



Etude de la germination de *Lawsonia inermis* L. sous différentes contraintes abiotiques

Benziwa Nathalie JOHNSON*, Marie Luce Akossiwoa QUASHIE, Raoufou RADJI, Kossi Novinyo SEGLA, Kossi ADJONOU, Adzo Dzifa KOKUTSE et Kouami KOKOU

Université de Lomé, Faculté des Sciences (FDS), Laboratoire de Recherches Forestières (LRF), 01BP 1515, Lomé (Togo).

* Auteur correspondant ; E-mail: benziwa.johnson@gmail.com, Tél: +228 90866958

RESUME

Lawsonia inermis L. ou henné, est extrêmement réputé pour ses vertus cosmétiques, tinctoriales mais aussi médicinales. Cultivé dans les régions tropicales et subtropicales, le mode préférentiel dans les plantations industrielles des principales régions exportatrices du Moyen Orient, d'Asie et d'Afrique, est le semis. Cependant plusieurs contraintes limitant sa germination et sa multiplication à grande échelle au Togo ont été rapportées. Les graines entourées d'une coque dure et résistante germent difficilement au-delà de 20% et ne sont conservables qu'au plus trois mois. Cette étude vise la vulgarisation de la culture de cette espèce à valeur ajoutée au Togo. L'évaluation des effets de facteurs externes et endogènes sur la germination montre que la lumière est indispensable pour la germination. Les graines réagissent positivement à l'allongement de la photopériode de 0% à obscurité continue à 94% pour 16 h de lumière. L'enfouissement dans le substrat réduit drastiquement ce taux dès 5 mm de profondeur. Conservées à 25±2 °C sur huit mois en boîtes plastiques à l'obscurité, les graines révèlent une excellente capacité germinative dépassant les 93%. *In vitro*, elles germent à plus de 90% et les jeunes plants présentent une croissance régulière. Les conditions optimales de germination ainsi établies permettront donc la vulgarisation de la culture du henné.

© 2019 International Formulae Group. All rights reserved

Mots clés: *Lawsonia inermis* L., graines, germination, lumière, conservation, établissement *in vitro*.

Germination of *Lawsonia inermis* L. under different abiotic constraints

ABSTRACT

Lawsonia inermis L. or henna is one of the best-known plants for its cosmetic, dyeing and medicinal properties. Grown in the tropics and subtropics regions of the world, the preferred method used for industrial plantations in the main exporting regions of the Middle East, Asia and Africa is seed sowing. However, several constraints have been reported as impediment to henna germination, thus limiting a large-scale multiplication of the species in Togo. Those include the presence of a hard and resistant shell-seeds, low germination rates that hardly reaching 20% and limited shelf life (<<90 days). This study aims at popularizing the culture of this value-added species in Togo. Evaluation of the effects of external and endogenous factors on germination shows that light is necessary for seed germination. Seeds react positively to an elongation of the photoperiod from 0% in continuous darkness to 94% for 16 h of light. Burial in the substrate causes a drastic drop in

germination rate. Preserved at 25 ± 2 °C for eight months in simple plastic boxes in darkness conditions, the seeds used retain an excellent germination capacity exceeding 93%. *In vitro*, they germinate more than 90% and show a regular growth of the seedlings obtained. The optimal germination conditions thus established will therefore allow a better cultivation of henna.

© 2019 International Formulae Group. All rights reserved

Keywords: *Lawsonia inermis* L., seeds, germination, light, conservation, *in vitro* establishment.

INTRODUCTION

L'utilisation de plantes médicinales en phytothérapie suscite un grand intérêt dans la recherche médicale et devient aussi importante que la chimiothérapie (Quainoo et al., 2017). Ce regain d'intérêt vient d'une part, du fait que les plantes médicinales présentent une source de substances et composés naturels bioactifs et d'autre part, des besoins d'une meilleure médication accessible à tous, pour une thérapie plus douce sans effets secondaires. Au sein de cette multitude de plantes figure le henné, espèce répertoriée sous le nom latin de *Lawsonia inermis* L., présentant un pouvoir antioxydant intéressant dû à la présence de composés phénoliques (coumarines, flavonoïdes, naphthalène et dérivés d'acide gallique) dans ses feuilles (Hsouana et al., 2011).

C'est un arbuste de la famille des *Lythraceae* principalement exploité pour ses feuilles dont est extrait un pigment, la lawsone ou naphthaquinone, couramment utilisé dans les domaines cosmétique, esthétique et tinctorial (Kallo et al., 2018; Prosen et al., 2005). Le henné produit la plus grande teneur en colorant à une température variant entre 35-45 °C (Makhija et al., 2011), correspondant aux températures des régions tropicales et subtropicales. Il est utilisé pour embellir les femmes lors des mariages, fêtes religieuses et traditionnelles dans tout l'Orient et le monde musulman (Aweke and Tapapul, 2005; Kluger, 2009).

Sur le marché international, les produits couramment commercialisés sont les feuilles sèches entières ou réduites en poudre. Figurant parmi les plus grands producteurs, l'Inde a exporté entre 2002-2003, 2383 tonnes de poudre de henné vers la Turquie, les Emirats Arabes Unis, les Etats-Unis et

plusieurs autres pays et 150 tonnes de feuilles, principalement vers les pays du Moyen-Orient (Narain et al., 2005). La demande en henné des marchés intérieurs de nombreux pays islamiques du Moyen-Orient et de l'Afrique du Nord est si importante que le seul recours est l'importation, fait remarqué également chez d'autres pays non producteurs (Narain et al., 2005). Une quantité considérable et beaucoup plus importante de henné est exportée aussi sous forme de colorant au henné, de soins capillaires à base de henné et de produits cosmétiques (PraJapati, 2004). En outre, par distillation à la vapeur, les fleurs donnent 0,01–0,02% d'huile essentielle (l'huile de henné), qui contient essentiellement des α - et β -ionones, pouvant servir de base en parfumerie (Aweke et Tapapul, 2005).

En Afrique, sa culture est une source de revenus dans la plupart des zones sahéliennes et plus rarement en zone soudanienne (Gregoire, 2002). Au Mali, la vente de ses feuilles contribue à la sécurité alimentaire de certaines communautés du fait que les ressources économiques générées permettent de payer en partie la quantité de céréales nécessaire à la satisfaction de leurs besoins (Mallé, 2011). L'adaptation du henné à des sols variés (pauvres, fertiles, pierreux, sableux), associé à son rôle dans la protection des cultures (est utilisé comme haie vive et offre une protection durable de trois à cinq ans après son installation) et à ses nombreux autres atouts, dénotent de son importance socioéconomique (Mallé, 2011).

Au Togo, la plante est exploitée essentiellement pour des usages ornementaux (petites superficies en bord de routes), cosmétiques et tinctoriaux (Radji et al., 2010 ; Radji and Kokou, 2014) au sein de la

communauté musulmane estimée à près de 20% de la population totale (Diakadi, 2009). Du peu d'études menées, il ressort une insuffisance de données sur la biologie des graines et la domestication de l'espèce malgré ses nombreux usages. Sa multiplication à grande échelle est entravée par le fait que les graines possédant une coque dure et résistante (Miczak, 2001), présentent un faible taux de germination de l'ordre de 20% (Phirke et Saha, 2014a), problème constituant un obstacle pour les pépiniéristes qui visent à produire des plants massivement via une synchronisation et une homogénéisation de la germination. Par ailleurs, la durée de conservation et la profondeur d'enfouissement des graines constituent des facteurs limitants supplémentaires au développement de la culture du henné (Lal et al., 2007). C'est pour cela que la présente étude sur les graines a été entreprise afin d'approfondir les connaissances sur sa biologie et permettre ainsi l'amélioration et la vulgarisation de sa culture au Togo. L'étude est centrée sur la détermination des conditions optimales de germination des graines de *L. inermis* par l'analyse de l'influence de facteurs contrôlés particulièrement : la lumière, les prétraitements, la profondeur de semis et l'impact de la conservation sur la capacité germinative des graines. La culture *in vitro*, technique intéressante pour la propagation et la conservation des ressources génétiques menacées a aussi été évaluée.

MATERIEL ET METHODES

Matériel végétal

Les graines de henné utilisées pour les essais ont été récoltées pendant le mois de mai de l'année 2016 sur des individus en pleine production (fruits), et choisis aléatoirement au sein d'une formation végétale naturelle localisée à la périphérie de la ville de Lomé. L'étude s'est déroulée pendant les mois de février à octobre 2016 au Laboratoire de Physiologie et Biotechnologies Végétales, ainsi qu'au Jardin Botanique de l'Université de Lomé, sur le Site de Conservation de Plantes Alimentaires Mineures. Après décorticage des fruits mûrs, les graines sont

stockées en boîtes plastiques à l'obscurité durant 12 semaines à la température ambiante du laboratoire de 25 ± 2 °C. Cette espèce a été enregistrée à l'herbier national de l'Université de Lomé sous le numéro Togo04339.

METHODES

Les essais de germination visant à améliorer les capacités germinatives des graines de henné ont été menées en serre, et une introduction *in vitro* a également été effectuée permettant d'évaluer son potentiel pour une production ultérieure de plants.

Germinations en serre

Plusieurs paramètres ont été testés pour améliorer la germination. Il s'agit de 1) l'influence de la lumière, 2) l'effet des prétraitements tels que l'imbibition et la scarification mécanique, 3) l'influence de la profondeur de semis et 4) l'influence des conditions de conservation sur la viabilité des graines. Les germinations sont effectuées en boîtes de Pétri (140X140 mm²). Celles portant sur la profondeur d'enfouissement des graines ont été réalisées en pots plastiques (55 mm de hauteur sur 53 mm de diamètre). Les essais de germination de *L. inermis* ont été effectués par lots de 100 graines avec trois répétitions en serre, à une température de 28 ± 2 °C, une humidité relative de 60% et un régime photopériodique de 12 heures avec une intensité lumineuse de $120 \mu\text{E} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$.

L'influence de la lumière a été étudiée en soumettant les graines mises à germer, à différents régimes photopériodiques (Tableau 1).

Les prétraitements ont consisté en une scarification mécanique des graines de *L. inermis* par des grains de sable pendant 15 min. Le second procédé a été l'imbibition des graines, à l'obscurité dans des pots en verre contenant chacun 50 ml d'eau du robinet, durant des temps variés : 0 h (témoin), 12 h, 24 h, 48 h et 72 h. Après ces prétraitements, les graines ont été mises à germer en boîtes de Pétri dans les conditions décrites initialement. Un lot de graines non scarifiées et un lot de graines non imbibées ont servi de témoin.

L'influence de l'intensité lumineuse et de la profondeur de semis ont été testées en semant les graines à cinq profondeurs différentes : surface 0 mm (P1), 5 mm (P2), 10 mm (P3), 15 mm (P4) et 30 mm (P5). Le substrat d'expérimentation composé de terreau de jardin (composition en annexe) et de terre (terre de jardin de type argilo-siliceuse) dans les proportions 50/50 (v/v), est placé dans des pots en plastique. Après semis, l'apport d'eau est effectué par vaporisation tous les deux jours, afin de garder le substrat humide mais pas détrempé.

Pour l'évaluation de la viabilité des semences, les tests de germination ont porté sur des graines conservées en boîtes plastiques à température de 25±2 °C à l'obscurité, sur une durée variant de trois à huit mois.

Germinations *in vitro*

Deux protocoles de désinfection ont été appliqués aux graines de henné. Premièrement, elles ont subi des trempages successifs durant une minute pour chacun d'eux, dans une solution d'éthanol à 70 °, puis de Bétadine® Dermique 10% (Povidone iodée à 10 g/100 ml) pure et enfin dans une solution de Domestos® (Hypochlorite de sodium à 4,8 g/100 g ; Unilever France) à 10% (v/v). Dans le deuxième protocole, les mêmes solutions désinfectantes sont utilisées dans l'ordre précédent. Seuls ont varié les temps de contact : pour la solution de Bétadine, il est passé à deux minutes et pour la solution de Domestos, à trois minutes.

Entre le passage de la solution de Bétadine au Domestos, un rinçage à l'eau distillée stérile est effectué. Après le bain au Domestos dans les deux cas, les graines sont rincées quatre fois à l'eau distillée stérile. Ainsi désinfectées, elles sont mises à germer individuellement en tubes de culture, sur le milieu Murashige et Skoog (1962) ou milieu MS, additionné de saccharose à 30 g.l⁻¹ (pH=5,7-5,8) et solidifié à l'agar 8 g.l⁻¹. Les tubes sont placés sous un éclairage d'intensité lumineuse de 120 µE.m⁻².s⁻¹, une photopériode

de 16 h et une température de 25±2 °C. Au total, trois répétitions de 48 graines sont mises à germer par condition.

Analyses statistiques

Les paramètres évalués sont :

- Le taux de germination (TCG) correspondant au rapport du nombre de graines germées sur le nombre total de graines semées ;
- Le taux de contamination correspondant au rapport du nombre de graines contaminées sur le nombre total de graines semées *in vitro* ;
- La vitesse de germination exprimée par le nombre de graines germées par unité de temps ;
- Le temps moyen de germination (TMG)

$$TMG = \frac{N1J1 + N2J2 + \dots + NnJn}{N1 + N2 + \dots + Nn}$$

avec N1 représentant le nombre cumulé de germinations durant le premier jour (J1), N2 le nombre cumulé de germinations durant le deuxième jour (J2), ..., Nn le nombre cumulé de germinations durant le dernier jour (Jn) ;

- Et le temps moyen nécessaire pour atteindre 50% des germinations (TMG 50%). Il est calculé en utilisant la formule modifiée de Farooq et al. (2005):

$$TMG\ 50\% = \frac{t_i + (N/2 - N_i)(t_j - t_i)}{N_j - N_i}$$

avec N étant le nombre final de graines germées ; N_i et N_j les effectifs cumulés de graines germées respectivement aux temps t_i et t_j où N_i < N/2 < N_j.

Les données collectées sont traitées avec le logiciel R (version 3.1.1). Les taux et temps moyen de germination ont fait l'objet d'une comparaison et d'un classement des moyennes en groupes homogènes à l'aide du test de Student-Newman et Keuls au seuil de 5%.

Tableau 1: Répartition des lots de graines de *Lawsonia inermis* L. en fonction de la durée d'éclairement.

Lot	Durée d'éclairement
1	0 h de lumière (obscurité continue)
2	12 h de lumière
3	14 h de lumière
4	16 h de lumière
5	24 h de lumière (éclairage continu)

RESULTATS

Influence de la durée d'éclairement sur la capacité germinative des graines

Il y a une différence significative de comportement des graines lorsqu'elles sont mises à germer avec ou sans éclairage : à l'obscurité, aucune germination de *L. inermis* n'est enregistrée tout au long de l'expérimentation. Par contre, sa présence constitue un facteur déterminant pour la levée des graines. En effet, elles germent à la lumière et le taux de germination est fonction de la durée de l'éclairement appliquée (Figure 1).

Les germinations sont observées à partir du troisième jour pour les graines exposées en continu et à 16 h de lumière, et au quatrième jour pour les lots de graines exposées à 12 h et 14 h de lumière. La cinétique de la germination décrit une forme sigmoïde comprenant trois phases : la première correspond à un temps de latence dû à l'imbibition de la graine ; la deuxième phase exponentielle où on assiste à une accélération de la germination, phase où est évaluée la vitesse de germination et enfin la dernière phase caractérisée par un palier indiquant un arrêt de la germination. Au fur et à mesure que la durée d'éclairement augmente, l'allure des courbes est modifiée dans le sens d'un raccourcissement, se traduisant par une

accélération de la vitesse de germination (Figure 1A). Cette vitesse est la plus élevée quand les graines sont éclairées avec 16 h et 24 h de lumière puisqu'au jour 5, simultanément plus de 40 graines ont germé ; les pics de germination enregistrés sont les plus élevés. La vitesse ralentit les jours suivants où plus de 20 graines (jour 6), moins de 10 graines (jour 7), moins de 5 graines (jour 8 à 11) germent, puis elle devient nulle. Cette vitesse est maximale pour 14 h et 12 h de lumière respectivement aux jours 7 et 8 soient 2 et 3 jours après ceux de 16 et 24 h de lumière : 28 graines germées avec 14 h et 25 graines germées avec 12 h de lumière (Figure 1B). Ajouté à cela, le temps nécessaire le plus court pour que germent 50% des graines est également obtenu quand elles sont éclairées quotidiennement pendant 16 h d'affilée : TMG 50% = 90,80 h. Viennent ensuite avec un écart de 2 h soit 92,25 h, celles exposées à un éclairage continu traduit par la superposition presque complète des deux courbes sur la Figure 1 (A et B). Le temps maximal mis pour que germent cette proportion identique est enregistré avec 12 h et 14 h d'éclairement où des écarts de presque deux jours par rapport aux autres régimes photopériodiques sont relevés : 126,78 h pour 14 h et 150,05 h pour 12 h de lumière.

La variation de la durée d'éclairement a une incidence sur la vitesse de germination, mais n'a pas d'effet significatif sur les taux moyens finaux supérieurs à 90% et les temps moyens de germination relevés approximativement de six jours, d'après les tests statistiques effectués. En outre, la croissance dans les premiers jours, des plants exposés à 16 h de lumière est plus harmonieuse que pour ceux éclairés pendant 12 h d'affilée (Figure 2). Avec 16 h de lumière, le plant présente une tige robuste de 5 mm, une longue racine et des feuilles cotylédonaire bien vertes et étalées (Figure 2A). En revanche avec 12 h, la tige est plus longue (10 mm), plus frêle, la racine plus courte, avec deux feuilles cotylédonaire vertes moins étalées (Figure 2B).

Les graines de henné ne germent donc qu'en présence de lumière et plus rapidement lorsqu'elles sont exposées à 16 h d'illumination quotidienne.

Influence de la scarification mécanique et de l'imbibition dans l'eau sur la capacité germinative des graines

Dans l'expérimentation menée, les graines témoins aussi bien que les graines imbibées pendant un temps dans l'eau de robinet et les graines scarifiées germent. Les germinations commencent toutes à partir du jour 5 sauf pour le lot des graines immergées pendant 72 h, qui commencent 24 h après. De l'examen de la Figure 3 illustrant l'influence de ces traitements sur la germination, on déduit que l'imbibition permet d'avoir une plus grande accélération de la vitesse de germination comparativement à celle de la scarification. Les pics de germination sont atteints respectivement les jours 6 (18 graines scarifiées germées et 40 graines germées pour 48 h d'imbibition) et 7 soient 36, 40 et 51 graines germées après 12, 24 et 72 h d'imbibition, tandis que pour les témoins il est atteint un jour après : 27 graines témoins germées le jour 8. Le pic des graines témoins

coïncide avec le deuxième pic de germination des graines scarifiées soit 29 graines germées (Figure 3B). Il faut, de plus, attendre en moyenne 129,65 h pour que la moitié des graines imbibées germent tandis qu'il faut presque une demi-journée supplémentaire pour que les scarifiées atteignent ce même taux : TMG 50% (scarifiées) = 140,38 h. Et c'est avec 48 h d'imbibition que le meilleur temps est enregistré : TMG 50% (48 h d'imbibition) = 117,39 h soit un gain de temps de plus d'une journée par rapport aux témoins.

Au terme de l'expérience et conformément aux analyses statistiques, le taux moyen de germination des graines, témoins et tous traitements confondus sont élevés mais non significativement différents : 89% pour les témoins, 90,96% pour les graines immergées et 93,3% pour les graines scarifiées. Le résultat de la comparaison des temps moyens de germination proche de sept jours pour les trois lots est également équivalent, soit : 7,90 jours pour les témoins, 7,26 jours pour les graines scarifiées et 7,12 jours pour les graines imbibées dans l'eau (Figure 3).

Les prétraitements ont tous deux un effet positif : ils ont permis d'augmenter la vitesse de germination des graines. Cependant l'imbibition permet une accélération beaucoup plus efficace de cette vitesse contrairement à la scarification et c'est avec 48 h d'immersion qu'elle est plus prononcée ; elle ne change néanmoins pas les autres paramètres de germination qui restent élevés et analogues.

Influence de la profondeur d'enfouissement des graines et de l'intensité lumineuse sur la capacité germinative des graines

Les germinations ne sont observées que dans les pots où les graines sont exposées à la surface du sol. Les graines commencent leur germination en surface au sixième jour et moins d'une semaine après, sont enregistrés 70% de germination. Le taux moyen maximal de 73,3% est atteint peu après, marquant la fin

du processus. Le temps moyen de germination observé est de 10,2 jours. Aux autres profondeurs étudiées c'est-à-dire 5, 10, 15 et 30 mm d'enfouissement, elles ne germent pas du tout d'où l'obtention d'un taux nul.

Les graines germent donc uniquement en surface.

Conservation du pouvoir germinatif dans le temps

Les graines de henné fraîchement récoltées présentaient un taux de germination de 91,33% avec un temps moyen de germination de 7,90 jours.

Ce taux est resté élevé et est même devenu légèrement supérieur après huit mois de conservation. Les résultats obtenus pour les essais de germination indiquent que quelle que soient les durées de conservation, les taux moyens de germination enregistrés et les temps moyens de germination au cours du stockage restent similaires (Figure 4).

Le temps n'a nullement altéré la capacité germinative des graines de henné qui ont présenté en moyenne après huit mois de conservation un pouvoir germinatif de 93,33% avec un temps moyen de germination de sept jours.

Germinations *in vitro*

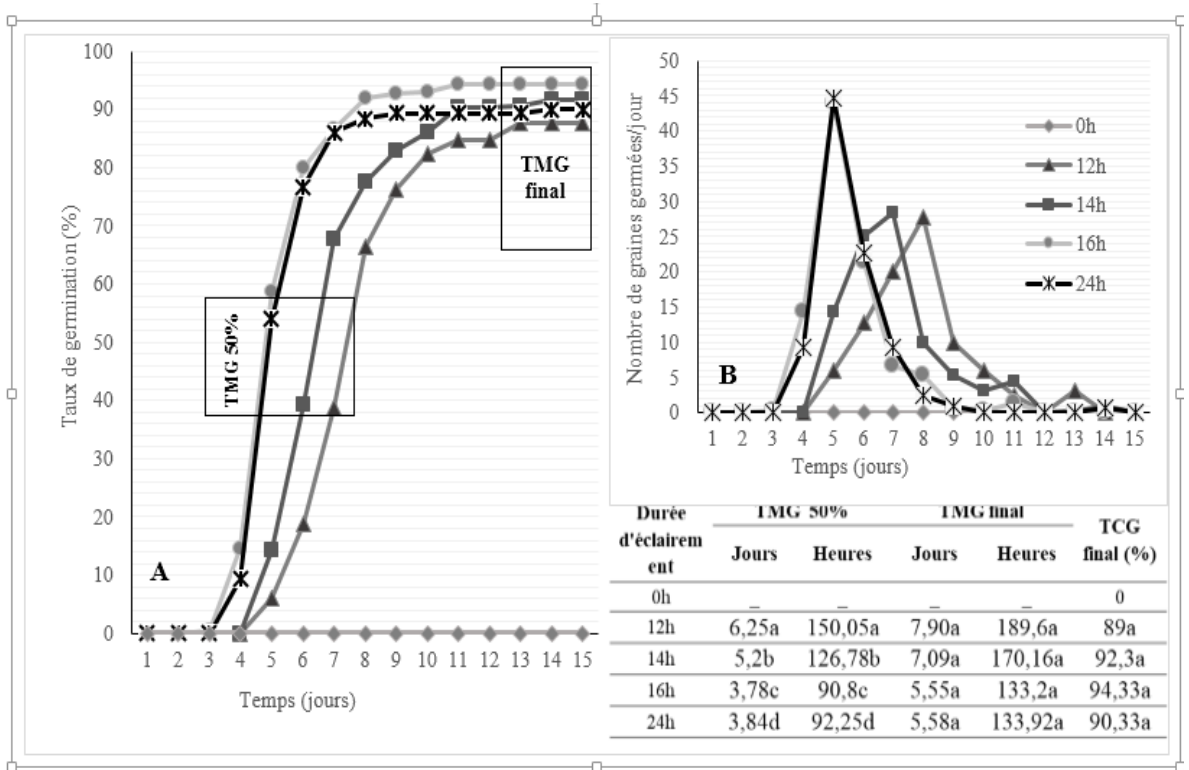
Deux protocoles de désinfection sont utilisés pour la germination *in vitro* de *L. inermis*, sur du milieu MS solidifié à l'agar. Les germinations des graines soumises au protocole 2 débutent au jour 5 et le lendemain pour celles qui ont été soumises au protocole 1 (Figure 5A).

Les graines soumises au protocole 1 germent 4 h plus tôt que celle soumises au protocole 2 ; La vitesse de germination des graines du protocole 2 est légèrement supérieure à celles du protocole 1, même si les pics de germination sont enregistrés

conjointement : respectivement 27 germées et 21 germées le jour 7. Le onzième jour, un nouveau pic de germination est atteint pour les deux protocoles. Cette vitesse s'annule le jour 13 pour les graines du protocole 1, contrairement aux graines du protocole 2 où sont enregistrés encore deux pics (trois graines germées chacun) avant l'arrêt de la germination le jour 15 (Figure 5B). Au terme des expérimentations, les taux de germination respectifs sont de 54,16% et 91,66%. Les temps moyens de germination de 8,38 jours pour les graines du protocole 1 et 9,45 jours pour celles du protocole 2, n'ont révélé aucune différence significative.

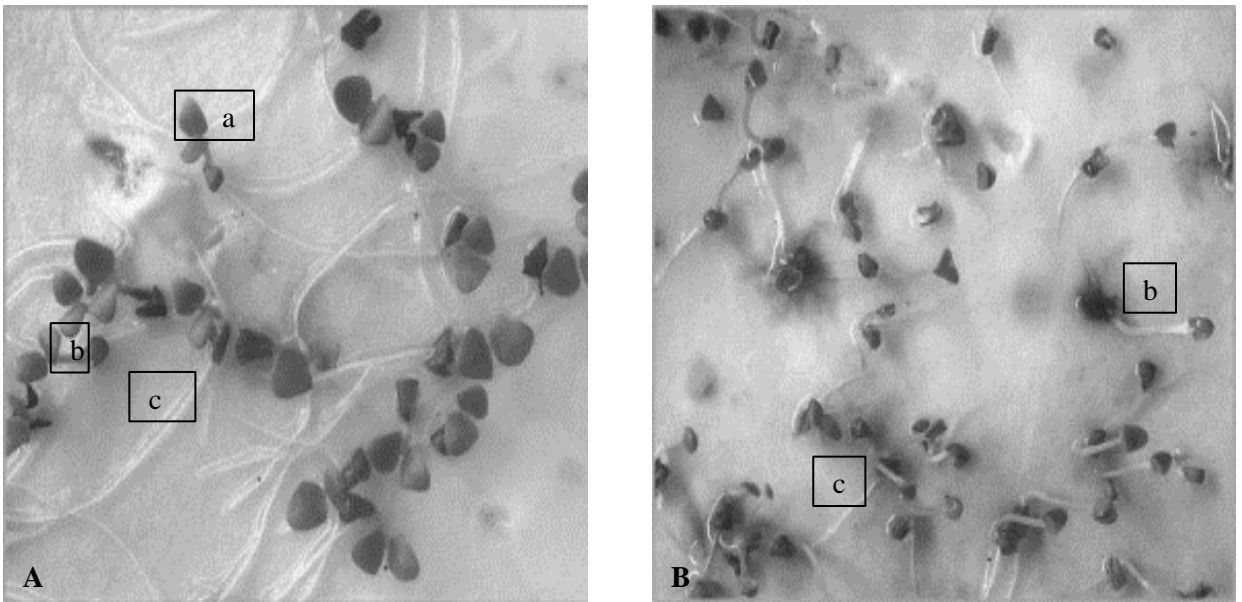
Les résultats les plus intéressants concernent les taux de contamination obtenus notamment de 41,66% pour les graines soumises au protocole 1 tandis qu'avec le protocole 2, il est dix fois moins important, soit 4,16%. L'augmentation du temps de contact des graines avec ces solutions, différence entre ces protocoles, a permis d'éliminer un nombre plus important de microorganismes avec le deuxième. Il est le meilleur pour une désinfection des graines en vue d'une germination *in vitro* car ayant permis plus de 90% de germination avec moins de 5% de contamination.

Enfin, la comparaison entre les deux modes opératoires (serre et *in vitro*) de germination des graines de henné exposées à 16 h de lumière, il ressort que les capacités germinatives restent élevées et similaires dans les deux cas. En effet, les taux moyens finaux de germination enregistrés ont été de 94,33% en serre et 91,66% *in vitro*. En revanche la désinfection semble ralentir la germination puisque le temps moyen de germination obtenu à la suite de cette désinfection est plus long que celui enregistré en conditions de serre : on passe en moyenne de 5,55 jours en serre à 9,45 jours *in vitro*.



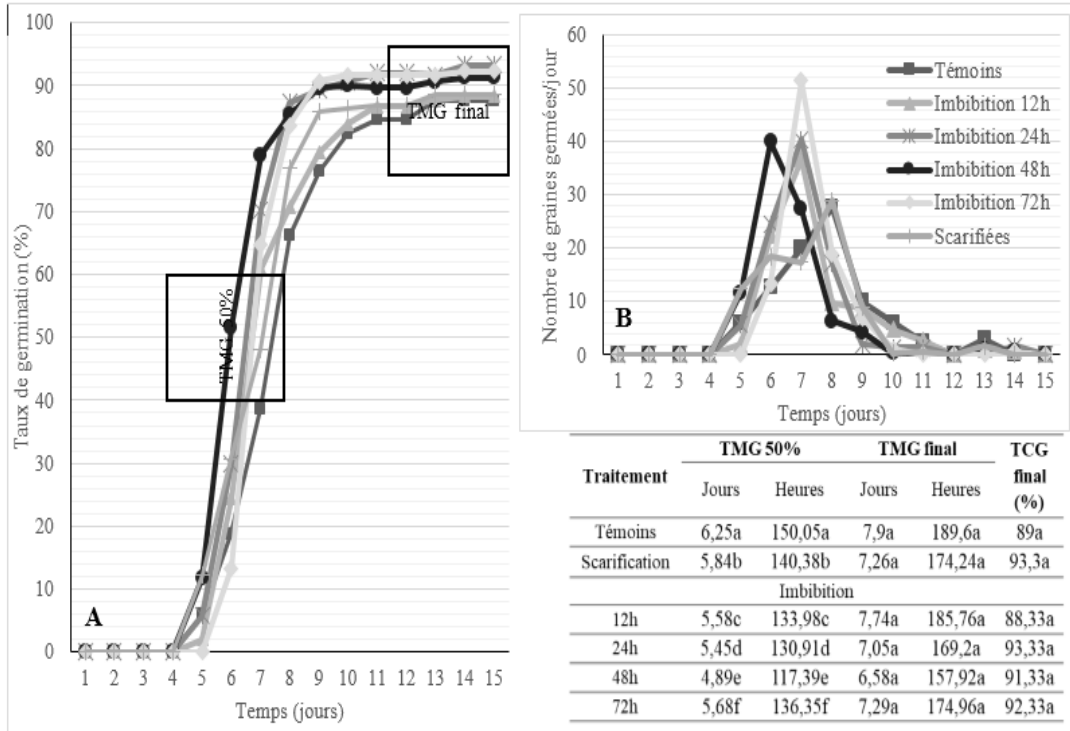
A : Taux cumulé de germination (TCG); B: Vitesse de germination (Nombre de graines germées/jour). *TMG 50%* = *TMG* pour atteindre 50% de germination ; *TMG final* = temps moyen de germination des graines. Test de Student-Newman-Keuls : les valeurs suivies par une même lettre ne sont pas significativement différentes au seuil de 5%.

Figure 1: Influence de la durée d'éclairément sur la germination des graines de *Lawsonia inermis* L.



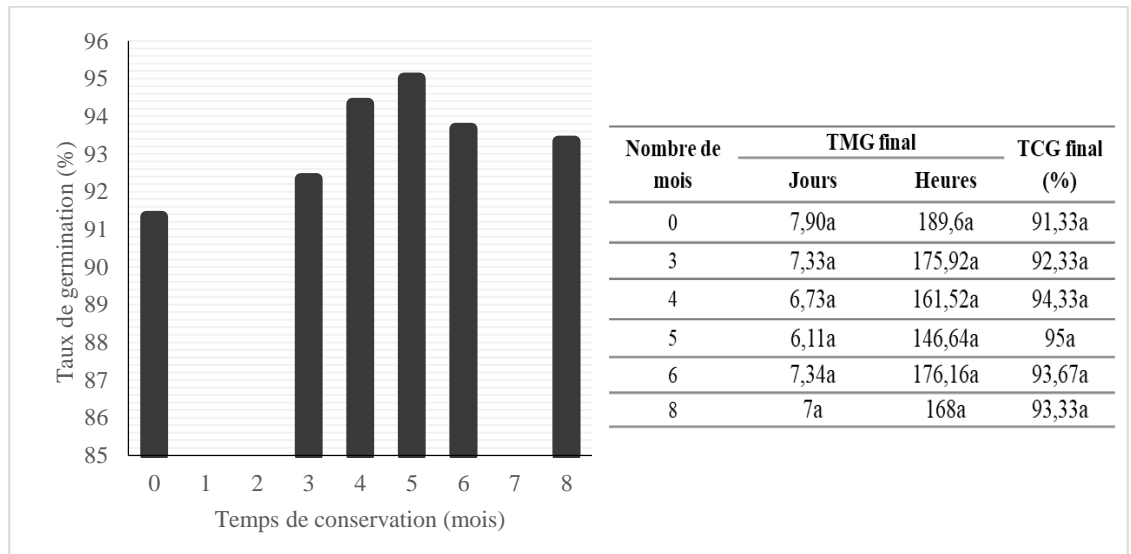
A : 16 h de lumière, B : 12 h de lumière. a: Feuille cotylédonnaire ; b : Tige; c : Racine

Figure 2 : Plants de *Lawsonia inermis* L âgés de sept jours ayant exposées à deux photopériodes différentes depuis le semis.



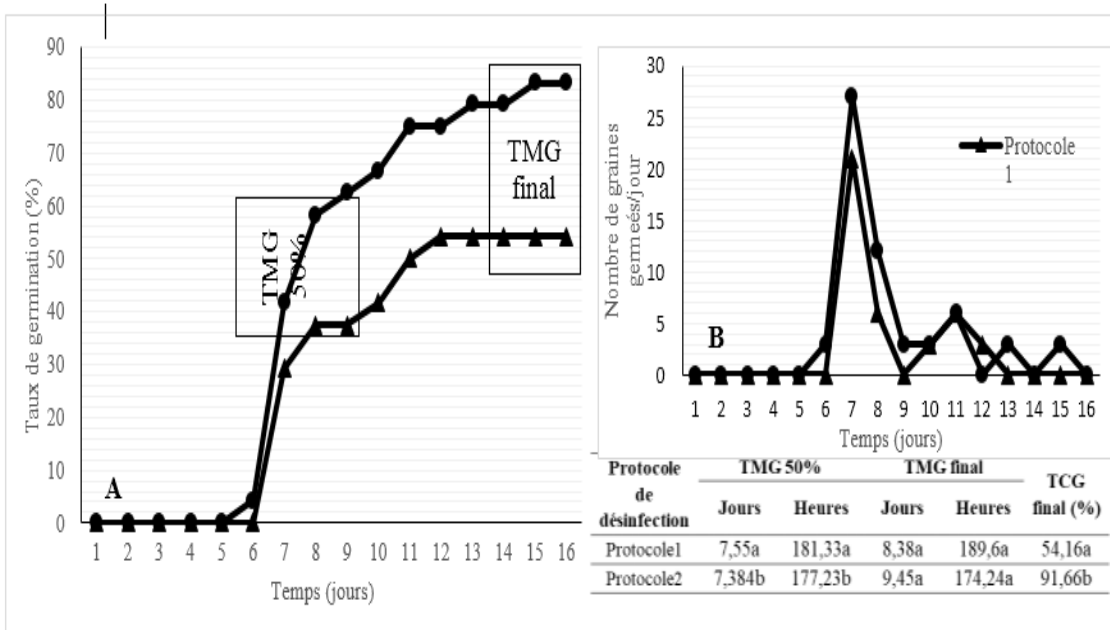
A: Taux cumulé de germination (TCG) ; B : Vitesses de germination (Nombre de graines germées/jour). *TMG 50%* = *TMG* pour atteindre 50% de germination ; *TMG final* = temps moyen de germination des graines. Test de Student-Newman-Keuls : les valeurs suivies par une même lettre ne sont pas significativement différentes au seuil de 5%.

Figure 3: Influence de la scarification et de l’imbibition sur la germination des graines de *Lawsonia inermis* L.



Les tests de germination commencent au troisième mois après conservation en boîtes plastiques à température ambiante au laboratoire (25±2 °C) à l’obscurité ; *TMG final* = temps moyen de germination des graines ; test de Student-Newman-Keuls : les valeurs suivies par une même lettre ne sont pas significativement différentes au seuil de 5%.

Figure 4: Influence de la durée de conservation sur la capacité de germination des graines de *Lawsonia inermis* L.



A: Taux cumulé de germination (TCG) ; B : Vitesses de germination (Nombre de graines germées/jour) ; Protocole 1 : Stérilisation avec le protocole 1 ; Protocole 2 : Stérilisation avec le protocole 2 ; TMG 50% = TMG pour atteindre 50% de germination ; TMG final = temps moyen de germination des graines. Test de Student-Newman-Keuls : les valeurs suivies par une même lettre ne sont pas significativement différentes au seuil de 5%.

Figure 5 : Influence du protocole de désinfection sur la germination *in vitro* des graines de *Lawsonia inermis* L.

DISCUSSION

La germination est l'ensemble des événements qui commencent par l'étape d'absorption de l'eau par la graine et se terminant par l'élongation de l'axe embryonnaire et l'émergence de la radicule à travers les structures qui entourent l'embryon (Mihoub et al., 2005; Pernollet and Ferault, 2008). Les principaux facteurs externes identifiés comme ayant des répercussions majeures sur la germination des graines sont la température, l'eau, la disponibilité en oxygène et la lumière (Hopkins, 2003 ; Baumgartner et Emonet, 2007).

Lorsqu'on considère le facteur « lumière », les graines de *Lawsonia inermis* sont classées dans la catégorie des espèces dites photoblastiques positives car nécessitant ce facteur pour germer. La lumière a une action différente sur la germination des espèces : nulle c'est-à-dire que les graines sont indifférentes à sa présence ou son absence, action inhibitrice (graines à photosensibilité négative) et action

stimulatrice (graines à photosensibilité positive) (Hopkins, 2003). Cette photosensibilité est due à une chromoprotéine résultant de l'association d'un chromophore et d'une apoprotéine, appelée phytochrome (Hopkins, 2003). Dans les graines, cette chromoprotéine bleuâtre présente des maximums d'absorption situés à 667 nm pour Pr, forme biologique inactive, et à 730 nm pour Pfr, au contraire active. Le phytochrome est synthétisé sous la forme Pr qui est stable. En présence de lumière, Pr, absorbant le rouge est convertie en Pfr, forme absorbant dans le rouge lointain, mettant en branle une cascade de réactions biochimiques appelée chaîne de transduction du signal aboutissant à une réponse physiologique : le pointement de la radicule (Hopkins ; 2003).

Le phytochrome sous ses deux formes photo-interconvertibles, variables avec la durée du jour et de la nuit, et l'espèce ou la variété végétale en cause, intervient également dans la régulation d'autres processus comme la croissance, la floraison, le gravitropisme

négatif à l'hypocotyle (Neff et al., 2000; Sullivan and Deng, 2003). Cette variabilité de la longueur du jour et de la nuit en conditions naturelles correspond à la photopériode.

L'apport de lumière peut donc se faire de manière continue ou discontinue, ce rapport conditionnant de nombreuses activités physiologiques définies précédemment, grâce au phytochrome (Khasirikani, 2009). De l'observation de l'évolution des germinations en conditions d'éclairement différentes, il ressort qu'un gain d'une journée est fait lorsque les graines sont exposées quotidiennement à 16 h et 24 h de lumière. L'induction de la germination est d'autant plus forte que l'illumination est longue. Des résultats similaires ont été obtenus par Zhou et al. (2005) dans ses travaux sur les graines de la morelle noire orientale (*Solanum ptychanthum*) où la germination de celles-ci a augmenté proportionnellement avec la durée d'exposition à la lumière. Cette induction est cependant maximale avec 16 h de lumière ici au vu de la vitesse de germination obtenue ; il apparaît également que 12 h, 14 h ou 24 h de lumière banche journalière, appliquées pendant 15 jours suffisent à stimuler pleinement la germination puisque les taux obtenus sont semblables à celui enregistré pour 16 h de lumière. De plus, il faut remarquer que les principales zones de culture du henné se retrouvent essentiellement sous les climats tropicaux et subéquatoriaux où la photopériode naturelle varie entre 10 et 12 h (Phirke et Saha, 2013), catégorie à laquelle appartient le Togo. La perception d'une meilleure croissance observée sous une photopériode plus longue, dénote de la capacité d'adaptation du henné à des latitudes nettement plus tempérées.

Les graines de *L. inermis* sont de petite taille (2 à 3 mm) et morphologiquement proches des akènes avec une coque dure. La présence d'une coque résistante peut être un obstacle à la germination des graines ou cause de dormance : on parle d'inhibition tégumentaire. L'application de prétraitements qu'ils soient physiques, chimiques ou mécaniques vise à altérer l'enveloppe afin de favoriser l'entrée rapide de l'eau dans la graine et par conséquent accélérer l'imbibition, première étape incontournable de

la germination (Niang-Diop et al., 2010; Trigiano and Gray, 2016). Dans cette étude les prétraitements consistant à une imbibition dans de l'eau de robinet et à une scarification par du sable, bien qu'ayant permis d'accélérer la vitesse de germination, n'ont pas amélioré la germination en elle-même. L'imbibition, traitement par voie humide permettant le ramollissement des téguments durs, aurait de surcroît facilité le lessivage des éventuels inhibiteurs chimiques (Aoudjit, 2006) présents chez les graines présentant une inhibition de type tégumentaire, cas typique du henné. Par ailleurs, Tozo et al. (2004) ont obtenu des résultats similaires lors d'essais de germination de *Dodonaea viscosa* L., espèce rare et menacée au Togo, où l'ébouillantage et la scarification des graines ont permis de diminuer le temps moyen de germination, mais pas d'en améliorer le taux.

Les essais de germination sur un substrat composé d'un mélange de terre et de terreau de jardin, substrat assez compact, ont permis d'obtenir un taux de 73,3% de germination pour les graines placées à la surface et un taux nul pour celles enfouies. Elles germent donc mieux en surface qu'en profondeur. De ce fait la photosensibilité des graines de henné est confirmée. Cette même corrélation entre le taux de germination et la profondeur d'enfouissement a été également établie par plusieurs auteurs (Pons, 2000 ; Ipou Ipou et al., 2004 ; Silue et al., 2017) qui ont montré que la levée des semences est plus importante chez les graines exposées à la surface du sol ou enfouies à de très faibles profondeurs. Pour *Euphorbia heterophylla* L., au-delà de 6 cm de profondeur, le taux de levée des semis s'annule (Ipou Ipou et al., 2004). Aussi, Pousset (2003) ayant travaillé sur la germination de graines photosensibles, a souligné l'importance de la quantité de lumière nécessaire pour enclencher le processus. Par ailleurs, il a établi que ce type de graines se trouve en dormance imposée dans le sol, est en « sommeil » et donc ne germe pas, par manque de lumière. L'enfouissement et par voie de conséquence la diminution de l'intensité lumineuse, qui est également l'impossibilité de perception de l'alternance lumière-obscurité, mais également dans une certaine mesure, de

l'accès à l'oxygène, empêche donc l'émergence des semis, réduisant drastiquement le taux de germination (Hopkins, 2003). Pour un rendement effectif, la mise en place de pépinière est donc incontournable, comme d'usage au Rajasthan, l'une des plus grandes régions de culture et d'exportation du henné (Sukla et al., 2012).

La conservation des graines diffère de celle des denrées consommables par la nécessité primordiale de conserver intacte leur faculté germinative. Pendant le stockage des graines, il peut y avoir détérioration sous l'influence de facteurs environnementaux notamment la température, l'hygrométrie etc. (Basra et al., 2000), pouvant s'accompagner donc d'une diminution de la capacité germinative des graines. Ici, le pouvoir germinatif du henné, est conservé intact et élevé, à près de 94% huit mois après la récolte, avec une conservation dans des boîtes plastiques, à température de 25 ± 2 °C. Phirke et Saha (2014b), travaillant sur la germination des graines de henné âgées d'une année et conservées dans des boîtes en plastique ont obtenu des résultats similaires : une fois mises en germination, un taux voisin de 100% a été enregistré.

La germination *in vitro* du henné s'est réalisée avec succès, la désinfection des graines de *L. inermis* diminue radicalement les contaminations, mais ne semble pas affecter la capacité germinative qui reste élevée. Les taux moyens de germination déterminés *en serre* sont semblables à ceux *in vitro*. La désinfection a eu un impact positif car, comme dans les études de germination du *Moringa oleifera* L. (Quashie and Tchezoum, 2016) elle réduit considérablement la contamination par les microorganismes et permet d'aboutir à un taux maximal de germination même si elle semble avoir retardé le processus. En outre, le taux de contamination a été significativement réduit lorsque le temps de trempage des graines dans les solutions stérilisantes a augmenté comme noté par Soumahoro et al. (2014). Cependant, autant l'augmentation du temps de trempage réduit significativement les contaminations, autant il peut porter atteinte à la survie de l'embryon : c'est le cas chez *Cana indica* L., où Joshi et Pant (2010) ont montré que l'acide

sulfurique, tout en améliorant la germination des graines de l'espèce, réduit cependant leur viabilité lorsque que le temps d'immersion s'allonge. Dans notre étude, le prolongement du temps de contact du henné avec les solutions stérilisantes a simplement retardé la germination des graines.

Conclusion

Les présents travaux ont permis d'améliorer les connaissances concernant la germination de *L. inermis* en évaluant les capacités de multiplication générative *en serre* et *in vitro* de ces graines. Cette étude a permis de déterminer les conditions optimales d'une bonne germination du henné. La présence de lumière est une condition obligatoire à son effectivité et à l'obtention de taux de germinations élevés (de 90% et plus). Ce processus est aussi influencé par la durée de la photopériode. En effet, avec un éclairage plus long, la germination commence plus tôt et est plus rapide, sans changer pour autant les paramètres de germination étudiés. Des prétraitements comme l'imbibition dans l'eau de robinet et la scarification mécanique améliorent la vitesse de germination qui connaît une nette accélération dans les premiers jours de culture. Les graines de *L. inermis* germent très mal, voire pas du tout lorsqu'elles sont enfouies à une légère profondeur de 5 mm, et ceci même dans un substrat assez aéré, meuble et drainant. Ces graines présentent une faculté germinative élevée et un maintien de celle-ci après huit mois de conservation à une température de 25 ± 2 °C. Enfin *in vitro*, l'application du protocole de désinfection approprié réduit la contamination par des microorganismes et permet d'obtenir des taux de germination de plus de 90%. Ainsi, du point de vue pratique, cette étude met à la disposition des pépiniéristes des outils adaptés pour la propagation de cette espèce par semis.

CONFLIT D'INTERETS

Les auteurs déclarent qu'ils n'ont pas de conflit d'intérêt.

CONTRIBUTION DES AUTEURS

RR, KNS, KA, ADK, KK ont participé à l'élaboration du protocole, supervisé sa mise

application et la rédaction de l'article. BNJ a effectué à la collecte des données et l'analyse des résultats. MLAQ a supervisé tout le travail et la rédaction du document final.

REFERENCES

- Aoudjit H. 2006. Étude de la germination des graines du *Pistacia atlantica* Desf. (pistachier de l'Atlas) et essai de multiplication de *Pistacia vera* L. (pistachier vrai) en pépinière selon deux types de greffes. Mémoire. Institut National Agronomique El Harrach. p. 93.
- Aweke G, Tapapul LS. 2005. *Lawsonia inermis* L. In *PROTA (Plant Resources of Tropical Africa / Ressources Végétales de l'Afrique Tropicale)*. Jansen PCM, Cardon D (Editors), Wageningen, Netherlands.
- Basra SMA, Rehman KU, Iqbal S. 2000. Cotton seed deterioration: assessment of some physiological and biochemical aspects. *Int. J. Agric. Biol.*, **2**(3) : 195–198.
- Diakadi. 2009. Togo, Population, langues et religions. Consulté le 02/10/2017. <http://www.diakadi.com/afriquedelouest/pays/togo/infos/pop.htm>
- Gregoire E. 2002. Territoires marchands en Afrique subsaharienne. *Historiens et Géographes*, (379) : 227–234.
- Hopkins WG. 2003. *Physiologie Végétale*. De Boeck Supérieur.
- Hsouna AB, Trigui M, Culioli G, Blache Y, Jaoua S. 2011. Antioxydant constituents from *Lawsonia inermis* leaves: isolation, structure elucidation and antioxidative capacity. *Food Chem.*, **125** (1): 193–200. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2010.08.060>
- Ipou Ipou J, Marnotte P, Aman KG, Aké S, Touré Y. 2004. Influence de quelques facteurs environnementaux sur la germination des semences d'*Euphorbia heterophylla* L. (Euphorbiaceae). *Tropicultura*, **22**(4): 176–179.
- Joshi SC, Pant SC. 2010. Effect of H₂SO₄ on Seed Germination and Viability of *Canna indica* L., medicinal plant. *J. Am. Sci.*, **6**(6): 24–25.
- Kallo MS, Adamou R, Sawadogo J, Mahamane AA, Maarouhi IM, Ikhiri K. 2018. Enquête ethnobotanique et criblage phytochimique de quelques plantes tinctoriales du Niger en vue d'une valorisation en énergie solaire. *Int. J. Biol. Chem. Sci.*, **12**(2): 867–883. DOI: <https://doi.org/10.4314/ijbcs.v12i2.20>
- Khasirikani MD. 2009. Notes d'écologie générale. Mémoire en ligne, Université de conservation de la nature et de développement de Kasugho. Consulté le 02/10/2017. https://www.memoireonline.com/08/10/3782/m_Notes-decologie-generale.html
- Kluger N. 2009. De l'art du henné (Mehndi) au henné noir. *Images En Dermatologie* **2**(3) : 100–104.
- Lal G, Roy PK, Singh YV. 2007. Effect of different treatments on germination behaviour of henna (*Lawsonia inermis* L.) seeds. *SAARC J. Agric.* 67.
- Makhija IK, Dhananjaya DR, Kumar VS, Devkar R, Khamar D, Manglani N, Chandrakar S. 2011. *Lawsonia inermis*-from traditional use to scientific assessment. *Afr. J. Pharmaceu. Sci. Pharm.*, **2**(1).
- Mallé K. 2011. Durabilité de la culture du henné dans la région de Koulikoro, au Mali: cas des communes rurales du Méguétan et de Banamba. Mémoire. Université Laval, Québec. p. 119.
- Miczak MA. 2001. *Henna's Secret History: The History, Mystery and Folklore of Henna*. Lincoln NE, Writers Club Press.
- Mihoub A, Chaoui A, El Ferjani E. 2005. Changements biochimiques induits par le cadmium et le cuivre au cours de la germination des graines de petit pois (*Pisum sativum* L.). *Comptes Rendus Biologies*, **328**(1) : 33–41. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.crv.2004.10.003>.
- Murashige T, Skoog F. 1962. A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant*, **15**(3): 473–497.
- Narain P, Singh M, Roy PK, Chand K, Jangid BL, Singh YV. 2005. Production, Trade and Future Prospect of Henna. Henna Cultiv. Improv. Trade Cent. Arid Zone Res. Inst. Jodhpur India.
- Neff MM, Fankhauser C, Chory J. 2000. Light: an indicator of time and place. *Genes & Development*, **14**(3) : 257–271.

- Niang-Diop F, Sambou B, Lykke AM. 2010. Contraintes de régénération naturelle de *Prosopis africana*: facteurs affectant la germination des graines. *Int. J. Biol. Chem. Sci.*, **4**(5): 1693-1705. DOI : <https://doi.org/10.4314/ijbcs.v4i5.65578>
- Pernollet J-C, Ferault C. 2008. Analyse du fascicule d'octobre 2008 (vol 331 - n°10) des comptes rendus "biologies" de l'Académie des sciences consacré a la biologie des semences. Académie d'Agriculture de France.
- Phirke SS, Saha M. 2013. *Lawsonia inermis* L.: A rainfed ratoon crop. In: National Conference on Biodiversity: Status and Challenges in Conservation-FAVEO. 189-193.
- Phirke SS, Saha M. 2014a. *In vitro* seed germination of *Lawsonia inermis* L. *Bionano Frontier*, **7**(1): 58-60.
- Phirke SS, Saha M. 2014b. Storage and germination in *Lawsonia inermis* L. *Bionano Frontier*, **7**(1): 58-60.
- Pons TL. 2000. Seed responses to light. In *Seeds: The Ecology of Regeneration in Plant Communities*. CABI Pub.; 237-260.
- Pousset J. 2003. *Agricultures sans Herbicides*. France Agricole Editions.
- PraJapati ND. 2004. M/s Sonamukhi Udyog, Sangaria Fanta, Salawas Road.
- Prosen H, Antonic J, Klobcar A. 2005. Determination of some organochlorine compounds in herbal colouring agent henna (*Lawsonia inermis*) and in tea (*Thea sinensis*). *Arh. Za Hig. Rada Toksikol. Ind. Hyg. Toxicol.* **56** (1): 1-7.
- Quainoo AK, Gali NM Mahunu GK. 2017. Henna (*Lawsonia inermis*): A neglected plant in Ghana. *Ghana J. Hort.*, **12**(1): 32-38.
- Quashie MLA, Tchezoum YA. 2016. Étude de la germination de *Moringa oleifera* LAM. *Numéros*, **12**(4).
- Radji R, Kokou K, Akpagana K. 2010. Etude diagnostique de la flore ornementale togolaise. *Int. J. Biol. Chem. Sci.*, **4**(2): 491-508. DOI: <https://doi.org/10.4314/ijbcs.v4i2.58159>
- Radji R, Kokou K. 2014. Distribution of the horticultural plants in Togo according to decorative parts and medicinal value. *Pak. J Sci*, **66**(3) : 257-268.
- Silue PA, Kouassi KÉ, Koffi KAD, Soro D. 2017. Qualités germinatives des graines et croissance des plantules de *Isobertinia* spp. en milieu contrôlé (pépinière). *Int. J. Biol. Chem. Sci.*, **11**(1) : 93-106. DOI : <https://doi.org/10.4314/ijbcs.v11i1.8>
- Soumahoro AB, Kone T, Kone M, Konate S, Kouadio JY, Zouzou M. 2014. Etablissement d'un protocole efficace de germination des graines du thé de savane (*Lippia multiflora* Mold., Verbenaceae). *Agron. Afr.*, **26**(2): 137-146.
- Sukla M, Regar RL, Jangid BL. 2012. Henna (*Lawsonia inermis* L.) Cultivation: A viable Agri-enterprise in arid fringes of western Rajasthan. *Den News*, **14**(2).
- Sullivan JA, Deng XW. 2003. From seed to seed: the role of photoreceptors in *Arabidopsis* development. *Developmental Biology* **260**(2): 289-297. DOI: [https://doi.org/10.1016/s0012-1606\(03\)00212-4](https://doi.org/10.1016/s0012-1606(03)00212-4)
- Tozo K, Kossi AM, Odah K, Bouchet P, Akpagana K. 2004. Les facteurs influençant la germination et la multiplication de *Dodonaea viscosa* (L) Jacq. (Sapindaceae), une espèce médicinale rare et menacée de disparition au Togo. *Acta Bot. Gallica*, **151**(2): 197-204. DOI: <https://doi.org/10.1080/12538078.2004.10516034>.
- Trigiano RN, Gray DJ. 2016. *Plant Tissue Culture, Development, and Biotechnology*. CRC Press.
- Zhou J, Deckard EL, Messersmith CG. 2005. Factors affecting eastern black nightshade (*Solanum ptycanthum*) seed germination. *Weed Science*, **53**(3) : 651-656.