

# UNIVERSITE DE BLIDA 1

Faculté des sciences de la nature et de la vie

Département de biologie et physiologie cellulaire

## MEMOIRE DE MAGISTER

En biologie

Spécialité : Biotechnologie végétale

INDUCTION DES CALS DE L'IF COMMUN (*Taxus baccata* L.) EN VUE DE

L'OPTIMISATION DU RENDEMENT DE TAXOL

Par

**Nabila ABDELLATIF**

Devant le jury composé de :

-HAMAIDI Mohand-Said	Maître de conférences (A)	Université Blida1	Président
-BELHADJ Safia	Professeur	Université Djelfa	Examinatrice
-CHAOUCH Fatema-Elzohra	Maître de conférences (A)	Université Blida1	Examinatrice
-CHAOUIA Cherifa	Maître de conférences (A)	Université Blida1	Promotrice

Blida, Juin 2015

## RESUME

*Taxus baccata* communément appelé l'if commun, regroupe les arbres connus par leur contenu en taxanes, particulièrement le taxol, agent anticancéreux prometteur.

L'étude de l'aptitude à la callogenèse de *Taxus baccata* L. en vue d'optimiser la production du taxol a montré qu'après deux mois de culture, les explants issus de pousses ont donné la meilleure induction (100%) avec une prolifération des cals de 3,29 g de poids frais sur le milieu **B5(M<sub>4</sub>)** (1mg/l de 2,4-D + 1mg/l de Kinétine + 0,5 mg/l de GA3). Quant aux explants foliaires, la meilleure induction (100%) est obtenue sur le milieu **B5(M<sub>4</sub>)**. Par ailleurs, la meilleure croissance est obtenue sur le milieu **B5(M<sub>1</sub>)** (0,75mg/l de 2,4-D + 0,75mg/l de kinétine) avec de 0,133 g de poids frais des cals. L'étude comparative des deux types d'explants pour un fort pouvoir callogène a permis de choisir les pousses comme étant les explants les plus callogènes. L'étude histologique a montré que la formation des cals au niveau des explants de pousses est due à la division cellulaire du parenchyme cortical.

La chromatographie liquide à haute pression (CLHP) a confirmé la présence du taxol dans la plante et dans les cals (après 30 jours de culture).

Les expériences réalisées en vue d'optimiser la production du taxol dans une suspension cellulaire ont montré que la croissance des cellules synchronisées est plus importante que celle des cellules non synchronisées. Le meilleur rendement du taxol enregistré est égal à 8,42 mg/l produit par les cellules synchronisées et élicitées par l'acide salicylique sur le milieu **MS** contenant 1mg/l de 2,4-D, 1mg/l de Kinétine et 0,5 mg/l de GA3. Il est de 1,3 et 1,5 fois plus grand que celui des cellules synchronisées non élicitées (**S<sub>1</sub>**) et de témoin (**S<sub>0</sub>**) respectivement.

**Mots clés :** *Taxus baccata* L., culture cellulaire, synchronisation de cellules, suspension cellulaire, acide salicylique, Taxol.

(Taxol) يضم الأشجار المعروفة باحتوائها على التاكسان

تحسين Taxol شهرين  
3,29 تحريض ( 100 )  
تحريض ( 100 ) تحريض ( 100 )  
(1mg/l,2,4-D+1mg/l Kin + 0,5mg/l GA3)B5(M<sub>4</sub>)  
(1mg/l 2,4-D+1mg/l Kin + 0,5mg/l GA3) B5(M<sub>4</sub>)  
هذي النوعين 0,133 (0,75mg/l 2,4-D + 0,75mg/l kin) B5(M<sub>1</sub>)  
العينات من حيث الاستجابة للتحريض سمحت لنا باختيار كأفضل عينة من جل إتمام تجاربنا الباقية.  
الأنسجة قد أظهرت أن تكون صادر عن انقسام خلايا البرنشيم القشري.

لكروماتوغرافيا المقرونة بالطيف أثبتت ( 30 يوما من الزرع) العينات من الشجرة ع Taxol .

تحسين Taxol تشير الخلايا هو  
8,42 من الخلايا الغير  
MS(M<sub>4</sub>) السالسليك  
2,4-D 1 Kin 1 GA3 0,5

لقد كان هذا الإنتاج اكبر ب 1,3 1,5 الخلايا الغير S<sub>1</sub> الخلايا الغير ا S<sub>0</sub>.

### الكلمات المفتاحية:

الخلايا حمض السالسليك

## ABSTRAT

*Taxus baccata* commonly named the common yew gathers the trees known by their contents in taxan, particularly the taxol, a promising anti-cancer agent.

The study of the aptitude for the callogenesis of *Taxus baccata* L. in order to optimize the production of the taxol showed that after two months of culture, the best induction (100%) and stem derived callus proliferation estimate at 3,2858g of fresh weight were obtained on the medium **B5(M<sub>4</sub>)** (1mg/l 2,4-D + 1mg/l Kinetin + 0,5mg/l GA3). However, the best induction needles derived callus (100%) was obtained on the medium **B5(M<sub>4</sub>)** (1mg/l 2,4-D + 1mg/l Kinetin + 0,5mg/l GA3), while, their best growth (132,6727mg) was obtained on the medium **B5(M<sub>1</sub>)** (0,75mg/l 2,4-D + 0,75mg/l kinetin). The comparative study of the two types of explants for the capacity of callogenesis allows choosing the stems to finish ours experiments. Histological examination showed that in the stem explants callus formation was due to the cell division of the cortical parenchyma.

The liquid chromatography high pressure confirmed the presence of the taxol in the plant and the callus (after 30 days of culture).

The experiments carried out in order to optimize the production of the taxol in a cellular suspension showed that the growth of the synchronized cells is more important than that of the asynchronized cells. The best taxol production equal to 8,42 mg/l, obtained by the cells synchronized and elicited by the salicylic acid on **MS** medium containing 1mg/l 2,4-D, 1mg/l Kinetin and 0,5mg/l GA3, being 1,3 and 1,5 times higher than that of the synchronized cells (**S<sub>1</sub>**) and the control **S<sub>0</sub>** respectively.

**Keywords:** *Taxus baccata* L., tissue culture, cells synchronization, cell suspension, salicylic acid, Taxol.

## REMERCIEMENTS

Au terme de ce travail, Je remercie avant tout **ALLAH** le tout puissant de m'avoir accordé force et volonté pour terminer ce travail.

Mes sincères remerciements sont exprimés agréablement à ma promotrice, **Mme. CHAOUIA C.** maître de conférence classe (A) à l'Université de Blida 1, qui a accepté avec toute modestie de m'encadrer, malgré ses multiples charges, pour sa patience, son aide et ses conseils pour réaliser ce travail.

Mes remerciements vont également aux membres du jury:

**Mr. HAMAIDI M.S.** maître de conférence classe (A) à l'Université de Blida (1), pour m'avoir fait l'honneur de présider mon jury;

**Mme. BELHADJ S.** professeur à l'Université de Djelfa, pour avoir accepté d'évaluer ce document.

**Mme. CHAOUCH F/Z.** maître de conférence classe (A) à l'Université de Blida1, pour leur participation dans l'évaluation de ce document. Ainsi, ce travail n'est rendu possible sans son aide technique. Je la remercié pour les moyens matériels qu'elle a mis à ma disposition.

Je voudrais exprimer toute ma gratitude à **Mme. SAIDI F.** professeur à l'Université de Blida (1), de m'avoir aidée à identifier les coupes histologiques.

Je n'oublie pas de remercier toute l'équipe de laboratoire de L'ENEV, particulièrement **Mr. KAMAL**, pour son aide et sa sympathie. Qu'ils trouvent ici l'expression de ma profonde gratitude.

Également, j'adresse mes remerciements à **Mr BOUCEBHA F.**, à **Mr. AKBAL M.**, à **Mr TURKI M.**, à **Mme HAKIMA.**, et à toute l'équipe de travail du laboratoire central de l'intendance sous la responsabilité de **Mr. LAKHAL A.**, sans lui, l'établissement et la réalisation des essais d'extractions et de dosage n'auraient pu être accomplis.

Sans oublier d'adresser mes vifs remerciements à l'ensemble des enseignants de biologie.

## DEDICACES

Je dédie ce modeste travail à

Tous les Algériens, particulièrement les chercheurs, qui travaillent dans le silence et qui rêvent d'une Algérie prospère. La vie d'un chercheur, n'est pas un fleuve tranquille! Après tout... c'est aussi pour cela qu'elle est si palpitante!

A

Mon défunt père qui est ma source d'inspiration. Que le paradis soit sa demeure.

A

Ma mère qui a sacrifié sa vie pour ma réussite, son amour et sa patience ont été de formidables moteurs.

A

Mes sœurs et belles sœurs et mes très chers frères

A

Ma précieuse amie AIZER Nassima, qui a traversé les beaux et durs moments avec moi. Merci pour ton écoute et toute l'aide pratique et morale que tu m'as offerte!

A

Mes camarades de promotion. Je leur souhaite une vie pleine de succès et de réussite

A

Mes proches : Ali-yahia, Hamza et Lamia, qui ont su me motiver. Je les remercie pour leur écoute, leur appui et pour la place qu'ils m'ont faite dans leur vie.

## TABLE DES MATIERES

<b>RESUME</b>	1
<b>REMERCIEMENTS</b>	4
<b>TABLE DES MATIERES</b>	6
<b>LISTE DES ILLUSTRATIONS, GRAPHIQUES DES TABLEAUX</b>	8
<b>LISTE DES ABREVIATIONS</b>	11
<b>INTRODUCTION</b>	12
<b>CHAPITRE 1 : SYNTHÈSE BIBLIOGRAPHIQUE</b>	15
1.1. Caractéristiques du <i>Taxus</i>	15
1.1.1. Classification	15
1.1.2. Monographie de <i>Taxus baccata</i>	17
1.1.2.1. Nom et étymologie	17
1.1.2.2. Aire de répartition de l'espèce	18
1.1.2.3. Description botanique de <i>Taxus baccata</i> L.	19
1.1.2.4. Croissance de l'espèce <i>Taxus baccata</i> L.	22
1.1.2.5. Caractères écologiques et phytosociologiques de l'espèce	23
1.1.2.6. Composition chimique	23
1.1.2.7. Toxicité de l'if	24
1.2. Taxol	26
1.2.1. Structure et propriétés chimiques du taxol	26
1.2.2. Biosynthèse de taxol	27
1.2.3. Mécanisme d'action	29
1.2.4. Pharmacologie et emplois du taxol	29
1.2.5. Source de taxol	30
1.3. Production du taxol <i>in vitro</i>	31
1.3.1. Callogenèse	31
1.3.2. Suspension cellulaire	33
1.4. Optimisation de la production du taxol	34
1.5. Travaux réalisés sur la culture <i>in vitro</i> de <i>Taxus baccata</i> L. en Algérie	37
<b>CHAPITRE 2 : MATERIEL ET METHODES</b>	38
<b>2.1. Aptitude à la callogenèse de <i>Taxus baccata</i> L.</b>	38
2.1.1. Matériel végétal	38
2.1.2. Description du végétal	39
2.1.3. Milieux de culture	41

2.1.4. Stérilisation du matériel végétal	42
2.1.5. Mis en culture des explants	44
2.1.6. Repiquage des cals	45
2.1.7. Paramètres mesurés	45
2.1.8. Méthodes histologiques	46
2.1.9. Analyse statistique	46
<b>2.2. Essais de production du taxol sur une suspension cellulaire</b>	<b>47</b>
2.2.1. Synchronisation de culture	47
2.2.2. Passage en Suspension	48
2.2.3. Mesure de la densité cellulaire	50
<b>2.3. Extraction et dosage du taxol</b>	<b>51</b>
2.3.1. Extraction du taxol	51
2.3.2. Dosage par chromatographie liquide couplée à un détecteur UV	53
<b>CHAPITRE 3 : RESULTATS</b>	<b>56</b>
<b>3.1. Aptitude à la callogenèse de <i>Taxus baccata</i> L.</b>	<b>56</b>
3.1.1. Stérilisation du matériel végétal	56
3.1.2. Induction des cals du <i>Taxus baccata</i> L.	59
3.1.2.1. Aspect des cals	59
3.1.2.2. Effet de milieux de base sur la callogenèse	61
3.1.2.3. Effet des hormones de croissance sur la callogenèse	64
3.1.2.4. Effet de l'interaction milieu de base / hormones de croissance	70
3.1.2.5. Influence de l'explant	77
3.1.3. Coupes histologiques	78
<b>3.2. Essais de production du taxol sur une suspension cellulaire</b>	<b>82</b>
3.2.1. Croissance des cellules mises en suspension	82
3.2.2. Dosage du taxol	84
3.2.2.1. Témoin	84
3.2.2.2. Courbe d'étalonnage	85
3.2.2.3. Teneur des pousses et des cals en taxol	85
3.2.3. Production du taxol	87
<b>CHAPITRE 4 : DISCUSSION</b>	<b>90</b>
<b>CONCLUSION ET PERSPECTIVES</b>	<b>100</b>
<b>ANNEXES</b>	<b>103</b>
<b>REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES</b>	<b>122</b>

## LISTE DES ILLUSTRATIONS GRAPHIQUES

<b>Figure 1.1</b>	Organes de <i>Taxus baccata</i>	20
<b>Figure 1.2</b>	Epiderme inférieur des aiguilles de <i>Taxus</i> au microscope électronique à balayage	21
<b>Figure 1.3</b>	Structure du taxol	27
<b>Figure 1.4</b>	Biosynthèse du taxol	28
<b>Figure 1.5</b>	Mécanisme d'action de taxol	29
<b>Figure 2.1</b>	Vue générale d'un arbre de <i>Taxus baccata</i> L.	39
<b>Figure 2.2</b>	Aiguilles et pousses de <i>Taxus baccata</i> L.	40
<b>Figure 2.3</b>	Fruit de <i>Taxus baccata</i> L.	40
<b>Figure 2.4</b>	Graine de <i>Taxus baccata</i> L.	40
<b>Figure 2.6</b>	Suspension cellulaire de <i>Taxus baccata</i> L. dans un flacon horizontal.	49
<b>Figure 3.1</b>	Nombre d'explants issus de pousses non contaminés de <i>T. baccata</i> L.	56
<b>Figure 3.2</b>	Nombre d'explants foliaires non contaminés de <i>T. baccata</i> L.	57
<b>Figure 3.3</b>	Contaminations cryptogamiques sur les explants/milieux	57
<b>Figure 3.4</b>	Contamination des explants issus de pousses et d'aiguilles après 67 jours de culture	58
<b>Figure 3.5</b>	Aspect des explants foliaires après la mise en culture	58
<b>Figure 3.6</b>	Effet des méthodes de stérilisation sur l'induction des cals à partir des aiguilles du <i>Taxus baccata</i> L.	59
<b>Figure 3.7</b>	Aspect de cals sur le milieu de GAMBORG (B5)	60
<b>Figure 3.8</b>	Aspect de cals sur le milieu MS	60
<b>Figure 3.9</b>	Aspect de cals sur le milieu WPM	60
<b>Figure 3.10</b>	Aspect des exsudats sur les cals et le milieu de culture	61
<b>Figure 3.11</b>	Effet des milieux de base sur le pourcentage de la callogénèse	62

<b>Figure 3.12</b>	Effet des milieux de base sur la croissance des cals	63
<b>Figure 3.13</b>	Effet des milieux de base sur la croissance des cals	64
<b>Figure 3.14</b>	Effet de l'apport des hormones sur le taux de la callogénèse	65
<b>Figure 3.15</b>	Effet des hormones de croissance sur le poids frais des cals	67
<b>Figure 3.16</b>	Effet des hormones sur le poids frais des cals issus des aiguilles	69
<b>Figure 3.17</b>	Effet d'interaction entre les milieux de base et les hormones	71
<b>Figure 3.18</b>	Croissance des cals issus de pousses	73
<b>Figure 3.19</b>	Manifestation des cals issus de pousses après 15 jours de culture	74
<b>Figure 3.20</b>	Aspect des cals issus de pousses après 65 jours de culture	74
<b>Figure 3.21</b>	Interaction entre les milieux de base et les hormones de croissance	75
<b>Figure 3.22</b>	Aspect des cals issus des aiguilles après 60 jours de culture	76
<b>Figure 3.23</b>	Coupes transversales au niveau de pousse de <i>Taxus baccata</i> L.	79
<b>Figure 3.24</b>	Coupes transversales au niveau d'aiguille de <i>Taxus baccata</i> L.	80
<b>Figure 3.25</b>	Coupes au niveau des cals issus des pousses après 20 jours d'induction.	81
<b>Figure 3.26</b>	Cinétique de la croissance des cellules mises en suspension.	83
<b>Figure 3.27</b>	Témoin taxol analysé à 225 nm par la CLHP.	84
<b>Figure 3.28</b>	Courbe d'étalonnage du témoin taxol obtenue par la CLHP	85
<b>Figure 3.29</b>	Extrait des cals issus de pousses du <i>Taxus baccata</i> L.	86
<b>Figure 3.30</b>	Extrait de la poudre sèche des jeunes pousses du <i>Taxus baccata</i> L.	86
<b>Figure 3.31</b>	Teneur en taxol intracellulaire et extracellulaire des suspensions	88

<b>Tableau 1.1</b>	Classification classique du genre <i>Taxus</i>	16
<b>Tableau 1.2</b>	Classification phylogénétique du genre <i>Taxus</i>	16
<b>Tableau 1.3</b>	Dénominations de l'if commun	18
<b>Tableau 2.1</b>	Stérilisation du matériel végétal	43
<b>Tableau 2.2</b>	Milieux de culture utilisés	44
<b>Tableau 2.3</b>	Essais de la suspension cellulaire	50
<b>Tableau 3.1</b>	Classification des moyennes des poids frais des cals	63
<b>Tableau 3.2</b>	Classification des moyennes des poids frais des cals	64
<b>Tableau 3.3</b>	Classification des moyennes des poids frais des cals	67
<b>Tableau 3.4</b>	Classification des moyennes des poids frais des cals	69
<b>Tableau 3.5</b>	Induction des cals issus de pousses (après 60 jours de culture)	70
<b>Tableau 3.6</b>	Induction des cals issus des aiguilles (après 60 jours de culture)	71
<b>Tableau 3.7</b>	Interaction milieu / hormones	72
<b>Tableau 3.8</b>	Vitesse de croissance des cals issus de pousses sur le milieu B5(M <sub>4</sub> )	75
<b>Tableau 3.9</b>	Interaction milieu de base / hormones de croissance	76
<b>Tableau 3.10</b>	Comparaison de poids frais moyen des cals issus de pousses et d'aiguilles.	77
<b>Tableau 3.13</b>	Teneur de <i>T. baccata</i> L. en taxol.	87

## LISTE DES ABBREVIATIONS

- B5** : Milieu de GAMBORG.
- CLHP** : Chromatographie Liquide à Haute Performance.
- CNSC** : Chemotherapy National Service Center.
- kDa** : Kilo Dalton.
- Kin** : Kinétine=6 fulfuryl aminopurine.
- M<sub>1</sub>** : 0,75mg/l de 2.4-D+0,75mg/l de Kinétine.
- M<sub>2</sub>** : 2 mg/l de 2,4-D.
- M<sub>3</sub>** : 2 mg/l de Kinétine.
- M<sub>4</sub>** : 1mg/l de 2,4-D + 1mg/l de Kinétine + 0,5mg/l de GA3.
- MS** : Milieu de Murashige et Skoog.
- NCI** : National Cancer Institute.
- PEG** : Poly éthylène glycol.
- PF** : Poids Frais.
- PS** : Poids sec.
- USDA** : United States Department of Agriculture.
- WPM** : Milieu de Woody Plant Medium.
- 2.4-D** : Acide 2,4 Dichlorophenoxyacétique.

## INTRODUCTION

Le genre *Taxus*, appartenant à la famille des Taxacées, constitue un petit groupe des gymnospermes. Il est principalement présent dans l'hémisphère Nord [1]. Les arbres sont extrêmement toxiques et peuvent, en cas d'ingestion d'une partie de la plante, entraîner la mort [2]. Toutefois, les espèces de ce genre ont connu une importance particulière ces dernières années du fait de leur contenu en taxanes [3].

Le Taxol est l'un des agents naturel anticancéreux le plus prometteur [4]. C'est un composé diterpénique appartenant à la sous-classe des taxanes, et présente une activité anti-tumorale suscitant de grands espoirs dans la lutte contre une large gamme de cancers (du sein, des ovaires et des poumons) [5] [6] [7] [8] [9]. FROHNE et *al.*, [3] signalent que cette molécule a été isolée pour la première fois à partir de l'écorce de *Taxus brevifolia* Nutt.

La production de ce métabolite secondaire (Taxol) à partir d'une plantation spontanée de l'if est dépendante de nombreux facteurs environnementaux [10]. Un sérieux problème à surmonter est sa faible teneur en taxol qui ne dépasse pas 0,01%. Un arbre centenaire peut produire 3 kg d'écorces, soit 300 mg de taxol [11] et un malade du cancer en a besoin approximativement de 2,5 à 3 g [12]. De plus la demande de cet agent antinéoplasique augmente approximativement chaque année par 20% [13]. Une production industrielle de la molécule sans, à terme, détruire l'espèce, n'est pas donc envisageable. Selon MIHALJEVIC et *al.*, [4] ces espèces sont en voie de disparition en Europe.

Afin de pallier à ce faible taux de taxol, la synthèse chimique de ce métabolite s'avère intéressante. Cependant, le coût élevé et l'aspect polluant de ce type de production rendent cette synthèse chimique peu rentable. Une autre alternative plus prometteuse est le développement de procédés biotechnologiques pour intensifier la plantation et ainsi la production de ce métabolite, le taxol.

Effectivement, les cultures de cellules et de tissus de plants (cals, racines, tiges et feuilles) offrent une alternative pour la production *in vitro* de métabolites secondaires utiles [14]. Une telle culture permet d'éviter d'importantes variations climatiques, des risques induits par les agents pathogènes et elle est indépendante des conditions du sol [15].

La plupart des études sur la production de métabolites secondaires dans des tissus végétaux sont effectuées principalement dans des suspensions cellulaires, parce que les conditions de culture sont uniformes, la croissance est plus rapide, avec des applications à grande échelle [16]. Cependant, afin d'optimiser cette production le passage par le stade de callogenèse est une étape capitale.

En Algérie, aucune étude de la callogenèse n'a été réalisée sur l'espèce *Taxus baccata* L. Quelques essais préliminaires d'induction des cals ont été réalisés par ABDELLATIF et HARFOUCHE en 2005 *in* BENLAKEHAI [17]. De plus, les compositions qualitatives et quantitatives des métabolites secondaires peuvent varier considérablement à cause de la variabilité naturelle des plantes.

Dans ce contexte, s'inscrit notre présent travail qui s'articule autour de trois parties :

-La première partie, vise à induire les cals de *Taxus baccata* L. (if commun) provenant de Chréa. Les objectifs sont :

- La mise au point d'une méthode de stérilisation des explants ;
- Le choix d'un explant à fort pouvoir callogène ;
- L'étude de l'effet de la composition minérale sur la callogenèse ;
- L'étude de l'effet de l'apport des régulateurs de croissance sur la callogenèse ;
- L'étude de l'interaction entre les milieux de base et les régulateurs de croissance sur la callogenèse.

-Dans la deuxième partie, un essai est réalisé pour stimuler la production de taxol en suivant les étapes suivantes :

- Synchronisation des cellules, pour avoir une suspension cellulaire homogène ;
- Utilisation d'un système biphasique de culture ;
- Stimulation de la production de taxol en ajoutant l'acide salicylique.

-La troisième partie concerne l'extraction et le dosage du métabolite (taxol) présent dans la plante et produit dans les suspensions cellulaires réalisées.

Une comparaison de rendement en métabolite, le taxol, a été effectuée entre les pousses juvéniles et les cals induits de l'if commun.

## CHAPITRE 1

### SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE

#### **1.1. Caractéristiques du Taxus**

Le genre *Taxus*, appelé if, regroupe des arbres et des arbustes constituant une exception des gymnospermes. Ce sont des conifères dont les fruits ne sont pas des cônes et ils ne fabriquent pas de résine. Ils sont considérés comme très toxiques [18].

##### **1.1.1. Classification**

Le genre *Taxus* appartient à la famille des Taxacées dans le sous embranchement des gymnospermes. En effet, les Taxacées regroupent moins de 2% des espèces des gymnospermes. La classification du genre *Taxus* et de la famille des Taxacées a largement évolué au cours du temps et connaît encore aujourd'hui des variations.

Il existe deux types de classification :

- La classification classique basée sur les caractères morphologiques du végétal.
- La classification phylogénétique basée sur l'examen de marqueurs génétiques du végétal afin de recréer une phylogénie [2].

##### **1.1.1.1. Classification classique**

Les ifs sont des gymnospermes et ne sont pas considérés comme des conifères car ils ne sont pas résineux et leurs fruits ne sont pas des cônes. En effet, la famille des taxacées est placée dans l'ordre des *Taxales* et non dans l'ordre des *Pinales* (Tableau 1.1) [2].

**Tableau 1.1** : Classification classique du genre *Taxus* [19].

Règne	<i>Plantae</i>
Sous-règne	<i>Tracheophyta</i>
Division	<i>Pinophyta</i>
Classe	<i>Pinopsida</i>
Ordre	<i>Taxales</i>
Famille	<i>Taxaceae</i>
Genre	<i>Taxus</i>

#### **1.1.1.2. Classification phylogénétique**

Des analyses ADN ont montré que les ifs sont monophylétiques des autres familles de l'ordre des *Pinales* [20] [21]. De plus, les résultats de ces analyses sont renforcés par des études de micromorphologie [22]. C'est pourquoi la famille des taxacées est incluse avec les conifères dans l'ordre des *Pinales* alors qu'elle était répertoriée dans le groupe distinct des *Taxales* (Tableau 1.2) [2].

**Tableau 1.2** : Classification phylogénétique du genre *Taxus* [20] [21].

Règne	<i>Plantae</i>
Sous-règne	<i>Tracheophyta</i>
Division	<i>Pinophyta</i>
Classe	<i>Pinopsida</i>
Ordre	<i>Pinales</i>
Famille	<i>Taxaceae</i>
Genre	<i>Taxus</i>

Les *Taxus* se retrouvent tous dans l'hémisphère Nord du globe [1]. Selon les travaux des taxonomistes DELONG et PRANGE [23], il existe neuf espèces indigènes de *Taxus* :

-Quatre espèces nord-américaines :

- *T. brevifolia* Nutt.,
- *T. canadensis* Marsh.,
- *T. floridana* Champ.,
- *T. globosa* Schlecht.

-Une seule espèce européenne : • *T. baccata* L.

-Quatre autres asiatiques :

- *T. cuspidata* Sieb & Zucc,
- *T. chinensis* (Pilger) Rehd.,
- *T. wallichiana* Zucc,
- *T. yunnanensis* Cheng & Fu.

## **1.1.2. Monographie de *Taxus baccata***

### **1.1.2.1. Nom et étymologie**

Le nom de genre *Taxus*, est du latin *taxicum* (poison) à l'origine de toxique [18].

Le nom d'espèce *baccata* viendrait du fait que le pied femelle porte des graines entourées d'une partie charnue (arille), l'ensemble ressemblant à une baie [18].

Les noms vernaculaires sont représentés dans le tableau 1.3.

**Tableau 1.3:** Dénominations de l'if commun (*Taxus baccata* L.)

Langue	Dénominations	Références bibliographiques
Arabe	Tarek ( )	[24]
Française	If commun, if européen, if à baies,	[24]
Berbère	Siguel, Sigeh, Imerouel	[24]
Anglaise	Common yew	[25]

### **1.1.2.2. Aire de répartition de l'espèce**

#### **1.1.2.2.1. Dans le monde**

L'espèce *Taxus baccata* est native de l'Europe du Nord et du centre et de la région méditerranéenne (Asie Mineure, Caucase, Afrique du Nord) [26].

Elle se trouve dans l'hémisphère Nord du globe terrestre. Elle existe dans toute la région méditerranéenne et même dans l'Europe centrale et méridionale, de la Grèce au Caucase jusqu'au Sud de la Scandinavie. En Grande Bretagne, au Nord de l'Espagne, en France dans les Vosges, dans les Alpes et en Asie mineure dans les Himalaya, la Chine et le Japon [27] [28] et au Nord d'Iran [29].

#### **1.1.2.2.2. En Afrique du Nord**

Selon BOUDY [30] et BABA AISSA [31] en Algérie, l'if commun se localise au niveau des montagnes humides. Il se trouve au sein du Parc National de Chréa (Atlas Blidéen), au sein du parc National de Djurdjura (Djurdjura), dans la forêt d'Ait Ouabane et la forêt d'Ait Issig-Issig, au niveau du Parc National de Taza, et dans les Aurès ; dans le Parc National de Belezma (P.N.B).

Au Maroc, il est en association avec le chêne vert dans l'étage bioclimatique semi-humide et surtout humide au moyen Atlas et le Rif [30].

### **1.1.2.3. Description botanique de *Taxus baccata* L.**

L'if peut atteindre 15 m de hauteur sur 3 à 4 m de circonférence. Il peut se trouver à l'état arbuste, pourvu de branches étalées horizontalement ou vers le bas, à rameaux grêles et à couronne oblongue-pyramidale ou irrégulière. Son tronc présente une écorce brune rougeâtre, profondément sillonnée [3].

Il a une croissance lente. Il est doté d'une longue longévité [3]. En Europe, on trouve des arbres adultes de 1000 à 1500 ans [18]. Il croît dans les forêts de feuillus ou de résineux et préfère les sols calcaires. L'if ne forme pas de peuplements forestiers trop importants, mais peut s'élever jusqu'à 1800 m [3].

#### **1.1.2.3.1. Aiguilles**

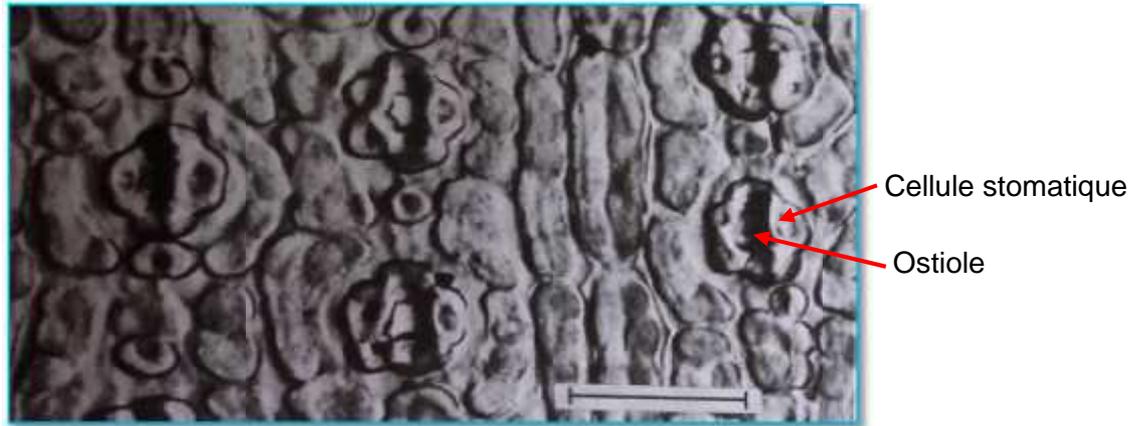
Les feuilles sont persistantes plates appelées aiguilles [18]. Elles sont disposées sur deux rangs de part et d'autre des rameaux (fig1.1) [32]. Elles sont brillantes, de couleur verte foncée sur le dessus et verte claire mate sur la face inférieure. Elles sont courtes, pouvant atteindre 35 mm de long et 2 mm de large [3].

Les stomates, disposés en rangs sur la face inférieure des aiguilles, constituent une caractéristique principale des aiguilles de l'if. Les cellules stomatiques situées en dessous au niveau de l'épiderme sont partiellement lignifiées et entourées de cellules secondaires papilleuses (fig 1.2). Il est à noter l'absence de canaux sécréteurs et d'hypoderme [3].



**Figure 1.1 :** Organes de *Taxus baccata* [33].

(A) Rameau mâle et ses fleurs, (B) Rameau femelle à maturité avec ses arilles ; (1 et 2) Fleur mâle ; (3) Fleur femelle ; (4, 5 et 6) Arille à différents stades de maturité ; (7) Coupe verticale de l'arille et de la graine ; (8) Coupe verticale de la fleur femelle.



**Figure 1.2 :** Epiderme inférieur des aiguilles de *Taxus* au microscope électronique à balayage [3].

### **1.1.2.3.2. Fleurs**

*Taxus baccata* L. est une espèce dioïque, ayant des pieds mâles et femelles distincts [18].

Les fleurs mâles, jaunes et très nombreuses, sont de minuscules chatons de forme sphérique situés sur de très petites pousses à l'aisselle des aiguilles (fig 1.1). Ils portent un nombre relativement grand d'étamines en forme d'écu avec 6 à 8 sacs polliniques [2]. La dissémination des graines de pollen se fait par voie anémophile [34].

Les fleurs femelles sont verdâtres, composées d'un ovule inséré dans une coupe entourée d'écailles. Elles sont situées à l'aisselle des aiguilles des jeunes rameaux (fig 1.1) [3]. Elles ressemblent à de petits bourgeons verdâtres [18]. Après la fécondation, ces fleurs femelles produisent de fausses baies rouges de la taille d'une petite olive appelées arilles qui entourent la graine [2].

### **1.1.2.3.3. Fruits**

Le fruit de l'if est un faux fruit issu du développement de l'écaille ovulifère, il est appelé arille [2]. Il s'agit d'une masse rouge charnue (fig1.1) d'aspect mucilagineux, à saveur douceâtre [3].

L'ensemble, graine et arille, mesurant de 10 à 12 mm de diamètre, ressemble à une baie, d'où l'appellation impropre de « baie d'if » [18].

L'arille est l'unique partie non toxique de l'arbre. Les oiseaux sont friands des arilles, restituent les graines intactes après passage dans leur tube digestif et contribuent ainsi à la dissémination de l'arbre [1].

#### **1.1.2.3.4. Graines**

Elles sont ovales (8 × 5mm) [18], ligneuses, luisantes, de couleur bruno-noirâtre, entourées d'un arille charnu en forme de coupe (fig1.1) [3]. On les trouve entre le mois d'août et le mois de novembre [18].

#### **1.1.2.3.5. Bois**

Le bois de l'if ne possède ni fibres interstitielles, ni poches ou canaux résinifères. Il est constitué par des cernes de croissance annuelle et des rayons médullaires particulièrement fins. Il se caractérise par la présence de forts épaisissements spiralés dans les trachéides, à l'origine de la très grande souplesse de son bois. Il y a peu de différence entre le bois clair initial et le bois final qui se met en place à la fin de l'été. L'ensemble a une texture homogène. C'est un bois élastique, dur, homogène, imputrescible et à forte résistance mécanique [35].

#### **1.1.2.4. Croissance de l'espèce *Taxus baccata* L.**

LEMOINE [36] souligne que la croissance de *Taxus* est très lente. Elle se caractérise par des cernes très minces, moins d'un millimètre. Cette croissance peut subir des arrêts au cours de la vie de l'arbre qui peuvent parfois durer plusieurs siècles. La difficulté de croissance est engendrée, en grande partie des positions écologiques, sols rocailloux et pauvres, ou étant sous un sous bois d'arbres plus grands tel que le Cèdre de l'Atlas.

### **1.1.2.5. Caractères écologiques et phytosociologiques de l'espèce**

Sur le plan écologique, l'if commun est une espèce qui apprécie une humidité atmosphérique élevée et résiste assez bien au froid. C'est une espèce rustique, craignant les sols sableux acides, se multiplie naturellement par graines et rejets de souches [37].

Du point de vue climatique, l'if commun se développe dans l'étage bioclimatique humide et subhumide, ses exigences en précipitations annuelles sont en moyenne de 1000 mm/an [38].

### **1.1.2.6. Composition chimique**

Différentes catégories de métabolites sont représentées dans les aiguilles et les tiges : oses, polysaccharides, et cyclitols, acides gras, stérols, bis-flavonoïdes (sciadopitysine, kayaflavone), proanthocyanidols, lignanes, hétérosides cyanogènes [11], composés phénoliques (3,5-diméthoxyphénol), flavonoïdes (myricétine) [39] [40].

Les constituants les plus intéressants sont des diterpènes tricycliques à noyau taxane notamment le taxol (paclitaxel), taxusine, taxagufine, baccatine III et dérivés, taxines (mélange complexe de taxine A, B et leurs dérivés), céphalomannine, taxicines et dérivés. Certains, comme les baccatines, sont strictement diterpéniques, d'autres sont des amides comme le taxol, un ester de la désacétylbaccatine III et de la *N* benzoyl-phénylisosérine, ou comme les taxines qui sont des esters de l'acide 3-diméthylamino-3-phénylpropionique. Du fait de la présence d'azote dans leur molécule, les amides diterpéniques sont parfois considérés comme des pseudo-alcaloïdes [11].

#### **1.1.2.6.1. Taxines**

Les nombreuses études menées conduisent à l'isolement de centaines de nouveaux métabolites [41]. Cependant, peu d'attention a été consacrée à la taxine (ou aux taxines) qui est le plus ancien et le plus notable des composés de l'if à avoir été mis en évidence. La taxine était considérée comme un composé pur avant de découvrir qu'il s'agit d'un mélange de plusieurs composés diterpéniques

d'où l'appellation des taxines [2]. Ils constituent approximativement 30% de toute la fraction d'alcaloïde de *T. baccata* [40] et sont responsables de sa toxicité [42].

Les taxoïdes du type du paclitaxel (taxol) dans lesquels l'azote amino-acide fait partie d'un groupement amide n'ont pas de propriété basique. Par cette propriété ils diffèrent des composés appartenant aux taxines. Ainsi, les taxines sont à différencier des taxanes [43].

Des analyses supplémentaires par spectrophotométrie, chromatographie et par infrarouge ont permis de déterminer deux taxoïdes majoritaires : la taxine A [44] et la taxine B qui est la composante principalement responsable de la toxicité de l'if [3].

#### **1.1.2.6.2. Taxol**

Le taxol est un composé dérivé des taxanes, il a été isolé pour la première fois à partir de l'écorce de *Taxus brevifolia* Nutt. [45] et revêt une importance particulière ces dernières années [3].

#### **1.1.2.7. Toxicité de l'if**

Toutes les espèces du genre *Taxus* sont toxiques. Cette toxicité est décrite dès le 2<sup>ème</sup> siècle avant JC [46]. Ainsi, le prince des Eburons (peuple germanique des rives du Rhin), CATAVOLCUS, qui combattait Jules CESAR, échappa à l'emprisonnement en se donnant volontairement la mort à l'aide de *Taxus baccata* L. [47]. Les celtes réalisaient des suicides rituels en buvant de l'extrait des feuillages d'if et ils utilisaient la sève pour fabriquer des flèches empoisonnées durant les campagnes de Jules César en Gaule [48]. Certaines civilisations primitives utilisaient même l'extrait d'if comme poison pour la chasse [49].

Durant le 18<sup>ème</sup> et le 19<sup>ème</sup> siècle on utilisait en Europe et en Inde des décoctions d'aiguilles d'if comme emménagogue et comme abortif à des doses appropriées [2].

L'intoxication se traduit par des signes d'irritation buccale et œsophagienne puis par des troubles digestifs. S'observent ensuite des difficultés respiratoires et cardio-vasculaires (ralentissement du rythme cardiaque), se manifestant par des tremblements d'origine nerveuse, vertiges, dilatation des pupilles, maux de tête, excitation ou, au contraire, somnolence et délire. Une phase de convulsions peut annoncer la mort dans les cas les plus graves, par collapsus respiratoire et insuffisance rénale aigue [1].

La toxicité de l'if est due à plusieurs taxoïdes appelés taxines qui sont les taxoïdes les plus présents dans l'if. Les taxines sont présentes dans toutes les parties de la plante à l'exception de l'arille [46]. La teneur en substances toxiques reste constante dans le matériel végétal (frais ou sec) tout au long de l'année avec un maximum de concentration en hiver [49] [50].

On rapporte que la dose mortelle pour un adulte est de 50 g d'aiguilles d'if qui correspond à 250 mg de taxines ou approximativement 3 mg de taxines par kilogramme de poids corporel [40].

*Taxus baccata* et *Taxus cuspidata* sont les deux espèces de *Taxus* dans lesquelles les concentrations en taxines sont les plus importantes [2].

## 1.2. Taxol

Les premiers échantillons d'écorce de *T. brevifolia* (if du Pacifique) ont été récoltés par le département d'agriculture des Etats-Unis (USDA) en 1962 dans le cadre d'un programme de recherche du Centre de service national de chimiothérapie (CNSC) de l'institut national du cancer (NCI) [2].

Le Taxol fut isolé comme le composé actif de l'extrait d'écorce en 1969. Un tournant dans le développement du taxol était la découverte de son unique mécanisme d'action. Cette découverte a démontré que le taxol n'était pas un simple autre agent cytotoxique [51].

### 1.2.1. Structure et propriétés chimiques du taxol

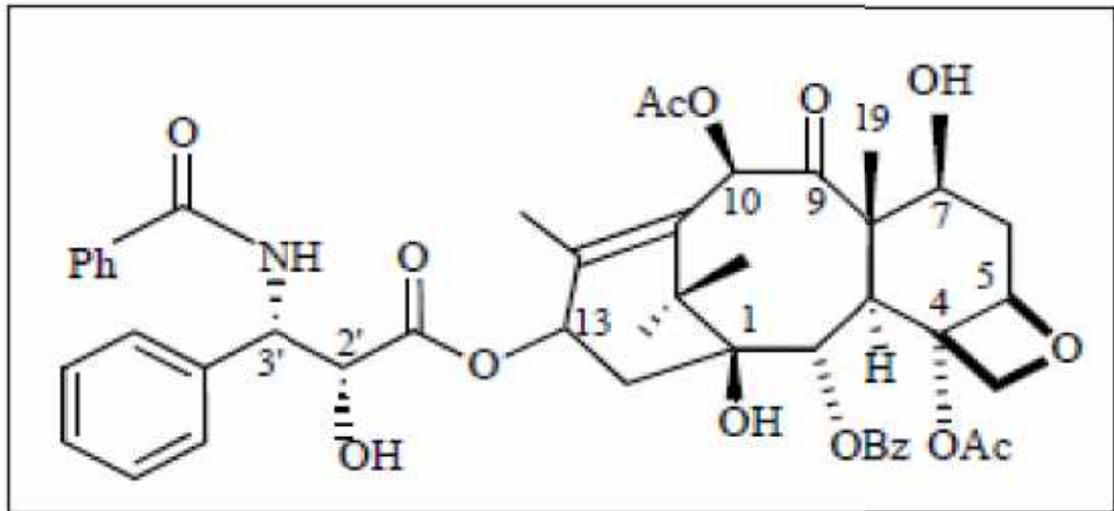
Le taxol (paclitaxel) est un composé diterpénique appartenant à la sous-classe des taxanes. Cette sous-classe de composés se caractérise par la présence d'un squelette taxène du type méthanobenzocyclodécène polyoxygéné. Le taxol, en particulier, a en plus un cycle oxétane accolé en position 4 et 5 et une chaîne latérale du type ester liée au C13 (fig 1.3). Ce produit naturel présente 11 centres chiraux [2]. Sa formule brute est  $C_{47}H_{51}NO_{14}$  avec une masse molaire de **853,9** g/mol [52].

La dénomination chimique du taxol selon PANCHAGNULA [52] est:  
5, 20-epoxy-1,2, 4,7, 13 - hexahydroxytax-11-en-9one-4, 10-diacetate-2-benzoate 13 ester avec (2R, 3S)-*N*-benzoyl-3-phenylisoserine.

Le taxol n'a pas de propriétés basiques, il diffère des composés appartenant aux taxines [43].

En effet, le taxol est très faiblement soluble dans les phases aqueuses. La mise au point d'une formulation pour administrer le taxol comme médicament a été très difficile car il était indispensable de le solubiliser dans une phase organique [2]. Les recherches ont mis au point une formulation à base de Cremophor® EL

(toxique et allergisant) et d'éthanol. Les scientifiques recherchent encore des formulations optimisées du Taxol® [53].



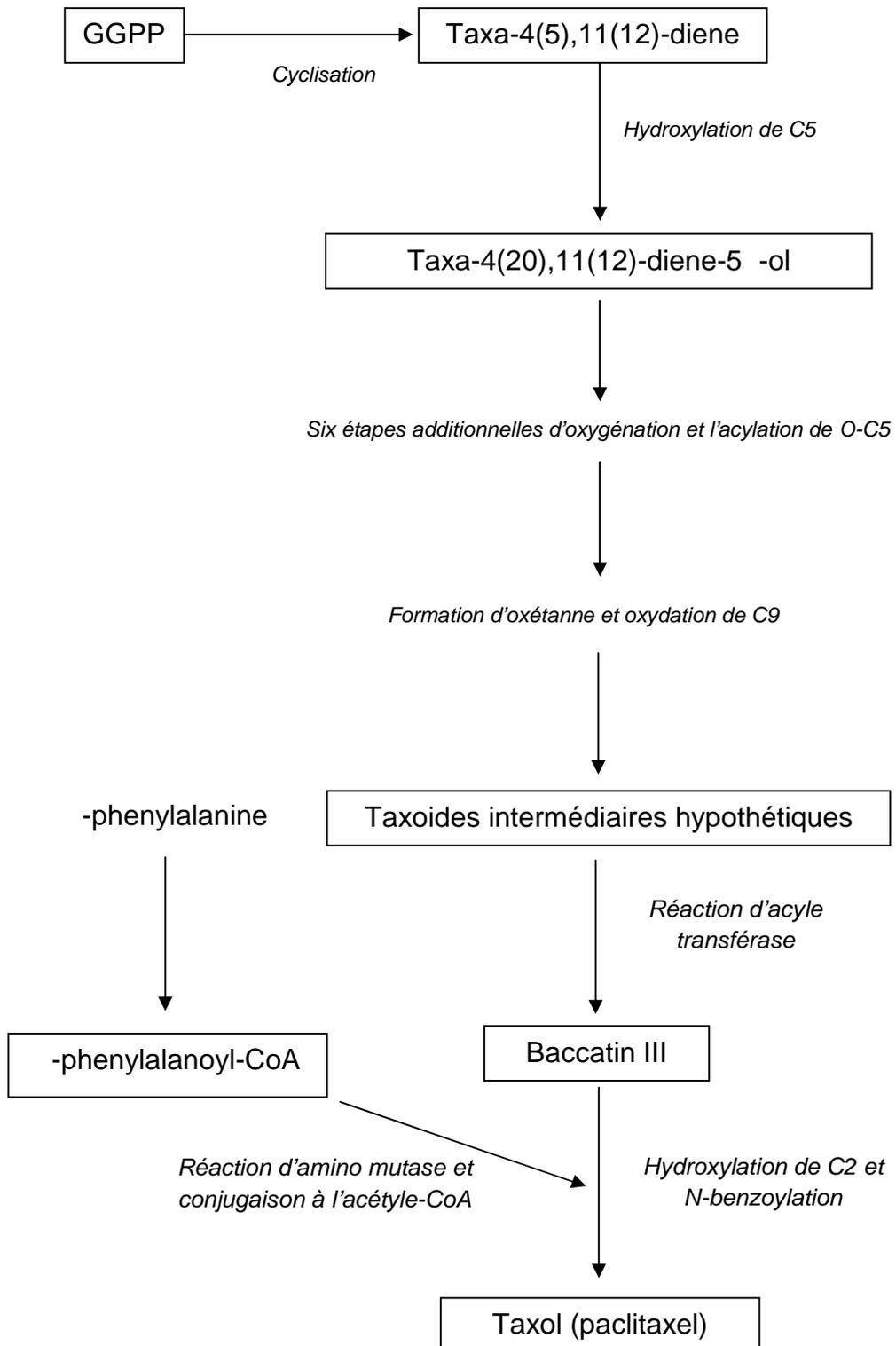
**Figure 1.3** : Structure du taxol [15].

### 1.2.2. Biosynthèse de taxol

La voie biosynthétique de taxol n'est pas encore complètement élucidée. Il est connu que la première étape est la cyclisation du geranylgeranyl diphosphate (GGPP) aux taxa- (4.5), (11.12) - diène. La réaction est catalysée par la taxadiène synthase (TXS) [13]. Cette enzyme est une protéine monomérique du 79 kDa [13], elle a été purifiée par HEZARI et *al.*, [54] (fig 1.4).

Les groupes d'oxygène et d'acyle sont ajoutés au noyau taxane par oxygénation à des positions multiples par des cytochromes P450 mono-oxygénases. Après la formation d'un précurseur polyhydroxylate hypothétique, la benzylation et l'acétylation mènent au baccatin III.

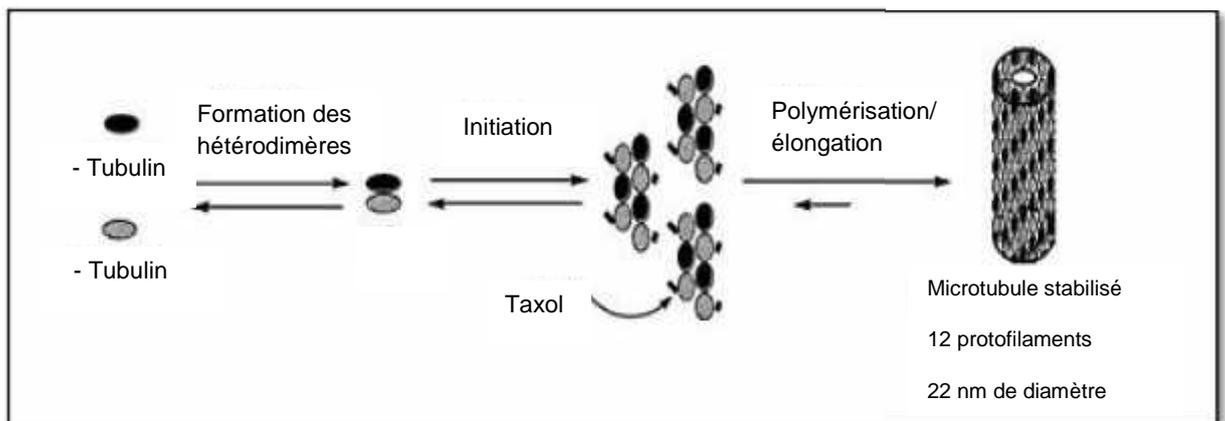
Une autre étape essentielle dans la biosynthèse de taxol est l'estérification du baccatin III avec la chaîne latérale de -phenylalanoyl-CoA dérivée du -phenylalanine, une réaction catalysée par la C-13-phenylpropanoyl-CoA transférase (BAPT). Par la suite, une hydroxylation et une nouvelle benzylation rapportent le composé final, qui est le taxol [13].



**Figure 1.4** : Biosynthèse du taxol [15].

### 1.2.3. Mécanisme d'action

Le taxol est un poison du fuseau mitotique [11]. Son mode d'action est très particulier : il promeut l'assemblage des dimères de tubuline en microtubules qu'il stabilise en inhibant leur dépolymérisation [55] (fig1.5). Cette stabilité inhibe la réorganisation dynamique normale du réseau microtubules, indispensable au fonctionnement et à la multiplication cellulaire [11]. Les agents anticancéreux de ce type sont aujourd'hui communément appelés stabilisateurs du fuseau [2].



**Figure 1.5 :** Mécanisme d'action du taxol [51].

### 1.2.4. Pharmacologie et emplois du taxol

La première indication de la molécule a été le traitement des carcinomes de l'ovaire. Par la suite, d'autres indications lui ont été reconnues [11] :

-traitement des carcinomes métastatiques du sein pour les patientes en échec, ou non candidates, au traitement classique à base d'anthracycline ;

-traitement, en association avec le cisplatine du cancer bronchique non à petites cellules chez les patients qui ne sont pas candidats à une chirurgie potentiellement curative et/ou une radiothérapie ;

-traitement des patients en stade avancé de sarcome de Kaposi lié au SIDA et après échec d'un traitement antérieur par des anthracyclines liposomales.

### **1.2.5. Source de taxol**

Une façon de suppléer à la demande croissante en Taxol® (médicament) est d'extraire le paclitaxel ou ses molécules associées à partir des autres espèces du genre *Taxus*. En effet, toutes les espèces du genre *Taxus* contiennent des taxanes, leurs taux et leur nature peuvent varier selon l'espèce, le tissu analysé [56] et l'environnement [10].

Depuis sa découverte, des efforts considérables ont été investis dans l'essai d'optimiser son extraction [12]. Le taxol est présent à des faibles concentrations dans la plante qui varient entre 0,01 et 0,1% [11]. Ainsi SCHIPPMANN [57] signale que pour produire seulement 1 kg du taxol, nous avons besoin de 10 000 kg d'écorce soit 3000 arbres.

Une étude systématique du genre *Taxus* a abouti à la sélection de cultivars dont les aiguilles constituent une source exploitable et renouvelable de taxol. La teneur en taxanes des aiguilles du *Taxus x media* dépasse 0,1%, celle en taxol peut atteindre 0,06%, notamment chez le cultivar *hicksii*. Le rendement en taxol est étroitement dépendant du processus du séchage (40-50°C) [11]. De plus, cette extraction exige un système complexe et des techniques spécifiques de purification en utilisant une technologie onéreuse et de pointe [12].

La voie classique d'accès au taxol consiste à le préparer par hémisynthèse, en couplant un -Lactame de la *N*-benzoyl-phénylisosérine et la 10-désacétylbaccatine III convenablement protégée. Cette désacétylbaccatine III est présente, en quantité plus importante (0,02-0,1%), dans une matière première aisément renouvelable ; les feuilles de *Taxus baccata*, ou encore celles de différents cultivars d'autres espèces [11].

Une alternative et une source durable de taxol et de composés analogues est la culture *in vitro* [12]. Cette méthodologie offre plusieurs avantages ; n'étant pas soumis au temps, saison ou l'endroit, le matériel peut être développé indépendamment de son origine et sans détruire l'espèce [15].

### **1.3. Production du taxol in vitro**

Le terme culture de tissu végétal se rapporte largement à une culture aseptique *in vitro* de n'importe quel segment de végétal. Il y a cinq types principaux de cultures de plante comprenant des plantules (plante entière), des embryons, des organes, des cellules (callogenèse) et des protoplastes [16].

Selon MALIK et *al.*, [12], deux approches sont appliquées pour la production de taxol *in vitro* ; l'induction des cals (callogenèse) et l'établissement de suspension cellulaire.

#### **1.3.1. Callogenèse**

En culture *in vitro*, le cal est un tissu néoplasique relativement homogène initialement, constitué de cellules dédifférenciées qui se divisent plus ou moins activement [58].

##### **1.3.1.1. Principaux facteurs contrôlant la callogenèse**

###### **1.3.1.1.1 Explant initial**

L'aptitude à la callogenèse peut varier suivant plusieurs facteurs dont l'explant qui est mis en culture et ainsi qu'à l'espèce de laquelle dérive l'explant [59].

Le premier rapport sur l'induction et la prolifération des cals à partir des gamétophytes de *T. baccata* a été édité en 1973 par ROHR [60]. Différents explants notamment les cotylédons, les hypocotyles, les racines juvéniles, tiges, gamétophytes et aiguilles, ont été employés pour l'induction de cals de *Taxus baccata* [12]. Selon BRUNAKOVA et *al.*, [61] les jeunes tissus des plantes juvéniles sont plus callogènes que les tissus de plantes âgées. En outre, la croissance des cals et la production des taxanes sont dépendantes de l'arbre lui-même [62].

### **1.3.1.1.2. Milieu de culture**

Les milieux de la culture cellulaire se composent habituellement de plusieurs éléments inorganiques, les macroéléments (N, P, K, Mg<sup>2+</sup> et Ca<sup>2+</sup>) et les micro-éléments (Fe<sup>2+</sup>, Mn<sup>2+</sup>, Zn<sup>2+</sup>, Mo<sup>2+</sup>, Co<sup>2+</sup>, Cu<sup>2+</sup>, B<sup>3+</sup>), de quelques éléments organiques notamment les vitamines et les acides aminés, ainsi que les régulateurs de croissance (phytohormones), en association avec une source de carbone. Cette composition a des effets profonds sur la croissance des cellules et l'accumulation des métabolites secondaires, et doit être optimisée selon l'espèce et le processus de production [16].

Différents milieux de base comme Murashige et Skoog [63], Gamborg [64], Schenk et Hildebrandt [65] et Woody Plant Medium [66] ont été utilisés pour l'induction et la maintenance des cals de *Taxus baccata* L.

### **1.3.1.1.3. Régulateurs de croissances**

Ils constituent la classe la plus importante pour l'induction de cals. En effet, l'initiation des cultures n'est possible que si le milieu contient des concentrations relativement importantes d'auxine (>10<sup>-5</sup> M). L'auxine synthétique la plus efficace est probablement le 2,4-D, cependant d'autres auxines ont été utilisées comme l'ANA, le 30 dicamba, le 2,4,5 -T et le picloram [67] [68].

Les cytokinines, sont souvent utilisées pour stimuler la prolifération des tissus en culture à faible concentration (10<sup>-6</sup> à 10<sup>-5</sup> M). A une concentration plus élevée (10<sup>-5</sup> à 10<sup>-4</sup> M) elles sont largement employées pour déclencher la néoformation de bourgeons sur des cals [58].

Selon MONACELLI *et al.*, [69] l'acide 2,4 dichlorofenoxyacetic (2,4-D) en combinaison avec la kinétine donne de meilleurs résultats sur l'induction des cals de *Taxus baccata* L.

#### **1.3.1.1.4 Environnement**

##### **1.3.1.1.4.1. Lumière**

La lumière peut stimuler la prolifération et la croissance des cals [70]. Cependant, dans le cas de *Taxus baccata*, l'obscurité convient plus à la croissance des cellules et à la production de taxol [71] [72]. Selon BRUNAKOVA et al., [61] les cultures cellulaires incubées sous une photopériode de 16/8 heures ont révélé une diminution de croissance.

##### **1.3.1.1.4.2. Température**

La température des salles de culture est habituellement réglée de façon constante à 22 -25°C. Cependant, la température réelle des tissus à l'intérieur des récipients de culture peut être supérieure de 2 à 4°C, c'est pourquoi il est préférable de régler la température de la salle à 2°C au-dessous de celle exigée par l'espèce [59].

#### **1.3.2. Suspension cellulaire**

Les suspensions cellulaires sont initiées en inoculant des cals friables dans un milieu liquide [12].

La plupart des études sur la production de métabolites secondaires dans des tissus végétaux ont été effectuées principalement dans des suspensions cellulaires. Cette technique a l'avantage d'avoir des conditions de culture uniformes, une croissance plus rapide, et des applications à grande échelle maîtrisables. En expérimentation, les petits volumes (par exemple, 10-100 ml) de suspension cellulaire sont habituellement maintenus dans des erlenmeyers sur un secoueur automatique [16].

Les cellules végétales en suspension ont différentes caractéristiques morphologiques et de croissance de celles des micro-organismes, tels que leur

grande taille, la formation de grands agrégats, une sensibilité à l'agitation et une croissance lente [16].

Elles forment des agrégats de plusieurs à quelques centaines de cellules, dont la taille globale varie selon l'espèce, les conditions de culture et l'intensité de l'agitation [73]. Un degré approprié d'agrégation peut être favorable à l'accumulation de métabolites secondaires, mais la formation de très grands agrégats peut ralentir la croissance et diminuer la productivité [16]. KOLEWE et *al.*, [74] signalent que ces agrégats sont sujets à de différents micro-environnements en ce qui concerne la disponibilité des éléments nutritifs, la signalisation de cellule-à-cellule, et les forces d'agitation extérieures appliquées.

#### **1.4. Optimisation de la production du taxol**

Dans les conditions de culture *in vitro*, les substances recherchées sont le plus souvent présentes en très faible quantité par rapport à la plante mère [75]. De nombreux essais d'optimisation de la production du taxol ont été effectués en associant différents paramètres : environnement, milieux de culture, l'apport des éliciteurs et des précurseurs des molécules ciblées et utilisation d'un système de culture biphasé [12].

##### **1.4.1. Facteurs environnementaux**

Les facteurs environnementaux comme la lumière, la température, le rayonnement UV, l'ozone et le CO<sub>2</sub> ont une influence directe et indirecte sur l'élaboration des métabolites secondaires [76].

Quant à l'espèce *Taxus baccata*, l'obscurité convient plus à la croissance des cellules et à la production de taxol [71] [72] [77]. HIRASUNA et *al.*, [72] ont rapporté que la couleur des milieux des suspensions cellulaires vire vers le vert s'ils sont exposés à la lumière continue et la production du taxol est inhibée.

### **1.4.2. Milieu de culture**

La composition du milieu de culture a des effets profonds sur la croissance des cellules et l'accumulation de métabolites secondaires et doit être optimisée selon l'espèce et le processus de production [16].

Selon MALIK et *al.*, [12] la production des taxanes dépend considérablement de la source et de la concentration du carbone utilisé. Les sources de carbone testées dans la production de taxol dans des cultures cellulaires du *Taxus* sp. ont donné des réponses différentes. HIRASUNA et *al.*, [72] ont signalé que la production de taxol est améliorée en utilisant le fructose et inhibée en utilisant le glucose.

Quant aux régulateurs de croissance, différentes concentrations et combinaisons des auxines (NAA, 2,4-D, picloram) et des cytokinines (kinétine, BAP) ont été testés dans des suspensions cellulaires du *Taxus baccata*. L'utilisation du milieu de GAMBORG auquel sont ajoutés l'hormone le picloram (2mg/l), la Kinétine (0.1 mg/l), sucrose (3%) et le méthyle jasmonate (100  $\mu$ M) a amélioré significativement la production du taxol [78]. Tandis que HIRASUNA et *al.*, [72] ont signalé que le picloram favorise la croissance des cellules mais il inhibe la production du taxol.

### **1.4.3. Apport d'éliciteurs**

Un grand nombre de métabolites secondaires appartiennent au groupe des phytoalexines qui sont des substances synthétisées par les plantes en réaction à un stress d'origine chimique, physique, ou correspondant à une attaque par un agent pathogène [79]. Le terme d'éliciteur au sens large, est donné donc aux molécules ou aux agents qui induisent la synthèse de phytoalexines dans les plantes. Ces éliciteurs peuvent être biotiques (extraits des microorganismes) ou abiotiques (irradiation, U.V., ions métalliques, substances chimiques) [80].

L'utilisation des éliciteurs se montre très efficace pour augmenter le rendement du taxol dans les cultures cellulaires des espèces de *Taxus* [81] [82] [83].

Les éliciteurs abiotiques utilisés dans les cultures cellulaires de *Taxus baccata* sont le vanadyl sulfate, l'acide jasmonique, le méthyle jasmonate, nitrate d'argent, l'acide arachidonique, citrate d'ammonium et l'acide salicylique [12].

YUKIMUNE et *al.*, [82] a rapporté que l'addition de méthyle jasmonate, dans le milieu de culture a augmenté la production du taxol avec 48.3 mg/l dans des cultures de cellules après deux semaines de culture.

Certains auteurs ont utilisé des extraits de champignons pour activer les gènes de défense des cellules végétales. KHOSROUSHAHI et *al.*, [84] ont combiné trois types d'éliciteurs, un extrait de champignon *Rhizopus stolonifera* (25 mg/l), méthyle jasmonate (10 mg/l) et l'acide salicylique (100 mg/l). Cette combinaison a augmenté la production du taxol par un facteur de 16 après 30 jours de culture comparée au témoin.

Des études précédentes ont montré que l'exposition des cellules végétales aux ultrasons augmente la biosynthèse de certains métabolites secondaires comme les ginsenosides saponins par *Panax ginseng* [85], shikonins par *Lithospermum erythrorhizon* [86], et le taxol par *Taxus chinensis* [87].

Un problème majeur associé aux cultures cellulaires de *Taxus*, principalement rencontré dans les cultures produisant des niveaux élevés du taxol, est la réduction de croissance et la mort cellulaire [88].

#### **1.4.4. Apport de précurseurs**

Dans certaines situations, dans le but de raccourcir les processus métaboliques et d'augmenter la biosynthèse de composés spécifiques, il est possible de fournir au matériel végétal des précurseurs des composés d'intérêt [76]. Ainsi, KHOSROUSHAHI et *al.*, [84] ont mis au point un protocole utilisant le phénylalanine comme précurseur en vue de stimuler la synthèse de taxol chez *Taxus baccata*. L'addition dans le milieu de culture la phénylalanine, combinée à

AgNO<sub>3</sub>, VSO<sub>4</sub>, CoCl<sub>2</sub>, sucrose, et ammonium citrate provoque une augmentation de la production du taxol avec un facteur de 5,6 comparée au témoin.

#### **1.4.5. Utilisation de système biphasé de culture**

Le taxol est un métabolite synthétisé par les cultures cellulaires en phase stationnaire. Par conséquent, un système à deux phases où les cellules sont d'abord cultivées dans un milieu pour la production de biomasse et ensuite transférées sur un milieu favorable à la production du taxol est une stratégie efficace. Ce système biphasique a l'avantage supplémentaire parce qu'il permet d'ajouter des précurseurs et des éliciteurs quand la production de métabolites secondaires est à l'extrême [12]. Cette stratégie est utilisée avec succès dans les cultures cellulaires de *Taxus brevifolia* [89] et *Taxus cuspidata* [90], contrairement au *Taxus baccata* où aucun résultat n'est rapporté [12].

#### **1.5. Travaux réalisés sur *Taxus baccata* L. en Algérie**

En Algérie, *Taxus baccata* L. est déclarée comme une espèce menacée, et en voie de disparition [91].

La régénération de *Taxus baccata* L. par les méthodes traditionnelles s'est montrée difficile. La propagation par semis de cette espèce a donné un taux de germination des graines nul. Cependant, les boutures ligneuses ont débourrées et elles sont restés en activité pendant 3 mois jusqu'à l'épuisement des réserves puis elles se sont desséchées [92].

Ainsi, les travaux réalisés sur la culture *in vitro* de *Taxus baccata* L. sont principalement concentrés sur la micropropagation de cette espèce. Les résultats de germination obtenus sont négatifs avec un taux de 0%. Ils montrent la double dormance tégumentaire des graines [93] [94] [95].

## CHAPITRE 2.

### MATERIEL ET METHODES

Nous avons réalisé notre travail dans les laboratoires de :

- Culture *in vitro*, entreprise d'horticulture et d'espace vert (EHEV) » de Bab El-Ezzouar (Alger) (Induction des cals);

- Amélioration des plantes, au département des biotechnologies (suspension cellulaire) et laboratoire des biotechnologies végétales (coupes histologiques) au département de biologie et physiologie cellulaire, faculté des sciences de la nature et de la vie, université de Blida 1 ;

-Laboratoire central de l'intendance à El Harrach (Alger) (Extraction et dosage du taxol).

#### **2.1. Aptitude à la callogenèse de *Taxus baccata* L.**

Dans cette partie, nous allons étudier la méthode de stérilisation adéquate à adopter, la réaction des explants, l'effet de la composition minérale des milieux de culture et l'apport des régulateurs de croissance sur l'aptitude à la callogenèse de *Taxus baccata* L.

##### **2.1.1. Matériel végétal**

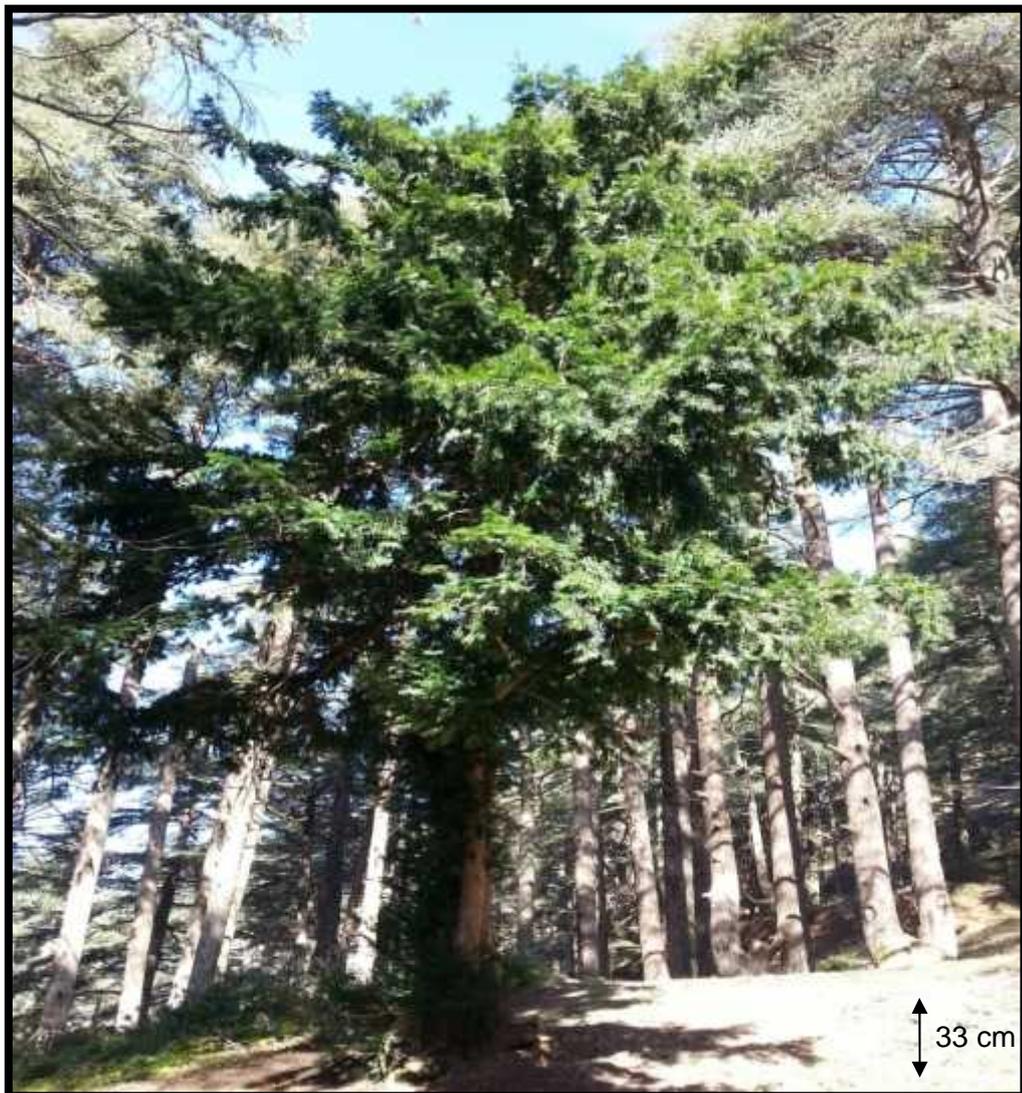
Le matériel végétal choisi est représenté par des organes juvéniles de l'année, aiguilles et pousses de *Taxus baccata* L.

La récolte s'est effectuée le 31 octobre 2013 sur une micro-population d'arbres adultes, au niveau du Parc National de Chréa située à 1400 m d'altitude.

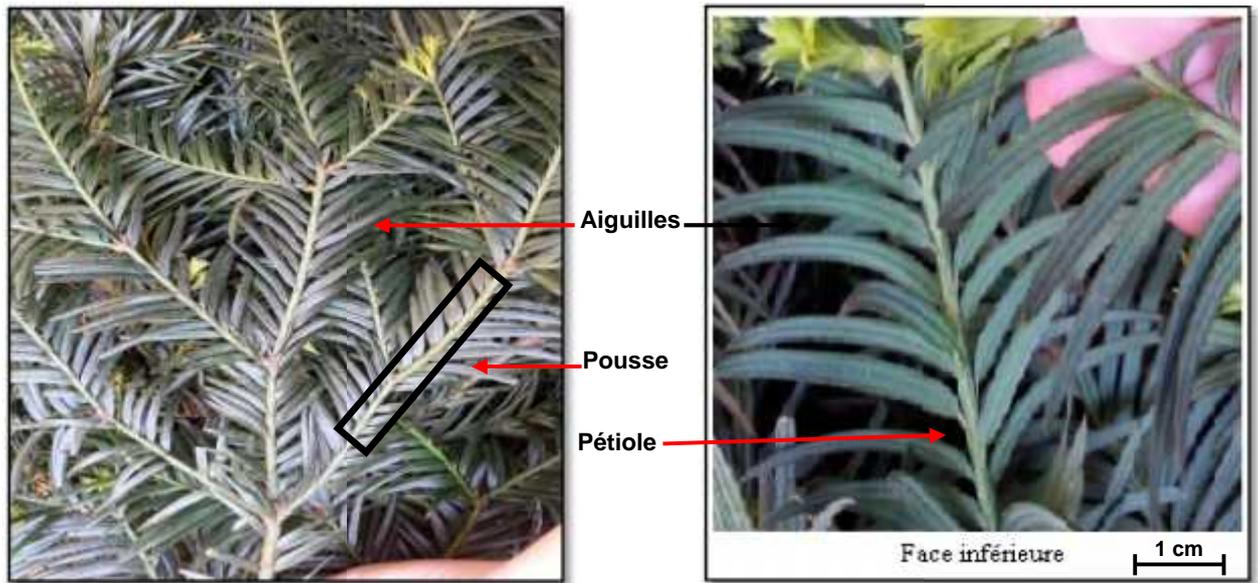
### 2.1.2. Description du végétal

L'âge, l'environnement et les tailles éventuelles confèrent aux ifs communs des silhouettes diverses (fig 2.1). L'identification est assurée par les caractéristiques spécifiques au genre. Les feuilles sont des aiguilles plates (30mm x 3mm) possédant une fine pointe non piquante à leurs bouts, et fixées à la branche par un court pétiole (fig 2.2).

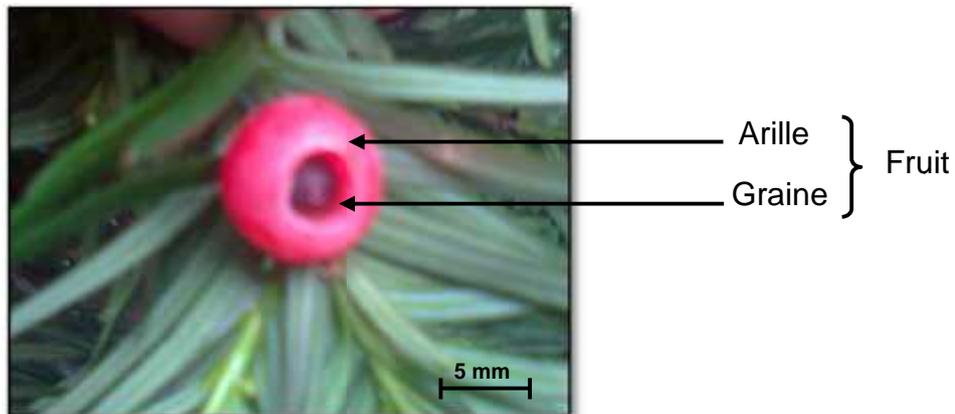
En automne (novembre) nous avons remarqué la maturité des fruits de l'if commun. Ce dernier est un conifère particulier, leurs fructifications ne sont pas des cônes. La graine est entourée par une masse rouge charnue appelée arille (fig 2.3 et 2.4).



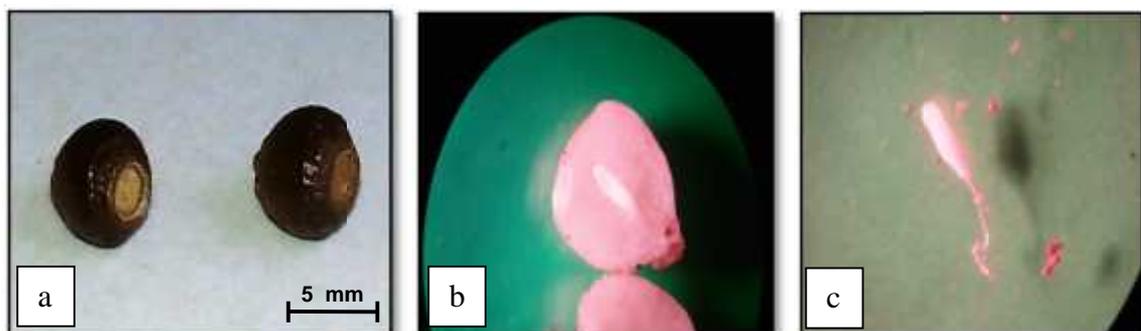
**Figure 2.1** : Vue générale d'un arbre de *Taxus baccata* L. de la région de Chréa.



**Figure 2.2 :** Aiguilles et pousses de *Taxus baccata* L.



**Figure 2.3 :** Fruit de *Taxus baccata* L. (30/ novembre / 2013).



**Figure 2.4 :** Graine de *Taxus baccata* L.

(a) : Aspect de graines ; (b) : Coupe longitudinale au niveau de la graine observée sous loupe (Gx16) ; (c) : Embryon extrait de la graine observé sous loupe (Gx 40)  
(30/ novembre / 2013).

### **2.1.3. Milieux de culture**

Trois milieux de base ont été utilisés dans notre expérimentation dont la composition figure dans les annexes 1,2 et 3 :

- **MS** : le milieu de culture de MURASHIGE et SKOOG [63] ;
- **B5** : Le milieu de GAMBORG [64] ;
- **WPM** : Le milieu de culture Woody Plant Medium [66].

Les hormones de croissance testées sont :

- **2,4-D** : l'acide 2,4-dichlorophénoxyacétique ;
- **Kin** : la kinétine ;
- **GA3** : l'acide gibbérellique 3.

#### **2.1.3.1. Préparation des milieux de culture**

Les milieux de base (**MS**, **B5** et **WPM**) ont été réalisés à partir des solutions mères. Ces dernières ont été préparées avec de l'eau distillée stérile et ont été conservées à une température basse de 2°C afin d'inhiber le développement des microorganismes.

Quant aux hormones de croissance, des solutions mères de 0,1 mg/ml de **2,4-D**, de **Kin** et de **GA3** ont été préparées en pesant 0,01g de chaque produit pour 100 ml d'eau distillée stérile. Quelques gouttes des solvants KOH (1N), HCl (1N) et eau distillée sont utilisées pour dissoudre ces hormones (Annexe 4). Toutes les solutions mères sont conservées à une température basse (2°C) dans des flacons bruns.

Pour chaque milieu utilisé (**MS**, **B5** et **WPM**) on ajoute 100 mg/l de l'acide ascorbique et on complète avec de l'eau distillée puis on ajuste le pH à 5,8. On ajoute graduellement sur une plaque chauffante, d'une manière uniforme jusqu'à l'ébullition, les éléments suivants :

- 20 g/l de sucrose utilisé comme source de carbone [4] ;

- 7 g/l d'agar utilisé comme agent gélifiant ;

- 0,5 g/l de charbon actif utilisé comme antioxydant pour diminuer le brunissement dû à l'oxydation des composés polyphénoliques sécrétés par les explants. Ce phénomène est particulièrement marqué chez les ligneux [2].

On laisse le mélange refroidir vers 45°C, et on ajoute les hormones de croissance. On coule le milieu dans des tubes de 20 cm de longueur à raison de 15 ml par tube. Ils sont ensuite autoclavés à une température de  $120 \pm 5^\circ\text{C}$  pendant 20 minutes. La durée de la stérilisation est très importante et doit être variée en fonction du volume des milieux contenus dans les récipients [96].

#### **2.1.4. Stérilisation du matériel végétal**

La difficulté de stérilisation tient de la nécessité absolue de la destruction totale des micro-organismes par les produits testés sans que les cellules de tissus, qui sont aussi sensibles que les bactéries et les champignons, soient abîmées.

Nous avons réalisé une étude comparative de deux techniques de stérilisation. Un fongicide contenant la matière active Thiophanate-Méthyle et un peroxyde d'hydrogène ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) (Tableau 2.1). Toutes les étapes de désinfection ont lieu sous une hotte à flux laminaire.

La stérilisation se fait sur les pousses entières. Ce n'est qu'à l'issue de la procédure que l'on sectionne les aiguilles à mettre en culture. En effet, si on sectionne les aiguilles avant la stérilisation, les produits stérilisants pourront

facilement diffuser à l'intérieur du végétal à travers des points de section et provoquent des altérations (nécroses).

Pour chaque technique de stérilisation et chaque explant (pousses et aiguilles), nous avons utilisé 90 tubes soit au total 360 explants testés.

Toutes les solutions désinfectantes sont préparées avec de l'eau distillée stérile. La verrerie et les pinces sont stérilisées dans une étuve à  $200 \pm 5^\circ\text{C}$  pendant deux heures avant la manipulation.

**Tableau 2.1** : Stérilisation du matériel végétal.

Stérilisation au fongicide	Stérilisation au H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>
Rinçage à l'eau courante du matériel végétal (pousses et aiguilles)	
Rinçage à l'eau distillée stérile	
20 min sous agitation dans une solution de fongicide (1g/l)	Immersion rapide dans l'éthanol à 70°
Immersion rapide dans l'éthanol à 70°	5 min dans NaClO (13°) dilué à 50%
10 min dans NaClO (13°) dilué à 75%	15 min sous agitation dans une solution de : H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (10V) + quelques gouttes de TWEEN 20 à 1 % v/v (2 répétitions)
5 rinçages à l'eau distillée stérile en changeant l'eau à chaque rinçage pendant 15, 15, 10, 10 et 5 minutes respectivement.	

Deux rinçages avec de l'eau distillée stérile ont été réalisés après chaque étape pendant 15 et 10 minutes respectivement. Après la stérilisation, on dépose notre matériel végétal sur un papier filtre stérile avant la mise en culture.

### 2.1.5. Mise en culture des explants

Les explants de 0,9 à 1 cm de long issus des aiguilles et des pousses désinfectées ont été placés horizontalement sur le milieu de culture dans des tubes de 20 cm. L'incubation a eu lieu à l'obscurité à  $25 \pm 2^\circ\text{C}$  dans une chambre de culture.

Les régulateurs de croissance testés (**2,4-D**, **Kin** et **GA3**) sont apportés seuls ou combinés entre eux à différentes doses dans les trois milieux de base (**MS**, **B5** et **WPM**) soit au total 15 combinaisons testées. Les mêmes milieux sont testés pour les explants provenant de pousses et d'aiguilles à raison de 30 explants pour chaque essai soit au total 450 pour chaque type d'explant (tableau 2.2).

**Tableau 2.2** : Milieux de culture utilisés.

Milieu de base	Hormones de croissance	Milieu de culture
<b>MS</b> <b>B5</b> <b>WPM</b>	<b>M<sub>0</sub></b> : témoin sans hormones	<b>MS (M<sub>0</sub>)</b> <b>B5 (M<sub>0</sub>)</b> <b>WPM (M<sub>0</sub>)</b>
<b>MS</b> <b>B5</b> <b>WPM</b>	<b>M<sub>1</sub></b> = 0,75 mg/l de <b>Kin</b> + 0,75 mg/l de <b>2,4-D</b>	<b>MS (M<sub>1</sub>)</b> <b>B5 (M<sub>1</sub>)</b> <b>WPM (M<sub>1</sub>)</b>
<b>MS</b> <b>B5</b> <b>WPM</b>	<b>M<sub>2</sub></b> = 2 mg/l de <b>2,4-D</b>	<b>MS (M<sub>2</sub>)</b> <b>B5 (M<sub>2</sub>)</b> <b>WPM (M<sub>2</sub>)</b>
<b>MS</b> <b>B5</b> <b>WPM</b>	<b>M<sub>3</sub></b> = 2 mg/l de <b>Kin</b>	<b>MS (M<sub>3</sub>)</b> <b>B5 (M<sub>3</sub>)</b> <b>WPM (M<sub>3</sub>)</b>
<b>MS</b> <b>B5</b> <b>WPM</b>	<b>M<sub>4</sub></b> = 1mg/l de <b>Kin</b> + 1mg/l de <b>2,4-D</b> + 0,5mg/l de <b>GA3</b>	<b>MS (M<sub>4</sub>)</b> <b>B5 (M<sub>4</sub>)</b> <b>WPM (M<sub>4</sub>)</b>

### **2.1.6. Repiquage des cals**

Après l'obtention de cals des explants de pousses et d'aiguilles, une fragmentation en subcultures a été réalisée. Les parties d'un même cal ont été déposées dans une boîte de Petri étiquetée pour suivre leur poids. Ces dernières sont ensuite fermées avec du parafilm pour éviter les contaminations et le dessèchement du milieu de culture.

### **2.1.7. Paramètres mesurés**

Les effets de la composition minérale (milieux de base), des régulateurs de croissance et de type d'explants sur le taux de callogenèse, et la croissance des cals ont été évalués par les paramètres suivants :

#### **2.1.7.1. Pourcentage de callogenèse**

Le pourcentage d'induction des cals est calculé par le nombre d'explants ayant donné des cals sur le nombre d'explants non contaminés.

#### **2.1.7.2. Croissance des cals**

Pour déterminer la croissance mesurée en tant que poids frais, 25 à 30 cals développés dans les milieux de culture testés ont été pesés séparément sous les mêmes conditions, après 60 jours de culture [97].

Le poids frais des cals est déterminé par pesée à l'aide d'une balance de précision. Le cal est mis dans une boîte stérile sous hotte à flux laminaire pour qu'on puisse le peser.

#### **2.1.7.3. Pourcentage de contamination**

Le nombre de contamination pour chaque technique de stérilisation est suivi chaque 15 jours pendant 67 jours en déterminant le type de contamination. Un pourcentage de contamination a été calculé.

#### **2.1.7.4. Aspect des cals**

Une observation de 25 à 30 cals repiqués a été effectuée pour chaque essai. Nous avons décrit l'aspect des cals et repéré les zones verdâtres qui ont proliféré.

#### **2.1.7.5. Vitesse de croissance des cals**

La vitesse de croissance des cals a été calculée selon la formule citée par GIBSON et *al.*, [98] :

$$\text{Vitesse de croissance} = (\text{PFF} - \text{PFI}) / \text{PFI} / \text{nombre de jours de la}$$

PFF : Poids frais final.

PFI : Poids frais initial.

#### **2.1.8. Méthodes histologiques**

Dès le début de la formation du cal, après le 21<sup>ème</sup> jour, des coupes histologiques au niveau de 5 explants ont été réalisées pour déterminer les tissus qui sont à l'origine de ces cals. Une observation au microscope photonique est effectuée en se basant sur la méthode de réalisation des coupes au microtome des organes imprégnés dans la paraffine (Annexe 5).

#### **2.1.9. Analyse statistique**

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

## **2.2. Essais de production du taxol dans une suspension cellulaire**

Des études récentes ont prouvé que les cellules de *Taxus spp.* peuvent produire le taxol et les composés dérivés dans des conditions optimisées *in vitro* [12].

Dans cette deuxième partie, nous allons dans un premiers temps synchroniser les cals friables de *Taxus baccata* L. obtenus, puis nous allons réaliser des suspensions cellulaires en stimulant la production du taxol.

### **2.2.1. Synchronisation de culture**

Vu que les phases de cycle cellulaire diffèrent d'une cellule à une autre au sein d'une même suspension cellulaire et que la production des terpénoïdes est étroitement liée au cycle cellulaire, un essai de synchronisation des cellules avant de les mettre en suspension a été réalisé.

Nous avons appliqué une méthode de synchronisation par l'absence d'hormones de croissance dans le milieu de culture, en suivant la méthode décrite par NISHIDA et *al.*, [99] qui consiste à maintenir les cellules de *Catharanthus roseus* dans le milieu MS liquide dépourvu de 2,4-D pendant 72 heures puis les transférer dans un nouveau milieu MS pourvu de 2,4-D.

NISHIDA et *al.*, [99] signalent que cette synchronisation permet d'arrêter préférentiellement les cellules à l'interphase au stade G1.

Une modification de cette méthode a été établie. En effet, nous avons synchronisé les cals sur un milieu solide et non pas liquide comme mentionné par NISHIDA et *al.*, [99], vu les risques de contaminations et les pertes de cellules qui restent accrochées sur le papier filtre durant le changement du milieu de culture par filtration.

### 2.2.1.1. Conditions de culture

Après 8 jours de subculture, les cals ont été maintenues dans le milieu de GAMBORG (B5), dépourvu de 2,4-D. Ces cals ont été rincés au préalable par le milieu B5 liquide sans hormones. Après 72 heures de culture, les cals ont été transférés sur un nouveau milieu B5 auquel nous avons ajouté 2 mg/l de 2,4-D et incubés à  $25 \pm 2^\circ\text{C}$  à l'obscurité. Ces cals vont être utilisés pour inoculer les suspensions cellulaires.

### 2.2.2. Passage en suspension

Le taxol est un métabolite synthétisé par les cultures cellulaires en phase stationnaire. Par conséquent, un système à deux phases où les cellules sont d'abord cultivées dans un milieu pour la production de biomasse et ensuite transférées sur un milieu favorable à la production du taxol est une stratégie efficace. Ce système a l'avantage supplémentaire parce qu'il permet d'ajouter des précurseurs et des éliciteurs quand la production de métabolites secondaires est à l'extrême [12].

#### 2.2.2.1. Conditions de culture

Dans nos essais deux stades de culture ont été établis. Le premier consiste à produire de la biomasse et le deuxième stade permet la production du taxol, soit au total 46 jours de culture.

##### 2.2.2.1.1. Phase de production de la biomasse

Le milieu utilisé pour la production de biomasse est le milieu GAMBORG (**B5**) dépourvu d'agar et de charbon actif. Il contient 20 g/l de sucrose, 100 mg/l d'acide ascorbique, 1 mg/l de **kin**, 1 mg/l de **2,4-D** et 0,5 mg/l de **GA3 (B5(M<sub>4</sub>))**.

Pour cette expérimentation, nous avons prélevé environ 5g de cals synchronisés avec trois répétitions. Ils ont été transférés sur 50 ml de milieu **B5(M<sub>4</sub>)** dans des flacons horizontaux de 75 cm<sup>3</sup> de volume. Ils sont ensuite incubés à  $25 \pm 2^\circ\text{C}$  à l'obscurité sous agitation de 70 rpm. Cette agitation est

suffisante car la surface occupée par le milieu dans le flacon est grande par rapport à sa quantité (fig 2.5). Selon ZHOU et WU, [16] les cellules végétales sont en général plus sensibles à l'agitation que les microorganismes. De ce fait, nous avons choisi une vitesse d'agitation faible de sorte qu'elle pourrait mélanger efficacement la solution en évitant de stresser les cellules.



**Figure 2.5** : Suspension cellulaire de *Taxus baccata* L. dans un flacon horizontal.

#### **2.2.2.1.2. Phase de production du taxol**

Le milieu de base utilisé pour la production du taxol est le milieu MS. FETT-NETO et *al.*, [100] signalent que les cals de *Taxus cuspidata* induits sur le milieu MS montrent une production du taxol significativement plus élevée que ceux induits sur d'autres milieux d'essai y compris le milieu GAMBORG (B5).

Nous avons ajouté au milieu MS retenu l'acide salicylique comme éliciteur. Selon SCHENK et *al.*, [101] et BULGAKOV et *al.*, [102], l'acide salicylique stimule non seulement la résistance des plantes aux pathogènes mais aussi induit la production des métabolites secondaires.

Après 16 jours de culture, les cellules ont été transférées du milieu **B5(M<sub>4</sub>)** au milieu de base **MS** en ajoutant l'acide salicylique tout en gardant la même composition hormonale (1 mg/l **kin**, 1 mg/l **2,4-D**, 0,5 mg/l **GA3**) (Tableau 2.3). Le transfert est effectué après filtration et 2 rinçages avec le milieu **MS(M<sub>4</sub>)**.

**Tableau 2.3** : Essais de la suspension cellulaire.

Suspensions cellulaires	Cals utilisés	Milieu de production de biomasse	Milieu de production de taxol	Eliciteur utilisé
<b>S<sub>0</sub></b> (Témoin)	cals non synchronisés	<b>B5(M<sub>4</sub>)</b> 1mg/l kin + 1mg/l 2,4-D + 0,5mg/l GA3.		
<b>S<sub>1</sub></b>	Cals synchronisés	<b>B5(M<sub>4</sub>)</b> 1mg/l kin + 1mg/l 2,4-D + 0,5mg/l GA3.		
<b>S<sub>2</sub></b>	Cals synchronisés	<b>B5(M<sub>4</sub>)</b> 1mg/l kin + 1mg/l 2,4-D + 0,5mg/l GA3.	<b>MS(M<sub>4</sub>)</b> 1mg/l kin + 1mg/l 2,4-D + 0,5mg/l GA3.	acide salicylique (50 mg/l)

### 2.2.3. Mesure de la densité cellulaire

La densité cellulaire a été mesurée tous les 8 jours durant 46 jours de culture, en tant que poids sec, en suivant le protocole cité par WU et LIN [103]. Les cellules ont été séparées du milieu par filtration de 2ml prélevés de la suspension cellulaire (Wattman 150mm). La masse fraîche des cellules a été rincée avec de l'eau distillée et séchée à 40 ± 2°C dans une étuve jusqu'à l'obtention d'un poids constant.

## **2.3. Extraction et dosage du taxol**

### **2.3.1. Extraction du taxol**

Durant cette étape, l'extraction du taxol s'est faite à partir de la matière sèche des pousses, des cals induits à partir de ces pousses, des cellules mises en suspension et du milieu de cette suspension.

#### **2.3.1.1. Extraction du taxol à partir des pousses**

La méthode de VIDENSEK et *al.*, [104] et VALLATA [2] a été utilisée pour l'extraction du taxol de notre échantillon. Elle consiste à séparer les pousses des aiguilles. Les organes ainsi séparés sont couverts par du papier filtre pour être séchés dans une étuve à  $40 \pm 2^\circ\text{C}$  jusqu'à obtention d'un poids constant. Selon BRUNETON [11] le rendement en taxol est étroitement dépendant du processus de séchage qui oscille entre  $40$  et  $50^\circ\text{C}$ . Les tissus secs sont ensuite broyés à l'aide d'un broyeur jusqu'à l'obtention d'une fine poudre.

##### **2.3.1.1.1. Extraction liquide/solide**

Cette étape consiste à extraire les métabolites contenus dans la poudre végétale obtenue à l'aide de méthanol. Pour cela, 10 g de poudre de pousses sont mélangés à 100 ml de méthanol et agités avec un agitateur magnétique pendant 48h, puis filtrés. Le filtrat obtenu est évaporé sous vide au Rotavapor® (Heidolph) à  $50 \pm 2^\circ\text{C}$ , le résidu est dissous dans 100 ml de méthanol.

##### **2.3.1.1.2. Etape de pré-purification**

L'étape de pré-purification a pour but de faire précipiter les tanins et les substances chlorophylliennes. La méthode citée par MROCZEK et *al.*, [105] et VALLATA [2] a été suivie, elle consiste à préparer un mélange de :

- 50 ml d'extrait méthanolique
- 50 ml de méthanol
- 50 ml d'eau distillée.

On ajoute en dernier 50 ml d'acétate de plomb  $(\text{CH}_3\text{COO})_2 \text{Pb} \cdot 3\text{H}_2\text{O}$  réalisée à 10% m/v avec de l'eau distillée. Il se forme un précipité dès l'ajout d'acétate de plomb. On filtre le mélange. Le filtrat est récupéré et le précipité est éliminé.

#### **2.3.1.1.3. Extraction liquide/liquide**

Le filtrat récupéré durant l'étape de pré-purification est mis dans une ampoule à décanter auquel on ajoute 150 ml de dichlorométhane ( $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ ). Le mélange est agité vigoureusement dans l'ampoule puis il est laissé à décanter. Une fois la phase aqueuse et la phase organique sont séparées, on recueille la phase organique et on élimine la phase aqueuse.

Le dichlorométhane de la phase organique est évaporé au Rotavapor® à  $35 \pm 2^\circ\text{C}$ , on obtient un résidu sec qui serait par la suite dissous dans 20 ml de méthanol et évaporé au Rotavapor® à  $50 \pm 2^\circ\text{C}$ . On obtient, à nouveau, un résidu sec. Enfin le résidu est dissous dans 1 ml de méthanol et analysé par la chromatographie liquide à haute performance (CLHP).

#### **2.3.1.2. Extraction à partir des cals issus de pousses**

La méthode d'extraction a été basée sur celles décrites par WANG et *al.*, [106] et WU et LIN [103].

Les cals âgés de 30 jours sont séchés dans une étuve à  $40 \pm 2^\circ\text{C}$  jusqu'à l'obtention d'un poids constant. Nous avons mélangé 0,2 g de cals secs issus des pousses à 10 ml de méthanol, puis homogénéisé avec un mortier pendant 10min.

Le mélange est filtré et évaporé sous vide au Rotavapor® à  $50 \pm 2^\circ\text{C}$ . Le résidu sec obtenu est dissous à nouveau dans 4ml de méthanol et analysé par la CLHP.

#### **2.3.1.3. Extraction du taxol à partir des suspensions cellulaires**

L'extraction est faite à partir des cellules (taxol intracellulaire) et le milieu de culture (taxol extracellulaire).

#### **2.3.1.3.1. Extraction du taxol intracellulaire**

Le taxol intracellulaire est extrait selon le protocole cité par KAJANI et *al.*, [107]. Les cellules et le milieu de culture ont été séparés par filtration. Nous avons mélangé 0,2 g de la masse cellulaire fraîche avec 10ml du méthanol pendant 40min. le mélange est filtré et le filtrat obtenu est évaporé sous vide au Rotavapor® à  $50 \pm 2^\circ\text{C}$ . Le résidu sec est dissous à nouveau dans 2ml de méthanol et analysé par la CLHP.

#### **2.3.1.3.2. Extraction du taxol extracellulaire libéré dans le milieu**

Nous avons mélangé 2ml du milieu de culture avec le dichlorométhane ( $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ ) et la phase organique est séparée de la phase aqueuse par une ampoule à décanter (étape répétée deux fois). Le  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  est évaporé sous vide au Rotavapor® à  $35 \pm 2^\circ\text{C}$  et le résidu sec obtenu est dissous dans 2 ml de méthanol et analysé par la CLHP [103] [106].

#### **2.3.2. Dosage par chromatographie liquide couplée à un détecteur UV**

La détermination de la teneur des extraits en taxol, est réalisée par la chromatographie liquide à haute performance (CLHP). Nous nous sommes basés sur le programme mis au point par VALLATA [2].

##### **2.3.2.1. Conditions chromatographiques**

Les analyses ont été réalisées sur l'appareil Agilent HPLC 1100. La détection est réalisée, en premier temps, à une longueur d'onde de 210 nm, cependant cette longueur d'onde n'a pas permis une bonne détection de pic correspond au témoin. Pour cela, nous avons cherché d'autres longueurs d'ondes qui pourraient permettre une bonne détection. Pour cela, nous avons choisi une longueur d'onde de 225 nm où le témoin a présenté un pic d'absorption visible.

Les volumes d'injection des échantillons et de l'étalon sont de 10 µl. Les conditions chromatographiques sont [2] :

- Phase mobile : méthanol : eau
- Phase stationnaire: Colonne de SB-C8 5µm, 250 x 4,6 mm.
- Température : 25 °C.

Le rapport de la phase mobile évolue selon un gradient pendant l'analyse : évolution d'un rapport méthanol : eau (50 : 50) à un rapport (100 : 0). Le débit est fixé à 1:0 ml/min et l'analyse dure 30 minutes.

### **2.3.2.2. Préparation du témoin taxol**

Par manque du standard, nous avons opté pour le médicament anticancéreux (paclitaxel) qui contient dans 50 ml :

- Taxol (ou paclitaxel) (300 mg) ;
- Polyéthylène glycol (PEG) 35 castor oil (26,35 g) ;
- Acide citrique (100 mg) ;
- Ethanol.

Le polyéthylène glycol (PEG) 35 castor oil est un émulsifiant non ionique, employé pour aider à la solubilisation des drogues hydrophobes telles que l'agent antinéoplasique, le taxol. Cependant, dans les analyses par la CLHP, la grande distribution de poids moléculaire de cet excipient produit de nombreux pics qui pourraient interférer avec celui correspondant au taxol. De plus cet excipient forme un liquide visqueux avec l'éthanol ce qui pourrait endommager la colonne de l'appareil. Pour cela, nous avons opté pour une méthode de précipitation de cet excipient. Selon PERDUE [108] une solution éthanolique saturée par le chlorure de mercure (HgCl<sub>2</sub>) est efficace pour faire précipiter du polyéthylène glycol (PEG) 35 castor oil.

### **2.3.2.3. Courbe d'étalonnage**

La solution mère a été préparée de sorte que sa concentration finale en taxol soit 0,5 mg/l. Une solution éthanolique saturée au  $\text{HgCl}_2$  a été additionnée, en premier temps, à 1ml du médicament (6 mg/ml du taxol). Il se forme un précipité dense et blanc dès l'ajout de l'éthanol saturé (Annexe 6). Le mélange est centrifugé à 1200 rpm pendant 30 min et le surnageant est récupéré. Le culot est mélangé avec l'éthanol pur (99°) et centrifugé pour une deuxième fois.

Les deux surnageants sont mélangés et centrifugés à nouveau à 1200 rpm pendant 30 min. Le volume est ajusté par l'éthanol à 99° pour avoir une solution finale de 0,5 mg/ml.

La courbe d'étalonnage a été réalisée avec plusieurs concentrations du taxol, comprises entre 1 et 10  $\mu\text{g/ml}$  pour un volume injecté de 10  $\mu\text{l}$ . Une quantification a été réalisée avec la méthode des « aires de la courbe ». L'aire du pic enregistré correspond donc à la concentration du taxol. Les droites de la régression linéaire sont exprimées par la formule  $Y = a x + b$ . Le coefficient de détermination  $R^2$  doit être 0,99.

## CHAPITRE 3

### RESULTATS

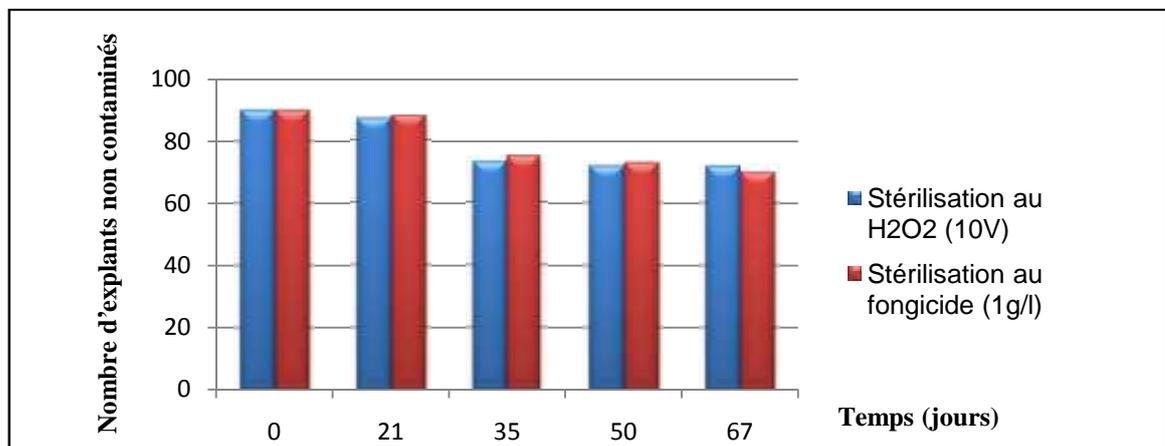
#### 3.1. Aptitude à la callogenèse de *Taxus baccata* L.

##### 3.1.1. Stérilisation du matériel végétal

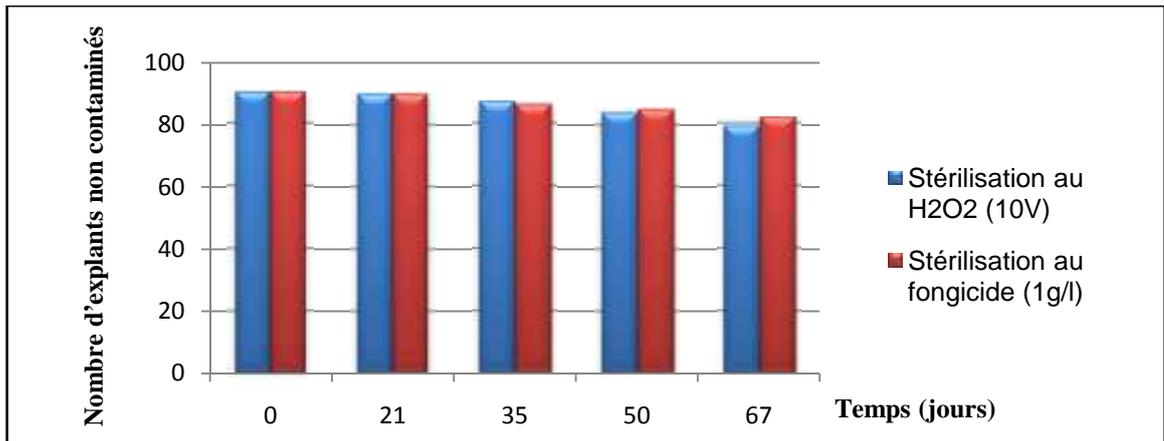
Le repiquage aseptique de matériel non contaminé exige un minimum de précautions. Cependant, lors de l'ensemencement de l'explant initial, la réalisation de l'asepsie demeure l'une des difficultés majeures de la culture *in vitro*.

Nous avons compté le nombre d'explants non contaminés chaque 15 jours, à partir du 21<sup>ème</sup> jour après le repiquage, pendant 67 jours.

Durant les deux premières semaines après la mise en culture aucune contamination n'a été observée. A partir du 21<sup>ème</sup> jour de culture nous avons enregistré des contaminations des explants issus des pousses (fig3.1). Quant aux contaminations des explants foliaires, elles ne sont apparues qu'à partir du 35<sup>ème</sup> jour (fig. 3.2).

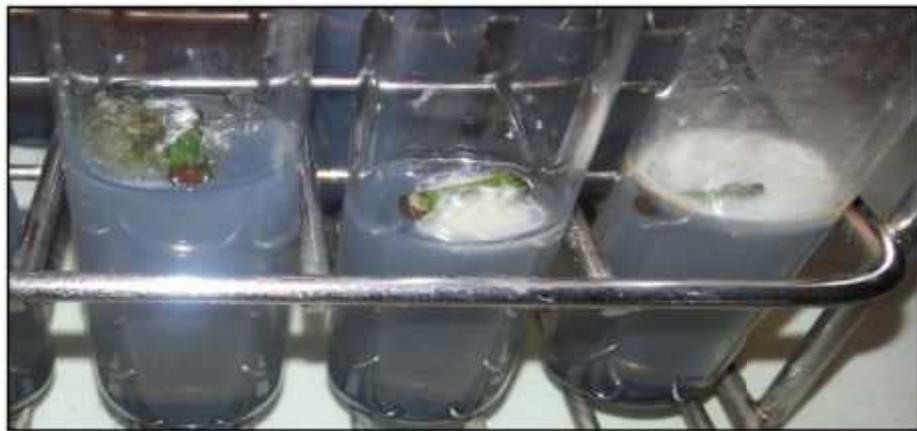


**Figure 3.1:** Nombre d'explants issus de pousses non contaminés de *T. baccata* L.



**Figure 3.2 :** Nombre d'explants foliaires non contaminés de *T. baccata* L.

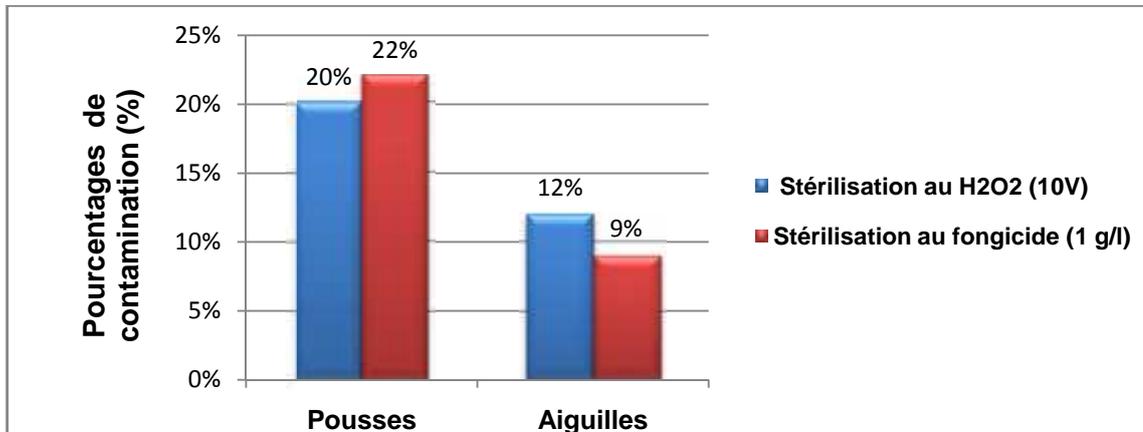
Dans les deux types d'explant, ces contaminations étaient toutes d'origine fongique. Elles se manifestent par le développement d'un mycélium, souvent blanchâtre ou noirâtre, recouvrant en premier temps l'explant puis envahit tout le milieu de culture (fig. 3.3).



**Figure 3.3 :** Contaminations cryptogamiques sur les explants/milieus après 21 jours de culture.

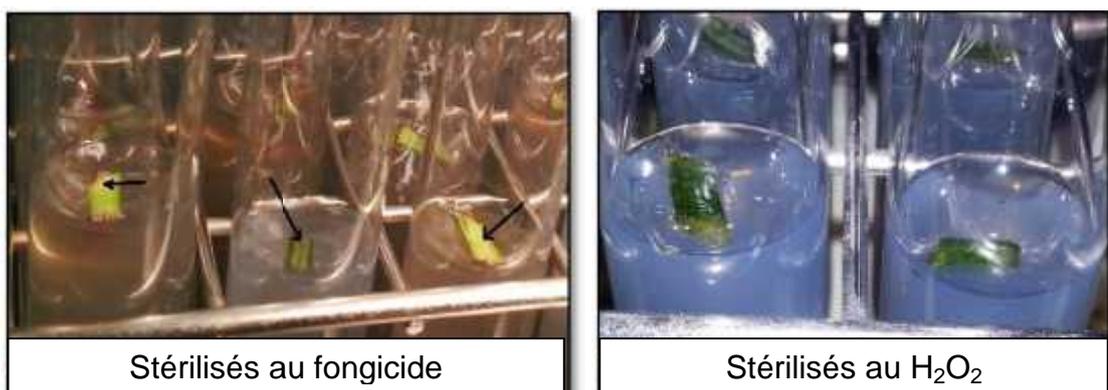
Les méthodes de stérilisation au fongicide et au peroxyde d'hydrogène sont efficaces (fig 3.4). En effet, parmi le matériel végétal stérilisé au fongicide et au H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, le pourcentage d'explants issus de pousses contaminés après 67 jours de culture *in vitro* est respectivement de 22 et 20%. Quant aux explants foliaires, le pourcentage de contamination est de 9 et 12%. Nous remarquons aussi que

quelque soit la méthode de stérilisation testée, le taux de contamination des pousses est plus élevé que celui des aiguilles.

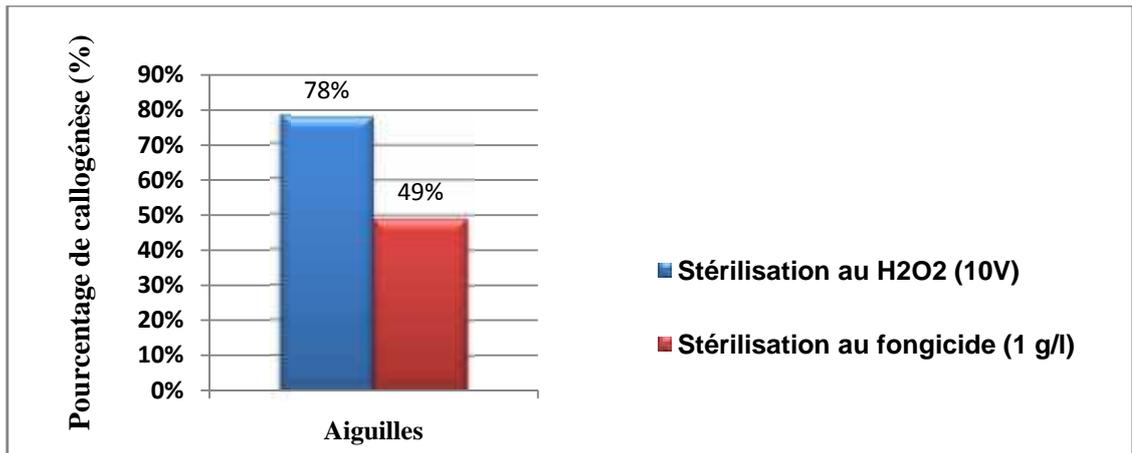


**Figure 3.4 :** Contamination des explants issus de pousses et d'aiguilles après 67 jours de culture.

Cependant la technique de stérilisation au fongicide s'est révélée un peu plus agressive pour les explants foliaires. Quelques explants ont été complètement brûlés et n'ont eu aucune évolution durant la phase d'étude (fig. 3.5). De plus si nous comparons les pourcentages des explants foliaires désinfectés par les deux méthodes donnant des cals, nous remarquons que les explants foliaires stérilisés au H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> donnent des cals avec un pourcentage de 84% comparés à ceux stérilisés au fongicide où le taux ne dépasse pas 49% (fig. 3.6).



**Figure 3.5 :** Aspect des explants foliaires après la mise en culture



**Figure 3.6 :** Effet des méthodes de stérilisation sur l'induction des cals à partir des aiguilles du *Taxus baccata* L.

### 3.1.2. Induction des cals du *Taxus baccata* L.

Le suivi de la callogenèse porte à la fois sur la description des caractéristiques morphologiques des cals (texture et couleur), la détermination du pourcentage d'explants callogènes et sur l'estimation quantitative des cals formés.

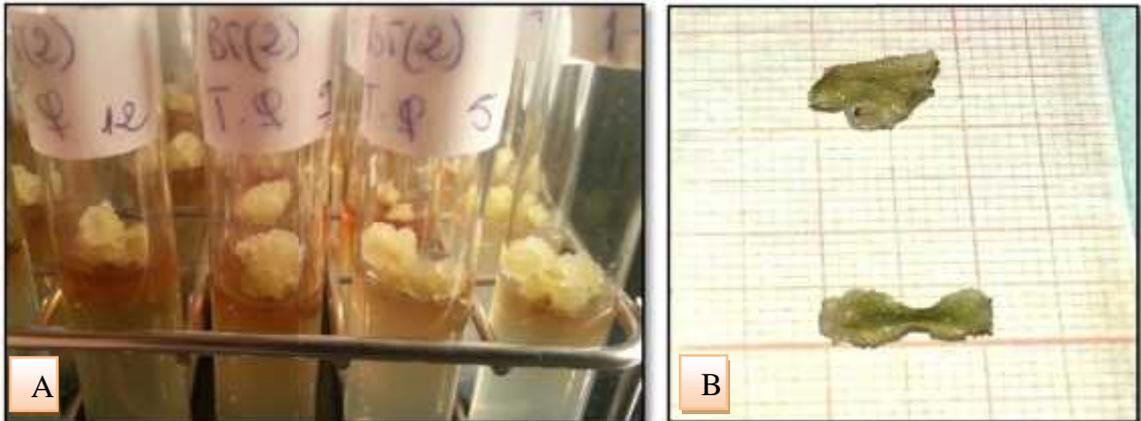
#### 3.1.2.1. Aspect des cals

L'aspect des cals sur les différents milieux de culture utilisés est représenté sur les figures 3.7 ; 3.8 et 3.9.

Nous avons obtenu sur tous les milieux de culture testés (**B5**, **MS** et **WPM**) des cals à texture friable et lisse.

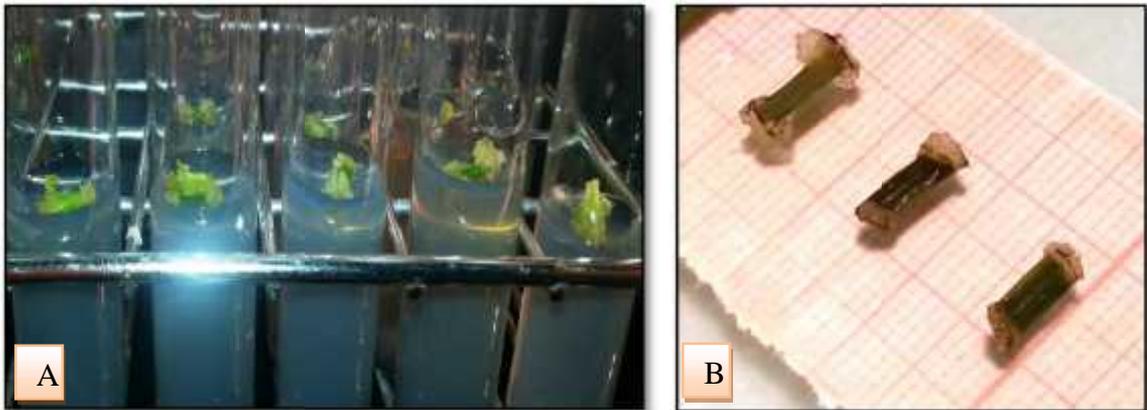
Nous remarquons que, pour les explants issus de pousses, les deux milieux de base utilisés **B5** et **WPM** favorisent la formation de cals à coloration jaune pâle comparés au milieu **MS** qui donne des cals à aspect chlorophylliens (coloration verte pâle) (fig. 3.7A, 3.8A et 3.9A).

Quant aux explants foliaires, les cals ont une coloration verte pâle seulement sur le milieu **B5**. Les milieux de base **MS** et **WPM** donnent des cals de couleur jaune pâle (fig. 3.7B, 3.8B et 3.9B).



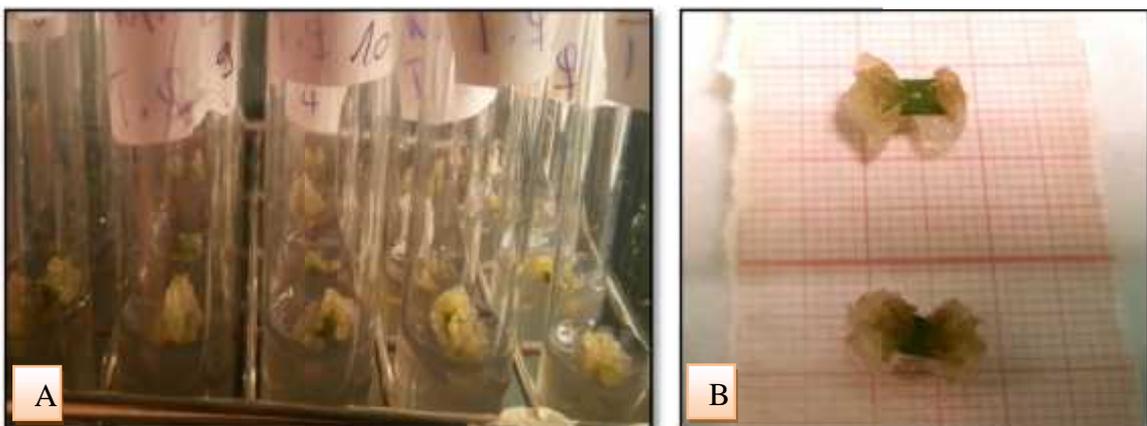
**Figure 3.7 :** Aspect de cals sur le milieu de GAMBORG (B5).

(A) Cals issus de pousses ; (B) Cals issus de feuilles.



**Figure 3.8 :** Aspect de cals sur le milieu MS.

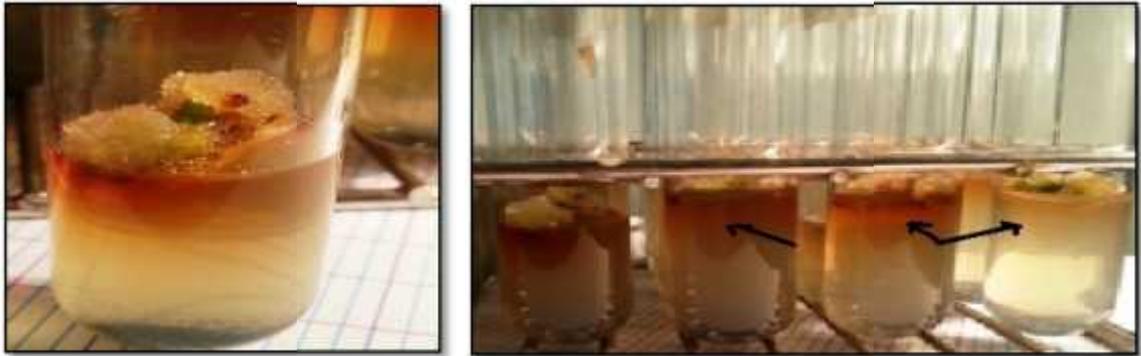
(A) : Cals issus de pousses ; (B) Cals issus de feuilles.



**Figure 3.9 :** Aspect de cals sur le milieu WPM.

(A) : Cals issus de pousses ; (B) Cals issus de feuilles.

Nous avons observé aussi une couleur rouge-marron des cals, que ce soit pendant l'initiation ou la subculture, et ce malgré l'addition des antioxydants dans les milieux de culture. Ces exsudats sont visibles soit sur les cals et/ou sur le milieu de culture (fig 3.10). Elles ont eu comme conséquences des nécroses au niveau des cals et une diminution de la croissance. Les cals présentant ces exsudats ont été écartés lors de nos comptages.



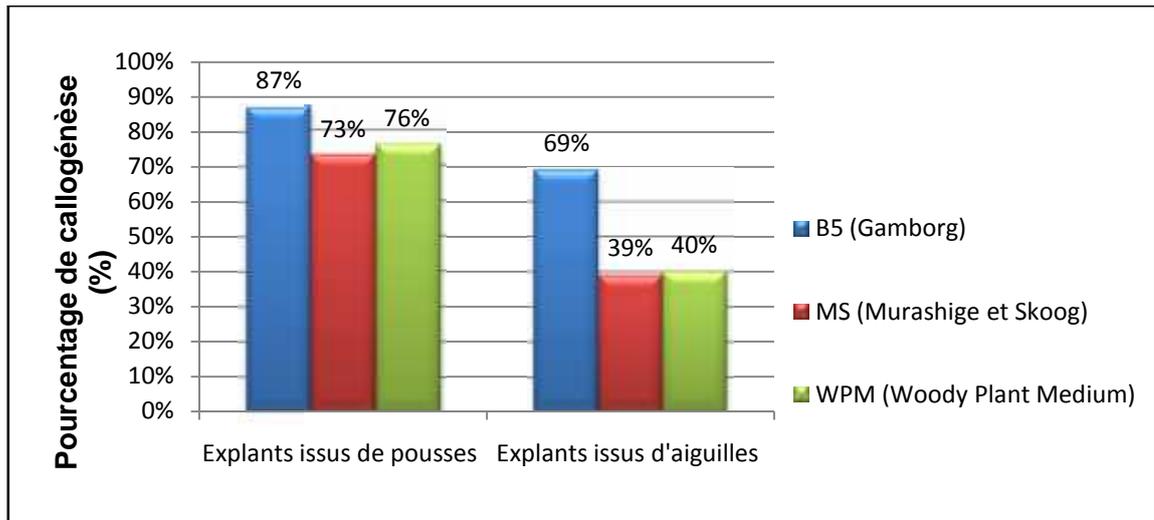
**Figure 3.10** : Aspect des exsudats sur les cals et le milieu de culture.

### **3.1.2.2. Effet de milieux de base sur la callogenèse**

L'effet des différents milieux de base utilisés sur la callogenèse de *Taxus baccata* L. nous a permis de calculer le pourcentage d'induction et la croissance des cals de chaque explant.

#### **3.1.2.2.1. Effet de milieux de base sur le pourcentage de callogenèse**

Les résultats obtenus montrent que le milieu **B5** (GAMBORG) est plus favorable à l'induction des cals avec 87% pour les pousses et 69% pour les aiguilles. Les deux autres milieux de base **MS** et **WPM** présentent des taux pratiquement similaires avec respectivement de 73 et 76% pour les pousses et 39 et 40% pour les aiguilles (fig 3.11) (Annexe 7).



**Figure 3.11** : Effet des milieux de base sur le pourcentage de la callogénèse.

Il ressort des résultats obtenus que la composition des sels minéraux, différente d'un milieu de base utilisé à un autre, a un effet plus fort sur l'induction des cals à partir des aiguilles avec 69% pour le milieu **B5** (GAMBORG), 39% pour le milieu **MS** (Murashige et Skoog) et 40% pour le milieu **WPM** (Woody Plant Medium). (Annexes 1, 2 et 3).

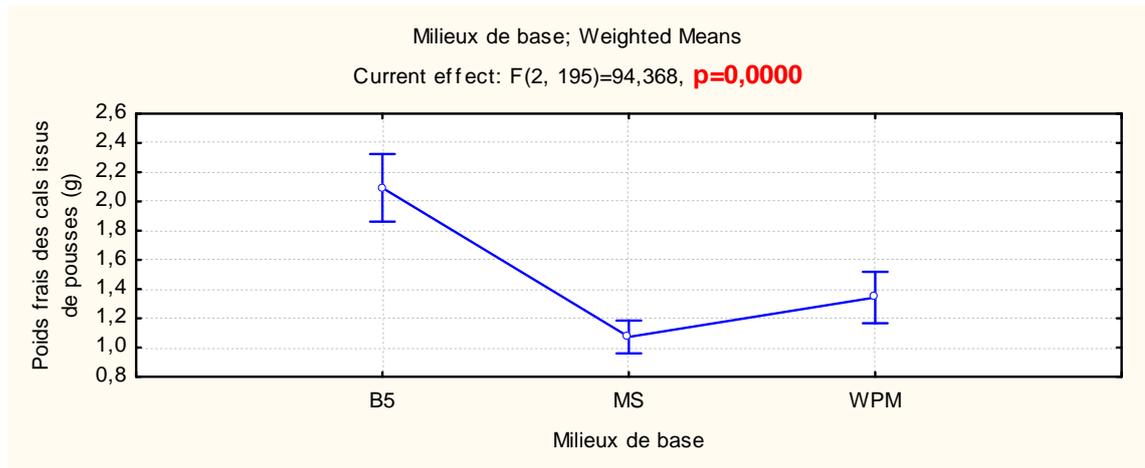
Quant aux explants issus de pousses, nous déduisons que quelque soit le milieu de base, les pousses ont un fort pouvoir callogène avec un taux de 87% pour le milieu **B5**, 73% pour le milieu **MS** et 76% pour le milieu **WPM**.

#### **3.1.2.2.2. Effet de milieux de base sur la croissance des cals**

L'étude statistique réalisée montre l'effet de la composition minérale des milieux de base utilisés (**B5**, **MS** et **WPM**) sur le poids frais des cals issus des pousses et des aiguilles.

##### **3.1.2.2.2.1. Croissance des cals issus de pousses**

Les résultats obtenus montrent qu'il existe une différence très hautement significative ( $P= 0,0000$ ) entre les poids frais moyens des cals issus de pousses (fig 3.12 et tableau 3.1). Nous pouvons déduire que les milieux de base utilisés (**B5**, **MS** et **WPM**) ont un effet très hautement significatif sur la prolifération cellulaire.



**Figure 3.12** : Effet des milieux de base sur la croissance des cals.

**Tableau 3.1** : Classification des moyennes des poids frais des cals.

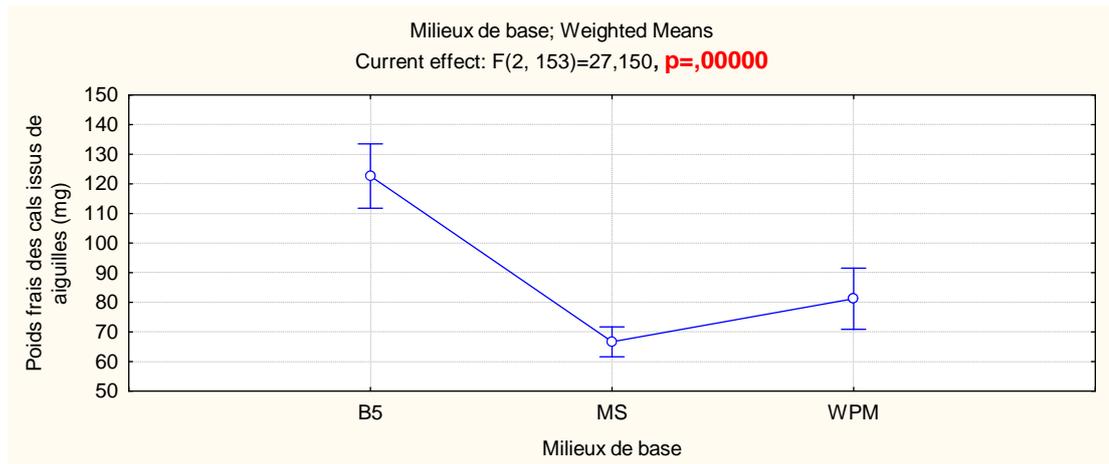
Newman-Keuls test; variable Poids frais des cals issus de pousses (g) (Spreadsheet17)				
Approximate Probabilities for Post Hoc Tests				
Error: Between MS = ,35508, df = 195,00				
Cell No.	Milieux de base	{1}	{2}	{3}
		2,0927	1,0729	1,3425
1	B5		0,000022	0,000009
2	MS	0,000022		0,009259
3	WPM	0,000009	0,009259	

Le test de Newman-Keuls (tableau 3.1) montre que le milieu **B5** favorise la plus forte prolifération cellulaire avec une moyenne de 2,0927 g comparé aux milieux **WPM** et **MS** avec respectivement 1,3425 g et 1,0729 g (Annexe 8).

Le milieu de GAMBORG (**B5**) est retenu comme étant le milieu de base le plus efficace pour l'induction et la croissance des cals issus de pousses du *Taxus baccata* L.

#### **3.1.2.2.2. Croissance des cals issus des aiguilles**

La figure 3.13 et le tableau 3.2 montrent qu'il existe une différence très hautement significative ( $P= 0,0000$ ) entre les poids frais moyens des cals issus des aiguilles. Nous pouvons déduire que les milieux de base utilisés (**B5**, **MS** et **WPM**) ont un effet très hautement significatif sur la prolifération cellulaire.



**Figure 3.13** : Effet des milieux de base sur la croissance des cals.

**Tableau 3.2** : Classification des moyennes des poids frais des cals.

Newman-Keuls test; variable Poids frais des cals issus des aiguilles (mg) (Spreadsheet1)				
Approximate Probabilities for Post Hoc Tests				
Error: Between MS = 1040,9, df = 153,00				
Cell No.	Milieux de base	{1}	{2}	{3}
		122,64	66,652	81,220
1	B5		0,000022	0,000009
2	MS	0,000022		0,019796
3	WPM	0,000009	0,019796	

Le test de Newman-Keuls montre que le milieu **B5** est le plus favorable à la prolifération cellulaire avec une moyenne de 122,640 mg suivi par le milieu **WPM** et le milieu **MS** avec une moyenne respectivement de 81,220 mg et 66,652 mg (Annexe 9).

Nous signalons que les deux explants, pousses et aiguilles, réagissent de la même manière dans les milieux de base testés **B5**, **MS** et **WPM**. En dépit de l'effet des hormones de croissance, le milieu de GAMBORG (**B5**) est le plus adéquat à l'induction et à la croissance des cals de l'espèce *Taxus baccata* L. et ce quelque soit le type d'explant testé (pousse ou aiguille).

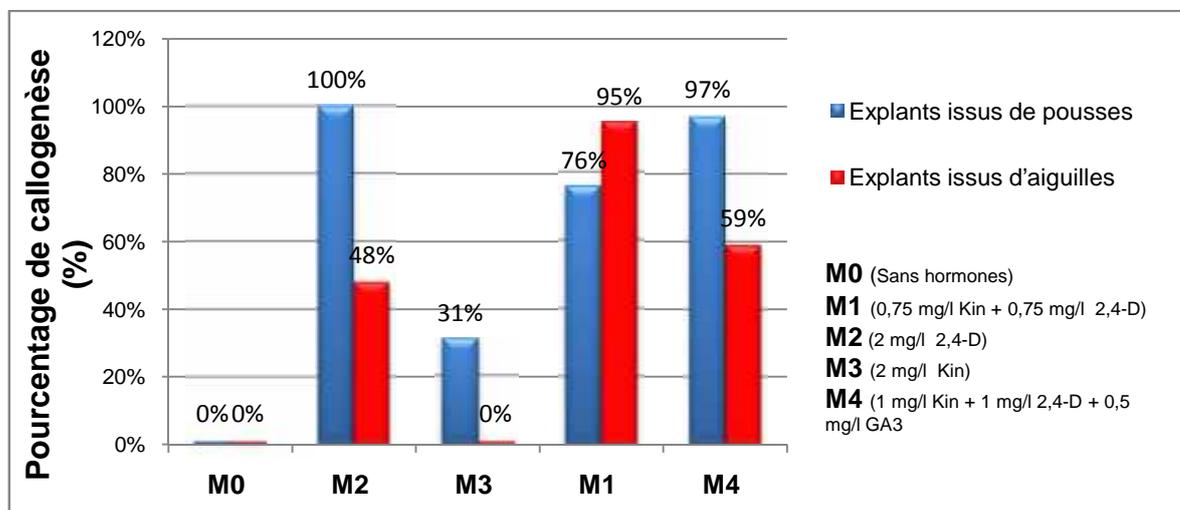
### **3.1.2.3. Effet des hormones de croissance sur la callogenèse**

Nous avons calculé le pourcentage d'induction et le poids frais des cals de chaque explant, pousses et aiguilles du *Taxus baccata* L.

### 3.1.2.3.1. Effet des hormones sur le taux d'induction des cals

La mise en culture des explants sur un milieu dépourvu d'hormones de croissance, entraîne une absence totale d'activité cellulaire durant toute la période de la culture. Nous observons la présence de nécroses sur la totalité des explants. Le milieu **M<sub>0</sub>** (dépourvu d'hormones) n'est pas donc susceptible d'induire des cals.

L'addition des auxines et des cytokinines au milieu de culture, seuls ou en combinaison, a permis l'induction des cals, à des taux différents, sur la majorité des explants (fig 3.14 et annexe 10).



**Figure 3.14** : Effet de l'apport des hormones sur le taux de la callogenèse.

#### 3.1.2.3.1.1. Action de kinétine dans le milieu d'induction

La kinétine seule dans le milieu d'induction **M<sub>3</sub>** (2 mg/l de Kin) s'est révélé inefficace à la callogenèse quelque soit le type d'explant ou le milieu de base utilisé. Pour les explants issus de pousses, l'apport de la kinétine a déclenché une légère callogenèse (31%), localisée au niveau des zones de blessures, comparés aux explants foliaires où aucune induction n'est enregistrée (0%) (fig 3.14).

### **3.1.2.3.1.2. Action de 2,4-D dans le milieu d'induction**

L'apport de l'auxine 2,4-D seul dans le milieu d'induction **M<sub>2</sub>** (2 mg/l de 2,4-D), se montre efficace à l'induction des cals à partir des pousses, quelque soit le milieu de base, avec un pourcentage de 100%. Quant aux explants foliaires, la présence de 2,4-D dans le même milieu de culture **M<sub>2</sub>** a permis d'induire des cals seulement à 48% (fig 3.14).

### **3.1.2.3.1.3. Action de la combinaison auxine / cytokinine**

L'apport des auxines et des cytokinines est bénéfique sur le milieu **M<sub>1</sub>** (0,75mg/l de Kin + 0,75mg/l de 2,4-D). Pour les explants foliaires nous remarquons que ce dernier est plus stimulant à la callogenèse avec un pourcentage de 95%. L'ajout de la gibbérelline (GA3) dans le milieu **M<sub>4</sub>** pour les mêmes explants (aiguilles) montre un taux plus faible d'induction où nous enregistrons 59%. Quant aux explants issus de pousses, la callogenèse est nettement améliorée par l'apport de la GA3 dans le milieu **M<sub>4</sub>** avec un taux de 97%, comparés aux explants foliaires (59%) (fig 3.14).

Nous déduisons que le milieu **M<sub>1</sub>** est plus favorable et l'apport de la GA3 a stimulé moyennement l'induction des cals à partir des aiguilles. Ainsi les deux compositions hormonales **M<sub>2</sub>** et **M<sub>4</sub>** sont plus favorables à l'induction des cals à partir des pousses.

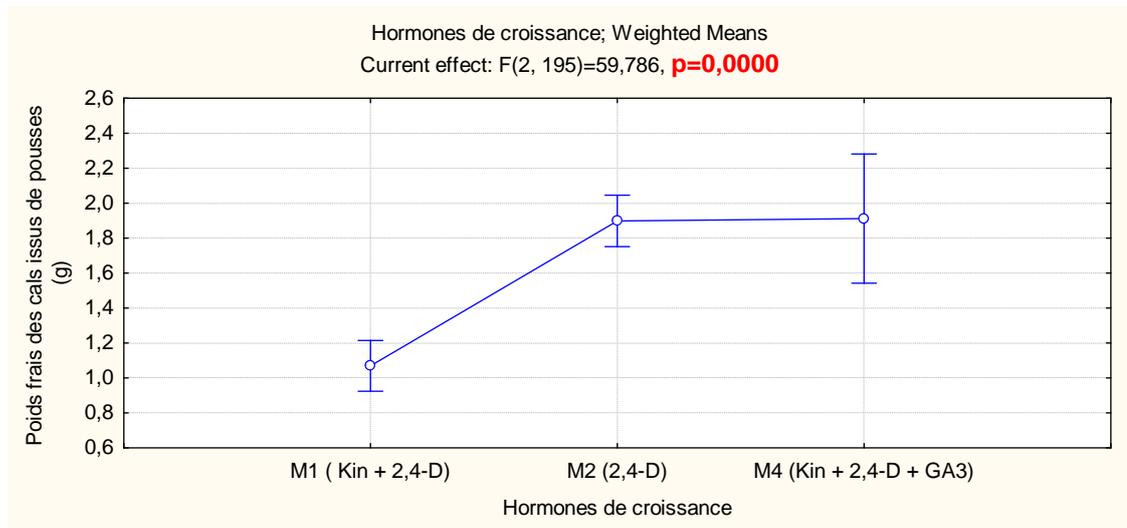
### **3.1.2.3.2. Effet des hormones sur la croissance des cals**

L'analyse statistique réalisée montre qu'il existe un effet de la composition hormonale sur le poids frais des cals issus des pousses et des aiguilles. Elle permet aussi de déceler les différences existantes et de déterminer l'hormone de croissance la plus favorable pour la prolifération des cals.

#### **3.1.2.3.2.1. Croissance des cals provenant de jeunes pousses**

L'analyse des variances représentée sur la figure 3.15 et le tableau 3.3 concerne les milieux **M<sub>1</sub>**, **M<sub>2</sub>** et **M<sub>4</sub>**. Vu les contaminations enregistrées, le milieu

**M<sub>3</sub>** a donné un pourcentage de callogenèse très faible à nul. Nous l'avons donc écarté du calcul.



**Figure 3.15** : Effet des hormones de croissance sur le poids frais des cals.

**Tableau 3.3** : Classification des moyennes des poids frais des cals.

Newman-Keuls test; variable Poids frais des cals issus de pousses (g) (Spreadsheet17)				
Approximate Probabilities for Post Hoc Tests				
Error: Between MS = ,35508, df = 195,00				
Cell No.	Hormones de croissance	{1} 1,0695	{2} 1,8982	{3} 1,9115
1	M1 (Kin + 2,4-D )		0,000009	0,000022
2	M2 (2,4-D)	0,000009		0,899250
3	M4 (Kin + 2,4-D + GA3)	0,000022	0,899250	

Les hormones de croissance utilisées lors des expériences effectuées ont montré un effet très hautement significatif ( $P= 0,0000$ ) sur le poids frais des cals issus de pousses (Annexe 11).

Le test de Newman-Keuls révèle que le poids frais moyen pour la combinaison hormonale **M<sub>1</sub>** (2,4-D/Kin) est significativement plus faible ( $P=0,000009$  et  $P=0,000022$ ) que le poids frais moyen pour les combinaisons **M<sub>2</sub>** et **M<sub>4</sub>**.

Nous constatons aussi que les poids frais moyens des cals, sur les milieux **M<sub>2</sub>** (1,8982 g) et **M<sub>4</sub>** (1,9115 g), sont comparables ( $P=0,8992$ ). Nous déduisons que le

2,4-D, seul ou combiné avec la kinétine et la GA3, a le même effet sur le poids frais final des cals issus de jeunes pousses après 60 jours de culture.

Le milieu **M<sub>1</sub>** (Kin + 2,4-D), comparé au milieu **M<sub>2</sub>** (2,4-D seul), montre que dans cette combinaison, la Kinétine a un effet inhibiteur significatif sur la croissance des cals ( $P=0,000009$ ). Notons que le milieu **M<sub>3</sub>** composé uniquement de la Kinétine a donné des résultats nuls.

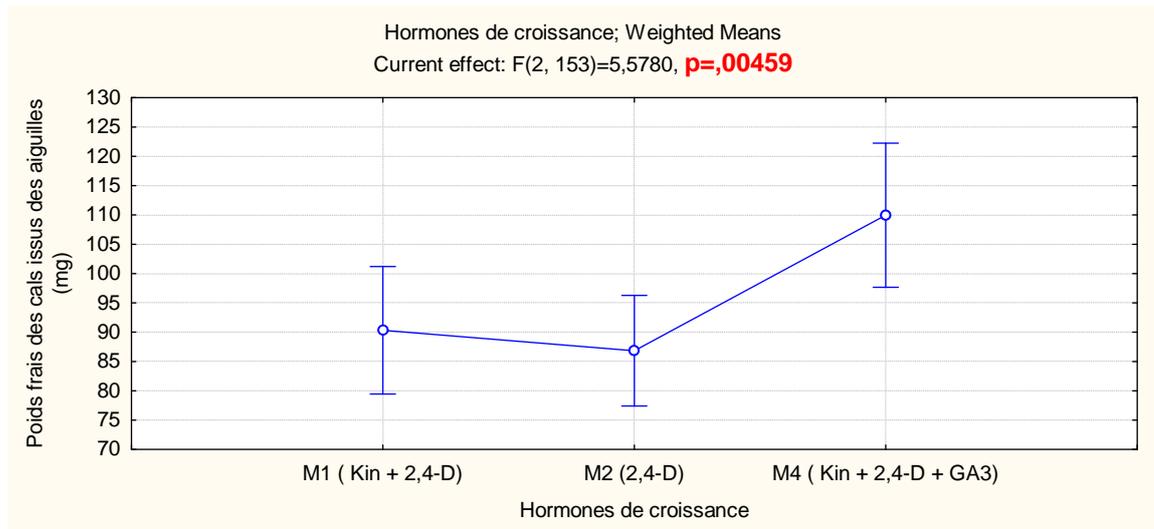
Si nous comparons les deux milieux **M<sub>1</sub>** (kin + 2,4-D) et **M<sub>4</sub>** (Kin + 2,4-D + GA3), nous remarquons que l'addition de la GA3 a joué un rôle très important dans l'augmentation du poids frais des cals de 1,0695 g sur le milieu **M<sub>1</sub>** allant jusqu'à 1,9115 g sur le milieu **M<sub>4</sub>** ( $P=0,000022$ ).

Notons que l'association du 2,4-D avec la GA3 a exprimé un taux d'induction et une intensité de prolifération de cals presque analogues que le 2,4-D seul. La gibbérelline GA3 a renforcé ainsi l'effet callogène du 2,4-D et de la kinétine en favorisant la prolifération cellulaire pour les explants issus des pousses.

### **3.1.2.3.2.2. Croissance des cals provenant des aiguilles**

Le milieu **M<sub>3</sub>** (2mg/l de Kin) est inadéquat à l'induction des cals (0%). Aucune croissance n'a été enregistrée pendant 60 jours de culture, contrairement aux milieux **M<sub>1</sub>**, **M<sub>2</sub>** et **M<sub>4</sub>**.

Les résultats de l'analyse statistique (fig 3.16) mettent en évidence une différence très significative ( $P=0,00459$ ) entre les poids frais des cals issus des aiguilles. Nous pouvons conclure que les hormones de croissance utilisées lors de nos expérimentations ont un effet significatif sur la prolifération cellulaire (Annexe 12).



**Figure 3.16** : Effet des hormones sur le poids frais des cals issus des aiguilles.

Le test de Newman-Keuls, montre qu'il n'existe pas une différence significative ( $P=0,6025$ ) entre les deux milieux, **M<sub>1</sub>** (Kin + 2,4-D) et **M<sub>2</sub>** (2,4-D seul).

L'addition de la GA3 au milieu **M<sub>4</sub>** augmente significativement le poids frais des cals issus des aiguilles avec 109,96 mg comparé aux milieux **M<sub>2</sub>** (86,842 mg) et **M<sub>1</sub>** (90,328 mg) qui en sont dépourvus.

**Tableau 3.4** : Classification des moyennes des poids frais des cals.

Newman-Keuls test; variable Poids frais des cals issus de aiguilles (mg) (Spreadsheet1) Approximate Probabilities for Post Hoc Tests Error: Between MS = 1040,9, df = 153,00				
Cell No.	Hormones de croissance	{1} 90,328	{2} 86,842	{3} 109,96
1	M1 (Kin + 2,4-D )		0,602576	<b>0,003364</b>
2	M2 (2,4-D)	0,602576		<b>0,001614</b>
3	M4 (Kin + 2,4-D + GA3)	<b>0,003364</b>	<b>0,001614</b>	

Il ressort que la présence de 2,4-D est nécessaire pour le déclenchement de la callogenèse contrairement à la kinétine. L'ajout de la GA3 augmente considérablement l'effet callogène du 2,4-D sur les aiguilles.

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

Les résultats obtenus après le calcul du pourcentage d'induction et le poids frais des cals de chaque explant (pousses et aiguilles) du *Taxus baccata* L. sur les milieux de culture utilisés sont :

#### 3.1.2.4.1. Effet de l'interaction sur le taux de callogenèse

Les milieux de culture testés induisent dans leur majorité des cals à partir des pousses en dehors de ceux dépourvus de régulateurs de croissance (**B5(M<sub>0</sub>)**, **MS(M<sub>0</sub>)** et **WPM(M<sub>0</sub>)**). Les meilleurs taux d'induction avec des réponses à 100% sont obtenus sur les milieux **B5(M<sub>2</sub>)**, **B5(M<sub>4</sub>)**, **MS(M<sub>2</sub>)** et **WPM(M<sub>2</sub>)** (tableau 3.5).

Les premières manifestations de callogenèse sur les pousses sont perceptibles à partir du 21<sup>ème</sup> jour sur tous les milieux de culture testés exceptés les milieux **B5(M<sub>2</sub>)** et **B5(M<sub>4</sub>)** où l'apparition des cals est précoce et survient respectivement à partir du 13<sup>ème</sup> (100%) et du 15<sup>ème</sup> jour (97%).

**Tableau 3.5** : Induction des cals issus de pousses (après 60 jours de culture).

	<b>B5</b>	<b>MS</b>	<b>WPM</b>
<b>M<sub>0</sub></b> (sans hormones)	0%	0%	0%
<b>M<sub>1</sub></b> (Kin + 2,4-D)	92%	65%	70%
<b>M<sub>2</sub></b> (2,4-D)	100%	100%	100%
<b>M<sub>3</sub></b> (Kin)	43%	31%	13%
<b>M<sub>4</sub></b> (Kin + 2,4-D + GA3)	100%	96%	96%

Nous constatons que contrairement aux explants issus de pousses, les pourcentages d'induction des cals à partir des aiguilles sont moyens à nuls, ils oscillent entre 0% et 45% (Tableau 3.6). Exception faite pour les milieux **B5(M<sub>4</sub>)**, **B5(M<sub>2</sub>)**, **MS(M<sub>1</sub>)** et **B5(M<sub>1</sub>)** avec respectivement 100%, 86%, 77% et 70%. Quelque soit le milieu, l'activité callogène des explants foliaires ne se déclenche qu'à partir du 30<sup>ème</sup> jour de culture avec des taux différents d'un milieu à un autre.

**Tableau 3.6** : Induction des cals issus des aiguilles (après 60 jours de culture).

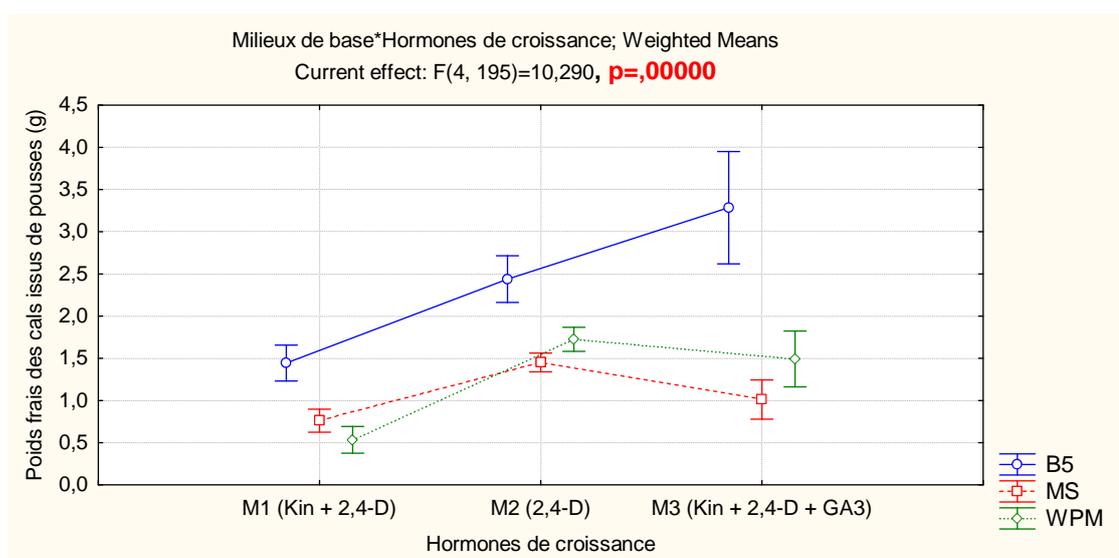
	<b>B5</b>	<b>MS</b>	<b>WPM</b>
<b>M<sub>0</sub></b> (sans hormones)	0%	0%	0%
<b>M<sub>1</sub></b> (Kin + 2,4-D)	70%	77%	44%
<b>M<sub>2</sub></b> (2,4-D)	86%	11%	45%
<b>M<sub>3</sub></b> (Kin)	0%	0%	0%
<b>M<sub>4</sub></b> (Kin + 2,4-D + GA3)	100%	16%	44%

### 3.1.2.4.2. Effet de l'interaction sur la croissance des cals

L'analyse factorielle (ANOVA) montre qu'il existe une interaction entre les milieux de base et la composition hormonale sur le taux d'induction et la croissance des cals exprimée par le poids frais moyen des cals.

#### 3.1.2.4.2.1. Croissance des cals issus de pousses

Les résultats représentés sur la figure (3.17) révèlent une différence très hautement significative ( $P= 0,00000$ ) entre les poids frais moyens des cals sur les milieux de culture testés. Une interaction significative des deux facteurs testés (milieux de base et hormones de croissance) par rapport aux poids frais moyens des cals est confirmée (Annexes 13 et 14).

**Figure 3.17** : Effet d'interaction entre les milieux de base et les hormones.

L'interaction est positive entre le milieu de base **B5** et les combinaisons hormonales **M<sub>2</sub>** et **M<sub>4</sub>**. Elle est en faveur d'une callogenèse. En dépit de l'effet de milieu de base, les poids frais moyens des cals sur les milieux contenant les combinaisons **M<sub>2</sub>** et **M<sub>4</sub>** étaient respectivement de 1,8982 g et 1,9115 g (fig 3.15). L'effet du milieu de base **B5** a accentué l'effet des hormones de croissance (**M<sub>2</sub>** et **M<sub>4</sub>**) avec une moyenne de poids frais des cals de 2,4386 g pour le **B5(M<sub>2</sub>)** et 3,2858 g pour le **B5(M<sub>4</sub>)** (tableau 3.7).

Les résultats représentés sur le tableau (3.7) révèlent une interaction négative entre le milieu **B5** et la composition hormonale **M<sub>1</sub>** (Kin + 2,4-D) en inhibant la callogenèse. Le poids frais moyen des cals sur le milieu de base **B5** sans tenir compte de l'effet d'hormone de croissance est de 2,0927g (fig.3.12), alors que sur le milieu **B5(M<sub>1</sub>)** (l'effet des deux facteurs, milieu de base **B5** et la combinaison hormonale **M<sub>1</sub>**) ce poids chute jusqu'à atteindre 1,4443 g (tableau 3.7).

**Tableau 3.7** : Interaction milieux / hormones.

Newman-Keuls test; variable Poids frais des cals issus de pousses (g) (Spreadsheet2 in Workbook1) Homogenous Groups, alpha = ,05000 Error: Between MS = ,35508, df = 195,00								
Cell No.	Milieux de base	Hormones de croissance	Poids frais des cals issus de pousses (g) Mean	1	2	3	4	5
7	WPM	(M1) 2,4-D + Kin	0,534000		****			
4	MS	(M1) 2,4-D + Kin	0,761208		****	****		
6	MS	(M4) 2,4-D + Kin + GA3	1,011520			****		
1	B5	(M1) 2,4-D + Kin	1,444300	****				
5	MS	(M2) 2,4-D	1,451817	****				
9	WPM	(M4) 2,4-D + Kin + GA3	1,493047	****				
8	WPM	(M2) 2,4-D	1,725288	****				
2	B5	(M2) 2,4-D	2,438578				****	
3	B5	(M4) 2,4-D + Kin + GA3	3,285840					****

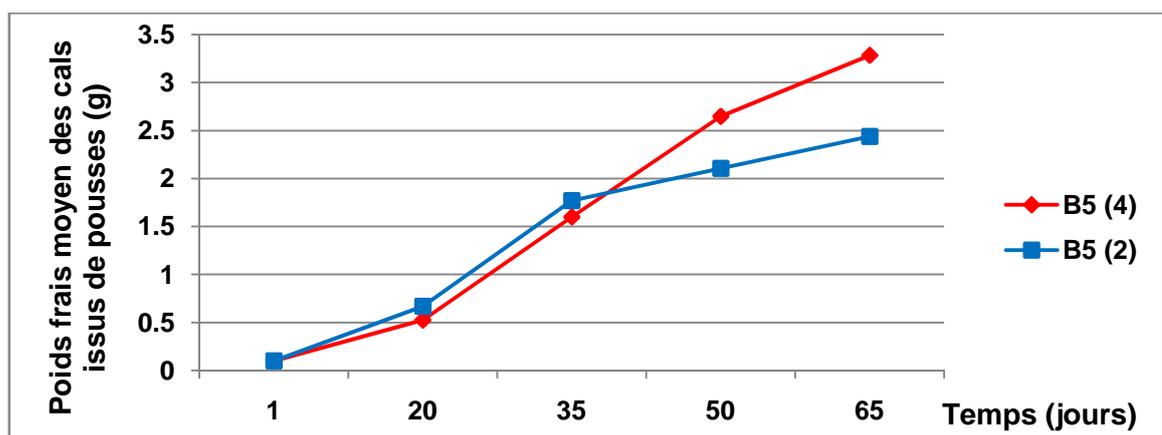
Le suivi du développement des cals sur les milieux **MS(M<sub>2</sub>)** (100%), **WPM(M<sub>2</sub>)** (100%), **MS(M<sub>4</sub>)** (96%), **WPM(M<sub>4</sub>)** (96%), et **B5(M<sub>1</sub>)** (92%) révèle que l'interaction favorable à l'induction des cals, entre les milieux de base et les régulateurs de croissance, n'est pas suivie d'une prolifération cellulaire intense (elle oscille entre 1,0115 g et 1,7253 g).

Nous constatons aussi qu'il y a une interaction négative entre le milieu de base **MS** et les différentes compositions hormonale testées. En dépit de l'effet de milieu de base, le poids frais moyen des cals est de 1,0695, 1,8982 et 1,9115g respectivement pour les combinaisons hormonales **M<sub>1</sub>**, **M<sub>2</sub>** et **M<sub>4</sub>** (fig.3.15). L'effet de l'interaction du milieu de base **MS** et les hormones de croissances a donné des poids frais des cals plus faibles avec 0,7612g (**MS(M<sub>1</sub>)**), 1,4518g (**MS(M<sub>2</sub>)**) et 1,0115g (**MS(M<sub>4</sub>)**).

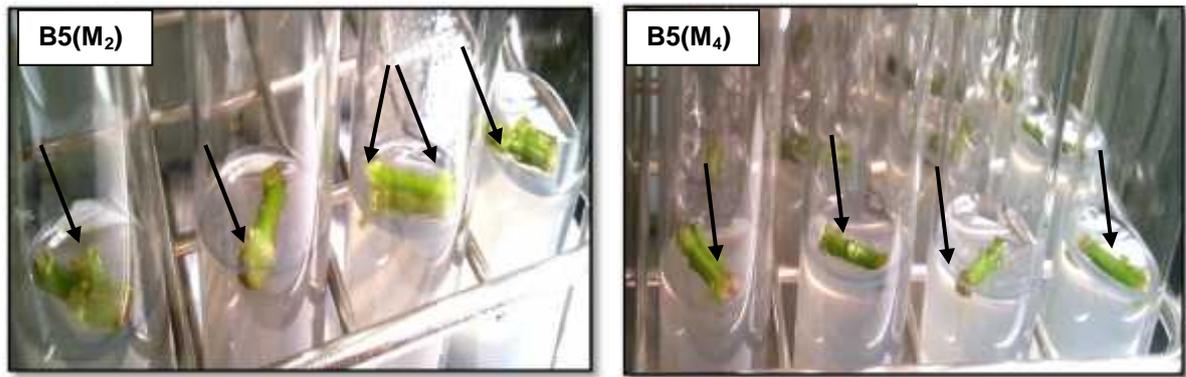
Même constatation est observée pour l'interaction entre le milieu de base **WPM** et les compositions hormonales testées.

Vu que la première manifestation des cals sur le milieu **B5(M<sub>2</sub>)** était à partir du 13<sup>ème</sup> jour et sur le milieu **B5(M<sub>4</sub>)** au 15<sup>ème</sup> jour après la mise en culture, un suivi du poids frais des cals sur les deux milieux **B5(M<sub>2</sub>)** et **B5(M<sub>4</sub>)** a été réalisé (fig.3.18).

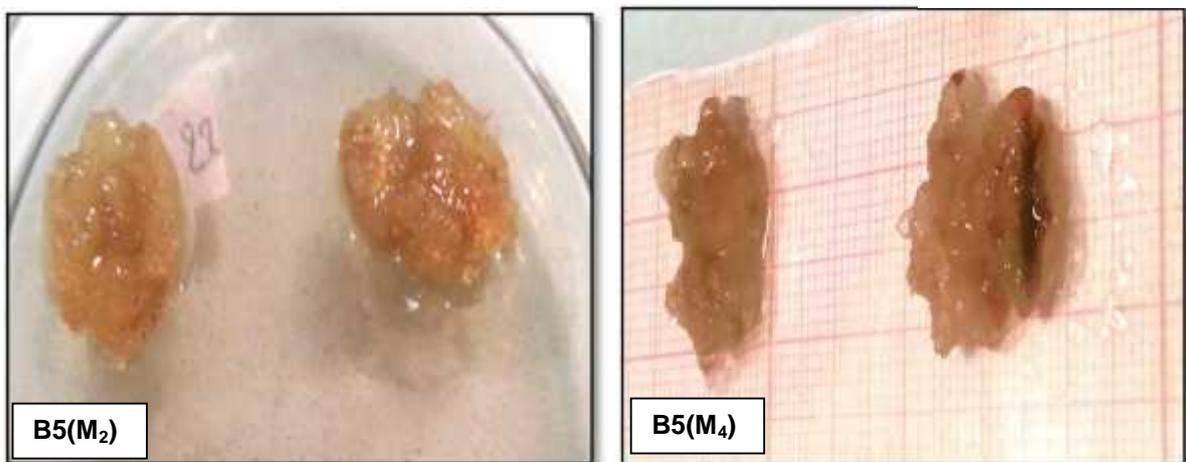
Sur ces deux milieux, de petits amas tissulaires apparaissent au niveau des sections, puis se propage sur le reste de l'explant (fig 3.19 et 3.20).



**Figure 3.18** : Croissance des cals issus de pousses.



**Figure 3.19** : Manifestation des cals issus de pousses après 15 jours de culture



**Figure 3.20** : Aspect des cals issus de pousses après 65 jours de culture

Durant la croissance des cals nous remarquons que la prolifération cellulaire sur le milieu **B5(M<sub>2</sub>)** est plus précoce que celle sur le milieu **B5(M<sub>4</sub>)** entre le 20<sup>ème</sup> et le 35<sup>ème</sup> jour. Cependant, après 65 jours de culture, les cals sur le milieu **B5(M<sub>4</sub>)** ont un poids frais moyen supérieur à celui des cals sur le **B5(M<sub>2</sub>)**. De plus, nous avons remarqué que la plupart des cals sur le milieu **B5(M<sub>2</sub>)** ont une couleur marron contrairement au milieu **B5(M<sub>4</sub>)** où le brunissement était négligeable.

Il serait donc intéressant d'induire les cals sur le **B5(M<sub>2</sub>)** puis les transférer sur le **B5(M<sub>4</sub>)** après 30 jours de culture pour avoir une bonne croissance.

La vitesse de croissance des cals sur ce milieu **B5(M<sub>4</sub>)** est suivie chaque 2 semaines pendant une période de 8 semaines. Les résultats sont représentés sur le tableau (3.8).

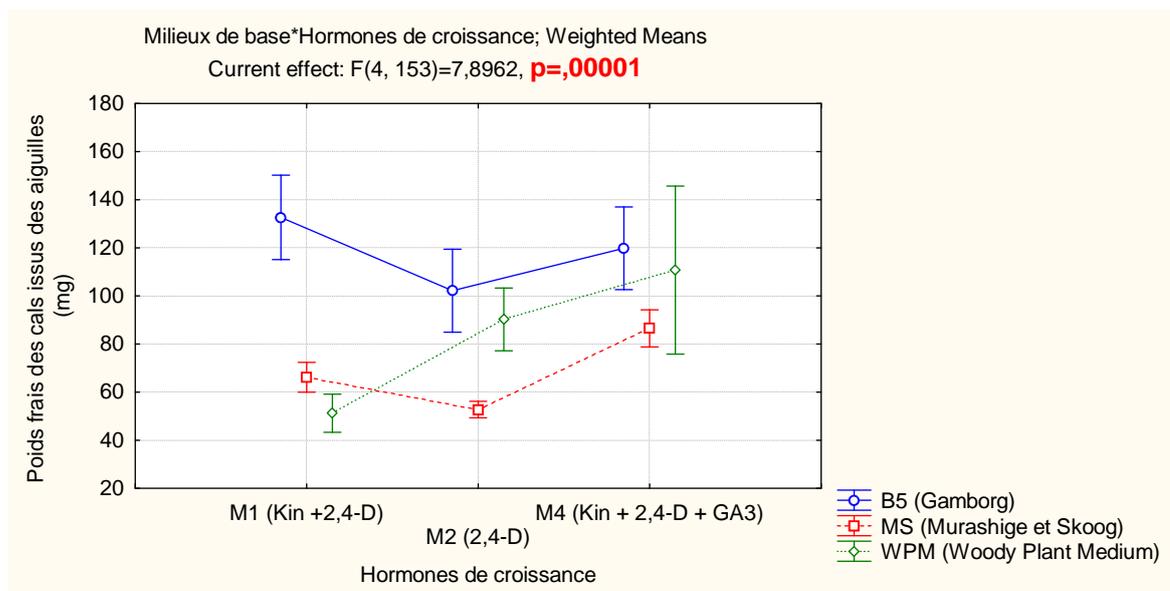
**Tableau 3.8** : Vitesse de croissance des cals issus de pousses sur le milieu **B5(M<sub>4</sub>)**.

Temps (semaines)	2	4	6	8
Taux de croissance des cals	0,1930	0,1365	0,0436	0,0153

D'après les résultats obtenus, on constate que la vitesse de croissance des cals sur le milieu **B5(M<sub>4</sub>)** diminue de plus en plus durant la période d'étude de 0,193 jusqu'à 0,0153 (tableau 3.8)

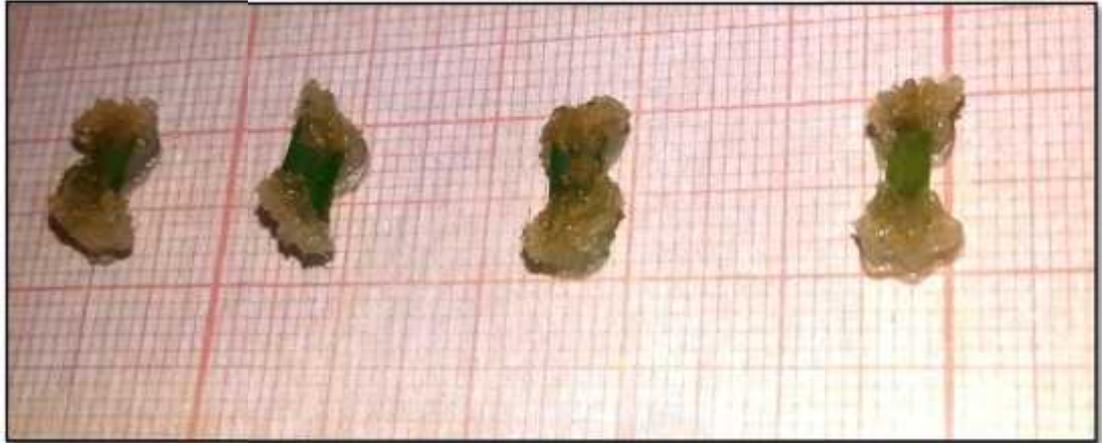
### 3.1.2.4.2.2. Croissance des cals provenant des aiguilles

L'analyse statistique représentée sur la figure (3.21) et le tableau (3.9), montre qu'il existe une interaction très hautement significative ( $P=0,00001$ ) entre les milieux de base utilisés et les régulateurs de croissance, par rapport aux poids frais moyens des cals issus des aiguilles (Annexes 15 et 16).



**Figure 3.21** : Interaction entre les milieux de base et les hormones de croissance.

La réponse de ce type d'explant est très limitée. Ce sont seulement les milieux **B5(M<sub>1</sub>)**, **B5(M<sub>2</sub>)**, **B5(M<sub>4</sub>)** et **WPM(4)** qui présentent une meilleure croissance comparés aux autres milieux avec respectivement de 132,67 mg, 102,19 mg, 119,83 mg et 110,75 mg. Les explants foliaires deviennent le siège d'une activité callogène moyenne et elle se limite au niveau des extrémités sectionnées dans ces milieux (fig 3.22).



**Figure 3.22** : Aspect des cals issus des aiguilles après 60 jours de culture.

**Tableau 3.9** : Interaction milieux de base / hormones de croissance

Newman-Keuls test; variable Poids frais des cals issus des aiguilles (mg) (Spreadsheet1) Homogenous Groups, alpha = ,05000 Error: Between MS = 1040,9, df = 153,00							
Cell No.	Milieux de base	Hormones de croissance	Poids frais des cals issus des feuilles (mg) Mean	1	2	3	4
7	WPM	M1 (2,4-D + Kin)	51,2250			****	
5	MS	M2 (2,4-D)	52,7667			****	
4	MS	M1 (2,4-D + Kin)	66,2125			****	****
6	MS	M4 (2,4-D + Kin + GA3)	86,5143	****			****
8	WPM	M2 (2,4-D)	90,2444	****			****
2	B5	M2 (2,4-D)	102,1857	****	****		
9	WPM	M4 (2,4-D + Kin + GA3)	110,7500	****	****		
3	B5	M4 (2,4-D + Kin + GA3)	119,8313	****	****		
1	B5	M1 (2,4-D + Kin)	132,6727		****		

Nous constatons une interaction positive entre le milieu de base **B5** et les différentes compositions hormonales testées. Cette interaction est en faveur d'une callogénèse.

En dépit de l'effet de milieu de base, le poids frais moyen des cals est de 90,328 mg, 86,842 mg et 109,96 mg respectivement pour les combinaisons hormonales **M<sub>1</sub>** (Kin + 2,4-D), **M<sub>2</sub>** (2,4-D) et **M<sub>4</sub>** (Kin + 2,4-D + GA3). L'effet du milieu de base **B5** a permis l'augmentation de ces poids jusqu'à 132,6727 mg sur le milieu **B5(M<sub>1</sub>)**, 102,1857 mg sur le milieu **B5(M<sub>2</sub>)** et 119,8313 mg sur le milieu (**B5(M<sub>4</sub>)**).

Contrairement au milieu **B5**, l'interaction du milieu **MS** est négative avec les compositions hormonales testées.

### 3.1.2.5. Influence de l'explant

Une comparaison de poids frais moyens des cals issus de différents explants est faite par le test d'indépendance (test de Student) (Tableau 3.10).

**Tableau 3.10** : Comparaison de poids frais moyen des cals issus de pousses et aiguilles

Variable	T-tests; Grouping: Explant (Spreadsheet7)						
	Moyenne Pousses	Moyenne aiguilles	valeur de t	degré de liberté	p	Effectif N Pousses	Effectif N aiguilles
Poids frais des cals (g)	1,568	0,093	20,340	364,0	0,000	204,0	162,0

Les résultats des essais obtenus, révèlent que la callogénèse dépend aussi de la nature des explants. Durant notre essai, ce sont les explants issus de pousses qui réagissent le mieux à la callogénèse.

Le pourcentage d'explants callogènes est de 79%, comparé aux explants foliaires qui ont de faibles capacités callogènes, dans les mêmes conditions de culture, estimée à 51%.

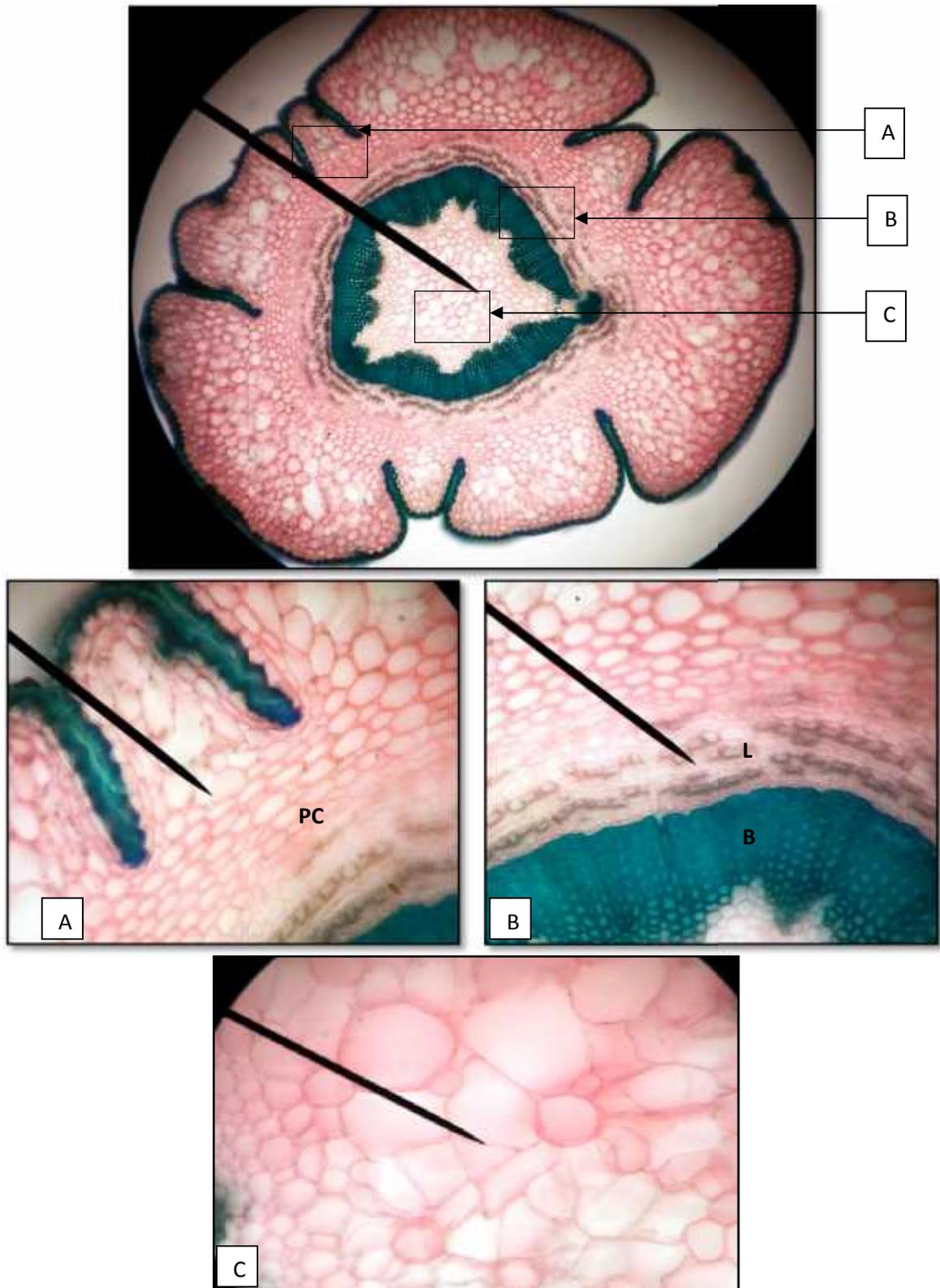
Il existe aussi une différence très hautement significative entre les poids frais moyens des cals ( $P=0,0000$ ) (tableau 3.10). Nous enregistrons un poids frais moyen de cals de 1,5682 g pour les explants issus de pousses et 0,0930 g pour les explants foliaires après 60 jours de culture.

Pour les explants provenant de pousses, la callogenèse se déclenche entre le 13<sup>ème</sup> et le 21<sup>ème</sup> jour après la mise en culture selon le milieu de culture. Les explants présentent d'abord un léger gonflement, accompagné de brunissement, au niveau des zones d'excisions. Les cals font, souvent, leur apparition au niveau de ces zones. Cette formation soit reste limitée au niveau de ces points soit elle se généralise pour couvrir la totalité de l'explant.

Pour les explants foliaires, la callogenèse est tardive par rapport à celle des explants issus de pousses. Elle commence après 30 jours de culture. L'apparition des cals reste souvent limitée au niveau des zones d'excisions. Notons par ailleurs, qu'après 60 jours de culture, ces cals stoppent leur croissance.

### **3.1.3. Coupes histologiques**

A partir des coupes histologiques transversales réalisées au niveau des pousses de *Taxus baccata* L. nous observons de l'extérieur vers l'intérieur (fig 3.23), un parenchyme cortical avec de grandes cellules (PC), le liber (L), et un bois homoxylé (B). Le bois et le liber constituent des pachytes continus. Un parenchyme médullaire composé de cellules de formes très diversifiées est observé (PM).



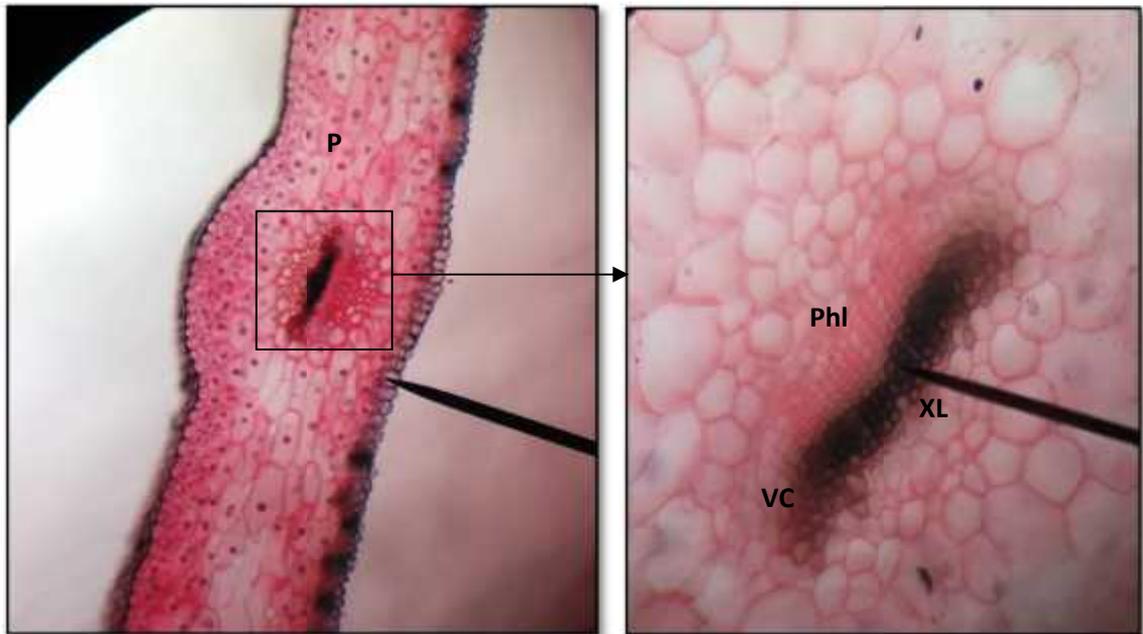
**Figure 3.23** : Coupes transversales au niveau de pousse de *Taxus baccata* L.

(A) **PC**: Parenchyme cortical (G x400).

(B) **L** : Liber, **B** : Bois (G x400).

(C) **PM** : Parenchyme médullaire (G x400).

Quant aux coupes histologiques transversales des aiguilles, nous observons un parenchyme à gros méats (P) (fig 3.24A), des vaisseaux conducteurs (VC) constitués du phloème (Phl) et du xylème (XL). Notant l'absence des canaux résinifères (fig 3.24).

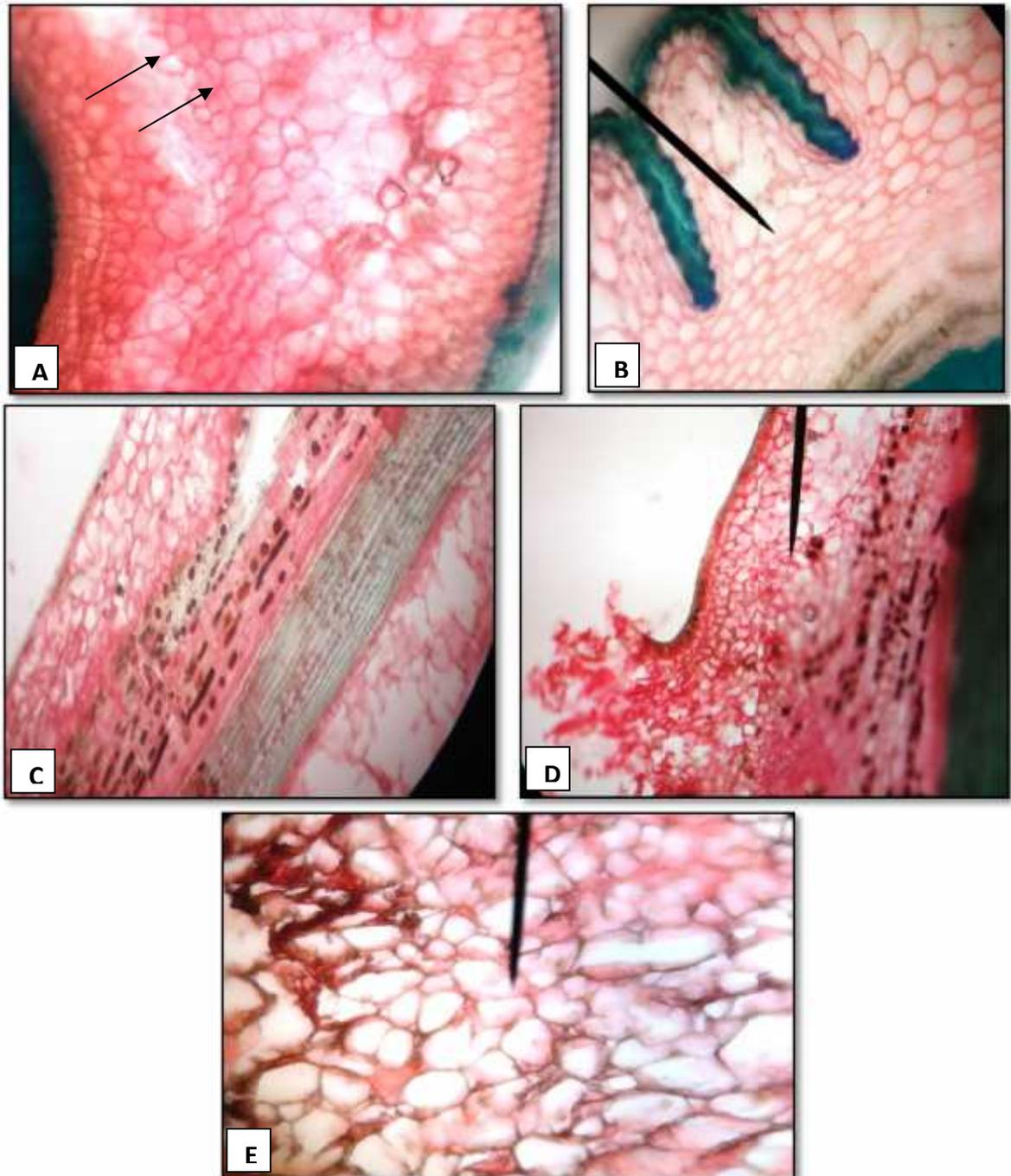


**Figure 3.24** : Coupes transversales au niveau d'aiguille de *Taxus baccata* L.

(A) **P** : Parenchyme à gros méats (G x100).

(B) **VC** : Vaisseaux conducteurs, **Phl** : Phloème, **XL** : Xylème (G x400).

A travers la comparaison des coupes au niveau de pousses avec celles des explants issus des mêmes organes après 20 jours d'induction (fig 3.25), nous constatons que le parenchyme cortical est à l'origine de la formation des cals. A ce niveau nous remarquons des cellules en division (fig 3.25A)



**Figure 3.25 :** Coupes au niveau des cals issus des pousses après 20 jours d'induction.

- (A) coupe transversale au niveau de cal plus explant pousse (G x100).
- (B) coupe transversale au niveau de pousses (G x100).
- (C) et (D) coupe longitudinale au niveau de cal (G x100).
- (E) foyer de division cellulaire (G x400).

### **3.2. Essais de production du taxol sur une suspension cellulaire**

A la lumière des résultats obtenus, nous avons choisi les cals provenant des pousses, induits sur le milieu de base de GAMBORG (**B5**) et la combinaison hormonale **M<sub>4</sub>** (1 mg/l de Kin + 1 mg/l de 2,4-D + 0,5 mg/l de GA3) pour réaliser des expériences sur les suspensions cellulaires.

#### **3.2.1. Croissance des cellules mises en suspension**

Le suivi de la croissance des cals synchronisés et non synchronisés en suspension, en tant que poids sec (PS), est représenté sur la figure 3.26.

Nous avons réussi à suivre la cinétique de croissance dans trois suspensions. Durant cette expérience, la durée de la culture est de 46 jours. Pendant le 16<sup>ème</sup> jour de culture, les cellules de la suspension **S<sub>2</sub>** ont été transférées sur le milieu **MS(M<sub>4</sub>)** et élicitées par l'acide salicylique.

Nous avons deux phases: 16 jours dans le milieu de production de biomasse (**B5(M<sub>4</sub>)**) et 30 jours dans le milieu de production du taxol (**(B5(M<sub>4</sub>) et MS(M<sub>4</sub>) + l'acide salicylique)**).

Les résultats obtenus montrent que, la croissance dans toutes les suspensions cellulaires est caractérisée par :

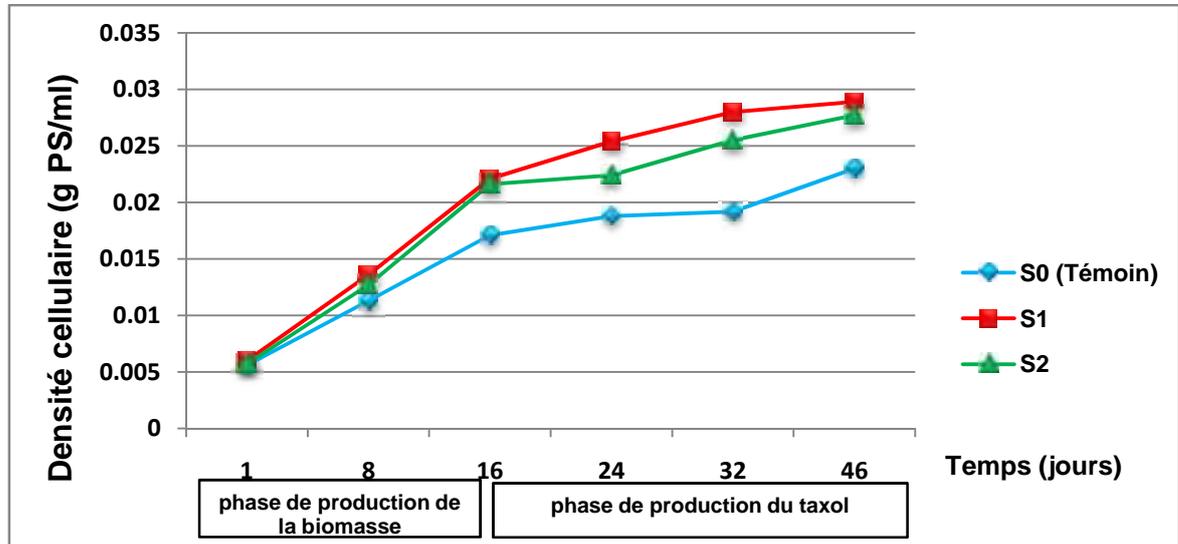
- une phase exponentielle entre le 1<sup>er</sup> et le 16<sup>ème</sup> jour, caractérisée par une croissance rapide et linéaire des cellules.
- une phase stationnaire à partir du 16<sup>ème</sup> jour, caractérisée par une augmentation lente de la croissance des cellules, jusqu'à atteindre un plateau au bout de 46 jours (fig 3.26).

Cependant cette croissance, estimée par le poids sec, diffère d'une suspension à une autre. En comparant les suspensions **S<sub>1</sub>** et **S<sub>2</sub>** avec le témoin (**S<sub>0</sub>**), nous remarquons que la croissance des cellules synchronisées (**S<sub>1</sub>** et **S<sub>2</sub>**) est plus importante que celle des cellules non synchronisées et ce quelque soit le milieu de culture (**B5(M<sub>4</sub>)** ou **MS(M<sub>4</sub>)**). Cette différence de poids augmente progressivement

au cours du temps jusqu'à avoir un maximum de biomasse à la fin de la culture (46<sup>ème</sup> jour), estimé à 0,0289 g PS/ml et 0,0277 g PS/ml respectivement pour **S<sub>1</sub>** et **S<sub>2</sub>**. Une biomasse faible est obtenue pour le témoin (**S<sub>0</sub>**) qui est estimée à 0,023 g PS/ml.

Nous constatons aussi que, pendant les 16 premiers jours de culture, la croissance des calcs synchronisés **S<sub>2</sub>** demeure la même que celle de **S<sub>1</sub>**. Durant cette période, ces calcs se caractérisent par une cinétique de croissance rapide allant d'un poids initial de l'ordre de 0,006 g PS/ml pour **S<sub>1</sub>** et 0,0057g PS/ml pour **S<sub>2</sub>** et progresse jusqu'à 0,0221g PS/ml (**S<sub>1</sub>**) et 0,0216 g PS/ml (**S<sub>2</sub>**) (fig 3.26).

Toutefois, dès le transfert de cellules de la suspension **S<sub>2</sub>** sur le milieu **MS(M<sub>4</sub>)** auquel nous avons ajouté l'acide salicylique, leur croissance est ralentit et devient moins importante que celle des cellules synchronisés non transférées (**S<sub>1</sub>**), pendant la première semaine après le transfert (16-24 jours), puis elles reprennent leur croissance avec une différence légère du poids sec final.



**Figure 3.26** : Cinétique de la croissance des cellules mises en suspension.

S0 (Témoin) : calcs non synchronisés (B5(M<sub>4</sub>)),

S1 : calcs synchronisés (B5(M<sub>4</sub>)),

S2 : calcs synchronisés transférés sur le milieu MS(M<sub>4</sub>) + l'acide salicylique.

### 3.2.2. Dosage du taxol

#### 3.2.2.1. Témoin taxol

Durant l'analyse de l'étalon (témoin taxol), deux pics ont été formés, l'un est à 2,56 min et l'autre est à 22,107 min (fig 3.27). Vu que le poids moléculaire du taxol ( $C_{47}H_{51}NO_{14}$ ) est très élevé (853,9g/mol), son pic ne pouvait pas être formé après seulement 2 min. pour cela, notre choix s'est porté sur le deuxième pic (fig 3.27).

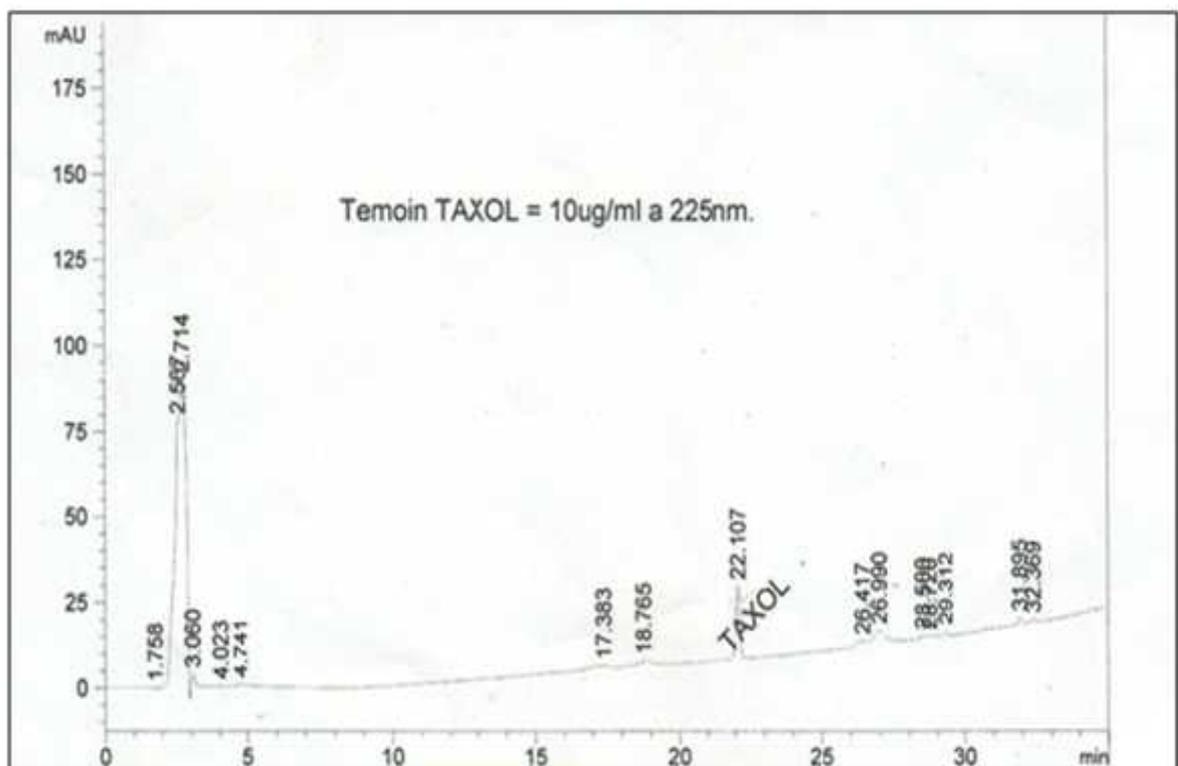
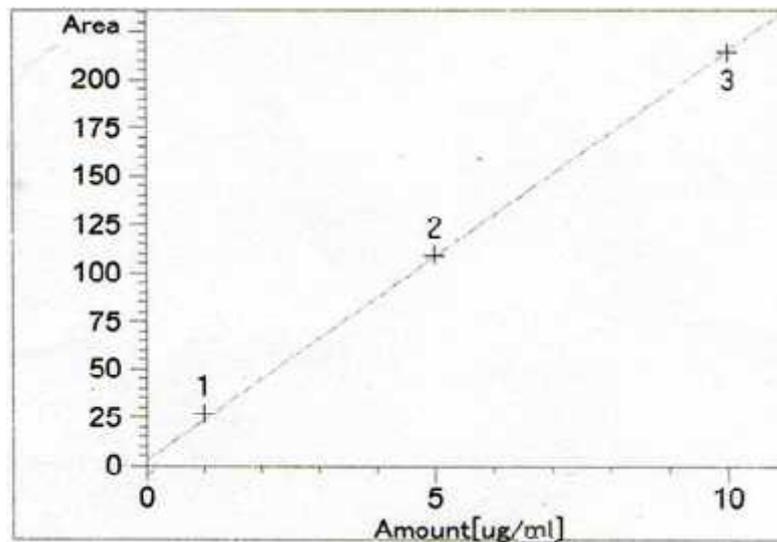


Figure 3.27 : Témoin taxol analysé à 225 nm par la CLHP.

### 3.2.2. 2. Courbe d'étalonnage

Sur la base des résultats obtenus grâce à la régression linéaire, nous déduisons que le coefficient de corrélation ( $R^2 = 0,9997$ ) représente une bonne corrélation entre les aires du pic et les différentes concentrations du taxol (fig 3.28).



**Figure 3.28** : Courbe d'étalonnage du témoin taxol obtenue par la CLHP  
 $y = 21,2179x + 2,7209$  ( $x =$  concentration du Taxol et  $y =$  aire du pic),  $R^2 = 0,9997$

### 3.2.2.3. Teneur des poussettes et des calcs en taxol

Les chromatogrammes des deux extraits, poussettes, et calcs, sont représentés sur les figures (3.29) et (3.30).

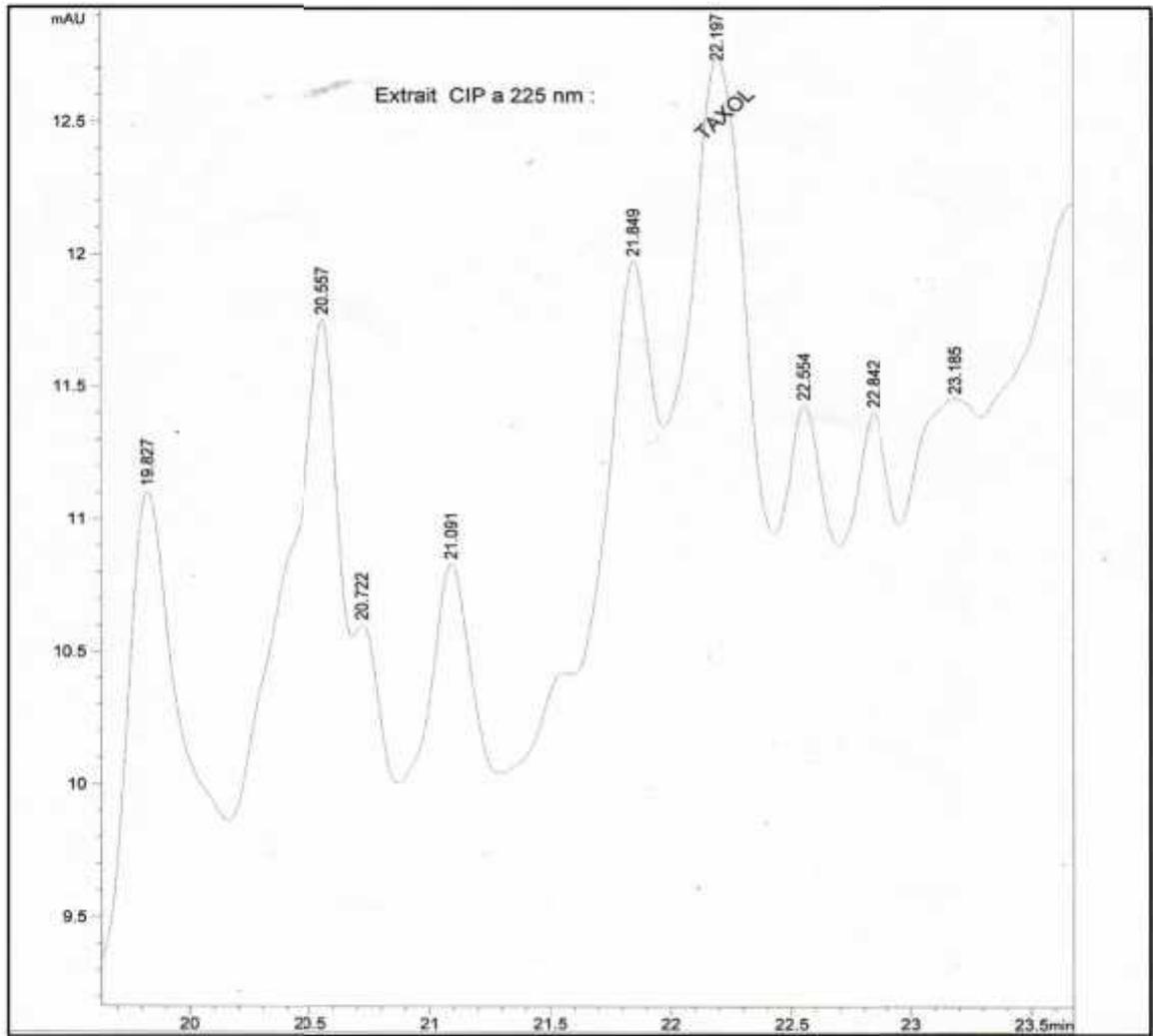
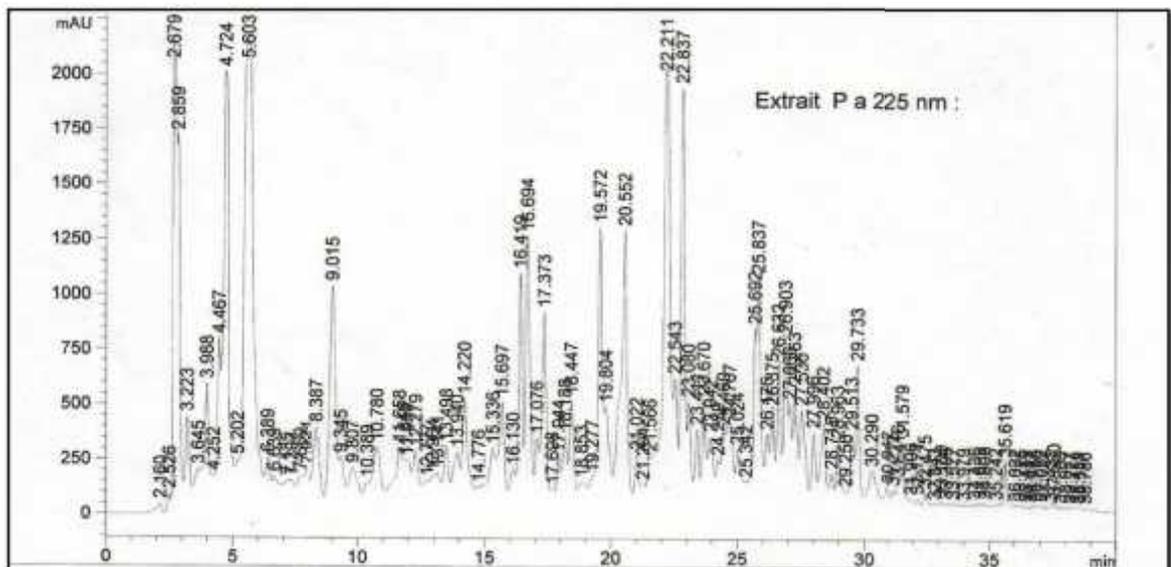


Figure 3.29 : Extrait des cals issus de pousses du *Taxus baccata* L.



Les chromatogrammes des deux extraits, pousses, et cals, présentent des pics correspondant au pic du chromatogramme témoin taxol. Le calcul des teneurs des pousses et des cals en taxol a été réalisé (tableau 3.13).

**Tableau 3.13** : Teneur de *Taxus baccata* L. en taxol.

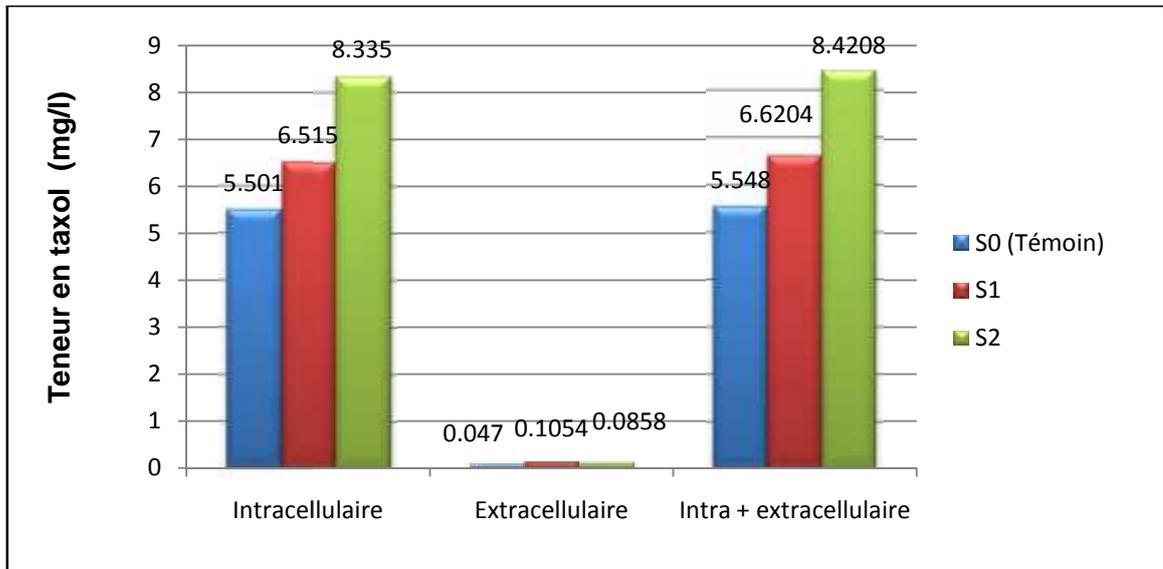
100 g de poudre	Taxol (g)
Pousses	0,0254
Cals	0,0021

Nous constatons que la teneur en taxol la plus importante est celle des pousses récoltées à partir de la plante. L'extrapolation des résultats obtenus donnent pour 10 kg de pousses sèches 2,54 g de taxol. Comparés aux cals secs où nous obtenons pour la même quantité (10kg) 0,21 g de taxol, quantité qui est très faible.

Le chromatogramme (fig 3.30), montre que le matériel végétal analysé, notamment les pousses, renferme d'autres taxanes potentiellement intéressants mais, par manque de standards, nous n'avons pas pu les identifier.

### **3.2.3. Production du taxol**

Les extraits de chaque suspension cellulaire ont été analysés par la CLHP (Annexe 17). Le calcul de taxol intracellulaire et extracellulaire (libéré dans le milieu) a été réalisé. Les résultats sont représentés sur la figure (3.31).



**Figure 3.31** : Teneur en taxol intracellulaire et extracellulaire des suspensions

$S_0$  (Témoin) : cals non synchronisés ( $B5(M_4)$ ),

$S_1$  : cals synchronisés ( $B5(M_4)$ ),

$S_2$  : cals synchronisés transférés sur le milieu  $MS(M_4)$  + l'acide salicylique.

Nous observons des différences de taux de taxol, en fonction du milieu de culture utilisé, mais également en fonction de l'inoculum initial (cellules synchronisées et non synchronisées) (fig 3.31).

En comparant la suspension  $S_1$  avec le témoin  $S_0$ , nous remarquons que les cellules synchronisées ( $S_1$ ) ont produit une quantité un peu plus élevée du taxol que celle des cellules non synchronisées ( $S_0$ ). Cette production est estimée à 6,6204 mg/l du taxol total comparée à celui produit par les cellules non synchronisées ( $S_0$ ) avec 5,548 mg/l. L'homogénéité de la suspension cellulaire a augmenté légèrement le rendement en taxol par un facteur de 1,2 après 46 jours de culture.

La stimulation de la production dans le milieu  $MS(M_4)$  par l'acide salicylique ( $S_2$ ) a augmenté le rendement en taxol total de 6,6204 mg/l ( $S_1$ ) jusqu'à 8,4208 mg/l, après 30 jours de production. Cependant, cette augmentation de la quantité de taxol n'a pas été très importante.

Quant au taxol extracellulaire, nous remarquons que la quantité du taxol libérée par les cellules synchronisées non élicitées (**S<sub>1</sub>**) est de 0,1054 mg/l. Elle est plus élevée que celle libérée par les cellules synchronisées et élicitées (**S<sub>2</sub>**) avec 0,0858mg/l. Nous pouvons émettre une hypothèse que la concentration du taxol extracellulaire n'est pas liée à la concentration du taxol intracellulaire.

## CHAPITRE 4

### DISCUSSION

#### 4.1. Aptitude à la callogenèse de *Taxus baccata* L.

##### 4.1.2. Stérilisation du matériel végétal

La contamination du matériel végétal est le problème commun qui a été rencontré premièrement dans la culture des tissus de *Taxus* sp. [109]. La durée des cultures est longue et les milieux sont relativement riches favorisant le développement des microorganismes dont la croissance est bien plus rapide que celle du tissu végétal. Le seul type d'infection enregistré est d'origine fongique, phénomène régulièrement observé chez plusieurs espèces de *Taxus* sp. [109] [110]. Le taux de contamination des pousses était plus élevé que celui des aiguilles. Selon LI et *al.*, [109] cette différence est attribuée au niveau élevé des champignons endophytes dans les pousses.

La méthode de stérilisation au fongicide n'a pas été retenue vu qu'elle s'est montrée agressive pour les explants foliaires. LI et *al.*, [109] soulignent que l'agent de stérilisation peut rester à l'intérieur des tissus. Dans notre cas, cet effet nocif pourrait être dû à la pénétration de la matière active, la thiophanate-méthyle, dans les tissus des aiguilles et la fragilité de ces dernières.

##### 4.1.2. Aptitude à la callogenèse

Des cals issus de pousses présentant un aspect volumineux ont été observés, avec une coloration jaune pâle sur le milieu **B5** et le milieu **WPM** et une coloration verte pâle sur le milieu **MS**.

Les explants foliaires présentent de petits cals avec une coloration jaune pâle sur le milieu **MS** et le milieu **WPM** et une coloration verte pâle sur le milieu **B5** contrairement aux explants de pousses.

Ces cals sont tous friables et lisses dont certains présentent parfois des colorations rouge-marron dues aux brunissements. Les mêmes observations ont été signalées par plusieurs auteurs [4] [71] [109]. Ce brunissement est un problème commun dans la culture des cals des espèces ligneuses. Certains attribuent ce brunissement à la sécrétion par les cellules végétales des pigments ou des composés phénoliques. Leurs produits d'oxydation empêchent les activités de beaucoup d'enzymes, en endommageant le métabolisme cellulaire et par conséquent, ralentissent la croissance de ces cellules [4] [111].

D'autres auteurs attribuent ce problème de brunissement au matériel végétal (cause interne) et à la composition hormonale du milieu utilisé (cause externe). Selon XIA et *al.*, [112] les jeunes pousses sont les meilleurs explants à utiliser pour éviter le brunissement des cals.

Dans notre expérimentation, malgré les précautions prises à savoir l'utilisation de jeunes explants, l'addition des antioxydants dans le milieu (le charbon actif et l'acide ascorbique) et l'incubation à l'obscurité, des brunissements sont apparus surtout sur les milieux dont la composition hormonale est 2 mg/l de 2,4-D.

LI et *al.*, [109] précisent que le 2,4-D est une hormone qui peut induire à la callogenèse, mais peut avoir comme conséquence le brunissement des cultures. Des études récentes, attribuent ce brunissement aux concentrations élevées du sucrose et du glucose dans le milieu de culture [113].

Après 60 jours de culture, le taux d'initiation des cals à partir des pousses est très élevé dépassant les 70%. Ces proportions sur les milieux de base **B5**, **MS** et **WPM** sont respectivement de 87%, 73% et 76%. Ces résultats sont proches à ceux obtenus par LI et *al.*, [109] pour l'espèce *Taxus chinensis* avec 83,5% sur le

milieu **B5** et 82,5% sur le milieu **MS**. Nos résultats obtenus comparés avec ceux de FETT-NETO et *al.*, [114] sont meilleurs. En effet, leurs résultats obtenus sur l'espèce *Taxus cuspidata* sont plus faibles, ils n'enregistrent que 15% pour le milieu **B5**.

Quant à la croissance des cals sur les milieux **B5**, **MS** et **WPM**, les résultats obtenus sont conformes à ceux de WICKREMESINHE et ARTECA [71]. Notons que le milieu **B5** est plus favorable à la croissance que les milieux **WPM** et **MS** avec des poids frais des cals respectivement de 2,0927 g sur le milieu **B5**, 1,3425 g sur le milieu **WPM** et 1,0729 g sur le milieu **MS**.

Par contre, KETCHUM et *al.*, [115] signalent qu'il n'y a aucune différence entre la croissance des cals issus des pousses de *Taxus brevifolia* développés sur le milieu **B5** et le milieu **MS**. Quant à MIHALJEVIC et *al.*, [4] ils précisent que le milieu **B5** est moins efficace que le milieu **MS** pour la croissance des cals issus des pousses de *Taxus baccata* L. Washingtonii.

Concernant les explants foliaires, leurs pourcentages d'induction de cals sont beaucoup plus fluctuants que ceux des pousses. Nous avons obtenu 69% pour le milieu **B5**, 39% pour le milieu **MS** et 40% pour le milieu **WPM**. Quant à la croissance, nous avons constaté que le milieu **MS** est le moins favorable à la prolifération cellulaire avec 66,652 mg que le milieu **B5** (122,640 mg) et le milieu **WPM** (81,220 mg). Selon ZHONG [116] le milieu **MS** inhibe souvent la croissance des cals ce qui confirme nos résultats.

Il ressort que l'induction des cals à partir des explants foliaires est beaucoup plus influencée par la composition minérale que celle des pousses. La prolifération cellulaire de ces cals est favorisée par les milieux **B5** et **WPM**, cela pourrait être dû à la faible teneur en azote de ces deux milieux par rapport au **MS**. La composition des macroéléments, particulièrement l'azote, est plus forte pour le milieu **MS** avec 40 mM du nitrate et 20 mM d'ammonium. Le milieu **B5** contient 25 mM du nitrate et 2 mM d'ammonium et le milieu **WPM** en contient beaucoup moins soit 10 mM du nitrate et 5 mM d'ammonium [71]. Selon KETCHUM et *al.*, [115], il y

a une forte corrélation entre la diminution de  $\text{NH}_4^{4+}$  et l'augmentation de la croissance des cals de *T. brevifolia*.

Nous avons constaté que le milieu **B5** (GAMBORG) est le plus favorable à l'induction et à la croissance des cals et ce quelque soit le type d'explant.

L'absence des hormones de croissance dans le milieu de culture a permis d'observer que la formation de cal à partir de pousses et d'aiguilles de *Taxus baccata* L. était totalement inhibée. Ces résultats sont contradictoires à ceux obtenus par WICKREMESINHE [117] qui signale que les cals de *Taxus x media* cv. Hicksii ont été stimulés sur un milieu sans hormones.

L'addition du 2mg/l de la kinétine au milieu de culture a permis d'avoir des cals seulement chez les explants issus de pousses avec un taux très faible ne dépassant pas 31%. Cette formation des cals reste limitée au niveau des zones de blessures. Ces résultats concordent avec ceux de WICKREMESINHE et ARTECA [71] qui signalent que la concentration de kinétine entre 1 et 2 mg/l endommage les explants de *Taxus baccata* cv. Repandens, *T. brevifolia*, *T. cuspidata*, et *T. x media* cv. Hicksii. en provoquant des brûlures.

L'addition du 2,4-D à la kinétine a amélioré nettement la formation de cals avec un taux de 95% pour les explants foliaires et 76% pour les explants issus de pousses. MONACELLI et al., [69] ont travaillé sur les cals du *Taxus baccata* et ils ont montré que la combinaison du 2,4-D et de la kinétine donne une meilleure induction des cals. Ce résultat confirme le taux obtenu (95%) pour les explants foliaires dans notre étude. Notons que cette combinaison n'est pas la meilleure pour l'induction des cals à partir de pousses. Nous avons enregistré un taux d'induction des cals à partir de pousses de 100% sur tous les milieux de culture contenant 2 mg/l de 2,4-D. Cela est en accord avec les résultats de WICKREMESINHE et ARTECA [71] qui montrent que le 2,4-D est la meilleure source d'auxine pour l'induction des cals de *T. brevifolia* et *T. baccata* cv. Repandens. La concentration de 2 mg/l est considérablement moins élevée que celle rapportée par FETT-NETO et al., [100] qui ont travaillé sur les cals de *Taxus*

*cuspidata*. Ils ont mentionné que la meilleure croissance est obtenue à une concentration de 8 mg/l de 2,4-D et 1 mg/l de kinétine.

Quant aux explants foliaires, la présence de 2 mg/l du 2,4-D dans le milieu de culture permet d'induire les cals avec un pourcentage de 48%. Cette faible réponse peut être interprétée par une toxicité de l'hormone. Selon MARGARA [58] le 2,4-D est une auxine très forte, devenant rapidement toxique aux concentrations élevées.

L'addition de la GA3 à la kinétine et au 2,4-D a amélioré significativement le taux d'induction et la croissance des cals issus de pousses. L'effet synergique entre ces régulateurs pourrait être à l'origine de cette amélioration [58]. Ces résultats sont en conformité avec ceux obtenus par KETCHUM et *al.*, [115] et FETT-NETO et *al.* [100]. Ce type de milieu inhibe l'induction des cals chez les explants foliaires tandis qu'il favorise significativement leur activité cellulaire.

Nous avons constaté que le 2,4-D, seul ou combiné avec la kinétine et la GA3, a le même effet sur le poids frais final des cals issus de pousses après 60 jours de culture. De plus, sa présence semble nécessaire pour le déclenchement de la callogenèse des explants foliaires.

Une interaction de milieu de base et de la composition hormonale est confirmée par une analyse factorielle.

Concernant les cals issus de pousses, le milieu de base **B5** (GAMBORG) semble interagir positivement avec le **2,4-D** seul ou associé avec la **kinétine** et la **GA3**, avec un taux d'induction de 100% et une croissance de cals de 2,4386 g pour le milieu **B5(M<sub>2</sub>)** (2 mg/l de **2,4-D**) et 3,2858g pour le milieu **B5(M<sub>4</sub>)** (1mg/l de **Kin** + 1 mg/l de **2,4-D** + 0,5 mg/l de **GA3**). En revanche, l'interaction des milieux de base **MS** et **WPM** avec les différentes combinaisons hormonales testées serait en baisse de la callogenèse. Malgré que cette interaction soit favorable à l'induction des cals, elle n'est pas suivie d'une prolifération cellulaire intense.

Le même phénomène s'est reproduit pour les cals issus des explants foliaires sauf que la composition hormonale **M<sub>1</sub>** (0,75 mg/l de **Kin** + 0,75 mg/l de **2,4-D**) a interagit positivement avec le milieu de base **B5**. Cela est démontré par le fait que le milieu **B5(M<sub>1</sub>)** est le meilleur pour la croissance des cals issus des explants foliaires.

En comparant le milieu **B5(M<sub>2</sub>)** (2 mg/l de **2,4-D**) et le milieu **B5(M<sub>4</sub>)** (1mg/l de **Kin** + 1 mg/l de **2,4-D** + 0,5 mg/l de **GA3**), nous avons remarqué que la première manifestation des cals issus de pousses dans le milieu **B5(M<sub>2</sub>)** est plus précoce que dans le milieu **B5(M<sub>4</sub>)**. Des résultats similaires ont été obtenus par LI et *al.*, [109] où ils signalent que l'initiation des cals de *Taxus chinensis* avec le **2,4-D** se reproduit plus rapidement, 2 à 3 jours avant, en comparaison avec l'apport de NAA dont l'initiation est légèrement plus lente.

Le suivi de la croissance sur le milieu **B5(M<sub>2</sub>)** et **B5(M<sub>4</sub>)** montre que les cals issus de pousses sur le milieu **B5(M<sub>2</sub>)** ont une croissance plus rapide que celle des cals sur le milieu **B5(M<sub>4</sub>)** pendant les 35 premiers jours, cependant cette croissance est ralenti par la suite, et la croissance sur le milieu **B5(M<sub>4</sub>)** devient plus importante. Cette régression pourrait être justifiée par la présence des brunissements causés par le **2,4-D**. Ces derniers ont été signalés par WICKREMESINHE et ARTECA [71] sur les milieux contenant le **2,4-D**. Selon LI et *al.*, [109] il serait bénéfique à la croissance de subcultiver les cals sur un autre milieu contenant de faible concentration de **2,4-D** ou sur un milieu dépourvu complètement de cette hormone de croissance.

La dose de 2 mg/l de **2,4-D** sur le milieu **B5** est favorable à la callogenèse à partir de pousses. Cette constatation est confirmée par GIBSON et *al.*, [98] ayant expérimenté des cals de *Taxus brevifolia*. De plus, les analyses statistiques montrent qu'à une concentration du **2,4-D** constante, l'adjonction au milieu de culture de la kinétine et de la **GA3** permet d'obtenir le taux d'induction et la croissance des cals issus de pousses les plus élevées.

Les explants issus de pousses se sont révélés comme un matériel de choix pour la callogenèse comparés aux explants foliaires. Ces explants se

caractérisent par une forte activité callogène dont le déclenchement est entre le 13<sup>ème</sup> et le 21<sup>ème</sup> jour après le repiquage selon le milieu de culture testé. Tandis que, les explants foliaires se caractérisent par une activité cellulaire tardive où l'apparition des cals n'est observée qu'à partir de 30 jours en se limitant au niveau des zones d'excisions. Des résultats concordants ont été obtenus par WICKREMESINHE et ARTECA [71] sur la même espèce.

Pour l'étude de la deuxième partie de notre travail, nous avons choisi les cals provenant des pousses, induits sur le milieu de base **B5** et la combinaison hormonale **M<sub>4</sub>** (1mg/l de Kinétine + 1mg/l de 2,4-D + 0,5mg/l de GA3). Le suivi du taux de croissance de ces cals montre une diminution de croissance sur ce milieu. Cela a été justifié par WICKREMESINHE et ARTECA [71] par la diminution de l'index mitotique coïncidant avec le virage progressif de la couleur des cals de jaune pâle au marron après les subcultures ultérieures.

L'étude histologique **des** explants issus des pousses a montré que la formation des **cals** est due à la division cellulaire du parenchyme cortical. Monacelli et *al.*, [69] ont montré que cette formation est due à la division du parenchyme cortical et du cambium.

## **4.2. Essais de production du taxol sur une suspension cellulaire**

### **4.2.1. Croissance des cellules mises en suspension**

Dans le système biphasique utilisé, les cellules synchronisées (**S<sub>1</sub>** et **S<sub>2</sub>**) et non synchronisées (**S<sub>0</sub>**) se sont développées activement pendant la première phase de la culture dans le milieu de production de biomasse, en multipliant par un facteur égal à 3,7 et 3 respectivement après seulement 16 jours. Ces résultats concordent avec ceux obtenus par ONRUBIA et *al.*, [13] en élicitant les cellules de *T.baccata* par le méthyle jasmonate et le vanadyle sulfate.

Quand les cellules synchronisées (**S<sub>2</sub>**) ont été transférées sur le milieu de production du taxol **MS** (1 mg/l de **Kin** + 1 mg/l de **2,4-D** + 0,5 mg/l de **GA3**) auquel nous avons ajouté l'acide salicylique dans des conditions contrôlées

(température, obscurité et agitation), la biomasse a augmenté approximativement par un facteur de 1,2 seulement entre le 16<sup>ème</sup> et le 46<sup>ème</sup> jour. L'addition de l'acide salicylique n'a pas vraiment changé la croissance de ces cellules (**S<sub>2</sub>**) si on la compare avec celle des cellules synchronisées non élicité (**S<sub>1</sub>**). Nos résultats ne sont pas conformes à ceux obtenus par YU et *al.*, [118] qui ont mentionné que l'acide salicylique provoque plutôt une diminution de croissance des cellules mises en suspension de *Taxus chinensis*. Ces résultats contradictoires peuvent s'expliquer, par le fait que, l'effet ne dépend pas seulement de l'éliciteur lui-même (type, concentration et durée de stimulation) mais également des espèces, des cellules et du stade de développement de la culture [119].

Toutefois, le recul de la croissance de ces cellules, pendant la première semaine de production, peut être justifié par une phase de latence résultant du changement du milieu de base.

#### **4.2.2. Production du taxol**

La teneur en taxol total (intracellulaire + extracellulaire) de la culture **S<sub>0</sub>** (témoin) maintenue dans le milieu de production de la biomasse **B5(M<sub>4</sub>)**, était faible, atteignant une production de 5,548 mg/l à la fin de la culture. Nous déduisons que les conditions de production de la biomasse ne sont pas favorables à la production du taxol. Selon WANG et *al.*, [106] la synthèse des métabolites secondaires s'accroît quand le métabolisme primaire (synthèse de biomasse) est inactif.

Toutefois, la synchronisation des cellules a permis une augmentation légère de rendement multiplié par un facteur de 1,2 après 46 jours de culture. Ces résultats ne sont pas conformes à ceux obtenus par YU et *al.*, [75] où la production du taxol par les cellules synchronisées est moins élevée que celle des cellules non synchronisées.

Le meilleur rendement du taxol enregistré est celui des cellules synchronisées (**S<sub>2</sub>**) et élicitées par l'acide salicylique sur le milieu **MS(M<sub>4</sub>)**, il est de 8,4208 mg/l.

Nos résultats ne sont pas conformes à ceux obtenus par YU et *al.*, [118] qui en utilisant la même concentration en acide salicylique (50mg/l), ils n'obtiennent que 5 mg/l de taxol. La réponse à l'éliciteur dépend de plusieurs facteurs, en particulier la capacité biosynthétique de la cellule [13].

Quant au taxol libéré dans le milieu, les concentrations obtenues sont entre 0,047 et 0,1054 mg/l, ce qui reste très faible. Ces concentrations ne sont pas liées à la concentration du taxol intracellulaire. Nos résultats concordent avec ceux obtenus dans la littérature [72] [120] [121]. L'un des problèmes qui doit encore être résolu dans l'exploitation biologique des cultures cellulaires de *Taxus sp.* est comment augmenter la libération du taxol dans le milieu de culture. Selon WU et LIN [103] les produits accumulés dans les cellules ou dans le milieu de culture peuvent causer une rétro-inhibition de leur biosynthèse et ils pourraient être également exposés à la dégradation.

A travers les résultats obtenus et ceux de la littérature, nous pouvons déduire que la suspension des cellules végétales est caractérisée par un degré très élevé d'hétérogénéité. Il peut également y avoir des variations significatives, entre les cellules de la même suspension, dans leur capacité de production, leur taux de croissance et leurs cycles cellulaires.

#### **4.2.3. Teneur des pousses et des cals en taxol**

Les compositions qualitatives et quantitatives des produits peuvent varier considérablement à cause de la variabilité naturelle des plantes. Durant nos expérimentations, l'analyse chromatographique CLHP montre que les extraits des pousses du l'if (*Taxus baccata* L.), récoltées pendant le mois d'octobre (Parc National de Chréa), contiennent 0,0254 g de taxol par 100 g de poids sec. Ce résultat est cohérent en termes d'ordre de grandeur avec celui énoncé pour l'if du pacifique (*Taxus brevifolia*) (entre 0,001 à 0,1 g pour 100 g de poids sec) [122].

Cette teneur est plus intéressante que celle obtenue par VALLATA [2] qui après extraction de taxol à partir des pousses de *T.baccata* collectées dans la nature, confirme que pour 100g de pousses la quantité de taxol est approximativement

0,009 g. Plusieurs facteurs comme le site d'échantillonnage et les différences entre les plantes (âge et environnement) peuvent expliquer ces écarts dans les résultats.

Nous déduisons que la teneur de taxol dans les pousses estimée à 0,0254 g est plus importante comparée aux cals avec une quantité de 0,0021 g dans 100 g de poids sec. Selon YU et *al.*, [75] les métabolites secondaires s'accumulent habituellement à des niveaux très bas dans les cals en comparaison avec la plante dans son milieu naturel.

## CONCLUSION

L'if commun (*Taxus baccata* L.) est une espèce endémique de l'Algérie. Cette espèce reste méconnue et mal exploitée en Algérie que ce soit sur le plan thérapeutique ou sur le plan écologique. Néanmoins, elle est déclarée menacée et en voie de disparition.

Les résultats obtenus au cours de ce travail concernent essentiellement l'étude de l'aptitude à la callogenèse de *Taxus baccata* L. en vue d'optimiser la production du taxol dans des suspensions cellulaires. Cette étude nous a permis de mettre en évidence quelques paramètres influençant la callogenèse et la production du taxol de cette espèce.

Nous sommes parvenus dans la première partie de recherche aux résultats suivants :

La méthode de stérilisation au fongicide, étant plus agressive pour les explants foliaires que la méthode de stérilisation au peroxyde d'hydrogène. En effet, la moitié des explants foliaires (51%) n'a eu aucune évolution durant notre expérimentation. Pour cela, nous avons continué nos essais en utilisant la méthode de stérilisation au peroxyde d'hydrogène.

Quant à la composition minérale du milieu de culture, quelque soit le type d'explant, le milieu de GAMBORG (**B5**) semble être le plus favorable pour l'induction et la prolifération cellulaire. Le pourcentage d'induction des cals à partir des pousses et des aiguilles était respectivement de 87 et 69% avec une croissance estimée respectivement à 2,0927 g et 0,1226 g de poids frais des cals après 60 jours de culture.

L'apport des régulateurs de croissance paraît nécessaire pour le déclenchement de la callogenèse. La composition hormonale **M<sub>1</sub>** (0,75mg/l 2,4-D et 0,75mg/l kin) est la plus favorable à l'induction des cals à partir des explants foliaires (95%). De plus la présence de 2,4-D est nécessaire pour le déclenchement de la callogenèse contrairement à la kinétine. L'ajout de la GA3

augmente l'effet callogène du 2,4-D et de la kinétine sur les aiguilles en favorisant la prolifération cellulaire. Quant aux explants provenant des pousses, les compositions hormonales **M<sub>2</sub>** et **M<sub>4</sub>** se sont révélées les plus favorables à l'induction avec un pourcentage respectivement de 100 et 97%. De plus, la combinaison de la GA3, du 2,4-D et de la Kinétine a un effet synergique sur l'induction et la prolifération cellulaire.

Les résultats de l'évaluation de l'aptitude à la callogenèse des pousses et des aiguilles montrent que les explants issus de pousses ont un fort pouvoir callogène que les explants foliaires. Le pourcentage d'induction des cals à partir les explants issus de pousses obtenu est de 79% avec un poids frais moyen des cals égal à 1,5682 g. L'étude histologique de ces derniers a montré que le parenchyme cortical est à l'origine de la formation des cals.

Durant notre expérimentation, malgré les précautions prises notamment, la manipulation sur de jeunes explants, l'addition des antioxydants dans le milieu et l'incubation à l'obscurité, quelques brunissements sont apparus particulièrement sur les milieux contenant 2 mg/l de 2,4-D.

Les résultats de l'optimisation de la production de taxol nous révèlent que :

Les pousses de *Taxus baccata* L., récoltées pendant le mois d'octobre (Parc National de Chréa), contiennent une concentration de taxol peu rentable. Cette dernière est estimée à 0,0254g de taxol par 100g de poids sec. Cette teneur reste faible si nous voulons préserver l'espèce.

Ainsi, la teneur des cals en taxol après 30 jours de culture est très faible. Elle est estimée à 0,0021 g de taxol dans 100 g de poids sec.

La croissance des cellules synchronisées (**S<sub>1</sub>** et **S<sub>2</sub>**) était plus importante que celle des cellules non synchronisées. Le meilleur rendement du taxol enregistré est égal à 8,4208 mg/l, produit par les cellules synchronisées et élicitées par l'acide salicylique sur le milieu **MS(M<sub>4</sub>)**. Il est plus important que le taxol obtenu sur

les cellules synchronisées ( $S_1$ ) et les cellules non synchronisées ( $S_0$ ) avec respectivement de 6,6204 et 5,548 mg/l.

Les concentrations du taxol extracellulaire (libéré dans le milieu) ne sont pas liées aux concentrations du taxol intracellulaire et ils sont entre 0,047 et 0,1054 mg/l, ce qui reste très faible.

Cette étude préliminaire mérite d'être poursuivie et approfondie.

### **Perspectives**

Suite aux résultats obtenus en comparaison à ceux de la littérature, nous ne pouvons pas préconiser l'extraction du taxol directement à partir des organes de la plante. Il serait souhaitable, dans nos futures recherches de se pencher sur :

- Mise en évidence d'un plan de gestion et de valorisation de l'espèce ;
- La régénération de *Taxus baccata* L. par micropropagation ;
- L'évaluation de l'aptitude à la callogenèse des autres explants, notamment les embryons et les racines.  
Afin d'éviter les brunissements obtenus, il serait préférable de subcultiver les cals sur un milieu dépourvu de 2,4-D ;
- L'optimisation du milieu des suspensions et la maîtrise des paramètres physico-chimiques (température, pH) pour un meilleur rendement de taxol ;
- L'augmentation de volume des suspensions cellulaires à partir de 1 litre pour obtenir des résultats applicables et plus probants à grande échelle ;
- L'identification des autres taxanes présents dans la plante et les cals pour augmenter le rendement.

## ANNEXES

**Annexe 1 : Composition de milieu de MURASHIGE et SKOOG [63].**

Solutions mères	Composés	Quantité à peser (solution mère) (g/l)	Volume à prélever (ml / litre de milieu de culture)
<b>Macroéléments MS</b>	NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	16,50	100
	KNO <sub>3</sub>	19	
	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1,7	
	CaCl <sub>2</sub> , 2H <sub>2</sub> O	4,4	
	MgSO <sub>4</sub> , 7H <sub>2</sub> O	3,7	
<b>Microéléments MS</b>	MnSO <sub>4</sub> , 4 H <sub>2</sub> O	16.9	1
	H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	6.2	
	ZnSO <sub>4</sub> , 7H <sub>2</sub> O	8.6	
	KI	0.83	
	CoCl <sub>2</sub> , 6H <sub>2</sub> O	0.025	
	Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> , 2H <sub>2</sub> O	0.25	
	CuSO <sub>4</sub> , 5 H <sub>2</sub> O	0.025	
<b>Fe EDTA</b>	FeSO <sub>4</sub> , 7H <sub>2</sub> O	2,785	10
	Na <sub>2</sub> EDTA	3,725	

**Solution vitaminique du milieu MS.**

Vitamines	Quantité à peser (g/l) (solution mère)	Volume à prélevé (ml/ litre de milieu de culture)
Acide nicotinique	0,05	10
Pyridoxine HCl	0,05	
Glycine	0,2	
Thiamine	0,01	
inositol	10	

**Annexe 2 : Composition de milieu de GAMBORG (B5) [64].**

<b>solutions mères</b>	<b>Constituants</b>	<b>Quantité à peser g/l (solution mère)</b>	<b>Volume à prélever (ml / litre de milieu de culture)</b>	<b>Concentration finale (mg/l) (milieu de culture)</b>
<b>A</b>	$(\text{NH}_4)_2 \text{SO}_4$	6,70	20	134
<b>B</b>	$\text{KNO}_3$	125,00	20	2500
<b>C</b>	$\text{H}_3\text{BO}_3$	0,60	5	3
	$\text{NaH}_2(\text{PO}_4) \cdot \text{H}_2\text{O}$	30,00		150
	KI	0,15		0,75
	$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0,05		0,25
	$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0,005		0,025
<b>D</b>	$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	30,00	5	150
<b>E</b>	$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	50,00	5	250
	$\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	2,00		10
	$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,40		2
	$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	0,005		0,025
<b>G</b>	Thiamine HCl	2,00	5	10
	Acide Nicotinique	0,20		1
	Pyridoxine HCl	0,20		1

**Annexe 3 : Composition du Woody Plant medium (WPM) [66].**

Solutions mères	Constituants	Volume total pour chacune des solutions mères (ml)	Quantité à peser (g)	Volume de solution mère à prélever pour faire 1l de milieu WPM (ml)
<b>A</b>	NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	400	8	20
	Ca(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> , 4H <sub>2</sub> O		11,12	
<b>B</b>	K <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	400	19,8	20
<b>C</b>	CaCl <sub>2</sub> , 2H <sub>2</sub> O	100	1,92	5
<b>D</b>	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	100	3,4	5
	H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>		0,124	
	Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> , 2H <sub>2</sub> O		0,005	
<b>E</b>	MgSO <sub>4</sub> , 7H <sub>2</sub> O	100	7,4	5
	MnSO <sub>4</sub> , H <sub>2</sub> O		0,446	
	ZnSO <sub>4</sub> , 7H <sub>2</sub> O		0,172	
	CuSO <sub>4</sub> , 5H <sub>2</sub> O		0,005	
<b>F</b>	FeSO <sub>4</sub> , 7H <sub>2</sub> O	100	0.557	5
	Na <sub>2</sub> , EDTA		0.745	
<b>G</b>	Thiamine HCl	100	0.02	5
	Acide Nicotinique		0.01	
	Pyridoxine HCl		0.01	
	Glycine		0.04	

**Annexe 4 : Préparation des régulateurs de croissance.**

<b>Hormones de croissance (poudre)</b>	<b>Solvants appropriés</b>
Cytokinines (BAP, K, 2IP, Z)	A dissoudre dans HCl 1N
Auxines (NAA, IBA, IAA, 2,4-D)	A dissoudre dans KOH 1N
Gibbérelines (GA3, GA4, GA7)	A dissoudre dans de l'eau puis à chauffer

**Annexe 5 : Protocole de réalisation des Coupes histologiques par microtome**

Les étapes à suivre sont :

- Fixation des organes ;
- Inclusion des organes dans la paraffine ;
- Coloration des coupes.

**1. Fixation**

Le but de la fixation histologique est d'immobiliser les structures cellulaires et de les conserver dans un état le plus proche possible de l'état vivant. Cette opération permet la confection des coupes.

Nous avons utilisé le formaldéhyde à 10% pendant 24heure. Ce dernier ne contracte pas les tissus mais les durcit fortement. Il acidifie le cytoplasme qui devient basophile et prend donc les colorons avec avidité. Le fixateur est remplacé par l'alcool 70°. L'éthanol assure une bonne conservation des organes pendant plusieurs mois.

## **2. Inclusion des organes dans la paraffine**

Cette étape comporte une déshydratation des pièces à l'éthanol dans un premier temps puis une imprégnation par le toluène, et enfin le coulage des blocs.

### **- Déshydratation**

La déshydratation consiste à éliminer l'eau qui se trouve dans des tissus par des passages successifs des explants dans les bains d'éthanol suivants :

- Ethanol 95° pendant 1 heure.
- Ethanol 95° pendant 30 minutes.
- Ethanol 100° pendant 45 minutes.
- Ethanol 100° pendant 45 minutes.
- Ethanol 100° pendant 1 heure.

### **- Imprégnation**

L'imprégnation par le toluène permet d'éliminer toute trace d'éthanol, et cela pour une meilleure pénétration de la paraffine dans les tissus. Cette étape se fait à chaud dans la paraffine dont le point de fusion se situe entre 54 °C et 56 °C pour le maintien de la paraffine à l'état liquide. Les étapes sont les suivantes :

- Toluène + alcool (1 volume+ 1 volume) pendant 30 minutes ;
- Toluène pur pendant 30 minutes ;
- Toluène pur pendant 30 minutes ;
- Toluène pur pendant 1 heure ;
- Toluène + paraffine (1 volume + 1volume) pendant 30 minutes ;
- Paraffine pendant 1 heure ;
- Paraffine pendant 1 heure ;
- Paraffine pendant une nuit.

Les quatre dernières étapes ont lieu dans l'étuve réglée à 56 °C (température de fusion de celle-ci)

### - **Inclusion à la paraffine**

La paraffine est coulée à chaud dans un moule métallique qui s'associe à des cassettes en plastique servant à maintenir les blocs de paraffine. Nous y plongeons rapidement l'explant avec une pièce préalablement chauffée, tout en orientant l'explant dans le sens de la coupe désirée. La polymérisation de la paraffine à température ambiante aboutit à l'obtention de blocs prêts à être coupés.

### **3. Confection et étalement des coupes**

La confection des coupes est réalisée à l'aide d'un microtome de type LEICA. Les coupes présentent une épaisseur de 10  $\mu\text{m}$ . Une fois les coupes faites, les rubans sont placés sur des lames propres nettoyées dans bain d'alcool et séchées à l'aide du papier absorbant. L'étalement se fait avec de l'eau gélatineuse filtrée (5 g de gélatine dans 100 ml d'eau distillée). Les lames sont mises sur une plaque chauffante afin d'étaler les coupes évitant leur plissement. Elles sont ensuite égouttées et étiquetées.

### **4. Déparaffinage**

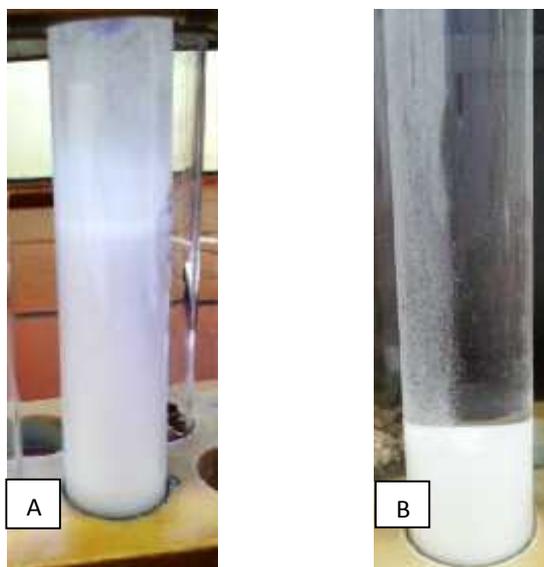
Le déparaffinage sert à enlever la paraffine des tissus pour faciliter la pénétration des colorants. Pour ce fait, les étapes suivantes sont nécessaires :

- Toluène pur pendant 15 à 20 minutes sur la plaque chauffante ;
- Toluène pur pendant 10 minutes ;
- Toluène pur pendant 10 minutes ;
- Alcool absolu + formol (4 volume/1volume) pendant 5 minutes ;
- Rinçage à l'eau courante.

### **5. Coloration**

Nous avons utilisé la double coloration

**Annexe 6 : Réaction de PEG avec le chlorure de mercure.**



(A) Dès l'ajout de  $\text{HgCl}_2$ ; (B) : précipitation dense après centrifugation.

**Annexe 7 : Nombre de cals obtenus sur chaque milieu de base.**

Type d'explant	Milieux de base	Nombre total d'explant non contaminés	Nombre d'explants ayant donné des cals
Pousses	B5	128	112
	MS	115	84
	WPM	113	86
Aiguilles	B5	1 33	92
	MS	117	46
	WPM	111	45

### Annexe 8 : Statistiques descriptives

**Moyennes des poids frais issus de pousses en fonction de milieux de base :**

Milieux de base; Weighted Means (Spreadsheet17)					
Current effect: F(2, 195)=94,368, p=0,0000					
Effective hypothesis decomposition					
Cell No.	Milieux de base	Poids frais des cals issus de pousses (g) Mean	Poids frais des cals issus de pousses (g) Std.Err.	Poids frais des cals issus de pousses (g) -95,00%	Poids frais des cals issus de pousses (g) +95,00%
1	B5	2,092736	0,116319	1,861382	2,324090
2	MS	1,072933	0,056095	0,960801	1,185065
3	WPM	1,342526	0,087609	1,167024	1,518028

### Annexe 9 : Statistiques descriptives

**Moyennes des poids frais issus d'aiguilles en fonction de milieux de base :**

Milieux de base; Weighted Means (Spreadsheet1 feu)					
Current effect: F(2, 153)=27,150, p=,00000					
Effective hypothesis decomposition					
Cell No.	Milieux de base	Poids frais des cals issus des aiguilles (mg) Mean	Poids frais des cals issus des aiguilles (mg) Std.Err.	Poids frais des cals issus des aiguilles (mg)	Poids frais des cals issus des aiguilles (mg) +95,00%
1	B5	122,637	5,42776	111,787	133,486
2	MS	66,652	2,51087	61,601	71,703
3	WPM	81,220	5,13877	70,898	91,541

## Annexe 10 : Nombre de cals obtenus sur les différentes compositions hormonales.

Type d'explant	Hormones de croissance	Nombre total d'explant non contaminés	Nombre d'explants ayant donné des cals
Pousses	M <sub>0</sub> (sans hormones)	120	0
	M <sub>1</sub> (0,75mg/l Kin + 0,75mg/l 2,4-D)	142	108
	M <sub>2</sub> (2mg/l 2,4-D)	83	83
	M <sub>3</sub> (2mg/l Kin)	55	17
	M <sub>4</sub> (1mg/l Kin + 1mg/l 2,4-D + 0,5mg/l GA3)	76	74
Feuilles	M <sub>0</sub> (sans hormones)	120	0
	M <sub>1</sub> (0,75mg/l Kin + 0,75mg/l 2,4-D)	109	104
	M <sub>2</sub> (2mg/l 2,4-D)	84	40
	M <sub>3</sub> (2mg/l Kin)	89	0
	M <sub>4</sub> (1mg/l Kin + 1mg/l 2,4-D + 0,5mg/l GA3)	66	39

**Annexe 11 : Statistiques descriptives**

Moyennes des poids frais issus de pousses en fonction des hormones :

Hormones de croissance; Weighted Means (Spreadsheet17) Current effect: F(2, 195)=59,786, p=0,0000 Effective hypothesis decomposition					
Cell No.	Hormones de croissance	Poids frais des cals issus des pousses (g) Mean	Poids frais des cals issus des pousses (g) Std.Err.	Poids frais des cals issus des pousses (g) -95,00%	Poids frais des cals issus des pousses (g)
1	M1 (2,4-D + Ki)	1,069522	0,073073	0,924130	1,214914
2	M2 (2,4-D)	1,898208	0,073813	1,751132	2,045284
3	M4 (2,4-D + Ki + GA3)	1,911536	0,183483	1,542204	2,280869

### Annexe 12 : Statistiques descriptives

Moyennes des poids frais issus des aiguilles en fonction des hormones de croissance:

Hormones de croissance; Weighted Means (Spreadsheet1 feu)					
Current effect: F(2, 153)=5,5780, p=,00459					
Effective hypothesis decomposition					
Cell	Hormones de croissance	Poids frais des cals issus des aiguilles (mg) Mean	Poids frais des cals issus des aiguilles (mg) Std.Err.	Poids frais des cals issus des aiguilles (mg) -95,00%	Poids frais des cals issus des aiguilles (mg) +95,00%
1	M1 (2,4-D + Ki)	90,33	5,4614	79,460	101,20
2	M2 (2,4-D)	86,84	4,6948	77,408	96,28
3	M4 (2,4-D + Ki + GA3)	109,96	6,0189	97,672	122,26

### Annexe 13 : Statistiques descriptives

Moyennes des poids frais des cals issus des pousses en fonction des deux paramètres :

Milieux de base*Hormones de croissance; Weighted Means (Spreadsheet17)						
Current effect: F(4, 195)=10,290, p=,00000						
Effective hypothesis decomposition						
Cell No.	Milieux de base	Hormones de croissance	Poids frais des cals issus des pousses (g) Mean	Poids frais des cals issus des pousses (g) Std.Err.	Poids frais des cals issus des pousses (g) -95,00%	Poids frais des cals issus des pousses (g) +95,00%
1	B5	M1 (2,4-D + Ki)	1,444300	0,105424	1,231393	1,657207
2	B5	M2 (2,4-D)	2,438578	0,134584	2,161937	2,715219
3	B5	M4 (2,4-D + Ki + GA3)	3,285840	0,310430	2,620035	3,951645
4	MS	M1 (2,4-D + Ki)	0,761208	0,065784	0,625437	0,896979
5	MS	M2 (2,4-D)	1,451817	0,053583	1,340693	1,562942
6	MS	M4 (2,4-D + Ki + GA3)	1,011520	0,108096	0,779676	1,243364
7	WPM	M1 (2,4-D + Ki)	0,534000	0,074116	0,375038	0,692962
8	WPM	M2 (2,4-D)	1,725288	0,068990	1,582899	1,867677
9	WPM	M4 (2,4-D + Ki + GA3)	1,493047	0,156205	1,161906	1,824188

**Annexe 14 : Effets de milieux de base, d'hormones de croissance et interaction entre milieux de base et hormones de croissance.**

Effect	Univariate Results for Each DV (Spreadsheet17) Sigma-restricted parameterization Effective hypothesis decomposition				
	Degr. of Freedom	Poids frais des cals issus de pousses (g) SS	Poids frais des cals issus de pousses (g) MS	Poids frais des cals issus de pousses (g) F	Poids frais des cals issus de pousses (g) p
Intercept	1	451,5372	451,5372	1271,660	0,000000
Milieux de base	2	67,0159	33,5079	94,368	0,000000
Hormones de croissance	2	42,4575	21,2288	59,786	0,000000
Milieux de base*Hormones de croissance	4	14,6154	3,6539	10,290	0,000000
Error	195	69,2400	0,3551		
Total	203	172,5904			

**Test de Newman-Keuls**

Cell No	Newman-Keuls test; variable Poids frais des cals issus des pousses (g) (Spreadsheet17) Approximate Probabilities for Post Hoc Tests Error: Between MS = ,35508, df = 195,00										
	Milieux de base	Hormones de croissance	{1} 1,4443	{2} 2,4386	{3} 3,2858	{4} ,76121	{5} 1,4518	{6} 1,0115	{7} ,53400	{8} 1,7253	{9} 1,4930
1	B5	M1 (2,4-D + Ki)		0,0000	0,0000	0,0008	0,9679	0,0207	0,0000	0,4358	0,9632
2	B5	M2 (2,4-D)	0,0000		0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0001	0,0000
3	B5	M4 (2,4-D + Ki + GA3)	0,0000	0,0000		0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000
4	MS	M1 (2,4-D + Ki)	0,0008	0,0000	0,0000		0,0013	0,1807	0,2244	0,0000	0,0009
5	MS	M2 (2,4-D)	0,9679	0,0000	0,0000	0,0013		0,0486	0,0000	0,3091	0,8255
6	MS	M4 (2,4-D + Ki + GA3)	0,0207	0,0000	0,0000	0,1807	0,0486		0,0287	0,0013	0,0492
7	WPM	M1 (2,4-D + Ki)	0,0000	0,0000	0,0000	0,2244	0,0000	0,0287		0,0000	0,0000
8	WPM	M2 (2,4-D)	0,4358	0,0001	0,0000	0,0000	0,3091	0,0013	0,0000		0,2143
9	WPM	M4 (2,4-D + Ki + GA3)	0,9632	0,0000	0,0000	0,0009	0,8255	0,0492	0,0000	0,2143	

## Annexe 15 : Statistiques descriptives

Moyennes des poids frais des cals issus des aiguilles en fonction des deux paramètres :

Milieux de base*Hormones de croissance; Weighted Means (Spreadsheet1 feu) Current effect: F(4, 153)=7,8962, p=,00001 Effective hypothesis decomposition						
Cell No	Milieu x de base	Hormones de croissance	Poids frais des cals issus des aiguilles (mg) Mean	Poids frais des cals issus des aiguilles (mg) Std.Err.	Poids frais des cals issus des aiguilles (mg) -95,00%	Poids frais des cals issus des aiguilles (mg) +95,00%
1	B5	M1 (2,4-D + Ki)	132,673	8,625	115,104	150,241
2	B5	M2 (2,4-D)	102,186	7,980	84,946	119,425
3	B5	M4 (2,4-D + Ki + GA3)	119,831	8,069	102,633	137,029
4	MS	M1 (2,4-D + Ki)	66,212	3,036	60,020	72,405
5	MS	M2 (2,4-D)	52,767	1,487	49,338	56,195
6	MS	M4 (2,4-D + Ki + GA3)	86,514	3,144	78,821	94,207
7	WPM	M1 (2,4-D + Ki)	51,225	3,728	43,279	59,171
8	WPM	M2 (2,4-D)	90,244	6,337	77,218	103,271
9	WPM	M4 (2,4-D + Ki + GA3)	110,750	14,783	75,793	145,707

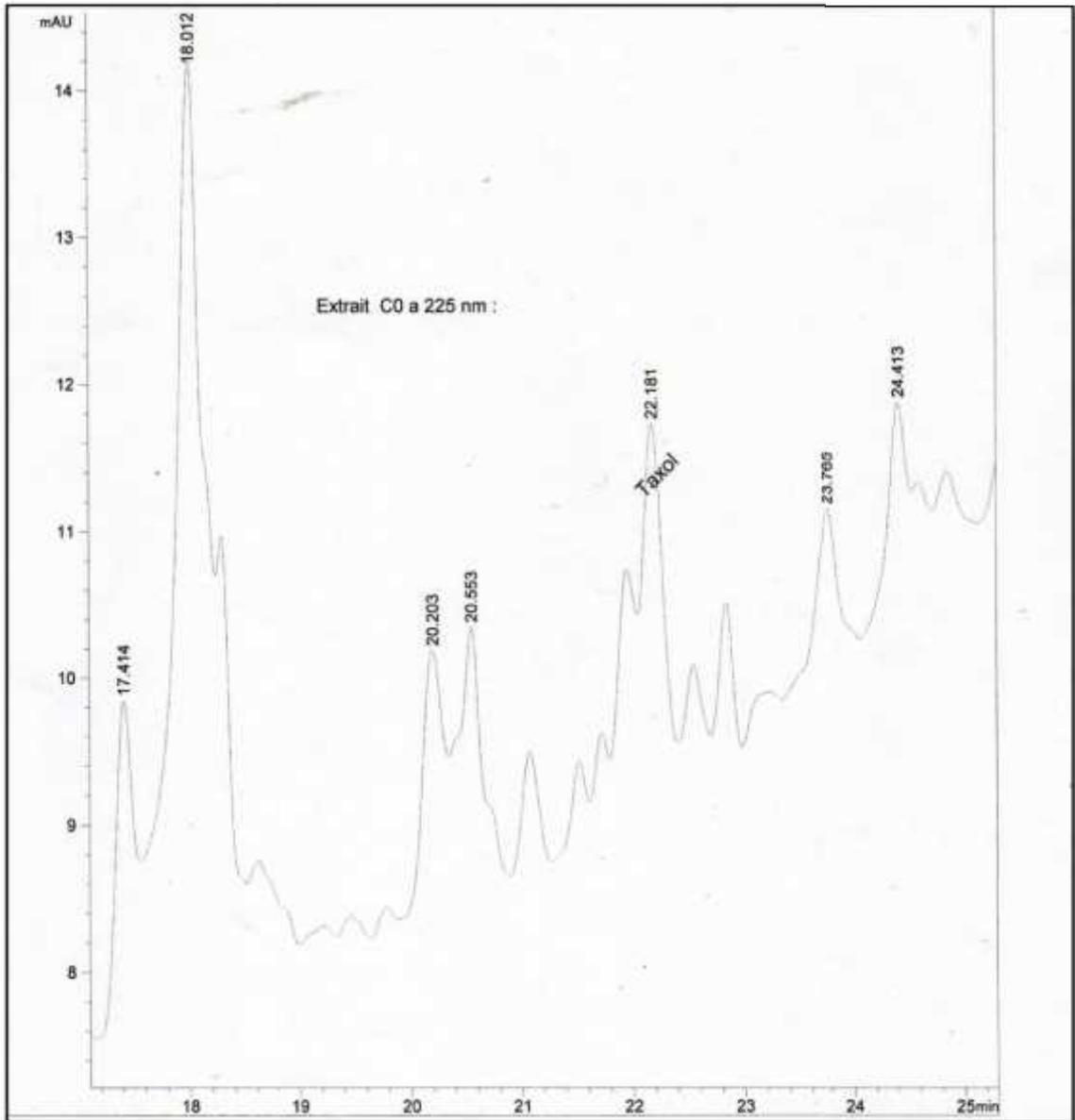
**Annexe 16 :**

Effets de milieux de base, d'hormones de croissance et interaction entre milieu de base et hormones de croissance :

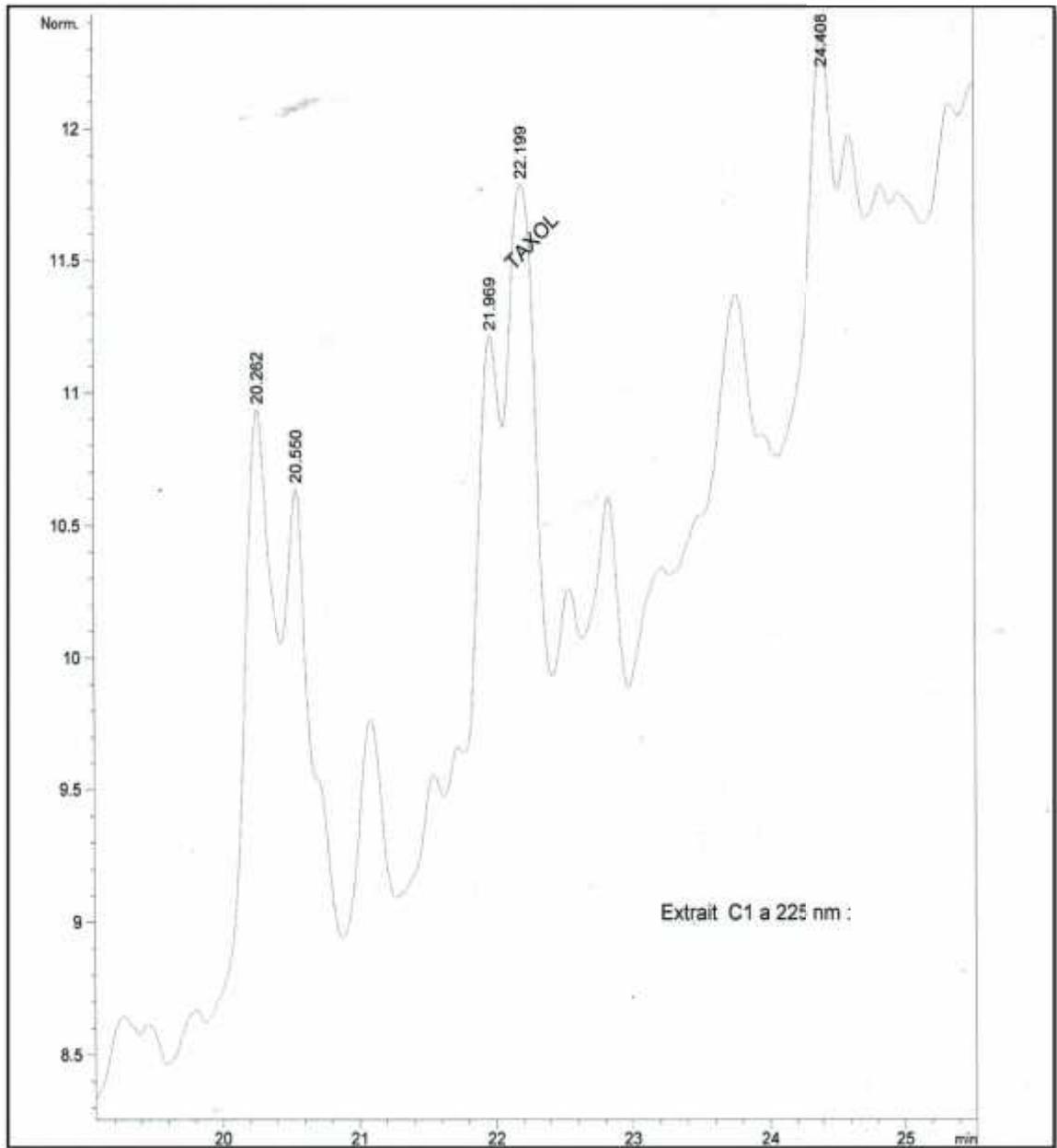
Effect	Univariate Results for Each DV (Spreadsheet1 feu) Sigma-restricted parameterization Effective hypothesis decomposition				
	Degr. of Freedom	Poids frais des cals issus des aiguilles (mg) SS	Poids frais des cals issus des aiguilles (mg) MS	Poids frais des cals issus des aiguilles (mg)	Poids frais des cals issus des aiguilles (mg)
Intercept	1	979244,5	979244,5	940,7801	0,000000
Milieux de base	2	56520,7	28260,3	27,1503	0,000000
Hormones de croissance	2	11612,0	5806,0	5,5780	0,004590
Milieux de base*Hormones de croissance	4	32876,3	8219,1	7,8962	0,000008
Error	153	159255,5	1040,9		
Total	161	292368,1			

**Test de Newman-Keuls :**

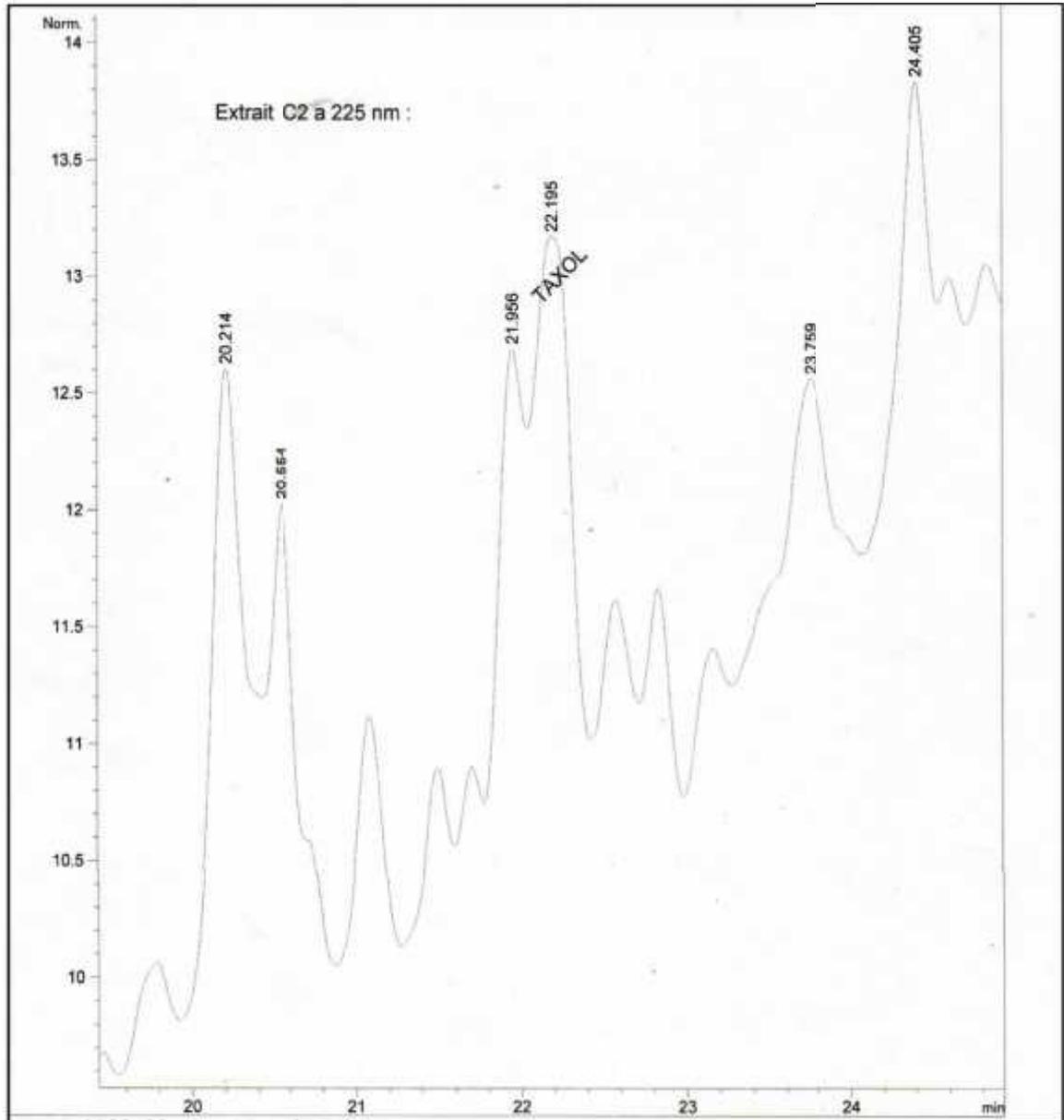
Newman-Keuls test; variable Poids frais des cals issus des aiguilles (mg) (Spreadsheet1) Approximate Probabilities for Post Hoc Tests Error: Between MS = 1040,9, df = 153,00											
Cell	Milieux de base	Hormones de croissance	{1} 132,67	{2} 102,19	{3} 119,83	{4} 66,212	{5} 52,767	{6} 86,514	{7} 51,225	{8} 90,244	{9} 110,75
1	B5	M1 (2,4-D + Ki)		0,06947	0,30373	0,00003	0,00003	0,00300	0,00001	0,00612	0,18471
2	B5	M2 (2,4-D)	0,06947		0,33401	0,02068	0,00073	0,42076	0,00065	0,33888	0,49277
3	B5	M4 (2,4-D + Ki + GA3)	0,30373	0,33401		0,00027	0,00003	0,05875	0,00003	0,08300	0,46704
4	MS	M1 (2,4-D + Ki)	0,00003	0,02068	0,00027		0,28154	0,10397	0,45294	0,13171	0,00334
5	MS	M2 (2,4-D)	0,00003	0,00073	0,00003	0,28154		0,01886	0,90174	0,01429	0,00007
6	MS	M4 (2,4-D + Ki + GA3)	0,00300	0,42076	0,05875	0,10397	0,01886		0,02435	0,76514	0,21090
7	WPM	M1 (2,4-D + Ki)	0,00001	0,00065	0,00003	0,45294	0,90174	0,02435		0,01531	0,00006
8	WPM	M2 (2,4-D)	0,00612	0,33888	0,08300	0,13171	0,01429	0,76514	0,01531		0,22791
9	WPM	M4 (2,4-D + Ki + GA3)	0,18471	0,49277	0,46704	0,00334	0,00007	0,21090	0,00006	0,22791	

**Annexe 17 : Analyses chromatographiques.****Extrait de cellules de la suspension Témoin S<sub>0</sub> :**

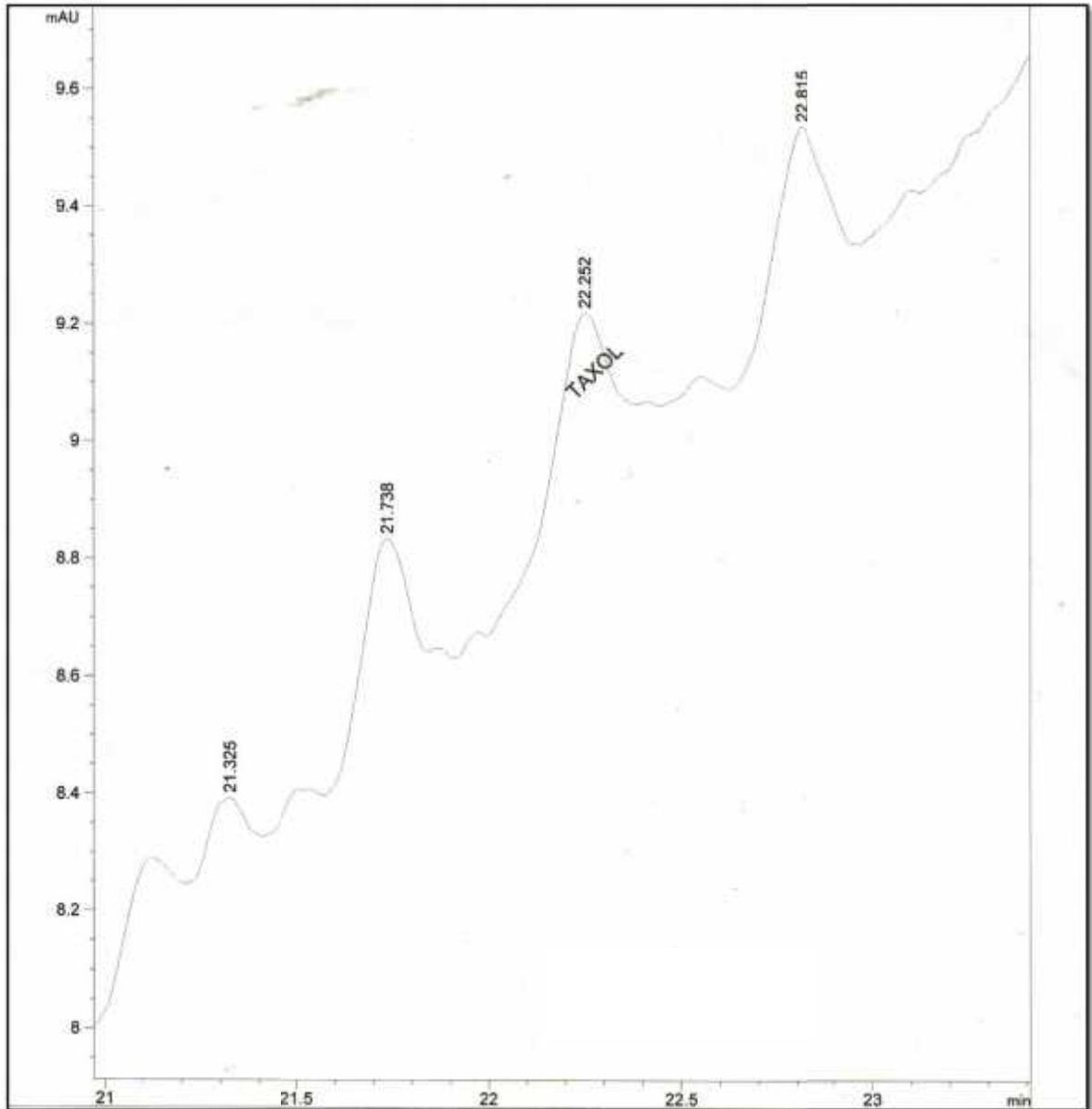
**Extrait de cellules de la suspension S<sub>1</sub> :**

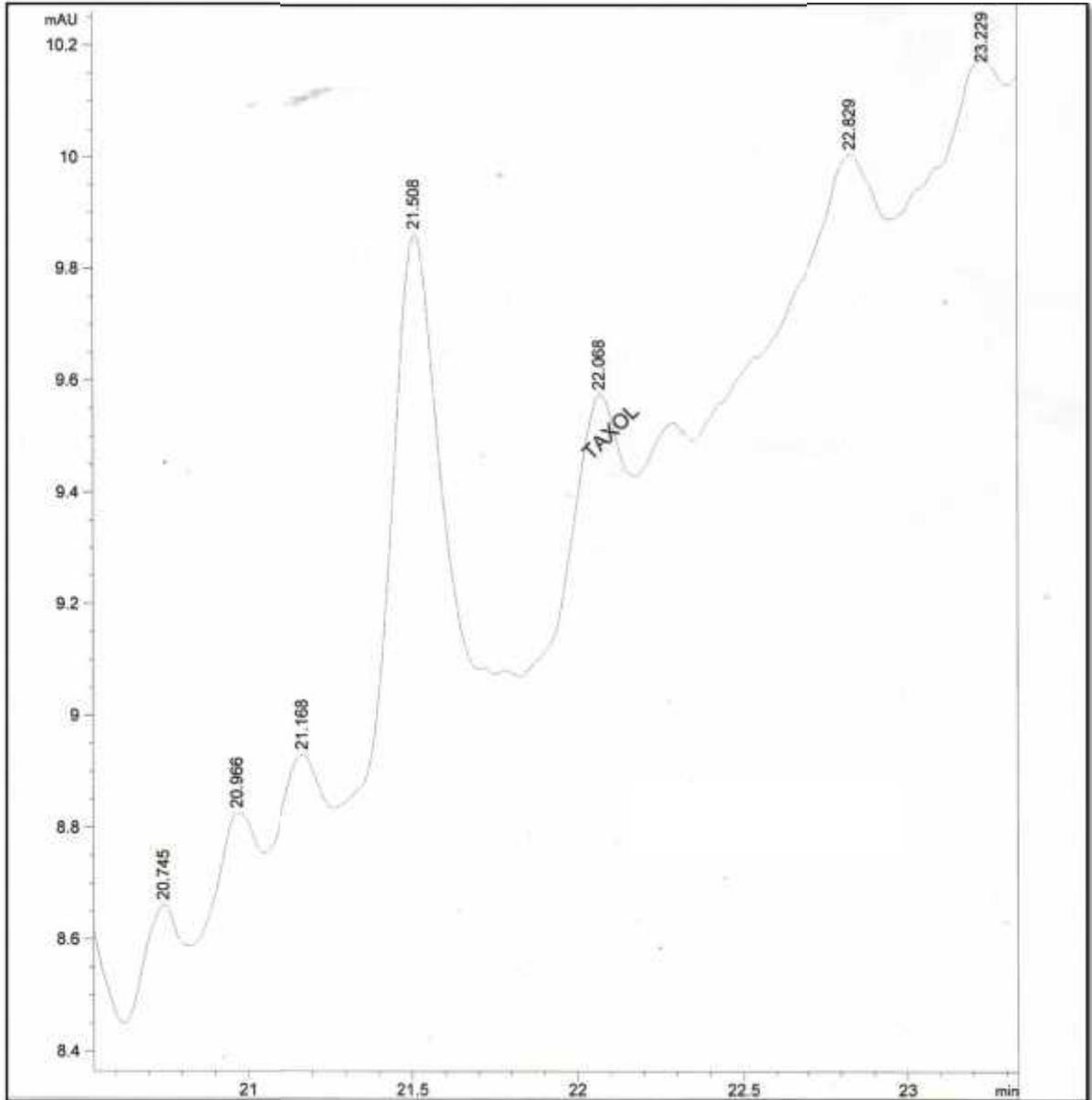


**Extrait de cellules de la suspension S<sub>2</sub> :**

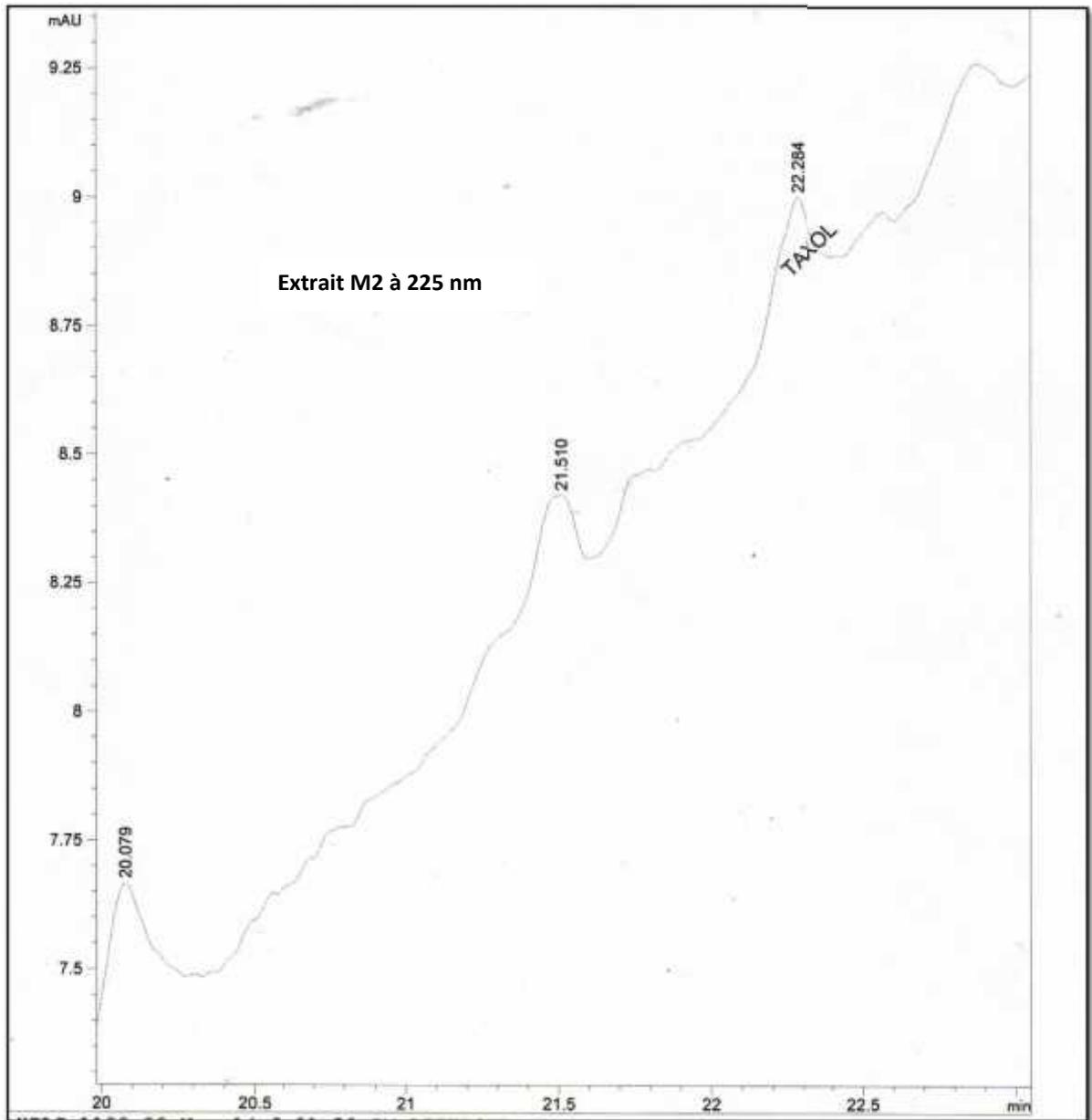


**Extrait de milieu de la suspension témoin S<sub>0</sub> :**



**Extrait de milieu de la suspension S<sub>1</sub>:**

**Extrait de milieu de la suspension S<sub>2</sub> :**



## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. **Richard, D.**, « Poisons et venins dans la nature ». Delachaux et Niestlé SA, Paris. (2008), 185 p.
2. **Vallata, P.**, « Intérêt pharmaceutique du genre *Taxus* et des Taxanes ; culture *in vitro* et dosage ». Thèse de doctorats, Faculté de pharmacie, Université HENRI POINCARÉ - NANCY 1, (2009), 106 p.
3. **Frohne, D., Pfander, H.J. et Anton, R.**, « Plantes à risque ». 5<sup>ème</sup> Ed. Lavoisier. (2009), 459 p.
4. **Mihaljevic, S., Bjedov, I., Kovac, M., Levanic, D.L. et Jelaska, S.**, « Effect of Explant Source and Growth Regulators on *in vitro* Callus Growth of *Taxus baccata* L. *Washingtonii* ». Food Technol. Biotechnol. V.40, n°4, (2002), 299–303.
5. **Suffness, M. et Wall, M. E.**, « Discovery and development of Taxol ». *In*: Suffness M. (ed) Taxol: Science and application. CRC Press, Boca Raton, (1995), 3–25.
6. **Thayer, A. M.**, « Busting down a blockbuster drug ». Chem. Eng. News, V.78, (2000), 20–21.
7. **Havrilesky, L. J., Alvarez, A. A., Sayer, R. A., Lancaster, J. M., Soper, J. T., Berchuck, A., Clarke-Pearson, D. L., Rodriguez, G. C. et Carney, M. E.**, « Weekly low-dose carboplatin and paclitaxel in the treatment of recurrent ovarian and peritoneal cancer ». Gynecol. Oncol. V.88, (2003), 51–57.
8. **Hata, K., Osaki, M., Dhar, D. K., Nakayama, K., Fujiwaki, R., Ito, H., Nagasue, N. et Miyazaki, K.**, « Evaluation of the antiangiogenic effect of Taxol in a human epithelial ovarian carcinoma cell line ». Cancer Chemother. Pharmacol. V.53, n°1, (2004), 68–74.

9. **Kumar, S., Mahdi, H., Bryant, C., Shah, J. P., Garg, G. et Munkarah, A.,** « Clinical trials and progress with paclitaxel in ovarian cancer ». *Int. J. Womens Health*, V.19, n°2, (2010), 411–427.
10. **Wheeler, N.C., Jech, K., Masters, S., Brobst, S.W., Alvarado, A.B., Hoover, A.J. et Snader, K.M.,** « Effects of genetic, epigenetic, and environmental-factors on taxol content in *Taxus brevifolia* and related species ». *Journal of Natural Products*, V.55, n°4, (1992), 432-440.
11. **Bruneton, J.,** « Pharmacognosie, phytochimie, plantes médicinales », 4<sup>ème</sup> Ed. Tec et Doc. Lavoisier. (2009). 1270 p.
12. **Malik, S., Cusido, R. M., Mirjalili, M. H., Moyano, E., Palazon, J. et Bonfill, M.,** « Production of the anticancer drug taxol in *Taxus baccata* suspension cultures ». *Process Biochemistry*, V.46, (2011), 23–34.
13. **Onrubia, M., Moyano, E., Bonfill, M., Exposito, O., Palazon, J. et Cusido, R. M.,** « An approach to the molecular mechanism of methyl jasmonate and vanadyl sulphate elicitation in *Taxus baccata* cell cultures: The role of txs and bap1 gene expression ». *Biochemical Engineering Journal*, V.53, (2010), 104–111.
14. **Verpoorte, R., Van der Heijden, R., Van Gulik, W. M. et H. J. G.,** « Plant biotechnology for the production of alkaloids : present status and prospects », Brossi A. (ed) *the alkaloids* Academic Press. San Diego, V.40, (1991), 1-187.
15. **Vongpaseuth, K. et Roberts, S. C.,** « Advancements in the Understanding of Paclitaxel Metabolism in Tissue Culture. » *Current Pharmaceutical Biotechnology*, (2007), V.8, n° 4, 219-236.
16. **Zhou, L. G. et Wu, J. Y.,** « Development and application of medicinal plant tissue cultures for production of drugs and herbal medicinals in China ». *Nat. Prod. Rep.*, V.23, (2006), 789–810.

17. **Benlakehal, Z.**, « Etude de quelques paramètres influant sur la micropropagation de l'if commun (*Taxus baccata* L. ssp *communis*) ». Mémoire d'ingénieur, foresterie et protection de la nature. Ecole nationale supérieure agronomique El Harrach, Alger. (2010). 56 p.
18. **Reynaud, J.**, « La flore du pharmacien », Ed techniques et documentations. (2002), 257 p.
19. **Anonyme 1.**, « **Système d'information taxonomique intégré** », Gouvernement du Canada, Ottawa. [http://www.cbif.gcca/pls/itisca/taxaget?p\\_ifx=scib&p\\_lang=fr](http://www.cbif.gcca/pls/itisca/taxaget?p_ifx=scib&p_lang=fr) (17 avril 2009).
20. **Chase, M. W.**, « Phylogenetics of seed plants, and analysis of nucleotide sequences from the plastid gene *rbcl* », *Annals of the Missouri botanical garden*, V.80, (1993), 528–580.
21. **Price, R. A.**, « Generic and familial relationships of the Taxaceae from *rbcl* and *matK* sequence comparisons ». *Acta Horticulturae*, V.615, (2004), 235–237.
22. **Anderson, E. et Owens, J. N.**, « Analysing the reproductive biology of *Taxus* : should it be included in Coniferales ? » *Acta Horticulturae*, V.615, (2003), 233–234.
23. **DeLong, J M. et Prange, R K.**, « *Taxus* spp.: A genus of ever-useful and everlasting evergreens », *Chronica Horticulturae*, V.45, n°4, (2005), 16-20.
24. **Trabut, L.**, « Flore du Nord d'Afrique, répertoire des noms indigènes des plantes spontanées, cultivées et utilisées dans le Nord de l'Afrique ». Ed. Typo-litho et Jules Carbonel Reunies, (1935), 254-255.
25. **Rameau, J.C., Mansion, D. et Dume, G.**, « Flore forestière française : Guide écologique illustré, Plaines et Collines ». Ed. Institut pour le développement forestier. Tome I, (1993), 314-315.

26. **Edward, C.**, « Taxaceae : The genera and cultivated species ». The Botanical Review. V.64, n°4, (1998), 291–322.
27. **Thiebaut, J.**, « La flore Libano syrienne » Ed. Centre National de la recherche scientifique. Paris, (1953), 326-327.
28. **Callen, G.**, « Les conifères cultivés en Europe ». Tome II. Ed. Bailliere J. B. (1977), 714-730.
29. **Hoseini, N.S. M., Modanlo, O.S., Jalilvand, H., et Mofidabadi, A. J.**, « Seed dormancy breakage of recalcitrant yew species (*Taxus baccata* L.) Using Embryo culture », Journal of biological sciences. V. 7, n°5, (2007), 781-785.
30. **Boudy, P.**, « Economie forestière Nord-Africaine, Essences résineuses », Tome II. Ed. Larose. Paris, (1955), 770 p.
31. **Baba Aissa, F.**, « Encyclopédie des plantes utiles ». Ed. Rouiba. Algérie, (2000), 137p.
32. **Becker, M., Picard, J.F. et Timbal, J.**, « Les arbres », Ed : Masson, Paris (1983), 120p.
33. **Otto Wilhelm, T.**, « Flora von Deutschland Österreich, und der Schweiz ». Gera Untermhaus, (1885), 693 p.
34. **Carlier, J.**, « Les arbres ». Ed. Bordas, (1987), 87 p.
35. **Martin, L. et Thiébault, S.**, « L'if (*Taxus baccata* L.) » : histoire et usage d'un arbre durant la Préhistoire récente. *Anthropobotanica*. (2010), 1.4. 20p.
36. **Lemoine, G.**, « L'if, l'arbre du meilleur et du pire ». Paris, (1997), 202 p.
37. **Durant, R.**, « Les arbres ». Ed. Solar. Paris, (1998), 81-82.

38. **Karmouta, G.**, « *Taxus baccata* L ». Thèse de Doctorat à l'unité de formation et de recherche. Faculté de pharmacie de Chatenay-Malabry de l'université de Paris XI, (1994), 72p.
39. **Krauze-Baranowska, M. et Wiwart, M.**, « Antifungal activity of biflavones from *Taxus baccata* and *Ginkgo biloba* ». *Z. Naturforsch. C*, V.58, n°1-2, (2003), 65-69.
40. **Wilson, C. R., Sauer, J. et Hooser, S. B.**, « Taxines; a review of the mechanism and toxicity of yew (*Taxus* spp.) alkaloids », *Toxicon*, V.39, n°2-3, (2001), 175-185.
41. **Appendino, G.**, « The phytochemistry of the yew tree ». *Natural Product Reports*, V.12, n°4, (1995), 349 :360.
42. **Ketchum, R.E.B., Rithner, C.D., Qiu, D., Kim, Y.S., Williams, R.M. et Croteau, R.B.**, « *Taxus* metabolomics; methyl jasmonate preferentially induces production of taxoids oxygenated at C-13 in *Taxus x media* cell cultures ». *Phytochemistry*, V.62, n°6, (2005), 901-909.
43. **Appendino, G. et Pelletier, S. W.**, « Chapter Two Taxine ». *In Alkaloids : Chemical and Biological Perspectives*, Pergamon, V.11, (1996), 237–268.
44. **Graf, E.**, « Zur chemie des taxins », *Angewandte Chemie*, (1956), 68 :249–250.
45. **Wani, M. C., Taylor, H. L., Wall, M. E., Coggon, P., & McPhail, A. T.** « Plant antitumor agents. VI. Isolation and structure of Taxol, a novel antileukemic and antitumor agent from *Taxus brevifolia* ». *Journal of the American Chemical Society*, V.93, (1971), 2325–2327.
46. **Bryan-Brown, T.**, « The pharmacological actions of taxine », *Quarterly Journal of Pharmacy and Pharmacology*, V.5, (1932), 205–219.

47. **Fröhne, D. et Pfänder, J.**1984. « A Color Atlas of Poisonous Plants ». 2e edition, halfe science book, wolfe publishing Ltd, 103-4p.
48. **Foster, S. et Duke, J. A.**, « A Field Guide to Medicinal Plants and Herbs Of Eastern and Central North America », Houghton Mifflin Harcourt, 1re edition, 1990. 366 p.
49. **Watt, J. M. et Breyer-Brandwijk, M. G.**, « The Medicinal and Poisonous Plants of Southern and Eastern Africa ». E. & S. Livingstone, Édimbourg, 2Ed, (1962), 1457p.
50. **Alden, C. L., Fosnaugh, C. J., Smith, J. B., et Mohan, R.**, « Japanese yew poisoning of large domestic animals in the midwest ». Journal of the American Veterinary Medical Association, V.170, n°3, (1977), 314–316.
51. **Gordon, M.C., David, G.I.K. et David, J.N.**, «Anticancer agents from natural products » Taylor et Francis group, CRC press, 2<sup>ème</sup> Ed, (2012), 729p.
52. **Panchagnula, R.**, « Pharmaceutical aspects of paclitaxel ». Int J Pharmaceut, V.72, (1998), 1–15.
53. **Tao Yang., Fu-De Cui., Min-Koo Choi., Jei-Won Cho., Suk-Jae Chung., Chang-Koo Shim., et Dae-Duk Kim.,.** « Enhanced solubility and stability of PEGylated liposomal paclitaxel : *in vitro* and *in vivo* evaluation ». International Journal of Pharmaceutics, V.338, n°1-2, (2007), 317–326.
54. **Hezari, M., Lewis, N.G., et Croteau, R.**, « Purification and characterization of taxa-4(5),11(12)-diene synthase from Pacific yew (*Taxus brevifolia*) that catalyzes the first committed step of taxol biosynthesis », Arch. Biochem. Biophys, V.322, (1995), 437–444.
55. **Horowitz, S.B., Lothsteia, S.B., Manfredi, J.J., Mellado, W., Parness, J., Roy, S.N., Schiff, P.B., Sorbara, L., Zeheb, R.**, « Taxol: mechanism of action and resistance ». Ann. N. Y. Acad. Sci, V.446, (1986), 733–743.

56. **Witherup, K.M., Look, S.A., Stasko, M.W., Ghiorzi, T.J., Muschik, G.M. et Cragg, G.M.**, « *Taxus* spp needles contain amounts of taxol comparable to the bark of *Taxus brevifolia* - analysis and isolation » *Journal of Natural Products*, V.53, n°5, (1990), 1249-1255.
57. **Schippmann, U.**, « Medicinal plants significant trade study », German Federal Agency for Nature Conservation Bonn, (CITES Project S-109), (2001), 97p.
58. **Margara, J.**, « Base de multiplication végétative. Les méristèmes et l'organogénèse », Ed. Institut National de Recherche Agronomique. Paris, (1989), 262 p.
59. **Kacem, N.S.**, « Embryogénèse somatique et variation somaclonale chez le blé dur et tendre (culture d'embryons matures et immatures) ». Thèse de magister. Université Mentouri Constantine. (2005), 144p.
60. **Rohr, R.**, « Production de cals par les gametophytes males de *Taxus baccata* L. cultivars sur un milieu artificiel ». Etude en microscopie photonique et électronique. *Caryologia*, V.25, (1973), 177–89.
61. **Brunakova, K., Babincova, Z., Takac, M. et Cellarova, E.** « Selection of callus cultures of *Taxus baccata* L. as a potential source of paclitaxel production ». *Eng Life Sci*, V.4, (2004), 465–9.
62. **Filova, A., et Rovna, K.**, « Explantate culture of yew (*Taxus* sp.) as alternative production systems for taxane metabolites », *Acta Horticulturae et Regiotechnurae*, V. 14, n°1, (2011), 19-23.
63. **Murashige, T. et Skoog, F.**, « A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures ». *Physiol Plantarum*, V.15, (1962), 473–97.

64. **Gamborg, O.L., Miller, R.A. et Ojima, K.**, « Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells ». *Exp Cell Res*, V.50, (1968), 151–8.
65. **Schenk, R.U. et Hildebrandt, A.C.**, « Medium and techniques for induction and growth of monocotyledonous and dicotyledonous », *plant cell cultures*. *Can J Bot*, V.50, (1972), 199–204.
66. **McCown, B.H. et Lloyd, G.**, « Woody Plant Medium (WPM), a mineral nutrient formulation for microculture for woody plant species ». *Hortic Sci* (1981), 16-453.
67. **Udvardy, J., Sivok, B. et Nemet, G.**, « Effect of naphthylacetic acid, 2,4,5-trichlorophenoxyacetic acid and 3,6-dichloro-o-anisic acid on nucleolytic enzymes in callus cultures from wheat root », *Z. Pflanzen physiol*, V.78, (1976), 33-40.
68. **Collins, G.B., Vian, W.E., et Phillips, G.C.**, « Use of 4-amino-3,5,6-trichlorophenoxyacetic acid as an auxin source in plant tissue cultures », *Crop. Sci*, V.18, (1978), 286-288.
69. **Monacelli, B., Pasqua, G., Cuteri, A., Varusio, A., Botta, B. et Delle Monache, G.**, « Histological study of callus formation and optimization of cell growth in *Taxus baccata*. *Cytobios*, V.81, n°326, (1995), 159–70.
70. **Briggs, W. B.**, « Phototropism in higher plants ». *Photophysiology*. Academic Press, V.1, (1964) 223-271.
71. **Wickremesinhe, E. R. M. et Arteca, R. N.**, « *Taxus* callus cultures: Initiation, growth optimization, characterization and taxol production » *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. V.35, (1993), 181-193.

72. **Hirasuna, T.J., Pestchanker, L.J., Srinivasan, V. et Shuler M.L.**, « Taxol production in suspension cultures of *Taxus baccata* », *Plant Cell Tiss Org*, V.44, (1996), 95–102.
73. **Singh, G. et Curtis, W. R.**, « Biotechnological Applications of Plant Cultures », ed. P. D. Shargool and T. T. Ngo, CRC Press, Boca Raton, (1994), 151–184.
74. **Kolewe, M.E., Henson, M.A., et Roberts, S.C.**, « Analysis of Aggregate Size as a Process Variable Affecting Paclitaxel Accumulation in *Taxus* Suspension Cultures ». *Biotechnol. Prog*, V.27, n°5, (2011), 1365-1372.
75. **Yu, L.J., Lan, W.Z., Qin, W.M. et Xu, H.B.**, « High stable production of taxol in elicited synchronous cultures of *Taxus chinensis* cells ». *Process Biochemistry*. V.38, (2002), 207- 210.
76. **Vu, T.D.**, « effets de l'environnement sur la croissance et l'accumulation des métabolites secondaires chez *Datura innoxia* Mill. cultivé en conditions hors sol ; impacts des facteurs biotiques et abiotiques ». Thèse de doctorat en Sciences Agronomiques. Institut national polytechnique de Lorraine. Ecole Nationale Supérieure d'Agronomie et des Industrie Alimentaires. (2008), 237p.
77. **Fett-Neto, A.G., Pennington, J.J., et DiCosmo, F.**, « Effect of White Light on Taxol and Baccatin III Accumulation in Cell Cultures of *Taxus cuspidata* Sieb and Zucco », *Plant Physiol*. V.146, (1995), 584-590.
78. **Bentebibel, S., Moyano, E., Palazon, J., Cusido, R.M., Bonfill, M., Eibl, R.**, « Effects of immobilization by entrapment in alginate and scale-up on paclitaxel and baccatin III production in cell suspension cultures of *Taxus baccata* ». *Biotechnol Bioeng*, V.89, (2005), 647–55.
79. **Paxton, J. D.**, « Phytoalexins ». A working redefinition . *Phytopathol. Z.*, V.101, (1981), 106- 109.

80. **Lambert, N.**, « Etude comparative de la biosynthèse de roténoïdes par des suspensions cellulaires hétérotrophes et photomixotrophes de *Tephrosia vogelii* Hook f. essais d'optimisation de la production ». Thèse de doctorat, Spécialité ; Physiologie et Biologie des organismes et des populations, Université des Sciences et Techniques du Languedoc. (1989), 303p.
81. **Srinivasan, V., Ciddi, V., Bringi, V. et Shuler, M.L.**, « Metabolic inhibitors, elicitors, and precursors as tools for probing yield limitation in taxane production by *Taxus chinensis* cell cultures ». *Biotechnol Prog.* V.12, (1996), 457–65.
82. **Yukimune, Y., Tabata, H., Higashi, Y. et Hara, Y.**, « Methyl jasmonate-induced overproduction of paclitaxel and baccatin III in *Taxus* cell suspension cultures ». *Nat Biotechnol*, V.14, (1996), 1129–32.
83. **Ciddi, V., Srinivasan, V. et Shuler, M.L.**, « Elicitation of *Taxus* sp. cell cultures for production of taxol ». *Biotechnol Lett*, V.17, (1995), 1343–6.
84. **Khosroushahi, A.Y., Valizadeh, M., Ghasempour, A., Khosrowshahli, M., Naghdibadi, H., Dadpour, M.R.**, « Improved Taxol production by combination of inducing factors in suspension cell culture of *Taxus baccata* ». *Cell Biol Int*, V.30, (2006), 262–9.
85. **Wu, J. et Lin, L.**, « Elicitor-like effects of low-energy ultrasound on plant (*Panax ginseng*) cells: induction of plant defense responses and secondary metabolite production », *Appl. Microbiol. Biotechnol.* V.59, (2002), 51–57.
86. **Lin, L. et Wu, J.**, « Enhancement of shikonin production in single- and two-phase suspension cultures of *Lithospermum erythrorhizon* cells using low-energy ultrasound », *Biotechnol. Bioeng.* V.78, (2002), 81–88.
87. **Wu, J. et Ge, X.**, « Oxidative burst, jasmonic acid biosynthesis, and taxol production induced by low-energy ultrasound in *Taxus chinensis* cell suspension cultures », *Biotechnol. Bioeng.* V.85, (2004), 714–721.

88. **Bonfill, M., Exposito, O., Onrubia, M., Jane, A., Cusido, R.M., Palazon, J.**, « Effect of external factors on the production of taxol and other taxanes in cell cultures of *Taxus baccata* », *Abstracts / Journal of Biotechnology*, V.131S, (2007), S43–S47.
89. **Collins-Pavao, M., Chin, C.K. et Pedersen, H.**, « Taxol partitioning in two-phase plant cell cultures of *Taxus brevifolia* ». *J Biotechnol.* V.49, (1996), 95–100.
90. **Kwon, I.C., Yoo, Y.J., Lee, J.H. et Hyun, J.O.**, « Enhancement of taxol production by *in situ* recovery of product ». *Process Biochem.* V.33, (1998), 701–8.
91. **Abdelguerfi, A.**, «Les zones de développement durables». Bilans des Expertises sur « La Conservation *in situ* et *ex situ* en Algérie » MATE-GEF/PNUD : Projet ALG/97/G31. (2003), 146-233.
92. **Djilali, W.**, « Propagation du *Taxus baccata* L. par semis et bouturage ». Mémoire d'ingénieur. Agronomie. Université SAAD DAHLAB de Blida. (2005), 46 p.
93. **Benlarbi, Z.**, « Micropropagation de l'if (*Taxus baccata* L.) ». Mémoire d'ingénieur. Agronomie. Université SAAD DAHLAB de Blida, (2004), 62p.
94. **Cheliout, M.** « Essai de quelques techniques de macropropagation et micropropagation de l'if commun (*Taxus baccata* L.) », mémoire d'ingénieur. Agronomie. ENSA, El-Harrach, Alger. (2008), 52p.
95. **Benhamouche, D.**, « Effet des doses d'irradiation aux rayons (cobalt-60) sur la stimulation de la germination de l'if commun (*Taxus baccata* ssp communis) », Mémoire d'ingénieur. Agronomie. ENSA, El Harrach, Alger, (2009), 53p.

96. **Torres, K.C.**, « Tissue Culture Techniques for Horticultural » Crops. Ed, CHAPMAN & HALL, New York, USA, (1989), 286 p.
97. **Cusido, R M., Palazon, J., Navia-Osorio, A., Mallol, A., Bonfill, M., Morales, C. et Pinol, M. T.**, « Production of Taxol and baccatin III by a selected *Taxus baccata* callus line and its derived cell suspension culture ». *Plant Science*, V.146, (1999), 101–107.
98. **Gibson, D.M., Ketchum, R.E.B., Vance, N.C. et Christen, A.A.**, « Initiation and growth of cells lines of *Taxus brevifolia* (Pacific yew) », *Plant Cell Rep*, V.12, (1993), 479–482.
99. **Nishida, T., Ohnishi, N., Kodama, H. et Komamine, A.**, « Establishment of synchrony by starvation and readdition of auxin in suspension cultures of *Catharanthus roseus* cells ». *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, V.28, (1992), 37-43.
100. **Fett-Neto, A.G., Melanson, S.J., Sakata, K. et DiCosmo, F.**, « Improved growth and taxol yield in developing calli of *Taxus cuspidata* by medium composition », *Biotechnology II*, (1993), 731-734.
101. **Schenk, P.M., Kazan, K., Wilson, I., Anderson, J.P., Richmond, T., Somerville, S.C. et Manners, J.M.**, « Coordinated plant defense responses in *Arabidopsis* revealed by microarray analysis », *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, V.97, (2000), 11655–11660.
102. **Bulgakov, V.P., Tchernoded, G.K., Mischenko, N.P., Khodakovskaya, M.V., Glazunov, V.P., Radchenko, S.V., Zvereva, E.V., Fedoreyev, S.A. et Zhuravlev, Y.N.**, « Effect of salicylic acid, methyl jasmonate, ethephon and cantharidin on anthraquinone production by *Rubia cordifolia* callus cultures transformed with the *rolB* and *rolC* genes », *J. Biotechnol*, V.97, (2002), 213–221.

103. **Wu, J. et Lin, L.**, « Enhancement of taxol production and release in *Taxus chinensis* cell cultures by ultrasound, methyl jasmonate and in situ solvent extraction ». *Appl Microbiol Biotechnol*, V.62, (2003), 151–155.
104. **Vidensek, N., Lim, P., Campbell, A., et Carlson, C.**, « Taxol content in bark, wood, root, leaf, twig, and seedling from several *Taxus* species ». *Journal of Natural Products*, V.53, n°6, (1990), 1609–1610.
105. **Mroczek, T., Glowniak, K. et Hajnos, M.**, « Screening for pharmaceutically important taxoids in *Taxus baccata* var. Aurea corr. with CC/SPE/HPLC-PDA procedure », *Biomedical Chromatography*, V.14, n°8, (2000), 516–529.
106. **Wang, C.G., Wu, J.Y. et Mei, X.G.**, « Enhanced Taxol production and release in *Taxus chinensis* cell suspension cultures with selected organic solvents and sucrose feeding ». *Biotechnol Prog*, V.17, (2001), 89–94.
107. **Kajani, A.A., Moghim, S et Mofid, M.R.**, « Optimization of the basal medium for improving production and secretion of taxanes from suspension cell culture of *Taxus baccata* L ». *DARU Journal of Pharmaceutical Sciences*, V.20, (2012), 54-60.
108. **Perdue, J. D.**, « The removal of Cremophor® EL from paclitaxel for quantitative analysis by HPLC-UV ». A Thesis Submitted to the University of North Carolina Wilmington in Partial Ful fillment Of the Requirements for the Degree of Master of Science. (2005), 74 p.
109. **Li, J., Liu, M., Chen, H., Wu, Z. et Wang, J.**, « Callus initiation and subculture of *Taxus chinensis*. » *Journal of Forestry Research*, V.10, n°1, (1999), 11-14.
110. **Stierle, G.A., Strobel, G., Stierle, D., Grothaus, P. et Bignami, G.**, « The search for a taxol producing microorganism among the endophytic fungus of the Pacific yew, *Taxus brevifolia* ». *J. Nat. Prod.* V.58, (1995), 1315-1324.

111. **Chen, Z. H.**, « Wood plant tissue culture », Beijing: Higher Education Press, (1986), 34-36.
112. **Xia, M., Wu, J.Y. et Zhang, L.M.**, « Studies on the problem of darkening in tissue culture of *Taxus* », *Biotechnology*, V.6, n°3, (1996), 18-20.
113. **Yari Khosroushahi, A., Naderi-Manesh, H. et Toft Simonsen, H.**, « Effect of Antioxidants and Carbohydrates in **Callus** Cultures of *Taxus brevifolia*: Evaluation of Browning, **Callus** Growth, Total Phenolics and Paclitaxel Production ». *Bioimpacts.* , V.1, n°1, (2011), 37-45.
114. **Fett-Neto, A.G., DiCosmo, F., Reynolds, W.F. et Sakata, K.**, « Cell culture of *Taxus* as a source of the antineoplastic drug taxol and related taxanes », *Bio:Technol.* V.10, (1992), 1572–1576.
115. **Ketchum, R. E. B., Gibson, D. M. et Gallo, G.**, « Media optimization for maximum biomass production in cell cultures of pacific yew. » *Plant Cell tissue and Organ Culture*, V.42, (1995), 185-193.
116. **Zhong, J. J.**, « Recent advances in cell cultures of *Taxus* sp. for production of the natural anticancer drug taxol ». *Plant Tissue Cult. Biotechnol*, V.1, (1995), 75-80.
117. **Wickremesinhe, E. R. M.**, « Callus and cell suspension cultures of *Taxus* as a source of taxol and related taxanes ». PhD thesis. The Pennsylvania State University, University Park, Pennsylvania (1992).
118. **Yu, L.J., Lan, W.Z., Qin, W.M. et Xu, H.B.**, « Effects of salicylic acid on fungal elicitor-induced membrane-lipid peroxidation and taxol production in cell suspension cultures of *Taxus chinensis* ». *Process Biochemistry*, V.37, (2001), 477–482.

119. **Bonfill, M., Palazon, J., Cusido, R.M., Joly, S., Morales, C. et Pinol, M.T.**, « Influence of elicitors on taxane production and 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase activity in *Taxus x media* cells », *Plant Physiol. Biochem.* V.41, (2003), 91–96.
120. **Seki, M. et Furusaki, S.**, « An immobilized cell system for taxol production ». *Chemtech*, V.26, (1996), 41–45.
121. **Seki, M., Ohzora, C., Takeda, M. et Furusaki, S.**, « Taxol (paclitaxel) production using free and immobilized cells of *Taxus cuspidata* ». *Biotechnol. Bioeng.* V.53, (1997), 214–219.
122. **Hoffman, A.M., Voelker, C.C.J., Franzen, A.T., Shiotan, K.S. et Sandhu, J.S.**, «Taxanes exported from *Taxus x media* hichsii cuttings into liquid medium over time ». *Phytochemistry*, V.43, n°1, (1996), 95-98.