

## Essais préliminaires d'induction et de croissance in vitro de cals chez l'if européen (*Taxus baccata* L).

Karima ABDELATIF et Abdelkader HARFOUCHE

INRF, Arboretum de Baïnem B.P. 37 CHERAGA 16300 ALGER

### ملخص

أوراق *Taxus baccata* الأوروبية تحتوي على مكون طبيعي الـ "baccatine"، يستعمل لاستخلاص مادة التاكسول. جزيئته تواعد بالكثير فيما يخص الإشفاء من بعض أمراض السرطان. يمكن استخراج هذا المكون تجارياً من الكالوسات المحصلة عليها من أوراق وبراعم الـ *Taxus baccata* بعد زرعها في بيئة غذائية اصطناعية. والنتائج المحصلة عليها في إطار هذه الدراسة بينت أنه لا يوجد فرق في نمو الكالوسات المنتجة من الأوراق أو من البراعم. غير أن التركيزات الضئيلة لهرمون D 2.4 لها تأثير إيجابي على نمو الكالوسات.

### Résumé

Les feuilles de l'if européen fabriquent un composé naturel, la baccatine, utilisée pour la synthèse de taxol, une molécule anti-tumorale qui suscite beaucoup d'espoir dans la lutte contre certains cancers. La culture de cellules ou de cals *in vitro* peut être une source de production commerciale de ce composé susceptible d'offrir une alternative qui permettrait de préserver les ressources génétiques de l'if, déjà sérieusement menacées. Dans cette perspective, des essais d'induction de callogenèse et de croissance des cals à partir d'explants de feuilles et de bourgeons ont été réalisés. Les résultats obtenus semblent indiquer que l'aptitude à la callogenèse et à la croissance des cals d'explants de feuilles ne sont pas significativement différentes de celles des explants issus de bourgeons. Cependant, la croissance des cals est nettement influencée par la concentration en 2,4 D du milieu de culture. La croissance des cals était, en effet, significativement plus rapide sur un milieu ne comportant qu'une dose faible de ce régulateur de croissance.

**Mots clés :** *Taxus baccata*, callogenèse, *in vitro*, taxol

## INTRODUCTION

La flore de l'Algérie est riche en espèces à vertu thérapeutique peu exploitées. Cette réserve permettra sans doute de jouer un rôle important dans la pharmacologie locale. Tel est le cas de l'if, producteur de taxol. Le taxol, un diterpène poly-oxygéné (Fig. 1) présentant une activité antitumorale, suscite de grands espoirs dans la lutte contre une large gamme de cancers (Wani *et al*, 1971).

Le problème qui s'est posé pour la production commerciale de cette molécule est la rareté des peuplements d'if et le faible rendement en taxol des tissus corticaux des arbres; on estime à 7 tonnes la quantité d'écorce de *Taxus brevifolia* nécessaire pour produire 1 kg de taxol (Cragg *et al*, 1993) et à 3-10 arbres de 100 ans pour traiter un seul patient (Murdoch et Taylor, 2003). Il est évident qu'une exploitation dans de telles proportions mettrait rapidement en péril la survie de l'espèce.

L'if européen est rare en Algérie et sa propagation est limitée du fait que des méthodes de multiplication rentables, qu'elles soient par semis ou par voie végétative, ne sont pas encore maîtrisées. En effet, comme pour de nombreuses autres espèces ligneuses, les méthodes traditionnelles de multiplication végétative par bouturage ne sont pas applicables à un niveau commercial, vu le faible pourcentage de réussite (Rancillac, 1981) et la multiplication par semis est particulièrement difficile. La mise au point d'une méthode de micro-propagation pour la production de cals à partir de feuilles et de bourgeons d'if pourrait constituer une voie alternative intéressante.

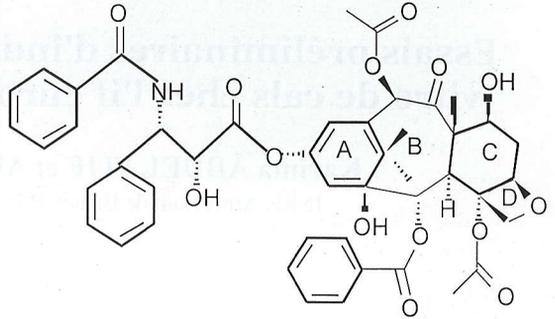


Fig. 1. Formule stéréochimique du taxol (d'après Murdoch et Taylor, 2003)

## MATERIEL ET METHODES

### PREPARATION DU MATERIEL VEGETAL

Les explants utilisés proviennent de feuilles et de bourgeons d'ifs adultes en peuplement naturel (région lyonnaise, France).

Les feuilles et les bourgeons sont prélevés durant le mois de Novembre sur des rameaux sains. Ils sont tout d'abord lavés à l'eau du robinet, puis trempés dans une solution mouillante au triton x 100 à 7% avant de subir une désinfection selon le protocole d'Augé *et al* (1989) qui consiste à désinfecter les organes dans deux solutions différentes d'hypochlorite de calcium ( $\text{Ca}(\text{OCl})_2$ ) à 7% et 12% pendant 20 mn chacune, puis à les rincer trois fois (5 mn à chaque rinçage) à l'eau déminéralisée stérile sous hotte à flux laminaire.

### Milieux et support de culture

#### Milieu d'induction de la callogenèse

Les explants (feuilles et bourgeons) sont

cultivés individuellement en tube à essai sur un milieu composé des macro-éléments de Murashige et Skoog, (1962), modifié ( $\text{NH}_4\text{NO}_3=400$  mg/l), des micro-éléments de Murashige et Skoog (1962) et des vitamines de Morel (1960). Deux variantes hormonales ont été utilisées : M1=Milieu de culture + 0,5 mg/l de 2,4D et M2= Milieu de culture + 0,5mg/l de 2,4D et 0,5mg/l de BAP. Les tubes sont obturés avec des capuchons métalliques non étanches.

Les milieux utilisés sont additionnés de saccharose (30g/l), leur pH est ajusté à 5,66. Ils sont solidifiés par de l'agar (6 g/l).

#### *Croissance des cals*

Après 4 semaines de culture sur les milieux M1 et M2, les cals produits sont transférés, après fragmentation pour les plus volumineux, sur 2 milieux neufs représentés par le **M3** (1.0 mg/l de 2,4D) et le milieu **M4** (2.0 mg/l de 2,4D). Une partie de cals a été transférée sur le même milieu frais **M1**.

#### **Nombre de répétitions par organe et par milieu**

Le nombre de répétitions est de 96 (48 sur M1, 48 sur M2) aussi bien pour les explants de feuilles que pour les explants de bourgeons. On dispose donc d'un total de 192 explants pour l'essai de callogenèse.

#### *Croissance des cals*

Le nombre total de répétitions est de 150 (50 sur M1, 50 sur M3, 50 sur M4) pour les explants de feuilles et de 93 (31 sur M1, 31 sur M3, 31 sur M4) pour les explants de bourgeons.

## **Analyses statistiques**

### *Callogenèse*

Au bout de 4 semaines de culture, on a procédé au comptage des cals produits à partir des explants de feuilles et de bourgeons cultivés sur les milieux M1 et M2. La comparaison des nombres de cals produits a été effectuée à l'aide d'un test d'homogénéité khi-deux de Pearson.

### *Croissance des cals*

Après 5 semaines de culture, on a procédé aux mesures des diamètres des cals issus des feuilles et des bourgeons cultivés sur les milieux M1, M3 et M4.

Pour estimer la croissance des cals, nous les avons assimilé à des cercles, dont nous avons mesuré le diamètre en mm.

Afin d'améliorer la normalité des résidus et de stabiliser les variances résiduelles, nous avons utilisé la transformation Logarithme népérien des diamètres ( $\text{Log } \emptyset$ ) pour effectuer une analyse de variance à deux facteurs croisés de variation (organe: feuilles, bourgeons; milieu de culture: M1, M3, M4). Le modèle d'analyse est:

$$\text{Log } X_{ijk} = \mu + o_i + m_j + (om)_{ij} + e_{ijk}$$

où  $X_{ijk}$  est le diamètre (mm) du  $k^{\text{ème}}$  cal issu de l'organe  $i$  cultivé sur le milieu  $j$ ;  $\mu$ , la moyenne de l'essai;  $o_i$ , l'effet du type d'organe  $i$  (feuille ou bourgeon);  $m_j$ , l'effet du milieu  $j$  (M1, M3 ou M4);  $(om)_{ij}$ , l'effet d'interaction entre le type d'organe  $i$  et le milieu  $j$  et  $e_{ijk}$ , le résidu individuel aléatoire de moyenne 0 et d'écart type  $\sigma_e$ .

**Tableau 1. Pourcentages de cals obtenus sur les 2 milieux d'induction testés.**

	<b>Feuilles</b>	<b>Bourgeons</b>	<b>Total</b>
<b>M1</b> (MS 400+0,5 mg/l 2,4 D)	26/48 (54%)	18/48 (37%)	44/96 (45,8%)
<b>M2</b> (MS 400+0,5 mg/l 2,4 D+0,5 mg/l BAP)	18/48(37%)	16/48 (33%)	34/96 (35,4%)
<b>Total</b>	44/96 (45,8%)	34/96 (35,4%)	78/192 (40,6%)

## RESULTATS ET DISCUSSION

### Désinfection du matériel végétal

La désinfection du matériel végétal est une étape cruciale préalable à la mise en culture in vitro des explants. Les résultats obtenus montrent une plus grande efficacité de la solution d'hypochlorite de calcium à 12% comparée à la solution de 7% (25% contre 50% d'infections). Nous avons donc retenu la concentration de 12% pour la suite de notre expérimentation.

### Callogenèse

Les résultats obtenus sur les milieux d'induction de la callogenèse (M1etM2), montrent que les explants représentés par les feuilles, semblent plus callogènes que les bourgeons (Tableau 1)

### Effet de la nature des explants

Trente quatre explants de bourgeons (sur 96) et 44 explants de feuilles (sur 96) ont produit des cals, soit respectivement, 35,4% et 45,8%. Ces pourcentages ne sont pas significativement différents (Khi-deux corrigé de Yates = 1.75,  $p = 0.186$ ), ce qui indique que la nature des explants, feuilles ou bourgeons, ne semble pas déterminant quant à l'aptitude de l'if à produire des cals. Mihaljevic *et al.* (2002) ont pour leur part obtenu des taux de callogenèse plus élevés

à partir de rameaux juvéniles qu'à partir d'embryons zygotiques matures.

### Effet des régulateurs de croissance

De même que pour l'effet " nature des explants", on n'enregistre pas une différence significative entre les pourcentages de callogenèse obtenus sur les milieux M1et M2 (Tableau 1).

### Interaction organe X milieu d'induction

La valeur du test d'indépendance au khi-deux (khi-deux=0,44;  $p=0,51$ ) montre une absence d'interaction entre le type d'organe utilisé et le milieu de culture; les deux milieux n'exercent pas une action différentielle sur l'aptitude à la callogenèse des deux types d'organe, feuilles ou bourgeons.

### Croissance des cals

Globalement, les cals obtenus sont de texture granuleuse et de consistance friable; leur couleur est jaune crème. Cependant, certains cals issus d'explants de bourgeons ont légèrement bruni suite à une excrétion de phénols qui a conduit à un ralentissement de leur croissance.

La croissance des cals a surtout été remarquablement influencée par la concentration en régulateur de croissance (2,4 D); quelque soit la nature de l'explant (feuille ou bourgeon).

Tableau 2. Moyennes en millimètres et erreurs standards (entre parenthèses) des diamètres de cals obtenus à partir de feuilles et de bourgeons sur les 3 milieux de culture différents.

	Feuilles	Bourgeons	Moyenne générale
M1 (2,4 D 0,5 mg/l)	7,08 (0,164)	5,40 (0,212)	6,45 (0,158)
M3 (2,4 D 1,0 mg/l)	3,60 (0,225)	3,70 (0,296)	3,64 (0,178)
M4 (2,4 D 2,0 mg/l)	2,74 (0,232)	2,46 (0,286)	2,64 (0,180)
Moyenne générale	<b>4,47 (0,195)</b>	<b>3,85 (0,199)</b>	<b>4,24 (0,144)</b>

Tableau 3. Résultats de l'analyse de variance à deux facteurs croisés (organe, milieu) effectuée sur les mesures individuelles de diamètre transformées en logarithme népérien. Les sources de variation statistiquement significatives sont marquées d'une étoile (\*).

Source de variation	ddl	SC	CM	F	P
Organe (fixe)	1	0,7799	0,7799	1,59	0,335
*Milieu (fixe)	2	40,8508	20,4254	87,19*	<0,000001
Interaction organe x milieu (fixe)	2	0,9826	0,4913	2,10	0,125
Résiduelle	234	54,8028	0,2342	/	/
Totale	239	97,4161	/	/	/

Les valeurs de diamètre les plus fortes (7.08 mm) sont obtenues pour les explants de feuilles cultivés sur le milieu M1 et les plus faibles pour les explants de bourgeons cultivés sur le milieu M4. Les diamètres de cals obtenus sur le milieu M3 sont de valeurs intermédiaires (Tableau 2).

#### *Effet de la nature des explants*

Les cals de feuilles développent un diamètre moyen (tous milieux confondus) de 4,47 mm au bout de 5 semaines de culture, les cals de bourgeons 3,85 mm. L'analyse de variance des logarithmes de diamètre suggère un effet organe non significatif (Tableau 3), comme l'indique la valeur du test F de l'effet F=1,59 et  $p=0,335$ .

Ce résultat a une portée pratique intéressante, en ce sens qu'il ne s'avèrerait pas nécessaire de sélectionner un type d'organe plutôt qu'un autre, étant donné que la croissance des cals obtenus dans les deux cas est quasi similaire. Cependant, il semblerait que les cals de bourgeons ont une plus grande tendance à produire des phénols composés, induisant un ralentissement de la croissance in vitro (Margara, 1982).

#### *Effet des régulateurs de croissance*

Des différences significatives de croissance ont été obtenues sur les 3 milieux M1, M3 et M4 (Tableau 3),  $F=87,19$  et  $p<10^{-6}$ . Le milieu M1 semble donner les meilleurs résultats avec un diamètre moyen

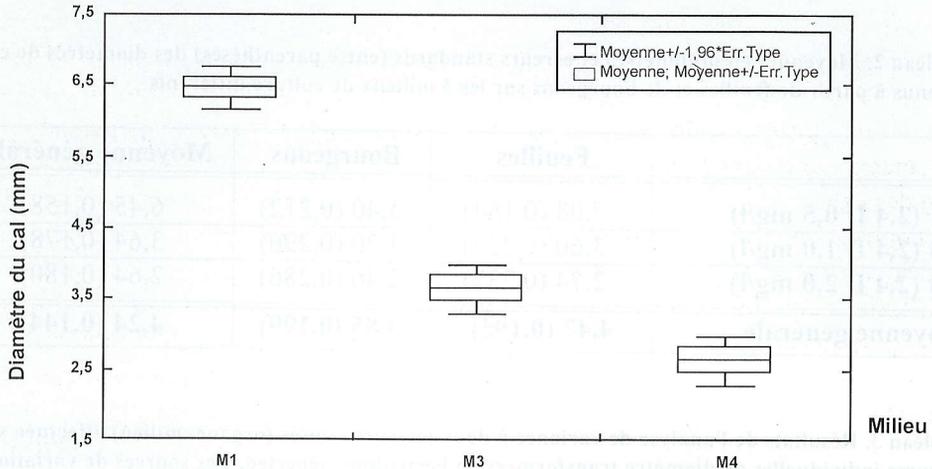


Fig. 2. Diagramme en boîtes à moustaches (boxplot) comparant les diamètres moyens sur les milieux M1, M3 et M4.

des cals de 5,45 mm, alors que le milieu M4 ne permet qu'une croissance modérée des cals, dont le diamètre moyen est de 2,64 mm (Tableau 2 et Fig. 2).

Dans un travail similaire Mihaljevic *et al.* (2002), ont pu mettre en évidence que la présence dans le milieu de culture de saccharose à une concentration de 2% et de kinétine à une dose de 0,5 mg/l améliorait la croissance des cals in vitro chez l'if européen malgré une dose de 3 mg/l de 2,4D, relativement plus élevée que les doses que nous avons appliqué dans ce travail.

*Interaction organe X milieu de croissance*

Il n'existerait pas une interaction significative entre la nature des explants et le type de milieu de culture comme semblent l'indiquer les résultats de l'analyse de variance (Tableau 3) avec  $F=2,10$  et  $p=0,125$ . Le comportement des cals de bourgeons par rapport aux cals de feuilles semble indépendant de la

concentration en régulateur du milieu de croissance.

Ce résultat indique qu'il n'est pas nécessaire de sélectionner en particulier une combinaison donnée d'organe et de milieu parmi ceux testés dans ce travail.

**CONCLUSION**

Les pourcentages d'induction de cals obtenus dans ce travail aussi bien à partir d'explants de feuilles que d'explants de bourgeons s'avèrent assez modestes pour les deux types de milieux utilisés. De tels milieux d'induction ont été choisis dans le but de mettre au point un procédé de production de cals in vitro. Des milieux plus complexes semblent nécessaires pour une telle production. De meilleurs résultats ont été obtenus avec l'if européen sur le milieu de Murashige & Skoog (1962) supplémenté de 3 mg/l de 2,4 D, 0,5 mg/l de kinétine et 2% de saccharose (Mihaljevic *et al.*, 2002). Les doses des

composés ont un effet important sur la callogénèse, ces auteurs ont signalé qu'une concentration de 3% de saccharose sur le même milieu avait entraîné une réduction du pourcentage d'induction et de la croissance des cals.

Par contre, on a pu montrer que la croissance des cals *in vitro* était significativement plus rapide sur un milieu ne comportant qu'une dose faible de (2,4 D) ; des doses plus fortes de ce régulateur ont même induit un ralentissement de la croissance. Ce résultat est cohérent avec ce que l'on connaît sur les propriétés physiologiques du 2,4 D qui se comporte comme un désherbant toxique à des doses élevées. Cependant, la composition du milieu de culture exercerait une influence sur le comportement des cals vis-à-vis de la dose de régulateur ; une dose de 3 mg/l de 2,4 D, dose plus élevée que celles que nous avons utilisée, n'a pas provoqué un ralentissement de la croissance des cals en présence de kinétine et de saccharose à 2% (Mihaljevic *et al*, 2002). Des interactions synergiques doivent donc exister entre composés, interactions dont il faudra tenir compte dans les essais ultérieurs. Il serait, en outre, intéressant de poursuivre le travail afin de trouver les concentrations idéales de régulateurs de croissance pour une bonne callogénèse.

### Summary

Leaves of the european yew (*Taxus baccata*) produce baccatin, a natural compound employed in the synthesis of taxol, an antitumoral drug used for the treatment of certain cancers. However, to produce some grams of taxol, collection of several trees is necessary, so such a way of

production is to rapidly endanger the natural genetic resources of the species.

*In vitro* production of compound via callus culture is likely to be a valuable alternative for producing taxol. In this perspective, we initiated *in-vitro* callus induction and growth of tissues from leaves and buds of the European yew. Results show that callus induction and growth from leaves and buds are not significantly different. On the other hand, the composition of the culture medium played a significant role in callus growth *in vitro*; growth of callus was, indeed, fastest in medium with low concentration of growth regulator (2,4 D).

**Key words:** *Taxus*, callogenesis, *in vitro* culture, taxol.

### BIBLIOGRAPHIE

AUGE R., BEAUCHESNE G., BOCCON-GIBOD J., DECOURTYE L., DIGAT B., JALOUZOT R., MINIER R., MORAND J. CL., REYNOIRD J. P., STRULLU D. G. & VIDALIE H., 1984 ou 1989. La culture *in vitro* et ses applications horticoles. Ed. J. B. Baillièrre, Paris, 225 p.

CRAGG G. M., SCHEPARTZ S. A., SUFFNESS M. & GREVER M. R., 1993. The taxol supply crisis. New NCI policies for handling the large-scale production of novel natural product anticancer and anti-HIV agents. *J. Nat. Prod.* **56**: 1657-1668.

MARGARA J., 1982. Bases de la multiplication végétative : les méristèmes et l'organogénèse. Ed. INRA, Paris ; 262 p.

MIHALJEVIC S., BJEDOV I., KOVAC M., LEVANIC D.L. AND LELASKA S.,

2002. Effect of explant source and growth regulators on in vitro callus growth of *Taxus baccata* L. Washingtonii. Food technol. Biotechnol. **40** (4):299-303.

MOREL.G., 1960. Producing virus-free cymbidium. Am. Orchid.Soc.Bull., **29**; PP 495-497.

MURDOCH M. & TAYLOR C., 2003. Taxol: anti-cancer wonder drug. The university of aberdeen, Scotland, UK. Website:

[www.Chemsoc.org/exemplarchem/entries/2003/aberdeen-murdoch/mm/](http://www.Chemsoc.org/exemplarchem/entries/2003/aberdeen-murdoch/mm/)

MURASHIGE, T. & SKOOG, F., 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.* **15**: 473-479.

RANCILLAC.M., 1981. Perspectives d'application des cultures d'organes in vitro à la multiplication végétative du pin maritime, *Pinus pinaster* Sol. *Ann. Sci. Forest.* **38** (1), 55-70

WANI M. C., TAYLOR H. L., WALL M. E., COGGON P. & MC PHAIL A. T., 1971. plant antitumor agents VI. The isolation and structure of taxol, a novel antileukemic and antitumor agent from *Taxus brevifolia*. *J. Am. Chem. Soc.* **93**: 2325-2327.

## ANNEXE

Milieu de MURASHIGE et SKOOG (1962), modifié MS 400.

Macroéléments (MS 400):

KNO <sub>3</sub> .....	1900 mg/l
NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub> .....	400 mg/l
CaCL <sub>2</sub> , H <sub>2</sub> O .....	440 mg/l
MgSO <sub>4</sub> , 7H <sub>2</sub> O .....	370 mg/l
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> .....	170 mg/l

Microéléments (MS 62):

MnSO <sub>4</sub> .....	22,3 mg/l
ZnSO <sub>4</sub> , 7H <sub>2</sub> O.....	8,6 mg/l
H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> .....	6,2 mg/l
KI.....	0,83 mg/l
(NH <sub>4</sub> ) <sub>6</sub> Mo <sub>7</sub> O <sub>24</sub> , 1,5 H <sub>2</sub> O.....	0,2 mg/l
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> , 2H <sub>2</sub> O.....	0,25 mg/l
CuSO <sub>4</sub> , 5H <sub>2</sub> O.....	0,025 mg/l
CoCL <sub>2</sub> , 6H <sub>2</sub> O.....	0,025 mg/l
Na <sub>2</sub> EDTA.....	37,3 mg/l
FeSO <sub>4</sub> , 7H <sub>2</sub> O.....	27,8 mg/l

Vitamines: MOREL (1960):

Biotine.....	0,01 mg/l
Acide nicotinique.....	1 mg/l
Pyridoxine hydrochlorite.....	1 mg/l
Thiamine.....	1 mg/l
Pantothenate de Ca.....	1 mg/l
L cysteine hydrochlorite.....	1 mg/l
Myo Inositol.....	100 mg/l
Saccharose.....	30 000 mg/l
Agar: .....	6000 mg/l
pH.....	5,66