

## INDUCTION DES BOURGEONS DE L'IF COMMUN : *TAXUS BACCATA* L.

ABDELLATIF Nabila<sup>1</sup>, AIZER Nassima<sup>1</sup>, SAIDI Fairouz<sup>1</sup> et CHAOUIA Cherifa<sup>2</sup>

1. Université de Blida 1, Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie, Département de Biologie et Physiologie Cellulaire, Laboratoire de Biotechnologies, Environnement et Santé, B.P. 270, Route de Soumaâ, Blida 09000, Algérie.
2. Université de Blida 1, Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie, Département de Biotechnologie, Laboratoire de Biotechnologies des Productions Végétales, B.P. 270, Route de Soumaâ, Blida 09000, Algérie.

Reçu le 02/11/2019, Révisé le 23/06/2020, Accepté le 27/06/2020

### Résumé

**Description du sujet :** *Taxus baccata* L. communément appelé if commun est une espèce endémique de l'Algérie. Elle regroupe les arbres connus par leur contenu en taxanes, particulièrement le taxol, agent anticancéreux prometteur. Cette espèce est déclarée menacée et en voie de disparition. Afin de le préserver, une multiplication par micropropagation *in vitro* a été entreprise en utilisant des explants de jeunes pousses issus d'un arbre adulte provenant de l'Atlas Blidéen (Chrèa).

**Objectifs :** Nous visons à multiplier cette espèce *in vitro* en étudiant l'effet de la composition minérale de milieu de culture et les hormones de croissance sur la callogenèse des pousses.

**Méthodes.** Nous avons testé les milieux de base Woody Plant Medium (WPM) et Murashige et Skoog (MS) à différentes concentrations en hormones de croissance pour stimuler la néoformation des bourgeons.

**Résultats :** Les résultats obtenus montrent que le milieu WPM est plus favorable à l'induction des bourgeons que le milieu MS. L'apport des régulateurs de croissance paraît nécessaire pour le débourrement des bourgeons. La composition hormonale 2mg/l 2iP et 1mg/l AIA est la plus favorable à l'induction et la néoformation des bourgeons avec un taux de 73,33% et 3 bourgeons néoformés par explant. Quant à la croissance de ces bourgeons, la combinaison de la Kin et de l'AIA (2mg/l Kin+ 1mg/l AIA) et du 2iP et de l'AIB ((2mg/l 2iP+ 1mg/l AIB) a donné un développement de la partie aérienne plus important avec une longueur moyenne de pousses formées égale à 2 et 2,4 cm et un nombre moyen de 20 et 21 feuilles respectivement.

**Conclusion :** l'induction et la néoformation des bourgeons a été favorable avec l'apport de 2mg/l 2iP et 1mg/l AIA dans le milieu WPM. Tandis que, l'utilisation de la Kinétine et de l'AIA (2mg/l Kin+ 1mg/l AIA) et du 2iP et de l'AIB ((2mg/l 2iP+ 1mg/l AIB) a stimulé la croissance de ces bourgeons.

**Mots clés :** *Taxus baccata* L. ; Micropropagation ; Induction des bourgeons.

## BUDS INDUCTION OF THE COMMON YEW: *TAXUS BACCATA* L.

### Abstract

**Description of the subject:** *Taxus baccata* L. commonly known as european yew is an endemic species of Algeria. It groups trees known for their taxane content, particularly taxol, a promising anticancer agent. This species is declared threatened and endangered. In order to preserve this species, propagation *in vitro* was undertaken using explants of young shoots from an old tree from the Blidéen Atlas (Chrèa).

**Objectives:** We aim to multiply this species *in vitro* by studying the effect of the mineral composition of the culture medium and growth hormones on the callogenesis of shoots from an old tree.

**Methods:** We tested two basic mediums Woody Plant Medium (WPM) and Murashige and Skoog (MS) and various concentrations of the growth hormones to stimulate new bud formation.

**Results:** The results obtained show that the WPM medium is more favorable for the induction of buds than the MS medium. The contribution of growth regulators seems necessary for bud bursting. The hormonal composition 2mg/l 2iP and 1mg/l AIA is the most favorable for the induction and neoformation of the buds with a rate of 73.33% and 3 new buds per explant. As for the growth of these buds, the combination of Kin and AIA (2mg/l Kin + 1mg/l AIA) and 2iP and AIB ((2mg/l 2iP + 1mg/l AIB) greater development of the aerial part with an average length of shoots formed equal to 2.00 cm and 2.40 cm and an average number of leaves equal to 20 and 21 leaves respectively.

**Conclusion:** the induction and neoformation of the buds was favorable with the supply of 2 mg/l 2iP and 1 mg/l AIA in the WPM medium. While the use of Kinetin and AIA (2mg/l Kin + 1mg/l AIA) and 2iP and AIB ((2mg/l 2iP + 1mg/l AIB) stimulated the growth of these buds.

**Keywords :** *Taxus baccata* L. ; *in vitro* micropropagation ; bud's induction.

\*Auteur correspondant : ABDELLATIF Nabila, Email : bionab0@gmail.com

## INTRODUCTION

L'espèce *Taxus baccata*, communément appelé if commun, appartenant à la famille des taxacées a connu une importance particulière ces dernières années compte tenu de sa teneur en taxol (paclitaxel) [1] qui est l'un des agents naturels anticancéreux le plus prometteur [2]. Cet agent suscite de grands espoirs dans la lutte contre une large gamme de cancers [3 et 4]. Cependant, le rendement de cet arbre est très faible ne dépassant pas 0,1% [5] et la demande de taxol par an est estimée à 250kg de médicament purifié, équivalent au rendement de 750000 arbres [6]. En outre, cette espèce est caractérisée par une croissance très lente et une inhibition des graines pouvant atteindre 2 consécutives [7]. Cette surexploitation due à l'arrachage anarchique et non réglementée ainsi qu'à la lenteur de la reprise des graines par voie naturelle entraînent inéluctablement sa disparition dans le temps [8]. La synthèse chimique de ce métabolite (taxol) nécessite le précurseur baccatin III produit par le même arbre qui en contient aussi une faible teneur. Pour toutes ces considérations, une autre alternative est nécessaire afin de sauvegarder et préserver cette espèce. Ainsi, plusieurs protocoles d'enracinement des boutures ont donné de résultats probants [9, 10 et 11]. Cependant, la régénération de *Taxus baccata* L. par les méthodes traditionnelles (bouturage, marcottage et éclats de souches) en Algérie s'est montrée difficile. Les boutures sont restées en activité pendant 3 mois jusqu'à l'épuisement des réserves puis elles se sont desséchées (absence de formation des racines) [12]. Les chercheurs se sont alors orientés vers d'autres procédés biotechnologiques. Peu d'études de micropropagation ont été réalisées sur un matériel végétal adulte [13 ; 14 ; 15] où s'avère très délicat comparé aux plantes juvéniles [16]. Néanmoins, la facilité de la micropropagation d'une espèce varie souvent selon le génotype [17]. Ainsi, les travaux réalisés en Algérie sur la micropropagation de cette espèce se sont principalement concentrés sur la germination des graines entraînant des populations hétérogènes et ne permettent pas de conserver les espèces sélectionnées pour leur teneur en taxol. Les travaux d'Abdellatif *et al.* [18], sur *Taxus baccata* L. de la région de Blida (Parc National de Chréa) montre une concentration de taxol importante (0,0254g/100g de pousses) en comparaison avec d'autres espèces du même genre d'où la nécessité de le multiplier *in vitro*.

L'étude entreprise consiste donc à multiplier un écotype adulte provenant de l'Atlas Blidéen, Chréa (Algérie) déjà sélectionné pour leur teneur en taxol par Abdellatif *et al.* [18] en induisant un bourgeonnement *in vitro*. Les effets de la composition minérale de milieu de culture et la composition hormonale sur l'induction des bourgeons ont été étudiés.

## MATÉRIEL ET MÉTHODES

### 1. Matériel végétal

Le matériel végétal choisi est représenté par des jeunes pousses de l'année provenant des arbres centenaires de *Taxus baccata* L. Les parties apicales saines des pousses sont coupées en segments de 10 à 15 cm avec des ciseaux stériles et transportées au laboratoire dans des sacs en plastique à l'obscurité. La stérilisation se fait sur les pousses entières. Ce n'est qu'à l'issue de la procédure de stérilisation que l'on sectionne les aiguilles à mettre en culture. Le matériel végétal est rincé à l'eau courante puis immergé successivement dans les solutions suivantes ; 30 min sous agitation dans une solution de 1g/l de fongicide, 70s dans l'éthanol (99°) , 5 min dans NaClO (8°) et 5 rinçages à l'eau distillée stérile en changeant l'eau à chaque rinçage pendant 15, 15, 10, 10 et 5 minutes. Les segments de pousses désinfectées de 1 cm de long ont été placés verticalement sur le milieu de culture dans des tubes de 20 cm. L'incubation a eu lieu durant la première étape à l'obscurité pendant deux semaines puis à la lumière sous une photopériode de 16/8h et à une température de 25±2°C dans une chambre de culture où les facteurs abiotiques sont contrôlés notamment l'humidité et la température.

### 2. Milieux de culture

Les milieux de culture utilisés sont ceux de Murashigue et Skoog (MS) [19] et de Mccown et Lloyd (Woody Plant Medium WPM) [20]. A chaque milieu de base, 100 mg/l de l'acide ascorbique, 20 g/l de sucrose, 7 g/l d'agar et 0,5 g/l de charbon actif ont été ajoutés. Les hormones de croissance testées sont : la kinétine (Kin), le 6-(gamma,gammadimethylallylamino) purine (2iP), N-Benzyl-9-(2-tetrahydropyranyl) adenine (BAP), Indole-3-acetic acid Free acid (AIA), et Indole-3-butyric acid (AIB). Ces régulateurs de croissance sont apportés seuls ou combinés entre eux à différentes doses dans les deux milieux de base MS et WPM soit au total 22 milieux de culture testés. Chaque essai est répété 20 fois avec un total de 440 explants préparés (tableau 1).

Tableau 1 : Milieux de culture testés

Milieux	BAP mg/l	Kin mg/l	2iP mg/l	AIA mg/l	AIB mg/l
MS <sub>0</sub>		Témoin sans hormones de croissance			
WPM <sub>0</sub>		Témoin sans hormones de croissance			
MS <sub>1</sub>	2	-	-	-	-
WPM <sub>1</sub>	2	-	-	-	-
MS <sub>2</sub>	2	1	-	-	-
WPM <sub>2</sub>	2	1	-	-	-
MS <sub>3</sub>	-	2	-	-	-
WPM <sub>3</sub>	-	2	-	-	-
MS <sub>4</sub>	2	-	-	1	-
WPM <sub>4</sub>	2	-	-	1	-
MS <sub>5</sub>	-	-	-	2	-
WPM <sub>5</sub>	-	-	-	2	-
MS <sub>6</sub>	2	-	-	-	1
WPM <sub>6</sub>	2	-	-	-	1
MS <sub>7</sub>	-	-	-	-	2
WPM <sub>7</sub>	-	-	-	-	2
MS <sub>8</sub>	-	-	2	-	-
WPM <sub>8</sub>	-	-	2	-	-
WPM <sub>10</sub>	-	-	2	1	-
WPM <sub>11</sub>	-	-	2	-	1
WPM <sub>12</sub>	-	2	-	1	-
WPM <sub>13</sub>	-	2	-	-	1

WPM : Woody Plant Medium ; MS : milieu de MURASHIGE et SKOOG

### 3. Paramètres étudiés

A chaque subculture, les mesures suivantes sont effectuées sur les explants : (i) Nombre de bourgeons induits par explant ; (ii) Longueur des pousses formées ; (iii) Nombre de feuilles formées par pousse et (iv) Nombre de bourgeons néoformés par explant et le taux de cals produits.

### 4. Analyse statistique

L'analyse des données a été réalisée à l'aide d'un logiciel statistique (STATISTICA version 7.0). Les résultats ont été traités par l'analyse des variances ANOVA à un et à deux facteurs (ANOVA simple «one-way» et ANOVA factorielle « factoriel ANOVA »). Une différence significative existe lorsque la valeur de la probabilité  $p$  est inférieure au seuil  $\alpha = 0,05$ . Dans ce cas, la comparaison des moyennes est complétée par le test de Newman-Keuls au seuil de 5 % afin de les classer en groupes homogènes.

## RÉSULTATS

### 1. Débourrement

#### 1.1. Effet de la composition minérale

Les résultats obtenus après 8 semaines de culture montrent que le milieu WPM est le plus favorable à l'induction des bourgeons avec un taux moyen avoisinant 56,86% comparé au milieu de base MS présentant un taux d'induction plus faible estimé à 35,35% (Fig. 1).

Lors de nos essais, nous avons remarqué que le débourrement de la plupart des bourgeons repiqués sur le milieu de base WPM est plus précoce et survient à partir de la 2<sup>ème</sup> semaine de culture comparé au milieu de base MS où le débourrement des bourgeons est plus tardif et n'apparaît qu'à partir de la 4<sup>ème</sup> semaine de culture.

Quant au nombre des bourgeons néoformés, l'étude statistique montre que le milieu WPM est le plus favorable à la formation de nouveaux bourgeons avec une moyenne de 1,5 bourgeon par explant comparé au milieu MS où nous enregistrons une moyenne de néoformation très faible de 0,9 bourgeon par explant ( $p < 0,01\%$ ) (Fig. 2).

#### 1.2. Effet des hormones de croissance

Les résultats montrent que la mise en culture des explants sur un milieu dépourvu d'hormones de croissance ne permet pas d'induire des bourgeons durant toute la période de la culture et ce quel que soit le milieu testé (WPM et MS) (0%). Cependant, nous avons observé sous loupe binoculaire que ces explants restent verts et ne sont pas nécrosés. L'addition des cytokinines et des auxines seules ou en combinaison au milieu de culture provoque le bourgeonnement de la majorité des explants à des taux variables (Fig. 3).

L'utilisation de la kinétine seule dans le milieu (2 mg/l de Kin) est inefficace à l'induction des bourgeons où nous enregistrons un faible taux de débourrement de 16,66% seulement, comparé à l'apport de 2iP seule et la BAP seule où les taux d'induction sont plus élevés estimés à 51,85 et 48,14% respectivement (Fig. 3). Notons que l'association de deux cytokinines (2mg/l BAP+1mg/l Kin) a donné un taux moyennement faible atteignant 36,36% seulement. L'apport de l'auxine (AIB) dans le milieu de culture se montre plus efficace à l'induction des bourgeons que les cytokinines et ce quel que soit le milieu de base testé (Fig. 3). Nous enregistrons un pourcentage de débourrement estimé à 65,38% avec l'apport de 2mg/l d'AIB. Quant à l'incorporation de l'AIA à 2mg/l, un taux moyen de 54,16% a été enregistré. L'apport des auxines (AIB et AIA) dans un milieu contenant la kinétine a amélioré nettement le pourcentage d'induction des bourgeons de 16,66% (2mg/l Kin) jusqu'à 45,45% (2mg/l Kin+1mg/l AIA) et 58,33% (2mg/l Kin+1mg/l AIB). Quant à la BAP, l'apport de cette cytokinine dans un milieu contenant l'AIA ou l'AIB a stimulé moyennement le débourrement des bourgeons. Nous avons obtenu des taux presque similaires pour la BAP associée avec l'AIA (48%) et avec l'AIB (44,82%). L'apport de l'AIA dans un milieu contenant le 2iP a amélioré nettement le pourcentage de débourrement de 51,85% (2mg/l 2iP) jusqu'à 73,33% (2mg/l 2iP+1mg/l AIA). Nous déduisons alors que la composition hormonale de 2mg/l de 2iP et 1mg/l de l'AIA est la plus favorable à l'induction des bourgeons des pousses de *Taxus baccata* L.

Quant au nombre de bourgeons néoformés, le test de Newman-keuls montre qu'il existe des différences très hautement significatives de formation de nouveaux bourgeons entre les différentes concentrations d'hormones de croissance testées ( $p < 0,01\%$ ) (Fig. 4). Un faible nombre de bourgeons néoformés estimé à 1 bourgeon néoformé par explant est enregistré avec les cytokinines dans les milieux de culture (2mg/l BAP et 2mg/l 2iP). L'apport de l'AIA dans un milieu contenant le 2iP (2mg/l 2iP+1mg/l AIA) a le plus grand nombre de bourgeons néoformés avec une moyenne égale à 3 bourgeons par explant. De plus cette combinaison (2mg/l 2iP+1mg/l AIA) a montré le meilleur taux d'induction des bourgeons (73,33%).

### 1.3. Effet de l'interaction milieux de base / hormones de croissance

Les milieux de culture testés induisent dans leur majorité des bourgeons en dehors de ceux dépourvus de régulateurs de croissance (WPM<sub>0</sub> et MS<sub>0</sub>) et MS<sub>1</sub> contenant de la Kin (tableau 2). Les meilleurs taux d'induction avec des réponses à 76,92 ; 73,33 ; 71,42 ; 71,42 et 61,53% sont obtenus respectivement sur les milieux WPM<sub>7</sub>, WPM<sub>10</sub>, WPM<sub>5</sub>, WPM<sub>6</sub>, WPM<sub>8</sub> (tableau 2). Les premières manifestations de débourrement sont perceptibles à partir de la 4<sup>ème</sup> semaine sur tous les milieux de culture testés exceptés les milieux WPM<sub>2</sub>, WPM<sub>10</sub>, WPM<sub>11</sub> et WPM<sub>12</sub> où le gonflement des bourgeons est précoce et survient à partir de la 2<sup>ème</sup> semaine de culture. Nous constatons que contrairement aux milieux dont la composition minérale est celle de Woody Plant medium (WPM), les pourcentages d'induction des bourgeons sur les milieux de base MS ne dépassent pas 53,84% (Tableau 2). De plus, quel que soit la composition hormonale, le débourrement ne se déclenche qu'à partir de la 4<sup>ème</sup> semaine de culture avec des taux différents d'un milieu à un autre. Une interaction entre la composition minérale et la composition hormonale de milieu de culture est confirmée par une analyse factorielle (Fig. 5). L'interaction est positive entre le milieu de base WPM et la kinétine. Elle est en faveur d'une formation de bourgeons. L'effet du milieu de base WPM a accentué l'effet de la Kin avec une néoformation d'un bourgeon par explant comparé au milieu de base MS où son interaction avec la Kin est négative avec 0% de bourgeons formés. Le milieu le plus favorable avec 3 bourgeons néoformés par explant est le milieu WPM<sub>10</sub> contenant 2mg/l 2iP et 1mg/l AIA (Fig. 5).

## 2. Développement des pousses

### 2.1. Effet de la composition minérale

2.2. Les résultats de l'analyse des variances montrent qu'il y a une différence significative entre les longueurs moyennes des pousses ( $p=0,016$ ) et entre le nombre moyen des feuilles formées ( $p=0,012$ ) sur les deux milieux de base testés (Fig. 6 et 7).

2.3. En dépit de l'effet des hormones de croissance, nous avons enregistré après 8 semaines de culture une longueur moyenne des pousses estimée à 1,20 cm sur le milieu WPM et 0,88 cm sur le milieu MS.

Quant au nombre de feuilles, les milieux WPM et MS présentent respectivement une moyenne de 13 et 10 feuilles néoformées par explant.

#### 2.4. Effet des hormones de croissance

Les analyses statistiques montrent qu'il existe un effet très hautement significatif des hormones de croissance sur la longueur des pousses et sur le nombre moyen des feuilles formées ( $p=0,0000$ ). En effet, les vitroplants dont les milieux de cultures contiennent seulement de la Kin présentent un très faible développement aérien avec 0,34 cm de longueur et 4 feuilles (Fig. 8 et 9). L'apport de l'AIA dans un milieu contenant de la Kin a amélioré nettement la croissance jusqu'à 2 cm de longueur en moyenne et 20 feuilles par explant. Les vitroplants dont les milieux de culture contiennent uniquement soit du 2iP, de la BAP, de l'AIB ou de l'AIA présentent un développement des pousses formées d'une longueur égale à 0,86 ; 1,21 ; 1,21 et 1,54 cm respectivement. Cependant, ces hormones de croissance (2iP, BAP, AIB, AIA) ne présentent pas une différence significative sur la formation des feuilles. Les vitroplants forment un nombre moyen des feuilles compris entre 10 et 17 feuilles. Enfin, les vitroplants dont les milieux de culture contenant de la Kin et de l'AIA (2mg/l Kin+1mg/l AIA) et du 2iP et de l'AIB (2mg/l 2iP+ 1mg/l AIB) présentent une meilleure croissance aérienne avec une longueur moyenne de pousses formées allant de 2 à 2.4 cm et un nombre moyen de feuilles oscillant entre 20 et 21 respectivement.

#### 2.5. Effet de l'interaction milieu de base / hormones de croissance

Les milieux WPM<sub>11</sub> (2mg/l 2iP+1mg/l AIB), WPM<sub>12</sub> (2mg/l Kin+1mg/l AIA), et WPM<sub>5</sub> (2mg/l AIA) favorisent une meilleure croissance comparés aux autres milieux testés avec une longueur moyenne des pousses estimée à 2,4 ; 2 et 1,75cm. Quant au nombre moyen de feuilles, il est en moyenne de 21, 20 et 19 feuilles respectivement après deux mois de culture (Fig. 10 et 11). Les résultats montrent que l'interaction est positive entre le milieu WPM et les compositions hormonales 2iP+ AIB (WPM<sub>11</sub>) et Kin+AIA (WPM<sub>12</sub>), cette dernière enregistre un faible pourcentage d'induction des bourgeons estimé à 50 et 45,45% respectivement. Inversement au milieu WPM<sub>10</sub> (2iP+AIA) qui est favorable à l'induction des bourgeons (73% et formation de 3 bourgeons par explant) mais stimule une croissance en moyenne de 0,8 cm de longueur et 9 feuilles seulement (Fig. 10 et 11). Nous avons remarqué aussi, que les feuilles formées sur des explants induits dans les milieux contenant l'AIA (WPM<sub>5</sub>et WPM<sub>12</sub>) sont plus petites comparées aux autres milieux où les limbes sont plus larges (Fig. 12). Durant cette étude, nous avons remarqué la formation des cals sur tous les milieux testés avec un faible pourcentage oscillant de 10 à 34,6% comparé au milieu WPM<sub>10</sub> où le pourcentage de callogénèse est plus important avec 71%.

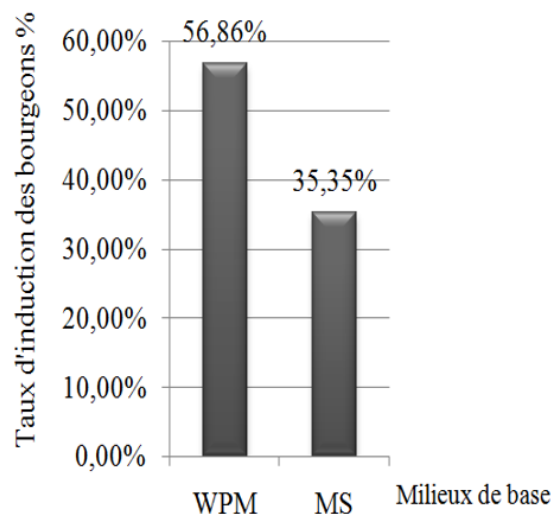


Figure 1: Effet de la composition minérale sur le taux d'induction des bourgeons

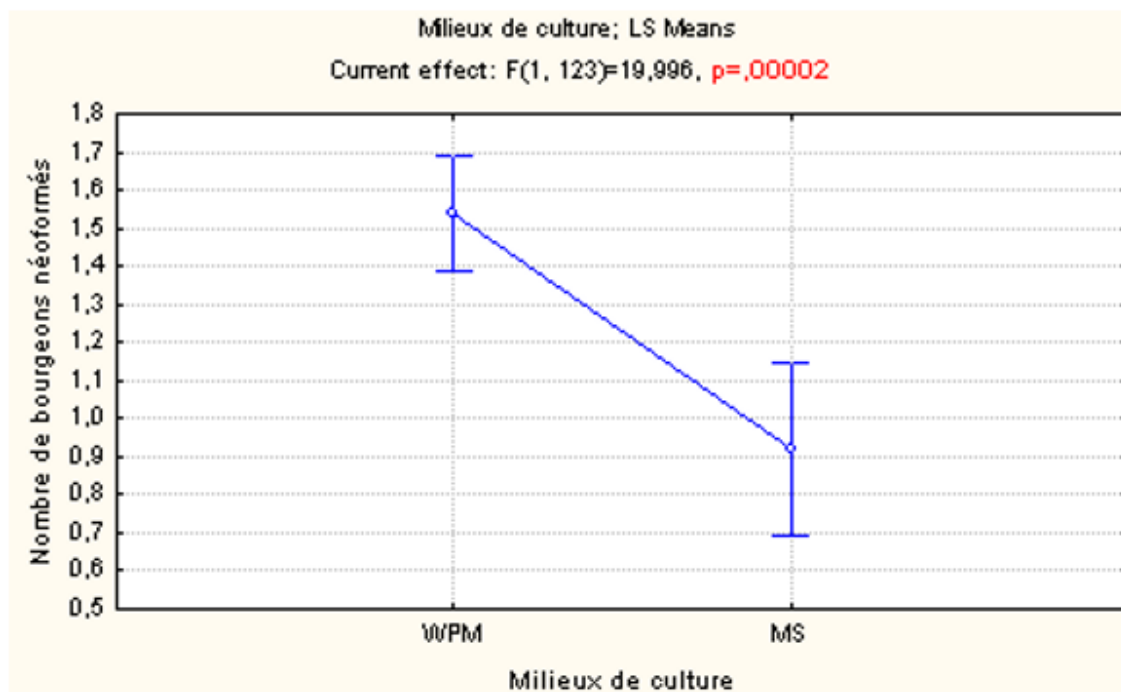


Figure 2: Effet de la composition minérale sur le nombre des bourgeons néoformés

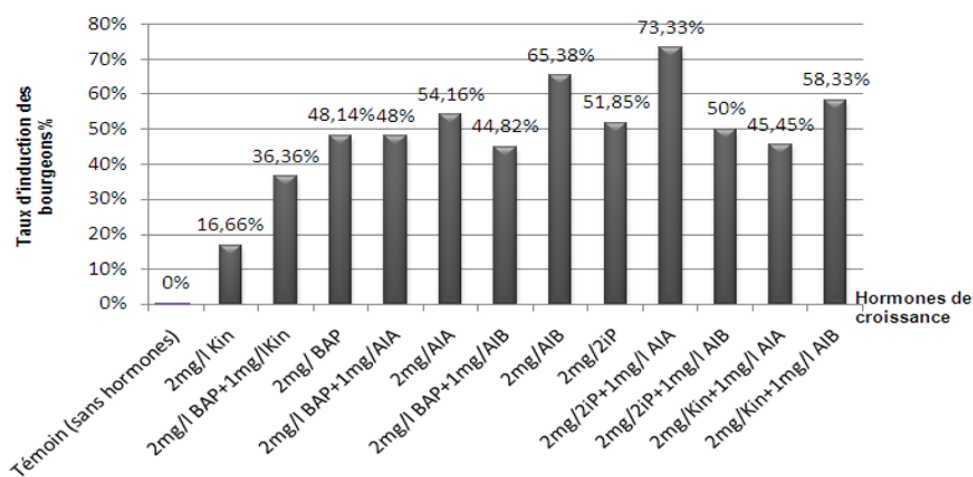


Figure 3 : Effet des phytohormones sur le taux d'induction des bourgeons

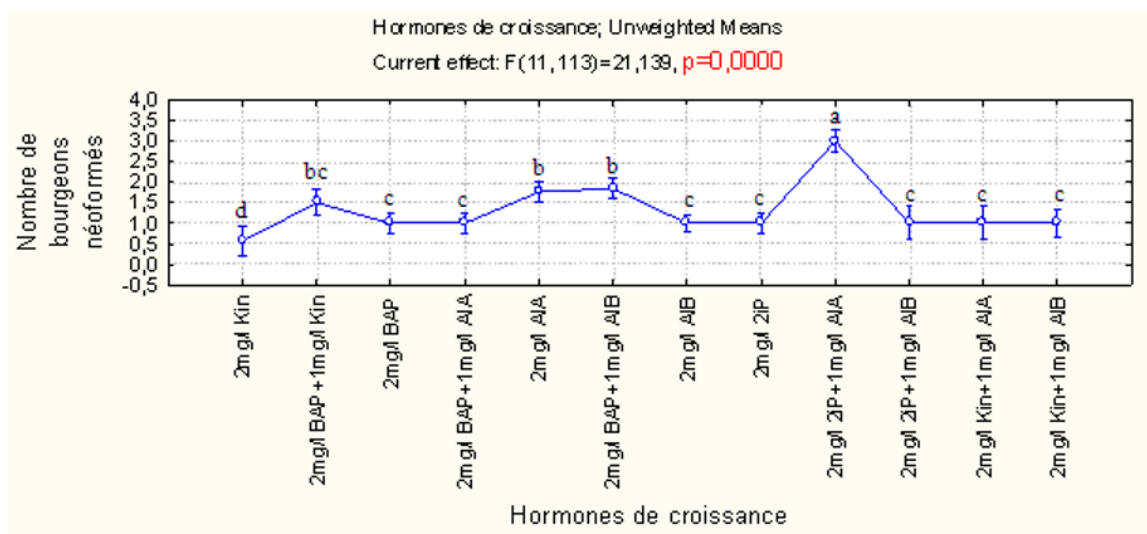
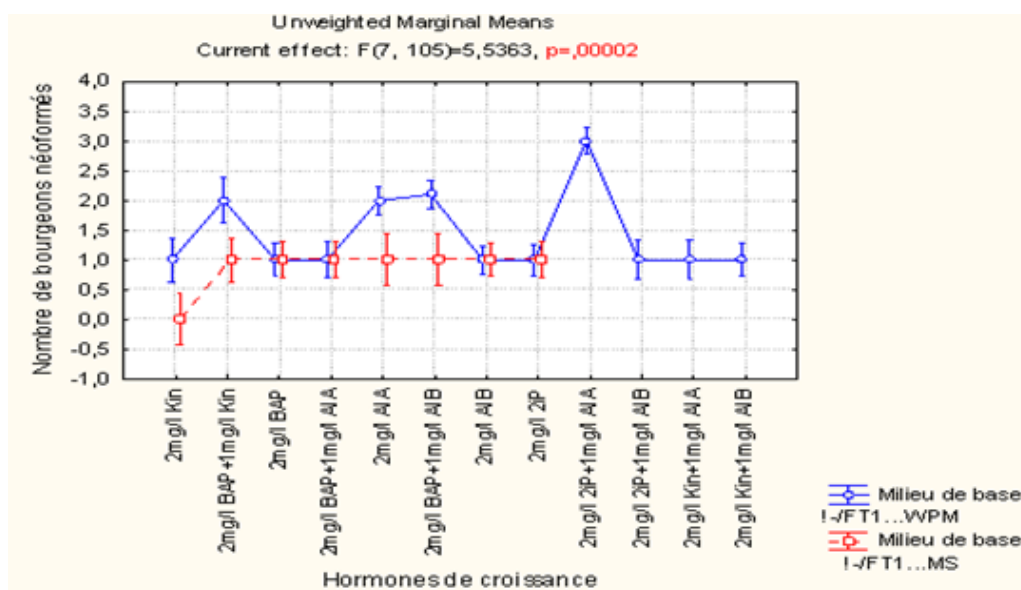


Figure 4 : Effet de la balance hormonale sur le nombre des bourgeons néoformés

Tableau 2 : Induction des bourgeons (après 60 jours de culture)

	WPM		MS	
Sans hormones	WPM <sub>0</sub>	00,00%	MS <sub>0</sub>	00,00%
2mg/l Kin	WPM <sub>1</sub>	33,33%	MS <sub>1</sub>	00,00%
2mg/l Kin+1mg/l BAP	WPM <sub>2</sub>	33,33%	MS <sub>2</sub>	40,00%
2mg/l BAP	WPM <sub>3</sub>	50,00%	MS <sub>3</sub>	46,15%
2mg/l BAP+1mg/l AIA	WPM <sub>4</sub>	46,15%	MS <sub>4</sub>	50,00%
2mg/l AIA	WPM <sub>5</sub>	71,42%	MS <sub>5</sub>	30,00%
2mg/l BAP+1mg/l AIB	WPM <sub>6</sub>	71,42%	MS <sub>6</sub>	20,00%
2mg/l AIB	WPM <sub>7</sub>	76,92%	MS <sub>7</sub>	53,84%
2mg/l 2iP	WPM <sub>8</sub>	61,53%	MS <sub>8</sub>	42,85%
2mg/l 2iP+1mg/l AIA	WPM <sub>10</sub>	73,33%		//
2mg/l 2iP+1mg/l AIB	WPM <sub>11</sub>	50,00%		//
2mg/l Kin+1mg/l AIA	WPM <sub>12</sub>	45,45%		//
2mg/l Kin+1mg/l AIB	WPM <sub>13</sub>	58,33%		//



Newman-Keuls test; variable Nombre de bourgeons néoformés						
Homogenous Groups, alpha = ,05000						
Milieux de culture	Hormones de croissance	Nombre de bourgeons néoformés Mean	1	2	3	4
MS	2mg/l Kin	0,000000	****			
MS	2mg/l BAP	1,000000		****		
WPM	2mg/l AIB	1,000000			****	
WPM	2mg/l 2iP	1,000000				****
WPM	2mg/l BAP	1,000000		****		
WPM	2mg/l 2iP+1mg/l AIB	1,000000			****	
WPM	2mg/l Kin+1mg/l AIA	1,000000				****
WPM	2mg/l Kin+1mg/l AIB	1,000000				****
WPM	2mg/l BAP+1mg/l AIA	1,000000				****
MS	2mg/l BAP+1mg/l Kin	1,000000		****		
WPM	2mg/l Kin	1,000000			****	
MS	2mg/l BAP+1mg/l AIA	1,000000			****	
MS	2mg/l AIA	1,000000				****
MS	2mg/l BAP+1mg/l AIB	1,000000				****
MS	2mg/l AIB	1,000000				****
MS	2mg/l 2iP	1,000000				****
WPM	2mg/l BAP+1mg/l Kin	2,000000				****
WPM	2mg/l AIA	2,000000				****
WPM	2mg/l BAP+1mg/l AIB	2,100000				****
WPM	2mg/l 2iP+1mg/l AIA	3,000000				****

Figure 5 : Interaction entre les milieux de base et les hormones

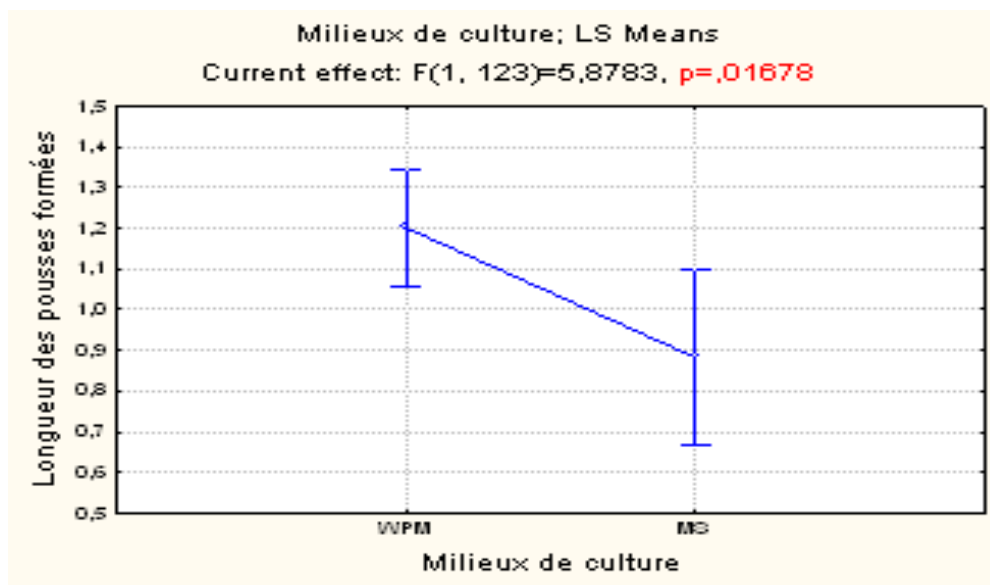


Figure 6: Effet de milieu de base sur la longueur moyenne des pousses formées

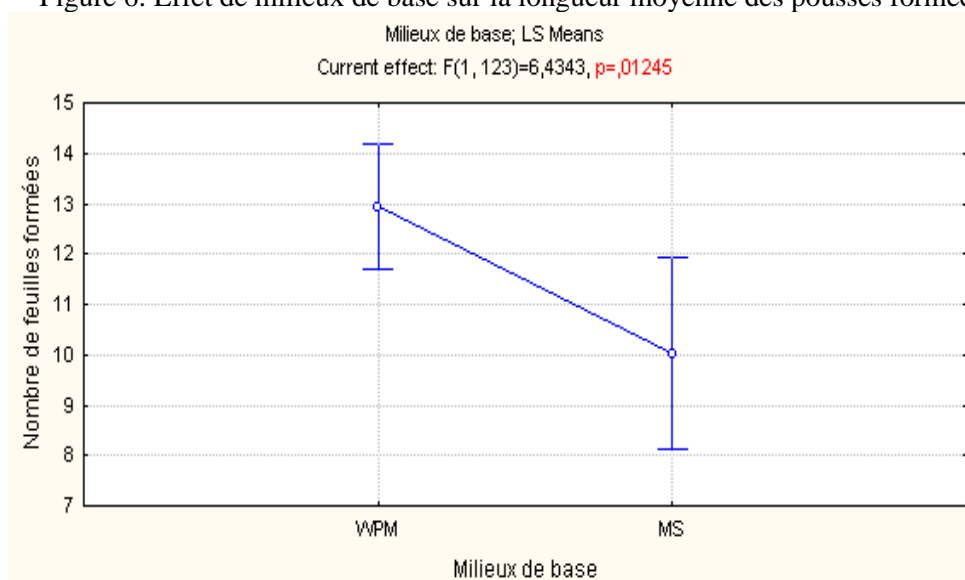


Figure 7 : Effet de milieu de base sur le nombre moyen des feuilles formées par explant

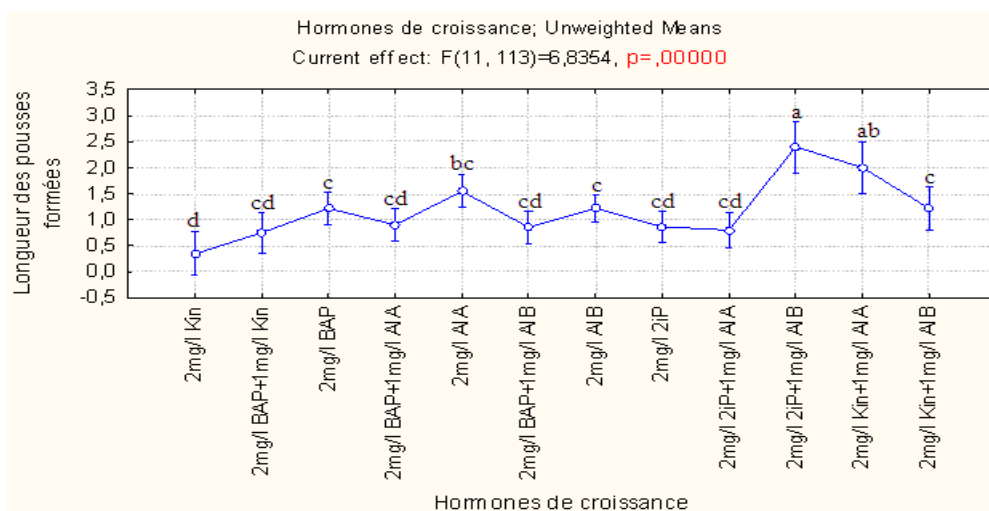


Figure 8 : Effet des phytohormones sur la longueur des pousses



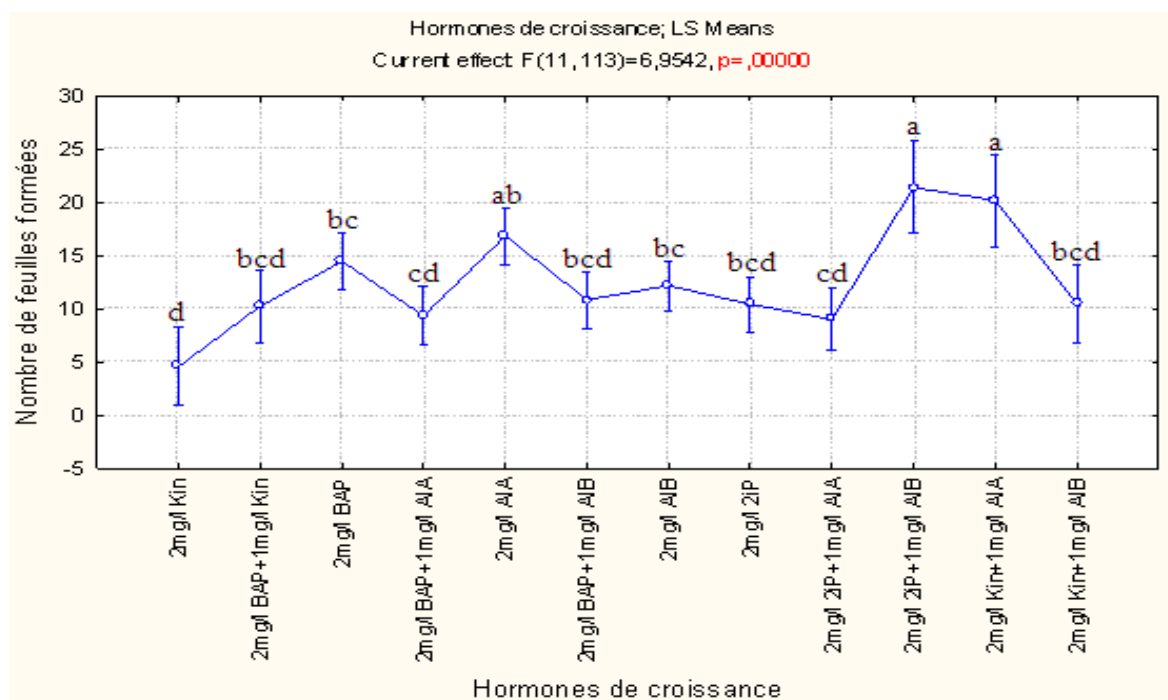


Figure 9: Effet des phytohormones sur la néoformation des feuilles

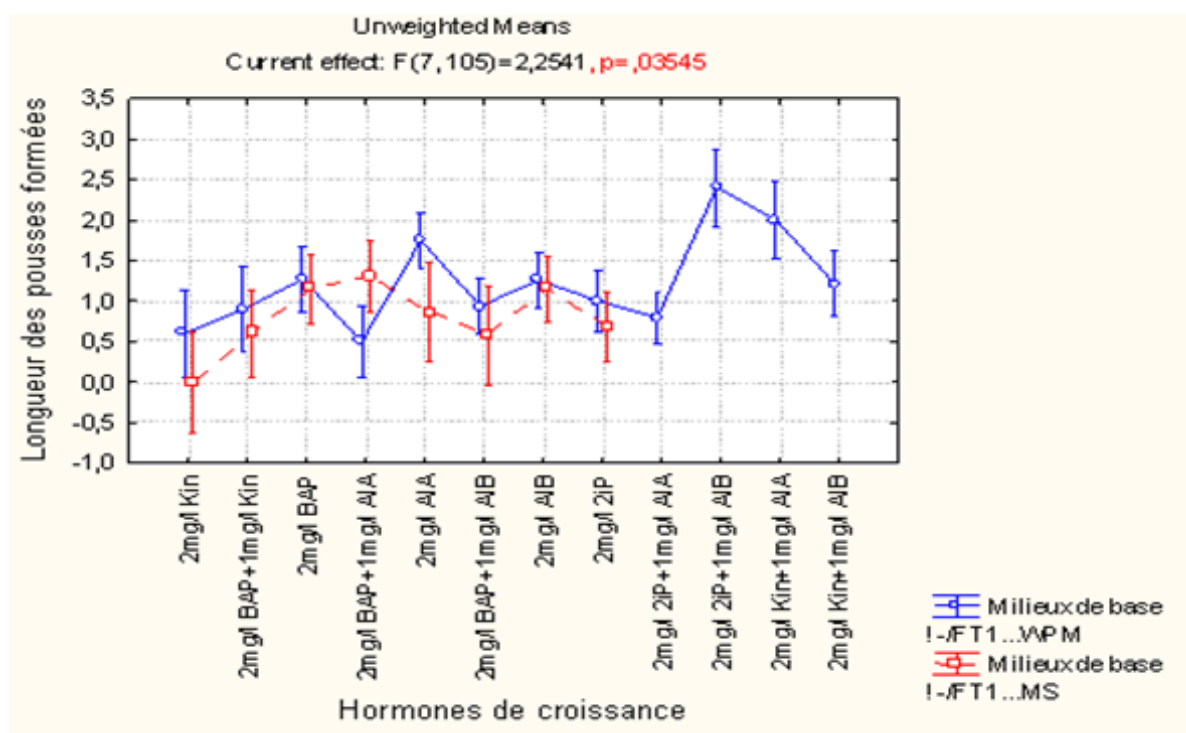


Figure 10 : Effet d'interaction entre milieux/ hormones sur la longueur des pousses

Figure 10 : Effet d'interaction entre milieu/ hormones sur la longueur des pousses

Newman-Keuls test; variable Longueur des pousses formées Homogenous Groups, alpha = ,05000							
Milieu de culture	Hormones de croissance	Longueur des pousses formées Mean	1	2	3	4	5
MS	2mg/l Kin	0,000000	****				
WPM	2mg/l BAP+1mg/l AIA	0,500000	****	****			
MS	2mg/l BAP+1mg/l AIB	0,566667	****	****			
WPM	2mg/l Kin	0,600000	****	****			
MS	2mg/l BAP+1mg/l Kin	0,600000	****	****			
MS	2mg/l 2iP	0,683333	****	****	****		
WPM	2mg/l 2iP+1mg/l AIA	0,800000	****	****	****		
MS	2mg/l AIA	0,866667	****	****	****		
WPM	2mg/l BAP+1mg/l Kin	0,900000	****	****	****		
WPM	2mg/l BAP+1mg/l AIB	0,940000	****	****	****	****	
WPM	2mg/l 2iP	1,000000	****	****	****	****	
MS	2mg/l BAP	1,150000		****	****	****	
MS	2mg/l AIB	1,157143		****	****	****	
WPM	2mg/l Kin+1mg/l AIB	1,214286		****	****	****	
WPM	2mg/l AIB	1,260000		****	****	****	
WPM	2mg/l BAP	1,271429		****	****	****	
MS	2mg/l BAP+1mg/l AIA	1,300000		****	****	****	
WPM	2mg/l AIA	1,750000			****	****	****
WPM	2mg/l Kin+1mg/l AIA	2,000000				****	****
WPM	2mg/l 2iP+1mg/l AIB	2,400000					****

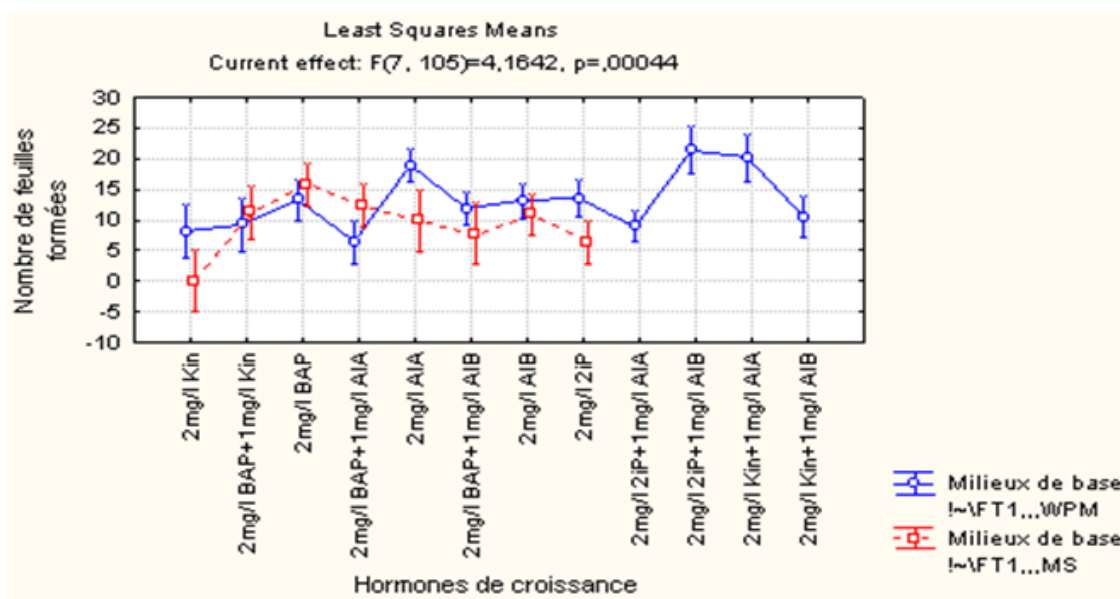


Figure 11 : Effet d'interaction entre milieu / hormones sur la néoformation des feuilles

Newman-Keuls test; variable Nombre de feuilles formées Homogenous Groups, alpha = ,05000								
Millieux de base	Hormones de croissance	Nombre de feuilles formées Mean	1	2	3	4	5	6
MS	2mg/l Kin	0,00000	****					
WPM	2mg/l BAP+1mg/l AIA	6,33333		****				
MS	2mg/l 2iP	6,33333	****	****				
MS	2mg/l BAP+1mg/l AIB	7,66667		****	****			
WPM	2mg/l Kin	8,00000		****	****			
WPM	2mg/l 2iP+1mg/l AIA	9,00000		****	****			
WPM	2mg/l BAP+1mg/l Kin	9,25000		****	****			
MS	2mg/l AIA	10,00000		****	****			
WPM	2mg/l Kin+1mg/l AIB	10,42857		****	****	****		
MS	2mg/l AIB	10,85714		****	****	****		
MS	2mg/l BAP+1mg/l Kin	11,25000		****	****	****		
WPM	2mg/l BAP+1mg/l AIB	11,80000		****	****	****		
MS	2mg/l BAP+1mg/l AIA	12,33333		****	****	****	****	
WPM	2mg/l AIB	13,10000		****	****	****	****	
WPM	2mg/l BAP	13,28571		****	****	****	****	
WPM	2mg/l 2iP	13,50000		****	****	****	****	
MS	2mg/l BAP	15,83333			****	****	****	****
WPM	2mg/l AIA	18,90000				****	****	****
WPM	2mg/l Kin+1mg/l AIA	20,20000					****	****
WPM	2mg/l 2iP+1mg/l AIB	21,40000						****

Figure 11 : Effet d'interaction entre milieux / hormones sur la néoformation des feuilles

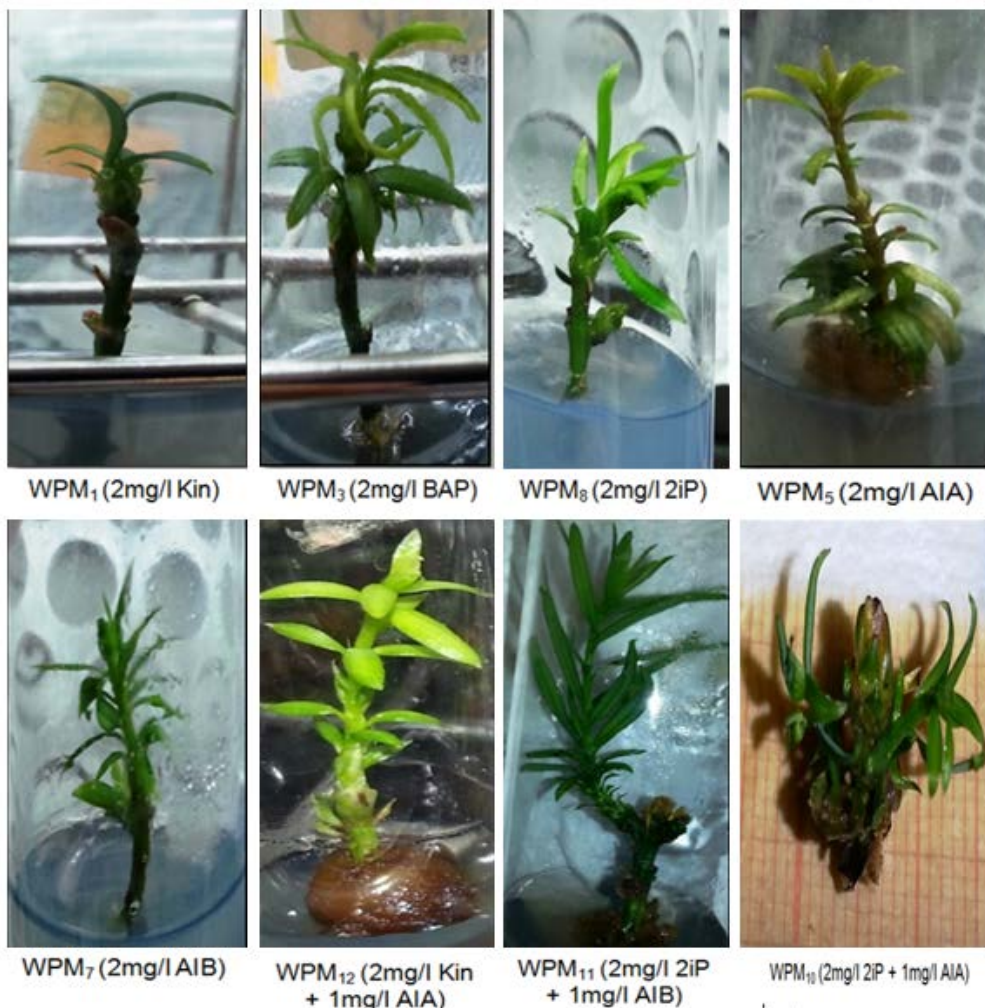


Figure 12 : Néoformation des pousses à différentes concentrations hormonales testées.

## DISCUSSION

Les travaux menés sur des explants des arbres centenaires en occurrence d'une espèce ligneuse *Taxus baccata* L. montrent qu'après 8 semaines de culture, le meilleur taux d'induction des bourgeons est obtenu sur le milieu WPM estimé à 56,86% comparé au milieu de MS avec un taux plus faible estimé à 35,35%. Néanmoins, ce taux d'induction sur le milieu MS est important si nous le comparons aux travaux d'Abhay Kulkarni [21] et Ibrahim et al. [15], qui eux ont obtenu un pourcentage nul (0%) sur le même milieu. Nos résultats sont similaires à ceux obtenus dans la bibliographie où ils recommandent le milieu WPM pour l'induction des bourgeons de *Taxus* ssp. [21 ; 22 et 23]. Cependant, le milieu MS est recommandé par plusieurs auteurs pour induire les bourgeons des espèces de *Taxus* [14 ; 24 et 25]. Concernant le deuxième paramètre évalué, nous remarquons que la croissance des bourgeons sur le milieu WPM se montre plus favorable avec une longueur moyenne des pousses estimée à 1,20 cm et un nombre moyen de 13 feuilles par explant comparée au milieu MS où la croissance est plus faible avec une longueur de 0,88 cm et un nombre moyen égal à 10 feuilles néoformées par explant. De plus, le débourrement de la plus part des bourgeons sur le milieu de base WPM est plus précoce que sur le milieu MS et survient à partir de la 2<sup>ème</sup> semaine de culture, contrairement au milieu de base MS où le débourrement des bourgeons ne survient qu'à partir de la 4<sup>ème</sup> semaine de culture. L'une des causes pour laquelle la croissance de beaucoup d'espèces ligneuses est faible sur le milieu MS est sa teneur en ions [15]. Selon Murashige et skoog [19], la composition ionique de milieu MS est plus forte estimée à 100,48 mM. Le milieu WPM en contient beaucoup moins soit 43,15 mM [20]. Nous pouvons déduire que le milieu WPM est le plus favorable à l'induction et à la croissance des bourgeons de *Taxus baccata* L. L'absence des hormones de croissance dans le milieu de culture a permis d'observer que l'induction des bourgeons de *Taxus baccata* L. est totalement inhibée. Cependant, ces explants restent verts, viables et ne présentent aucune nécrose. Ces résultats sont contradictoires à ceux obtenus par Abhay Kulkarni [21], qui signale que 52% des explants de *Taxus* ssp. ont été stimulés sur un milieu WPM sans hormones.

L'addition du 2mg/l de kinétine au milieu de culture a permis d'induire les bourgeons avec un taux très faible ne dépassant pas 16,66% comparée à l'apport de 2iP ou BAP seules où nous enregistrons respectivement un taux de 51,85 et 48,14%. Ainsi l'association de deux cytokinines (2mg/l BAP+1mg/l Kin) a donné un faible pourcentage égal à 36,36% seulement. Ces résultats ne concordent pas avec les résultats obtenus par Ibrahim et al. [15] sur un arbre âgé de *Taxus baccata* où l'utilisation de la BAP avec le milieu de base WPM a inhibé totalement le débourrement des bourgeons (0%). Ainsi, Ewald [23], signale que la BAP endommage les explants de *Taxus baccata* en provoquant des nécroses. Toutefois, plusieurs auteurs ont recommandé l'utilisation de BAP pour induire les bourgeons de différentes espèces de *Taxus* [14 ; 24 et 25]. Ainsi, Abhay Kulkarni [21], a obtenu des pourcentages d'induction des bourgeons de *Taxus* ssp. estimés à 0 ; 37,5 ; 66,66 et 75,77% en testant le 2iP, 2mg/l BAP, 0,1mg/l BAP et 0,05mg/l Kin respectivement. Ces différences peuvent être justifiées par les fortes concentrations d'hormones utilisées dans nos expérimentations. Cette constatation est confirmée par Amos et Mccown [26], où ils soulignent que les conifères sont sensibles aux cytokinines. L'apport de l'AIB dans le milieu de culture se montre plus efficace à l'induction des bourgeons que les cytokinines et ce quel que soit le milieu de base testé. Nous enregistrons un pourcentage de débourrement estimé à 65,38% pour 2mg/l de l'AIB et 54,16% pour 2mg/l de l'AIA. Ces résultats sont similaires à ceux obtenus par Vallata [27], où il signale que les cytokinines favorisent la formation des cals et empêchent le développement des bourgeons comparées aux auxines qui favorisent le développement des bourgeons de *Taxus baccata*. L'apport de l'AIB et l'AIA dans un milieu contenant la Kin améliore nettement le taux d'induction des bourgeons de 16,66% (2mg/l Kin) jusqu'à 45,45% (2mg/l Kin+1mg/l AIA) et 58,33% (2mg/l Kin+1mg/l AIB). Quant à la BAP, l'apport de cette dernière dans un milieu contenant l'AIA ou l'AIB a stimulé moyennement le débourrement des bourgeons. Nous avons obtenu des pourcentages similaires pour la BAP seule (48,14%) et associée avec l'AIA (48%) et légèrement proche pour la BAP associée avec l'AIB (44,82%).

L'apport de l'AIA dans un milieu contenant le 2iP (2mg/l 2iP+1mg/l AIA) a permis d'avoir le meilleur pourcentage d'induction des bourgeons des pousses juvéniles de *Taxus baccata* L. estimé à 73,33% (2mg/l 2iP+1mg/l AIA). De plus cette combinaison a induit un nombre acceptable de bourgeons néoformés avec une moyenne égale à 3 bourgeons néoformés par explant. Tandis que, les cytokinines dans les milieux de culture (2mg/l BAP, 2mg/l 2iP) ont induit un seul bourgeons néoformé par explant qui reste très faible. Quant à la croissance des bourgeons, l'utilisation de la Kin seule a donné un très faible développement aérien avec 0,34 cm de longueur et 4 feuilles contrairement à l'utilisation du 2iP, de la BAP, de l'AIB et de l'AIA seuls favorisant un développement aérien moyen avec une longueur de la pousse atteignant 0,86 ; 1,21 ; 1,21 et 1,54 cm respectivement et un nombre moyen des feuilles compris entre 10 et 17 feuilles. Les vitroplants dont les milieux de culture contiennent de la Kin et de l'AIA (2mg/l Kin+1mg/l AIA) et du 2iP et de l'AIB ((2mg/l 2iP+1mg/l AIB) présentent une meilleure croissance aérienne avec une longueur moyenne de pousses formées égale à 2 et 2,4 cm et un nombre moyen de feuilles compris entre 20 et 21 feuilles respectivement. Une interaction de milieu de base et de la composition hormonale est confirmée par une analyse factorielle. Les milieux de culture testés induisent dans leur majorité les bourgeons en dehors de ceux dépourvus de régulateurs de croissance (WPM<sub>0</sub> et MS<sub>0</sub>) et MS<sub>1</sub> contenant de la Kin. Les premières manifestations de débourrement sont perceptibles à partir de la 4<sup>ème</sup> semaine sur tous les milieux excepté ceux de WPM<sub>2</sub>, WPM<sub>10</sub>, WPM<sub>11</sub> et WPM<sub>12</sub> où le gonflement des bourgeons est précoce et survient à partir de la 2<sup>ème</sup> semaine de culture. Les meilleurs taux d'induction avec des réponses de 76,92 ; 73,33 ; 71,42 ; 71,42 et 61,53% sont obtenus sur les milieux WPM<sub>7</sub>, WPM<sub>10</sub>, WPM<sub>5</sub>, WPM<sub>6</sub>, WPM<sub>8</sub> contrairement aux milieux MS où les pourcentages ne dépassent pas 53% mais restent intéressant à exploiter. Cependant, seul le milieu WPM<sub>10</sub> (2mg/l 2iP et 1mg/l AIA) qui favorise la néoformation des bourgeons (3 bourgeons /explant). Quant à la croissance des bourgeons, ce milieu (WPM<sub>10</sub>) favorise une faible croissance de 0,8 cm de longueur des pousses comportant 9 feuilles seulement. Cela peut être justifié par la formation des calcs avec un taux élevé égal à 71%.

Une meilleure croissance est obtenue sur les milieux WPM<sub>11</sub> (2mg/l 2iP+1mg/l AIB), WPM<sub>12</sub> (2mg/l Kin+1mg/l AIA), et WPM<sub>5</sub> (2mg/l AIA) avec une longueur moyenne des pousses estimée à 2,4 , 2 et 1,75 cm et un nombre moyen de feuille égal à 21, 20 et 19 feuilles respectivement après deux mois de culture. Nous constatons que les milieux contenant l'AIA (WPM<sub>5</sub> et WPM<sub>12</sub>) favorisent la formation de petites feuilles comparées aux autres milieux où les feuilles sont bien développées.

## CONCLUSION

En dépit des difficultés de la micropropagation des ligneux et vu les pertes dues aux contaminations répétées et la récalcitrance des espèces, l'utilisation de cette technique reste une alternative prometteuse pour la propagation, la préservation et la conservation des clones des écotypes sélectionnés. Nous avons réussi à induire le bourgeonnement des explants provenant des arbres centenaires en voie de disparition de *Taxus* sur le milieu WPM. Ce dernier est le plus favorable pour l'induction, la néoformation et la croissance des bourgeons de *Taxus baccata* L. L'apport des régulateurs de croissance parait nécessaire pour la stimulation des bourgeons. La composition hormonale 2mg/l 2iP et 1mg/l AIA est la plus favorable à l'induction et la néoformation des bourgeons avec un taux de 73,33% et 3 bourgeons néoformés par explant. Quant au développement de ces bourgeons, la combinaison de la Kin et de l'AIA (2mg/l Kin+1mg/l AIA) et du 2iP et de l'AIB ((2mg/l 2iP+1mg/l AIB) a donné une meilleure croissance aérienne allant de 2 à 2,40 cm de longueur et un nombre moyen de feuilles égal à 20 et 21 feuilles respectivement. Vu la variation de la réponse génotypique au sein des espèces, d'autres expérimentations méritent d'être envisagées pour établir un programme de préservation et conservation qui peut réduire l'effet du génotype sur la régénération des *Taxus* en Algérie.

## RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- [1]. Frohne D., Pfander H.J. & Anton R. (2009). *Plantes à risque*. 5<sup>ème</sup> Ed. Lavoisier. 459 p.
- [2]. Mihaljevic S., Bjedov I., Kovac M., Levanic D.L. & Jelaska S. (2002). Effect of Explant Source and Growth Regulators on *in vitro* Callus Growth of *Taxusbaccata* L. Washingtonii. *Food Technol. Biotechnol.* 40 (4) : 299–303.
- [3]. Hata K., Osaki M., Dhar D.K., Nakayama K., Fujiwaki R., Ito H., Nagasue N. & Miyazaki K. (2004). Evaluation of the antiangiogenic effect of Taxol in a human epithelial ovarian carcinoma cell line. *CancerChemother. Pharmacol.* 53 (1) : 68–74.
- [4]. Kumar S., Mahdi H., Bryant C., Shah J.P., Garg G. & Munkarah A. (2010). Clinical trials and progress with paclitaxel in ovarian cancer. *Int. J. Womens Health*, 19 (2) : 411–427.
- [5]. Bruneton J. (2009). *Pharmacognosie, phytochimie, plantes médicinales*. 4<sup>ème</sup> Ed. Tec et Doc. Lavoisier. 1270 p.
- [6]. Wann S.R. & Goldner W.R. (1994). Induction of somatic embryogenesis in *Taxus* and the production of taxane-ring containing alkaloids there from. United states patent 5310672.
- [7]. Nhut D.T., Hien, N.T.T., Don N.T. & Khiem D.V. (2007). *In vitro* shoot development of *Taxus wallichiana zucc.*, a valuable medicinal plant. In : Jain, S.M. et Haggman, H. protocol for micropropagation of Woody Trees and Fruits. *Springer, the Netherlands*. 107-116.
- [8]. Liao Z.M., Chen X.S. & Tang. K. (2006). Micropropagation of endangered plant species. *Methods Mol.Biol.* 3 (18) : 179-185.
- [9]. Saumitro D. & Jha L.K. (2018). Effect of different rooting media on root proliferation of *Taxus baccata* L. stem cuttings. *Current Agriculture Research Journal*. 06 (1) : 95-104.
- [10]. Saumitro D. et Jha L.K. (2018). Optimization of conditions for vegetative propagation of *Taxus baccata* by shoot cuttings: effects of IBA, growth stage and seasonal differences. *Annals of Plant Sciences*. 7 (2) : 2082-2087.
- [11]. Kishor K., Upreti B.M., Pangtey Y.P.S., Tewari A. & Tewari L.M. (2015). Propagation and conservation of Himalayan Yew (*Taxus baccata* L.) through air layering: a simple method of clonal propagation. *Annals of Plant Sciences*. 4 (04) : 1064-1067.
- [12]. Djilali W. (2005). Propagation du *Taxus baccata* L. par semis et bouturage. Mémoire d'ingénieur. Agronomie. Université SAAD DAHLAB de Blida., 64 p.
- [13]. Chang S.H., Ho C.K., Chen,Z.Z. & Tsay J.Y. (2001). Micropropagation of *Taxus mairei* from mature trees. *Plant Cell Rep.* 20 : 496–502.
- [14]. Abbasin Z., Zamani S., Movahedi S., Khaksar G. & Tabatabaei B.E.S. (2010). *In vitro* micropropagation of yew (*Taxus baccata*) and production of plantlets. *Biotechnol.* 9 (1) :48-54.
- [15]. Ibrahim O., Gercheva P., Nacheva L. & Ivanova V. (2011). Biotechnological approaches for propagation of *Taxus baccata* L. an endangered plant with important ornamental and pharmaceutical value. *Ecological Approaches Towards The Production of Safety Food*. 111-116.
- [16]. Rosell C.H. & Villalobos A.V.M. (1992). *Fondements théoriques et pratiques de la culture des tissus végétaux*. Lavoisier. 162p
- [17]. Bonga M. & Von Aderkas P. (1992). *In Vitro Culture of Trees*. Springer Science+Business Media Dordrecht. 236p.
- [18]. Abdellatif N., Aizer. N., Saidi F. & Chaouia C. (2018). Production de taxol à partir des cals de l'if commun (*Taxus baccata* L.). *Revue Agrobiologia*. 8 (2) : 1125-1131.
- [19]. Murashige T. & Skoog F. (1962). A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol Plantarum*. 15 : 473–97.
- [20]. McCown B.H. & Lloyd G. (1981). Woody Plant Medium (WPM), a mineral nutrient formulation for microculture for woody plant species. *Hortic Sci.* 16-453.
- [21]. Abhay Kulkarni A. (2000). Micropropagation and secondary metabolite studies in *Taxus* spp. And *Withania somnifera* L. *Dunal. PhD thesis, University of Pune*. 354p.
- [22]. Majada J.P., Sierra M.I. & Sanchez-Tames R. (2000). One step more towards taxane production through enhanced *Taxus* propagation. *Plant Cell Rep.* 19 : 825-830.
- [23]. Ewald D. (2007). Micropropagation of yew (*Taxus baccata* L.). In : Jain, S.M. et Haggman, H. protocol for micropropagation of Woody Trees and Fruits. *Springer, the Netherlands*. 117-123.
- [24]. Naraghi T.S. (2003). *In vitro* propagation of *Taxus baccata* through shoot tip culture. *Iranian J. Rangelands Forrst Plant Breed. Genetic Res.* 11 (3) :309-325.
- [25]. Jun M. & MingDong M. (2007). Tissus culture technique of *Taxus media* 'Hecksii'. *Scientia SilvaeSinicae*. 43 (7) :30-34.
- [26]. Amos R.R. & McCown B.H. (1981). Micropropagation of members of the coniferae. *HortScience*. 16 :453 (Abstract).
- [27]. Vallata P. (2009). Intérêt pharmaceutique du genre *Taxus* et des Taxanes ; culture *in vitro* et dosage. Thèse de doctorats, Faculté de pharmacie, Université Henri Poincaré - Nancy 1, 106 p.