoot formation in tobacco callus, In vitro 14, pp.522-526.
10. Nozeran R., 1985, «L'expression de la variabilité dans les cultures d'organes » Actualités Botaniques, Paris, pp.11-21.

