

Mise Au Point D'un Protocole De Stérilisation D'explants Nodaux D'*Alchornea cordifolia* Avec De L'acide Trichlororoisocyanurique

*Aurélien Mokea-Niaty,
Samson Daudet Medza Mve,
Alexis Nicaise Lepengue,
Antoine Mitte Mbeang Beyeme,
Christian Moupela,
Maurice Ognalaga,
Darlène Badjina Eko,*

Université des Sciences et Techniques de Masuku,
B.P 941 Franceville Gabon

Nabil Sabet Mustafa,
Pomology Department, National Research Center, Cairo, Egypt

Bertrand M'batchi,
Université des Sciences et Techniques de Masuku,
B.P 941 Franceville Gabon

doi: 10.19044/esj.2017.v13n15p274 [URL:http://dx.doi.org/10.19044/esj.2017.v13n15p274](http://dx.doi.org/10.19044/esj.2017.v13n15p274)

Abstract

Trichloroisocyanuric acid is a swimming pool disinfectant and is readily accessible. As a result, there is the need to use it as a substitute for conventional disinfectants in *in vitro* culture. Nodal explants of *Alchornea cordifolia*, harvested in a natural environment, have been rinsed abundantly with Dettol under running water. Then it was soaked in Talo Plus (550 g/l carbendazim and 100 g/l Chlorothalonil) at 5 ml/liter, which is a broad spectrum fungicide. After then, it was immersed in 70% alcohol for 10 minutes before being soaked in different solutions of trichloroisocyanuric acid to: 6, 4, 3, 2, 1, 0.3, 0.1, and 0.08%. The explants were disinfected completely of all contaminating bacterial and fungal exogenous. This was after a treatment in solutions of acidic trichloroisocyanurique of 6 to 0.08%. The results showed that the losses of active chlorine remained low during storage at temperatures of 4 to 18 ± 2°C. They reach only 5.29% after 72 hours. At room temperature of 27 ± 2 ° C, these losses are more than 30% after three days. Concentrations of 0.1 to 0.3% are effective for the disinfection of explants. This protocol of explants disinfection *in vitro*

culture could therefore be advantageously substituted using the hypochlorite of calcium or the chloride of mercury.

Keywords: *Alchornea cordifolia*, sterilization, disinfection, trichloroisocyanuric acid, *in vitro* culture, nodal explant.

Résumé

L'acide trichloroisocyanurique est un désinfectant pour piscine et facilement accessible, d'où la nécessité de l'utiliser comme substitut aux désinfectants classiques en culture *in vitro*. Des explants de nœuds d'*Alchornea cordifolia*, prélevés en milieu naturel, ont été rincés avec du Dettol à l'eau courante puis trempés dans du Talo Plus (550 g/l de carbendazime et 100 g/l de chlorothalonil) à 5 ml/litre. Ils ont ensuite été trempés dans de l'alcool à 70 %, pendant respectivement 30 et 10 minutes, et immergés dans différentes solutions d'acide trichloroisocyanurique à : 6, 4, 3, 2, 1, 0,3, 0,1 et 0,08 %. Les explants ont par la suite été désinfectés de tout contaminant bactérien et fongique exogènes, après un traitement dans les solutions d'acide trichloroisocyanurique de 6 à 0,08 %. Les résultats ont révélé que les pertes en chlore actif restent faibles lors du stockage à des températures de 4 à 18±2°C, elles n'atteignent que 5,29 % au bout de 72 heures. Tandis qu'à température ambiante ; 27±2°C, ces pertes sont plus de 30 % après trois jours. Les concentrations de 0,1 à 0,3 % sont efficaces pour la désinfection d'explants. Le débourrement axillaire n'est obtenu que sur les explants désinfectés dans des solutions comprises entre 0,1 et 0,3 % d'acide trichloroisocyanurique, les concentrations au-dessus de cet intervalle entraînant la nécrose et la mort des explants. Ce protocole de désinfection d'explants en culture *in vitro* pourrait donc avantageusement substituer celui utilisant l'hypochlorite de calcium ou le chlorure de mercure.

Mots-clés : *Alchornea cordifolia*, stérilisation, désinfections, acide trichloroisocyanurique, culture *in vitro*, explant de nœud

Introduction

L'utilisation d'*Alchornea cordifolia* (Schumach & Thonn) Müll.Arg. dans la phytoremédiation des sols pollués nécessite la disponibilité du matériel végétale de plantation. Les méthodes classiques de multiplication, appliquées à cette plante, par voie générative et végétative présentent des inconvénients notables. En effet, les boutures prennent racines en neuf semaines, le marcottage donne des résultats mitigés, et les graines, mettent trois à douze semaines pour germer (Latham, 2007). Cependant la culture *in vitro* d'explants, apparaît comme un outil qui permet une production rapide de nombreuses plantes génétiquement identiques, reproductibles à partir des

espaces très restreints avec une quantité minimale de matériel végétale de base sur quelques semaines (Birch, 1997). Cette méthode n'a pas encore été réalisée sur *Alchornea cordifolia* L. dont les explants initiaux sont prélevés dans la nature, avec une forte charge en contaminants bactériens et fongiques. La mise au point d'une bonne technique de désinfection des explants devient indispensable, pour l'établissement de cultures aseptiques.

Plusieurs protocoles utilisés pour la désinfection des explants mis au point par certains auteurs sur d'autres ligneux, notamment sur *Theobroma cacao* L (Hall & Collins, 1975), *Alnus glutinosa* (Bajji & Druart, 2003) et *Jatropha curcas* L (Medza Mve *et al.*, 2011), sont souvent difficilement applicables ou pas toujours efficaces pour assainir le matériel végétal de plantation. Dans cette perspective, nous avons voulu tester un produit financièrement accessible sur les marchés locaux, notamment l'acide trichloroisocyanurique, pouvant donner des résultats similaires, en termes de d'explants stériles disponibles à la culture *in vitro*. C'est un composé solide blanc, peu soluble dans l'eau, titrant à 90% d'équivalent chlore a été testé. Il se présente sous forme de galets, blocs ou pastilles et est utilisé pour un traitement chimique en continu, des piscines, du fait de sa lente dissolution.

La mise au point d'un protocole de stérilisation des explants à base de ce produit à faible coût permettrait de lever une contrainte majeure pour les structures de multiplication *in vitro*, dont l'accès aux désinfectants conventionnelles restent difficiles.

Matériel

Le matériel végétal utilisé est constitué d'explants nodaux d'*Alchornea cordifolia* de la famille des Euphorbiaceae, prélevés dans le campus de l'Université des Sciences et Techniques de Masuku à Franceville (1°37'45.9"S 13°33'04.6"E). Les nœuds sont pris à 5 cm de l'apex avec élimination du bourgeon apical de tige. Les pétioles sont sectionnés à 1 cm de la tige, afin de préserver l'intégrité des bourgeons axillaires dormants à leurs aisselles. Les tablettes de trichloroisocyanurate de sodium (94 % de chlore), conditionnées par la Gabonaise de Chimie, sous le nom commercial de Triplex sont utilisées, pour préparer les solutions désinfectantes.

Méthodes

Neuf solutions désinfectantes sont préparées à partir de galets de triclocarban (l'acide trichloroisocyanurique 90.5 % EINECS 201-782-8 (ATCC), de formule brute $C_3Cl_3N_3O_3$, avec l'eau de distribution de la Société d'Eau d'Electricité du Gabon. Les concentrations des solutions désinfectantes varient de 60, 40, 30, 20, 10, 8, 5, 3 et 1 g/l. Les galets sont pesés puis mis dans l'eau sous agitation magnétique et la solution est filtrée.

Les solutions filtrées sont utilisées pour la désinfection des explants nodaux d'*A. cordifolia*.

Les explants nodaux prélevés sont pré-traités par un rinçage abondant à l'eau courante et lavés avec du Dettol à 5 %. Ils sont ensuite immergés dans une solution fongicide de Talo Plus (550 g/l de carbendazime et 100 g/l de chlorotalonil) à 5 ml /litre d'eau distillée stérile ou de Préfongil (chlorothalonil) à 4.60 ml/l avant d'être trempés dans l'alcool à 70 %, pendant 30 secondes. Ces explants pré-traités sont trempés dans différentes solutions de trichloroisocyanurate de sodium additionnées à 3 gouttes de Tween 20, pendant 10 minutes, sous hotte à flux laminaire stérile. On effectue ensuite trois rinçages successifs, avec de l'eau distillée stérile, dont un rinçage en agitation pendant une minute, pour éliminer toutes traces de substances désinfectantes.

Stabilité de la Solution de L'acide Trichloroisocyanurique

La stabilité du chlore actif contenu dans la solution de triclocarban (trichloroisocyanurate sodium : $C_3Cl_3N_3O_3$) est déterminée par titrage au thiosulfate de sodium pentahydraté ($Na_2S_2O_3 \times 5H_2O$), à des températures de stockage à 4, 18 et 28 °C après 6, 24 et 48 heures de stockage. On dispose à cet effet de 3 solutions A, B et C. La solution A de thiosulfate de sodium pentahydraté à 0.01 mol/l, de coloration vert brun : 6,20 g de thiosulfate de sodium pentahydraté à 99 %, sont dilués sous agitation magnétique dans 250 ml d'eau distillée. La solution B d'amidon pur à 10 g/l de coloration transparente : 0.5 g d'amidon sont introduits dans 50 ml d'eau distillée, sous agitation magnétique à 400 tours/minute, et le mélange de la solution portée à ébullition (100 °C). La solution est prête à l'emploi après un refroidissement, d'une heure, à température ambiante. La solution C qui correspond à l'indicateur est obtenue en introduisant dans un flacon à bouchon de 250 ml, 200 ml d'eau distillée, 10 ml d'acide acétique glacial à 98,5 %, 10 ml de la solution B (amidon à 10 g/l) et 0,8 g d'iodure de potassium à 99,9 %.

Pour la titration, on remplit avec 15 ml de solution A une burette jusqu'au trait de jauge. On prélève 5 ml de la solution d'acide trichloroisocyanurique à titrer, à l'aide d'une pipette jaugée que l'on introduit dans un Erlenmeyer de 100 ml. On y ajoute 20 ml de solution C à l'aide d'un cylindre gradué, sous agitation magnétique pour obtenir un virage bleu-noir. Si la solution ne se colore pas, on ajoute goutte à goutte, la solution C, jusqu'au virage total.

Désinfection Des Milieux De Culture et Menu Matériel

La stérilisation des milieux de culture, des pinces, des bistouris et des lames se fait par autoclavage dans une cocotte-minute pendant 20 minutes.

Les paramètres théoriques de l'autoclave pour la stérilisation sont de 121 °C de température, sous une pression de 1,35 bar, pendant 15 minutes. La hotte à flux laminaire est désinfectée avec de l'alcool à 70 %.

Culture *In vitro*

La mise en culture est réalisée sur le milieu de Murashige et Skoog (1962) [MS], contenant 8,87 µm de kinétine, 4,92 µm d'AIB, 30 g/l de saccharose, ajusté à un pH de 5,7 ± 0,1 et solidifié avec 0,7 % d'agar (Select Agar). Les nœuds stérilisés sont déposés sur du papier stérile et mis à dimension, grâce à des instruments stériles. La mise en culture est réalisée, pendant deux semaines, dans des pots, contenant 20 ml de milieu chacun.

Pour l'enracinement, les tiges feuillées issues du milieu de prolifération sont placées sur le milieu MS contenant la moitié des éléments majeurs (MS/2), complété de 5,7 µM d'AIB, 15 g/l de saccharose et solidifié avec 0,7 % d'agar. Les plantules sont d'abord placées pendant quatre jours à l'obscurité totale, puis soumises à une photopériode de 16 h durant 4 semaines. Les tiges enracinées sont lavées à l'eau distillée, pour éliminer les résidus de milieu. Elles sont repiquées dans des pots contenant du terreau commercial et placées sous serre. Les pots sont recouverts d'un film plastique transparent pendant deux semaines. Les plantules sont ensuite laissées à l'air libre dans les cellules durant deux semaines supplémentaires avant d'être transférées en serre.

Les cultures *in vitro* sont réalisées sous hottes avec 60 à 70 % d'humidité relative, 16 heures de photopériode, sous une intensité lumineuse de 80 µmol⁻²s⁻¹ à 20 ± 2 °C de température.

Conditions Expérimentales: Les essais sont menés en blocs aléatoires complets. Chaque traitement est répété trois fois, avec 14 explants par répétition. Les données observées sont relatives à l'apparition des colonies bactériennes ou fongiques, le débourrement axillaire, le développement et l'enracinement des tiges ainsi que le pourcentage de survie de ces dernières en acclimatation.

L'ensemble des résultats a été soumis à une analyse de variance (ANOVA), à un facteur ou deux facteurs, à partir du logiciel Minitab 17.3.1, la discrimination des moyennes a été réalisée à l'aide du test de comparaisons multiples de Test de Games-Howell, au seuil 5%.

Résultats

1.1 Stabilité de la Solution de L'acide Trichloroisocyanurique

Le tableau 1 présente l'évolution de la concentration du chlore actif présent dans les différentes solutions d'acide trichloroisocyanurique, en fonction de la température et du temps de stockage.

Tableau 1. Niveau de chlore actif (ppm) disponible dans la solution en fonction de la température de stockage

Températures (°C)	Teneur en chlore (ppm)			
	Temps (jours)			
	J0	J3	J6	J9
4±2	100000±0	100000±0	97399,14±146,10	94991,40±142,48
18±2	100000±0	99811,47±149,72	97170,97±145,76	94709,71±142,06
28±2	100000±0	99829±149,74	69546,88±104,32	68885±103,32
4±2	80000±0	80000±0	77919,31±116,88	75993,11±113,99
18±2	80000±0	79849±119,77	77736,77±116,61	75767,77±113,65
28±2	80000±0	79863±119,79	55637,51±83,46	55108±82,66
4±2	60000±0	60000±0	58439,48±87,66	56994,83±85,49
18±2	60000±0	59886,80±89,83	58302,58±87,45	56825,83±85,24
28±2	60000±0	59897±89,85	41728,13±62,59	41331±62
4±2	40000±0	40000±0	38959,65±58,44	37996,55±56,99
18±2	40000±0	39924±59,89	38868,38±58,30	37883,88±56,83
28±2	40000±0	39931,60±59,90	27818,75±41,73	27554±41,33
4±2	30000±0	30000±0	29219,74±43,83	28497,4±42,75
18±2	30000±0	29943,44±44,92	29151,29±43,73	28412,91±42,62
28±2	30000±0	29948,7±44,92	20864,06±31,30	20665,50±31,00
4±2	20000±0	20000±0	19479,82±29,22	18998,27±28,50
18±2	20000±0	19962±29,94	19434,19±29,15	18941,94±28,41
28±2	20000±0	19965,8±29,95	13909,37±20,86	13777±20,67
4±2	8000±0	8000±0	7791,93±11,69	7599,31±11,40
18±2	8000±0	7984,91±11,98	7773,67±11,66	7576,77±11,37
28±2	8000±0	7986,32±11,98	5563,75±8,35	5510,80±8,27
4±2	6000±0	6000±0	5843,94±8,77	5699,48±8,55
18±2	6000±0	5988,68±8,98	5830,25±8,75	5682,58±8,52
28±2	6000±0	5989,74±8,98	4172,81±6,26	4133,10±6,20

Les concentrations d'acide trichloroisocyanurique ne varient presque pas dans les solutions au bout de trois jours à des températures de stockage de 4 à 18±2°C, elles ne baissent que de 5 % après neuf jours. Stockées à 28±2° C, ces concentrations peuvent varier à plus de 30 % après six jours de stockage.

Le tableau 2 présente l'analyse statistique de la variation moyenne de la teneur en chlore actif, à différentes températures de stockage au bout de neuf jours.

Tableau 2. Analyse statistique (Test de Games-Howell) de la variation moyenne du chlore en fonction de la température de pendant neuf jours

Température (°C)	Moyenne de la variation (ppm)	Ecart-type	IC à 95%
4±2	2154 ^a	± 1640	[1461 ; 2846]
18±2	2275 ^a	± 1732	[1543 ; 3006]
28±2	13379 ^b	± 10181	[9080 ; 1769]

Les moyennes ne partageant aucune lettre sont significativement différentes au seuil $\alpha = 0,05$

L'analyse de la variance montre qu'il n'y a pas de différence significative sur la perte en chlore actif entre des solutions stockées à des températures de 4 et 18±2°C quel que soit la concentration initiale (P-valeur = 0,000). Par contre les pertes de chlore actif dans la solution d'acide trichloroisocyanurique stockée à une température de 28±2°C sont très élevées au bout de neuf jours; on enregistre un intervalle de confiance de 9080 à 17679, ces pertes sont significativement différentes de celles obtenues aux températures de 4 et 18±2°C.

1.2 Désinfection Des Explants

Le tableau 3 présente l'efficacité de la désinfection obtenue après le pré-traitement au Talo Plus (550 g/l de carbendazime et 100 g/l de chlorothalonil) et l'immersion des explants pendant 10 minutes, dans les solutions à différentes concentrations d'acide trichloroisocyanurique.

Les solutions concentrées de 6 et 0,1 %, ont éliminé tous contaminants bactériens et fongiques exogènes présents sur les explants. On n'a observé pas d'apparition de colonies bactériennes sur le milieu de culture synthétique, deux semaines après la mise en culture des explants stérilisés. Les concentrations de 6 à 0,3 % d'acide trichloroisocyanurique, ont entraîné la mort des explants. On a observé une sécrétion abondante de polyphénols dans le milieu pendant trois jours, suivie de la mort des explants de nœuds. Les solutions dont la concentration était comprise entre 0,3 et 0,10 % assuraient une stérilisation complète tout en permettant le débourement axillaire des explants et la morphogenèse *in vitro*. A partir de 0,08 %, on a enregistré 6, 19 et 22 % de contaminations respectivement 4, 7 et 14 jours après la mise en culture des explants dans le milieu MS.

Tableau 3. Taux de contaminations bactériennes en fonction de la concentration d'acide trichloroisocyanurique

Temps (jour)	Taux de contamination (%)								
	Concentration d'acide trichloroisocyanurique (%)								
	6	4	3	2	1	0,5	0,3	0,1	0,08
4	0	0	0	0	0	0	0	0	6
7	0	0	0	0	0	0	0	0	19
14	0	0	0	0	0	0	0	0	22

L'utilisation du Préfongil (Chlorothalonil) en pré-traitement entraîne l'apparition de mycélium sur 40 % des explants dès le quatrième jour, avec les concentrations inférieures à 1 % d'acide trichloroisocyanurique. Au bout d'une semaine, l'ensemble des milieux de culture a été contaminé par des champignons.

Les bourgeons débourrés se développent et deviennent des tiges feuillées, six semaines après la mise en culture sur un milieu MS additionné à 8,87 μm de kinétine, 4,92 μm d'AIB, 30 g/l de saccharose (Figure 1). Ces tiges feuillées sont isolées de l'explant initial après six semaines (Figure 2) et transférées sur le milieu d'élongation pendant 4 semaines. Les tiges feuillées issues du milieu d'élongation ont pu être enracinés sur MS/2 complétement de 5,7 μM d'AIB, 15 g/l de saccharose et solidifié avec 0,7% d'agar. Des nombreuses racines se développent à la base de la tige sans formation d'un cal (Figure 3). Les vitroplants obtenus au terme de l'enracinement ont été acclimatés avec un taux de survie de 85 % (Figure 4).

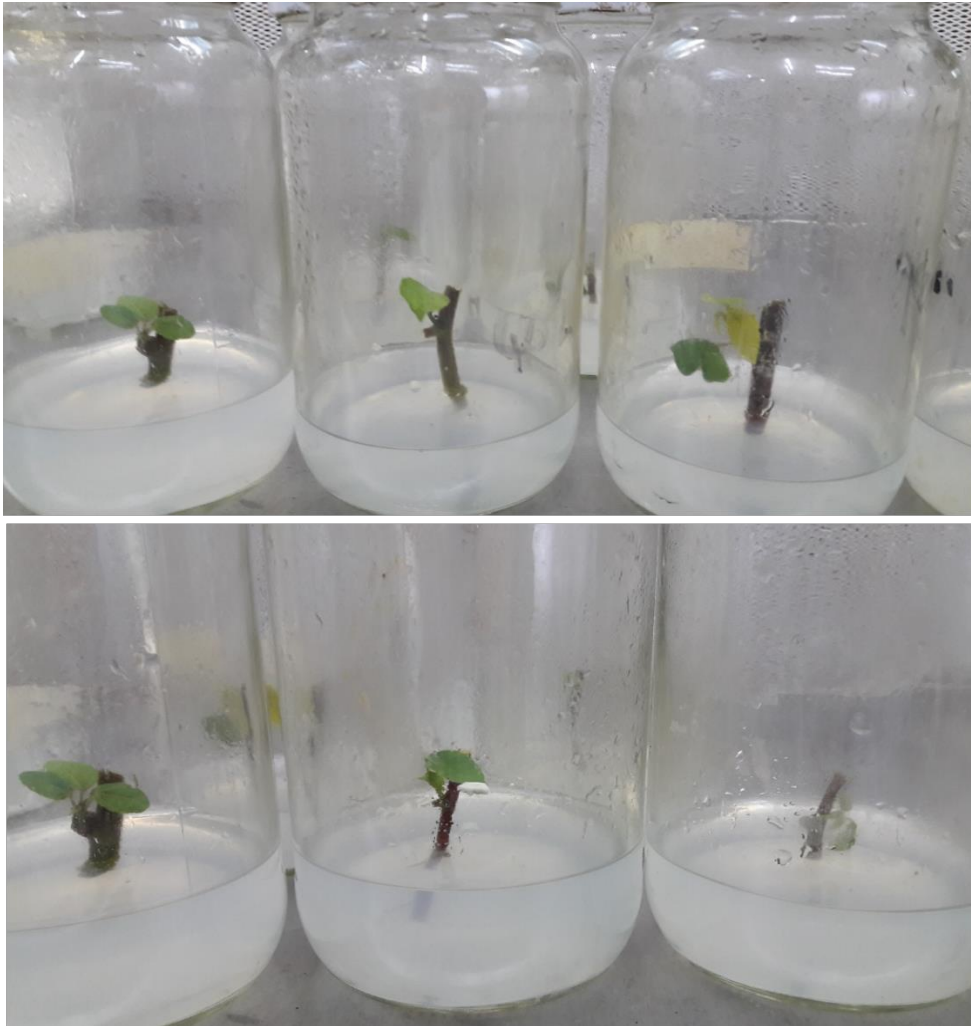


Figure 1. Développement *in vitro* des tiges feuillées d'*Alchornea cordifolia*, 6 semaines après la mise en culture sur un milieu MS contenant 8,87 μm de kinétine, 4,92 μm d'AIB, 30 g/l de saccharose



Figure 2. Tiges feuillées d'*Alchornea cordifolia*, développés *in vitro* et séparée de l'explant initial après 6 semaines sur MS contenant 8,87 μm de kinétine, 4,92 μm d'AIB, 30 g/l de saccharose



Figure 3. Tiges feuillées d'*Alchornea cordifolia*, enracinées sur MS contenant 8,87 μm de kinétine, 4,92 μm d'AIB, 30 g/l de saccharose



Figure 4. Vitroplant d'*Alchornea cordifolia*, acclimatés en serre, âgées de 2 mois

Discussion

Pour un effet fongicide complet de l'acide trichloroisocyanurique aux temps d'action requis, soit 10 minutes, pour la désinfection d'explants nodaux, de fortes concentrations sont indispensables. Mais ces concentrations élevées deviennent toxiques et corrosives pour le matériel végétal. L'acide trichloroisocyanurique est un composé organochloré qui s'hydrolyse en acide hypochloreux et en acide cyanhydrique dans l'eau. Il contient du chlore stable, rapidement soluble dans l'eau et conserve une activité biocide dans une large gamme de pH, qui peut varier de 6 à 10 (Boutaleb, 2007).

Selon le modèle prédictif d'O'Brien (1972), l'hydrolyse et la dissociation de l'ATCC à $\text{pH} > 3,5$ donne de l'acide hypochloreux et sa forme hypochlorite. La première étape est l'hydrolyse du chloroisocyanurique en acide hypochloreux. La seconde étape est la réaction entre l'acide hypochloreux et les ions ammonium avec formation de chloramines dont le trichlorure d'azote est le composant ultime. L'intérêt premier de l'utilisation de l'acide trichloroisocyanurique réside dans la libération de formes beaucoup moins sensibles aux ultraviolets que ne l'est HOCl.

Les solutions sont plus stables à basse température et se conservent plus longtemps par rapport aux solutions d'hypochlorite de sodium; ce qui compense dans une certaine mesure la lenteur de la réaction. Cette stabilité est liée à présence de l'acide cyanurique sous forme de sel ou d'acide libre, qui stabilise le chlore dans la solution désinfectante. Selon Golaszewski (1991), les réactions observées avec les chloroisocyanuriques sont analogues

à celles obtenues avec l'acide hypochloreux (HOCl). Les produits formés sont identiques, mais la présence du motif isocyanurique favorise les étapes réactionnelles intermédiaires et limite ou ralentit la dégradation en trichloramine qui est le produit final de la dégradation des organochlorés. L'isocyanure a également pour autre avantage de neutraliser l'effet du pH de la solution, sur le chlore actif (Canelli, 1974). L'acide cyanhydrique réduit la perte de chlore en raison des réactions photochimiques, avec les rayons UV, et accroît la disponibilité de l'acide hypochloreux utile à l'action biocide. La stabilité contraste avec l'instabilité qui caractérise les autres produits utilisés pour la stérilisation des explants en culture *in vitro* telle que les solutions d'hypochlorite de sodium. La bonne stabilité du chlore actif dans la solution désinfectante reste un avantage considérable car, il favorise l'efficacité de la désinfection du matériel végétal et surtout, maintient la quantité de chlore actif, à un niveau d'efficacité acceptable.

Les propriétés bactéricides et virucides des molécules des chloroisocyanures ont été révélées sur trois souches bactériennes (*Pseudomonas aeruginosa*, *Streptococcus faecalis*, *Staphylococcus aureus*) et sur une souche virale Poliovirus. L'utilisation de l'acide trichloroisocyanurique s'avère efficace pour la désinfection. Bien que les cinétiques de désinfection soient plus lentes que celles obtenues avec du chlore libre, les résultats sont satisfaisants avec une élimination de plus de 99,99% de contaminant (Golaszewski *et al.*, 1988). L'efficacité d'un désinfectant ne se limite pas uniquement à l'asepsie des explants, parce que ces derniers doivent pouvoir conserver leur potentiel de régénération au terme du processus de stérilisation afin de pouvoir initier de nouvelles plantes, au cours de la première phase de mise en culture *in vitro*. Les solutions de trichloroisocyanurique supérieures à 0,30 % sont létales pour les tissus et cellules des explants. Seules les solutions contenant entre 0,10 et 0,30 % d'ATCC peuvent être suggérées pour la désinfection des explants nodaux. En effet, ces solutions ont permis la conservation des cellules en vie au terme du processus de désinfection. Cet intervalle de concentrations permet d'assurer l'asepsie du matériel végétal et garantit l'obtention d'un pourcentage de débourement axillaire élevé. L'acide hypochloreux, un des produits de la dégradation de l'ATCC, attaque la paroi cellulaire et pénètre dans les cellules où il agit par oxydation irréversible du matériel cellulaire et notamment des groupements thiols libres des enzymes. Cela entraîne le blocage des réactions métaboliques tout en perturbant la production de l'adénosine triphosphate. Son action affecte la membrane cytoplasmique dont l'altération provoque la perturbation des échanges membranaires spécifiques et la désorganisation du métabolisme. De même, les constituants cytoplasmiques, tels que les acides nucléiques, les ribosomes, les protéines structurales, mais surtout les protéines enzymatiques sont affectées ; leur

oxydation et/ou dénaturation perturbe gravement le métabolisme cellulaire des microorganismes (Bourion, 1995).

L'ATCC à concentration non-létale pour les explants semble inefficace pour éliminer les contaminants fongiques. Les champignons sont moins sensibles à un traitement à l'acide trichloroisocyanurique seul ou en combinaison avec un fongicide à spectre d'action étroit. L'isocyanure, l'autre composé présent dans la solution d'acide trichloroisocyanurique bien que présentant une activité biocide ne modifie que très peu l'activité antifongique du chlore actif (Canelli, 1974). La présence ou non du prétraitement fongicide, détermine donc le niveau d'asepsie et l'efficacité de l'ensemble du protocole de stérilisation conduisant à l'élimination de tous les contaminants exogènes, aussi bien bactériens que fongiques présents sur les explants de nœuds.

Toutefois, Stuart et Ortenzio (1964) ont observé que sa présence optimise l'effet du chlore actif, et qu'il existe une interaction entre l'hypochlorite, la forme de chlore actif présent dans la solution désinfectante, et le cyanure. Ces auteurs ont par ailleurs montré que la présence de 100 mg/l d'acide cyanurique dans une solution de 0,5 mg/l d'hypochlorite réduisait considérablement le temps d'inactivation des certains contaminants comme *Staphilococcus feacalis*. L'acide cyanurique a aussi pour avantage de neutraliser l'effet du pH de la solution sur le chlore actif. En effet, (Seux *et al.*, 1984) a montré que, pour une concentration en chlore total donnée, les formes chloroisocyanuriques sont un peu moins oxydantes que la solution d'acide hypochloreux de même titre en chlore, mais que la différence observée n'est pas très importante.

La désinfection des explants dans des solutions de 6 à 0,3 % ne permet pas le débourrement axillaire des bourgeons dormants à l'aisselle des feuilles. Cela s'explique par la réactivité du chlore présent dans la solution. Cet élément, à forte concentration est très corrosif pour les tissus végétaux. La solution désinfectante qui pénètre dans les tissus à travers les zones de coupe, diffuse dans les tissus en occasionnant des brûlures qui atteignent les cellules méristématiques spécialisées pour le développement des bourgeons dormants. La présence de l'isocyanure, l'autre composé du trichloroisocyanurique, confère aussi un effet toxique à la solution pour les cellules végétales. La phytotoxicité des solutions d'ATCC à forte concentration paraît donc liée à une libération importante de chlore actif et de composés cyanurés dans la solution. La corrosivité est due au chlore qui entraîne la nécrose voire la mort des tissus. L'isocyanure pourrait également être à l'origine de l'intoxication des cellules. Cette phytotoxicité des produits chloroisocyanurés a déjà été observée par Parkinson *et al.* (1996) sur *Quercus robur* L. Les protocoles de désinfection à base des deux derniers produits cités ont été optimisés depuis longtemps (Yanagawa *et al.*, 2007;

Pereira *et al.*, 2011), afin de maximiser la stérilisation et de minimiser la mort des explants par la phytotoxicité après désinfection. La détermination de l'intervalle de concentration d'ATCC, non létale, assurant la désinfection totale des explants, permet donc d'utiliser ce produit comme substitut pour assurer l'asepsie du matériel végétal de plantation en culture *in vitro*.

La sécrétion des phénols par les explants stérilisés mis en culture, à travers les zones de coupes, est une réaction due au traumatisme induit par la mise à dimension de l'explant et la diffusion de la solution désinfectante dans les tissus. Il ne semble pas exister une relation entre la concentration d'ATCC et le pourcentage de sécrétion de phénols. L'intensité des nécroses observées quant à elle, semble être liée aux concentrations de la solution désinfectante. Del-Toro-Sánchez *et al.* (2013) ont rapporté que l'exsudation des produits phénoliques serait liée au milieu de culture, au génotype, à l'explant et à la saison du prélèvement des explants. La neutralisation de leurs effets toxiques pourrait être faite par adjonction du charbon actif, dans le milieu d'initiation.

Le débourrement axillaire obtenu par les explants stérilisés dans l'intervalle de concentration d'ATCC de 0,30 à 0,10 % se justifie par le fait que les solutions désinfectantes sont moins agressives pour les tissus. La réactivité du chlore qui entraîne la nécrose et la mort des tissus hypothèque souvent la régénération axillaire des explants de nœuds, par la destruction du méristème apical. Cependant, certains auteurs comme Hmouni (2000) imputent l'absence de régénération des explants à l'âge des tissus et à leur degré de lignification. Le matériel végétal souvent peu lignifié est plus sensible au chlore. Prélevé dans la nature, ce matériel nécessite l'utilisation de doses élevées de désinfectant, ce qui a pour conséquence, une augmentation des pertes, suite à la dégradation des tissus. Par ailleurs, les nécroses pourraient également être liées aux produits d'oxydation des phénols qui diffusent dans le milieu de culture et ré-intoxiquent l'explant. Selon Preece et Compton (1991), ces composés toxiques envahissent rapidement l'explant qui s'asphyxie et meurt. Les taux de débourrement axillaire qui restent faibles pourraient aussi s'expliquer par la présence de ces phénols qui sont antagonistes des phytohormones de croissance et par conséquent inhibiteurs du débourrement axillaire (Aasim *et al.*, 2013).

Conclusion

Les résultats de cette étude montrent qu'il est possible d'établir un protocole de désinfection d'explants nodaux d'*Alchornea cordifolia* à base d'ATCC en vue de la micropropagation *in vitro* de cette plante. Les solutions pourraient donc être conservées trois jours, à de faibles températures, entre 4 et 18 ± 2 °C, après préparation, si leur utilisation n'est pas immédiate. L'efficacité de la désinfection des explants nodaux varient en fonction de sa

concentration. Le protocole global consisterait à un lavage abondant à l'eau et au savon suivi d'un rinçage. L'efficacité de la désinfection des explants nodaux d'*A cordifolia* avec l'ATCC varient donc en fonction sa concentration. L'ATCC étant facilement accessible dans les surfaces de commerce général, son utilisation pour la désinfection des explants est une alternative qui lève l'une des contraintes majeures des laboratoires de culture *in vitro*, notamment l'accès aux produits désinfectants classiques, que sont l'hypochlorite de sodium et l'hypochlorite de mercure.

References:

1. Aasim, M., Karatas, M., Khawar, K.M., & Dogan, M. (2013). Optimization of sterilization and micropropagation of water lettuce (*Pistia stratiotes* L.). *Journal of Applied Biological Sciences*, 7(3), pp.71–74.
2. Birch, R.G. (1997). Plant transformation: problems and strategies for practical application. *Annual review of plant biology*, 48(1), pp.297–326.
3. Bourion, F. (1995). Etude de la formation et de la désinfection de biofilms mono- et bi-microbiens de *Pseudomonas aeruginosa* et de *Listeria innocua*.
4. Boutaleb, N. (2007). Etude de la formation de biofilms sur les surfaces de matériaux couramment utilisés dans les canalisations d'eau potable.
5. Canelli, E. (1974). Chemical, bacteriological, and toxicological properties of cyanuric acid and chlorinated isocyanurates as applied to swimming pool disinfection: a review. *American journal of public health*, 64(2), pp.155–162.
6. Golaszewski, G. (1991). Activité microbiologique et réactivité chimique des chloroisocyanuriques vis-à-vis de quelques molécules organo-azotées.
7. Del-Toro-Sánchez, C.L., Zurita F., Gutiérrez-Lomelí, M., Solis-Sánchez, B., Wence-Chávez, L., Rodríguez-Sahagún, A., & Castellanos-Hernández, O. A. (2013). Modulation of antioxidant defense system after long term arsenic exposure in *Zantedeschia aethiopica* and *Anemopsis californica*. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 94, pp.67–72. Available at: <http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-84879007040&partnerID=40&md5=9d840e64524fa68b25658658edc1f972>.
8. Golaszewski, G., Clement, M. & Seux, R. (1988). Incidence de l'acide isocyanurique sur la réactivité du chlore avec la créatinine

- dans les eaux de piscine. *Journal français d'hydrologie*, 19(2), pp.179–190.
9. Hmouni, A. (2000). Recherches sur *Botrytis cinerea*, Agent causal de la pourriture grise de la tomate: Résistance aux fongicides et alternatives de lutte biologique.
 10. Latham, P. (2007). *Plantes utiles du Bas-Congo, République Democratique du Congo*, Mystole Publications. Available at: <https://books.google.be/books?id=mmgoAQAAIAAJ>.
 11. Medza Mvé S.D., Mergeai G., Baudoin J-P., & Toussaint A. (2011). Culture in vitro de *Jatropha curcas* L., 15(4), pp.567–574.
 12. Murashige, T. & Skoog, F. (1962). A Revised Medium for Rapid Growth and Bioassays with Tobacco Tissue Cultures. *Physiologia Plantamm*, 15, 473-497.
 13. O'Brien, J. (1972). Hydrolytic and Ionization Equilibria of Chlorinated Isocyanurate in Water.
 14. Parkinson, M., Prendergast, M. & Sayegh, A.J. (1996). Sterilisation of explants and cultures with sodium dichloroisocyanurate. *Plant Growth Regulation*, 20(1), pp.61–66.
 15. Pereira, G.A., Correa, L.S. & Boliani, A.C. (2011). Disinfestation and establishment of in vitro explants of banana “Grande Naine” in different concentrations of sodium hypochlorite. *Desinfestação E Estabelecimento In Vitro De Explantes De Bananeira “Grande Naine” Em Diferentes Concentrações De Hipoclorito De Sódio*, 33(SPEC. ISSUE 1), pp.222–226. Available at: <http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-83255193377&partnerID=40&md5=fccfef57acf217d8b29c47075f45c848>.
 16. Preece, J.E. & Compton, M.E. (1991). Problems with explant exudation in micropropagation. In *High-Tech and Micropropagation I*. Springer, pp. 168–189.
 17. Seux, R., Batto, M., Clement, M., Branducel, B. (1984). Evolution des chloroisocyanurates en solution aqueuse et comportement des formes chlorées vis-à-vis de la diéthylparaphénylènediamine. *Techniques et sciences municipales (1971)*, (12), pp.617–625.
 18. Stuart, L.S. & Ortenzio, L.F. (1964). Swimming pool chlorine stabilizers. *Soap Chem. Specialties*, 40(8), pp.79–82.
 19. Yanagawa, T., Tanaka, R. & Funai, R. (2007). Simple micropropagation of ornamentals by direct application of chlorine disinfectants without equipment. , 764, pp.289–298. Available at: <http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-42149179997&partnerID=40&md5=21b7f6fb3ff9b7f2522115f529b7925f>.