

INTRODUCTION IN VITRO DE DEUX PLANTES MEDICINALES: *Myrtus communis* L. ET *Myrtus nivellei* Batt et Trab.

Meriem TOUAIBIA¹⁾,
Fatma Zohra CHAOUCH²⁾,
Hamida Saida CHERIF¹⁾

1) Département de
biologie. Université SAAD
DAHLEB, Algérie. Email:
Biomeriem@hotmail.fr

2) Département
d'Agronomie. Université
SAAD DAHLEB, Algérie

Résumé.

L'espèce méditerranéenne *Myrtus communis* L. et l'espèce saharo-endémique *Myrtus nivellei* Batt et Trab. (Myrtaceae) sont très connues pour leurs vertus thérapeutiques. L'introduction in vitro de ces deux plantes a été réalisée à partir de quelques graines récoltées in situ sur des pieds adultes. Après désinfection, elles ont été semées in vitro sur milieu MS et ont donné naissance à des vitro-plants. Ces derniers ont été utilisés comme matériel de base pour comprendre leur comportement organogène (par microbouturage classique sur milieu MS avec et sans régulateurs de croissance), ainsi que leur aptitude à la callogenèse (sur milieu MS additionné de régulateurs de croissance). Les résultats obtenus permettent d'envisager une réimplantation ultérieure de ces espèces dans des zones protégées.

Mots clefs: *Myrtus communis* L., *Myrtus nivellei* Batt et Trab., vitro-plants, microbouturage, callogenèse.

Introduction

La récolte et l'utilisation intensive par l'Homme ont provoqué la disparition de certaines espèces (Boullard, 2001). Afin de palier à ce problème, plusieurs techniques de culture in vitro sont d'avantage employées pour satisfaire les besoins en agriculture, en industrie et en horticulture. Elles demeurent un outil très efficace au service de la recherche biologique et physiologique (Auge et al., 1989).

L'Algérie, de par son aire géographique et sa diversité climatique riche en flore naturelle, recèle d'une gamme importante de plantes médicinales et aromatiques, faisant partie du grand patrimoine végétal de notre pays. De multiples études, certes dispersées, ont été faites sur

les plantes médicinales, ce qui dénote toute l'importance accordée à la phytothérapie dans la politique sanitaire mise en place.

Ce travail apporte une nouvelle contribution à la connaissance scientifique de deux espèces de myrte en Algérie (*Myrtus communis* L. et *Myrtus nivellei* Batt et Trab.), connues pour leurs propriétés curatives. Dans le but de les introduire in vitro et comprendre leur comportement organogène et callogène. Cette étude s'intègre également dans le contexte plus global de la mise en valeur de la biodiversité des plantes aromatiques algériennes, ainsi que dans le cadre de la préservation des espèces endémiques en voie de disparition du Sahara central.

MATERIEL ET METHODES

1- Matériel végétal

Les fruits mûrs de l'espèce *M communis* L. ont été récoltés sur des pieds adultes à 32 km du chef lieu de

la wilaya de *Ain Defla* à proximité de la commune de *Ain Turki* (tableau 1). Alors que ceux de l'espèce *M nivellei* Batt et Trab. ont été récolté à 146 km du chef- lieu de la wilaya de *Djanet*, cette station est située à 94,8 km au sud de *Ihrir*, faisant partie du

parc national du *Tassili* (tableau 1). Les échantillons ont été identifiés au niveau du laboratoire de botanique de l'Ecole Nationale Supérieure d'Agronomie – El Harrach (Alger).

Tableau 1: Coordonnés géographiques des sites de récolte choisis.

Région	Localisation	Altitude	Latitude	Longitude	Etage bioclimatique
Tassili n'Ajjer	Wilaya de Djanet	2018 m	24°59' Nord	8°07' Ouest	Aride à hiver frais (Sahara central)
Zaccar	Wilaya de Ain Defla	522 m	36°18' Nord	2°16' Est	Semi-aride à hiver tempéré (Atlas tellien)

2- Milieu de culture utilisé

Le milieu de culture de base utilisé est celui de Murashige et Skoog (1962). Le pH est ajusté entre 5,7 et 5,8 avant l'addition de la gélose. Les milieux sont répartis dans des tubes à essais (2,5x20 cm) à raison de 15

ml/tube, puis stérilisés par autoclavage à 120°C sous une pression de 1 bar durant 20 min.

3- Désinfection des graines

La désinfection est réalisée en utili-

sant deux types de désinfectants: l'hypochlorique de sodium $\text{Na}(\text{ClO})$ et l'hypochlorite de calcium $\text{Ca}(\text{ClO})_2$, en faisant varier les concentrations et les temps de trempage correspondants (tableau 2).

	Concentrations		Temps de trempage		
	16%	8%	10 min	20 min	30 min
Hypochlorite de calcium $\text{Ca}(\text{ClO})_2$					
Hypochlorite de sodium $\text{Na}(\text{ClO})$					

Tableau 2: Conditions de désinfection des graines

Tableau 2: Conditions de désinfection des graines

	Concentrations	Temps de trempage		
		10 min	20 min	30 min
Hypochlorite de calcium Ca(ClO) ₂	16%	10 min	20 min	30 min
	8%	10 min	20 min	30 min
Hypochlorite de sodium Na(ClO)	16°	10 min	20 min	30 min
	8°	10 min	20 min	30 min

4- Multiplication par micro-bouturage

Les vitro-semis âgés de 16 semaines ont été fragmentés en explants

présentant des bourgeons axillaires ou apicaux de 0.5 à 1cm. Cependant, plusieurs combinaisons hormonales sont testées, en utilisant trois hormones de croissance selon la

phase de croissance étudiée: la benzyladénine BA (cytokinine), l'acide α -naphthylacétique ANA (auxine) et l'acide gibbéréllique GA₃(tableau 3).

Tableau 3: Différentes combinaisons hormonales testées

	Milieux	BA mg/l	ANA mg/l	GA ₃ mg/l
Phase de multiplication	M ₀	Témoin sans hormones		
	M ₁	0,5	0,1	-
	M ₂	1	0,1	-
	M ₃	1,5	0,1	-
	M ₄	2	0,1	-
	M ₅	1	-	-
	M ₆	0,5	0,5	-
Phase d'élongation	M ₀	Témoin sans hormones		
	M ₁	1	0,1	0,05
	M ₂	1,5	0,1	0,05
	M ₃	2	0,1	0,05
Phase d'enracinement	M ₀	Témoin sans hormones		
	M ₁	-	0,1	-
	M ₂	-	0,5	-
	M ₃	-	1	-

5- Induction de la callogenèse à partir des vitro-plants (culture de tissus)

Pour l'étude de la callogenèse, des vitro-plants âgés de 16 semaines sont utilisés. Sous hotte à flux

laminaire, le vitro-plant est délicatement découpé en petits fragments d'environ 0,25cm² dépourvus de bourgeons. On obtient ainsi des explants de racines, d'entre-nœuds et de feuilles. Chaque explant est introduit sur le milieu MS enrichi en hormones de

croissance (tableau 4). Les tubes sont ensuite placés dans le phytotron, avec une photopériode de 16h lumière et/8h d'obscurité, température (26±1°C). L'éclairage est assuré par une série de 16 néons d'une intensité de 25000 lux.

Tableau 4: Combinaisons hormonales utilisées pour l'induction de la callogenèse

Milieu MS	ANA	2,4-D	KIN
M ₀	Témoin sans hormones		
M ₁	0,5	-	0,5
M ₂	-	0,5	0,5
M ₃	1	-	1
M ₄	-	1	1

RESULTATS ET DISCUSSION

1- Résultats de la désinfection des graines

L'utilisation de l'hypochlorite de calcium à 8% pendant 30 min a permis d'abaisser le taux de contamination jusqu'à 11 % pour les graines de *M communis* L., et 16% pour *M nivellei* Batt et Trab. Quant à l'utilisation de l'hypochlorite de sodium, les résultats montrent une détérioration de l'état des graines, elle est d'autant plus accentuée que la dose du désinfectant est élevée,

provoquant la libération continue des phénols, qui en s'oxydant, deviennent toxiques et entraînent la mort des cellules. Les phénols peuvent annuler les échanges entre l'explant et le milieu de culture (Margara,1989).

2- Résultats de la multiplication par micro-bouturage

2-1- Phase de multiplication

Les résultats obtenus après sept semaines de culture, montrent que la meilleure combinaison hormonale pour le développement cauli-

naire est celle représentée par le milieu M₃ et le milieu M₂ respectivement (fig. 1). Le taux de débourrement, sur le milieu M₃, est plus important pour *M communis* L. avec 92,12%, par rapport à *M nivellei* Batt et Trab. ayant présenté un taux de 90,13%. Le milieu témoin présente un faible pourcentage de débourrement, ne dépassant pas les 20% chez les deux espèces étudiées. Alors que le milieu M₆ n'a présenté aucun débourrement visible, mais plutôt une dédifférenciation cellulaire marquée par l'apparition d'un cal à la base de la micro-bouture.

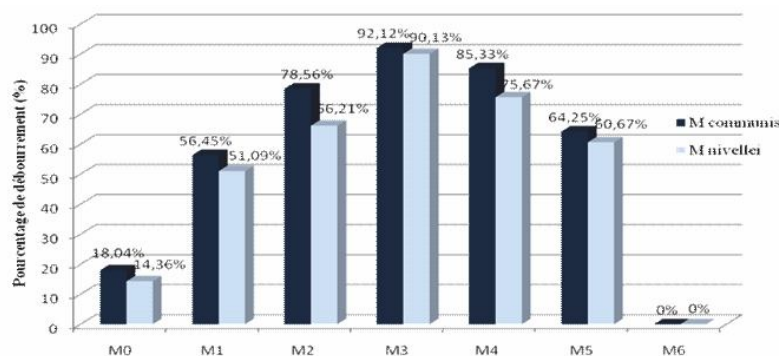


Fig 1: Taux de débourrement des bourgeons chez *M communis* L. et *M nivellei* Batt et Trab.

2-2-Phase d'élongation

Après 1 mois de culture, l'axe caulinaire a connu un allongement important et une bonne séparation

inter-nodale chez les deux espèces (fig. 2). Le milieu M_2 a fourni le meilleur allongement caulinaire aussi bien pour *M communis* L ($7,8\pm 0,23$ cm) que pour *M nivellei*

Batt et Trab ($6,63\pm 0,48$ cm). Le milieu M_3 vient en 2^{ème} position et le milieu M_1 en 3^{ème} position.

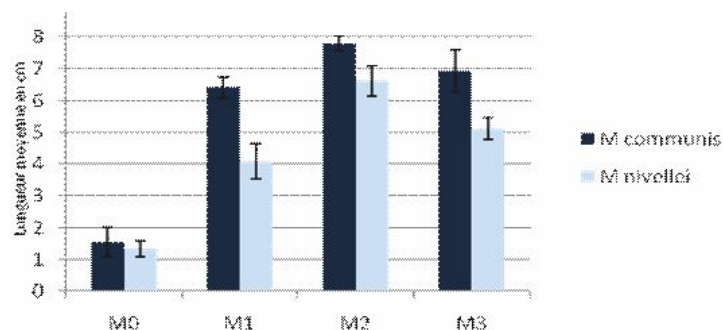


Fig 2: Effet de la GA_3 sur l'allongement moyen des vitro-plants de *M communis* L. et *M nivellei* Batt et Trab.

Les travaux de Druart et al. (1983) ainsi que ceux de Morel et Muller (1964) ont montré que si l'élongation des vitro-plants est difficile, il suffit de les introduire sur un milieu enrichi en GA_3 . L'action de celui-ci s'exerce au niveau de la zone méristématique sub-apicale et favorise l'élongation inter-nodale.

2-3- Phase d'enracinement

L'enracinement des vitro-plants est obtenu après 12 semaines sur le milieu de base MS additionné

d'ANA (fig. 3). L'ANA à $0,5$ mg/l a pu initier la rhizogenèse, mais une concentration de 1 mg/l (M_3) a donné un résultats meilleur, aussi bien pour *M communis* L ($3,98\pm 0,23$ cm) que pour *M nivellei* Batt et Trab ($2,69\pm 0,33$ cm).

Selon Viana et al. (1997), les tiges prélevées sur des végétaux jeunes fournissent des vitro-plants dont les potentialités rhizogènes sont les meilleures. Le phénomène de la rhizogenèse a été expliqué par Leifert et al (1991), rapportant que la

blessure de la tige au moment du micro-bouturage, donne le signal initial au développement d'une racine adventive, celui-ci peut ensuite être amplifié par l'apport d'auxine exogène. Selon Favre (1977), la néoformation des racines est déclenchée par l'action d'une substance mobile synthétisée par les feuilles adultes, celle-ci migre vers la base de la tige, cette substance hypothétique spécifique de la rhizogenèse avait été appelée la rhizocaline.

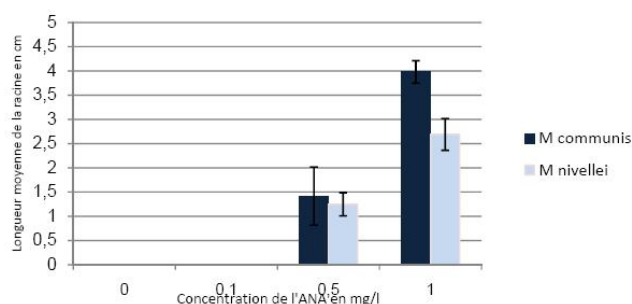


Fig 3: Effet de la variation de la concentration en ANA sur l'enracinement des vitro-plants

3- Résultats de la callogenèse

Le milieu contenant la combinaison hormonale ANA/KIN est significativement plus callogène que le milieu contenant le 2,4-D/KIN, ce qui se répercute sur la surface totale des cals. Le brunissement des milieux est significativement plus important sur

les milieux contenant le 2,4-D comme auxine. Des constatations similaires ont été rapportées par les travaux de Sez nec (1986) sur le comportement callogène de l'espèce *Bremontiera amoxylon*. Cependant, les résultats obtenus ont montré que le milieu M_0 est le seul n'ayant fourni aucune réponse callogène pour l'ensemble des

explants étudiés.

Chez L'espèce *M communis* L.

Les feuilles ont exprimé une excellente aptitude à la callogenèse sur le milieu M_1 . En effet, 96,04% des explants ont abouti à des cals après 4 semaines de culture, suivi par le milieu M_2 avec 70,75%.

On note un faible pourcentage de callogenèse sur les milieux M₃ et M₄, estimé respectivement à 54,16% et 48,30%. Les milieux M₁ et M₂ ont fourni les pourcentages les plus élevés pour la callogenèse des explants d'entre-nœuds, avec une prédominance du premier qui a exprimé 89,17%. Les explants issus des racines ont présenté les plus faibles taux de callogenèse sur la quasi totalité des milieux testés, seuls M₁ et M₂ ont fourni des taux plus ou moins satisfaisants mais ne dépassant pas 25%.

Chez l'espèce *M nivellei* Batt et Trab.

Le milieu M₁ a donné le meilleur pourcentage de callogenèse des explants foliaires estimé à 82,14% alors que le milieu M₂ a présenté 60,05%. Les milieux M₃ et M₄ ont provoqué l'expression des cals sur la moitié des explants testés. La callogenèse a partir d'entre-nœuds n'est initiée qu'après 7 semaines et ne concerne que 78,22% pour M₁ et 68% pour M₂. Ces cals connaissent une croissance très active et aboutissent à la formation de cals compacts de couleur claire. Quant aux explants racinaires et sur l'ensemble des milieux testés, aucune manifestation callogène n'a été observée.

D'après les résultats obtenus, on constate que les explants de feuilles et d'entre-nœuds constituent un matériel de choix pour l'étude du comportement callogène, en fournissant des cals volumineux de couleur verte et de texture friable, caractérisant les cals caulogènes d'après Piatti (1988).

Selon Boxus (1995), les fragments prélevés à différents niveaux de la plante ne fournissent pas les mêmes résultats, cela est dû à l'état physiologique interne des cellules de l'explant. En outre, Chaussat et al. (1980) confirment que le milieu MS sans hormones ne manifeste aucune réaction callogène et la plupart des

explants se nécrosent. Chose que nous avons également constaté au cours de nos essais.

CONCLUSION

Ce travail constitue une contribution à l'introduction de deux espèces de myrte (*M communis* L. et *M nivellei* Batt et Trab.) en culture *in vitro*, via la technique de micro-bouturage et la callogenèse.

Les essais effectués ont aboutis à la détermination d'une méthodologie pour une meilleure désinfection des graines, validant l'usage de l'hypochlorite de calcium, qui s'est révélé plus efficace que l'hypochlorite de sodium. Concernant la micro-propagation à partir de vitro-semis, les résultats obtenus ont montré que les hormones de croissance jouent un rôle prépondérant dans les différentes étapes de la multiplication. Cependant, l'élongation est plus favorable si le milieu est supplémenté de 0,05mg/l de GA₃. Le milieu MS contenant 1 mg/l ANA a permis un bon enracinement des vitro-plants. Les essais pratiqués sur la culture de tissus indifférenciés, ont révélé que les cals peuvent apparaître sur milieu MS contenant une balance hormonale équilibrée Kin/ANA ou Kin/2,4-D. Se sont les explants de feuilles et d'hypocotyles qui ont exprimé une très bonne aptitude à callogenèse.

REFERENCES BIBLIOLGRAPHIQUES

1. Auge, R. et al. (1989). La culture *in vitro* et ses applications horticoles. Ed Tec & Doc. 256p.
2. Boullard, B. (2001). Plantes médicinales du monde: Réalités et croyances. Ed Estem. 660p.
3. Boxus, P. (1995). Multiplication végétative: Micropropagation et embryogenèse somatique en biotechnologie végétale. Ed CNED. 191p.
4. Chaussat, A et al. (1980). La

multiplication végétale des plantes supérieures. Ed Gauthier-Villars. 277p

5. Druart, P., Kevers, C., Boxus, P.H., Gasper, T.H. (1983). *In vitro* promotion of root formation by apple shoots through darkness effect on endogenous phenols and peroxidases. *flanzenphysiol.* 108:429-436.
6. Favre, J.M. (1977). La rhizogenèse, aspects divers d'un processus d'organogenèse végétale. *J. Physiol.* 38:37-52.
7. Leifert, C, Ritchie, J.Y. et Whites, W.M. (1991). Contaminants of plant tissue and cell cultures. *J. Microbial and biotech.* 7:542-459.
8. Margara, F. (1989). Bases de multiplication végétative: les méristèmes et l'organogenèse. Ed INRA. Paris. 262p.
9. Morel, G. et Muller, J.F. (1964). La culture *in vitro* du méristème apical de la pomme de terre. *Comptes rendus.* 258:5250-5252.
10. Murashige, T., Skoog, F. (1962). A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiology of plants.* 15:473-497.
11. Piatti, M.F. (1988). Embryogenèse somatique et synchronisation du développement embryonnaire. Thèse de doctorat en pharmacie. Paris VI. France. 130p.
12. Seznec, G. (1986). Essai d'application des techniques de culture *in vitro* à la multiplication de deux espèces endémiques rares des Mascareignes: *Gouania mauritiana* et *Bremontiera amoxyylon*. Mémoire de DEA en biologie végétale. Université de Nancy. 84p.
13. Viana, A.M (1997). Recent advances in biotechnology for tree conservation and management. Edition IFS. Brezil. 251p.