

# UNIVERSITÉ DE SAAD DAHLEB DE BLIDA

Faculté des sciences agronomiques, vétérinaires et biologiques  
Département de biologie

## MEMOIRE DE MAGISTER

Spécialité : biotechnologie végétale

### ESSAIS DE MULTIPLICATION IN VITRO D'UNE PLANTE MEDICINALE *Aristolochia longa* L.

Par

**METIDJI Hafidha**

Devant le jury composé de

M. BENMOUSSA	Professeur, U de Blida	Président
M. ABDUL HUSSAIN	Maître de Conférence, U de Blida	Examineur
F/Z. CHAOUCH	Chargé de Cours, U de Blida	Examineur
F. SAIDI	Maître de Conférence	Promoteur
M.S. CHERIF	Chargé de Cours, U de Blida	Co-Promoteur

Blida, 16/03/2009

## RESUME

Le présent travail a porté sur l'étude de la multiplication d'une plante médicinale *Aristolochia longa* L. par la technique de la culture in vitro par voie directe et indirecte. L'analyse des résultats aboutit à la détermination d'une méthodologie pour une meilleure désinfection des explants. L'utilisation de HgCl<sub>2</sub> à 0.6 g/l pendant 10min est plus efficace que l'hypochlorite de calcium. Concernant la micropropagation par voie directe, les résultats obtenus ont montré que les hormones de croissance jouent un rôle important dans les différentes étapes de la multiplication. Le milieu de base MS complété avec 1.5 mg/l BAP et 0.5 mg/l ANA est le meilleur milieu qui favorise le développement des bourgeons. Alors que, l'élongation est plus favorable sur le milieu MS avec 1.5 mg/l GA<sub>3</sub> et dans MS avec 0.5 mg/l GA<sub>3</sub> et 1 mg/l ANA. L'enracinement est remarqué avec des pourcentages élevés. Les essais pratiqués sur l'organogenèse indirecte ont révélé que les cals peuvent apparaître après 40 jours à l'obscurité dans un milieu de culture MS contenant 20 g de saccharose, 0.1g/l d'acide ascorbique et les hormones de croissance BAP/ANA (1/1 mg/l), BAP/AIB (1/1mg/l), BAP/AIA (1/1mg/l) et Kinétine/AIA (1/1mg/l). L'apparition des bourgeons démarre à partir de 60<sup>ème</sup> à 70<sup>ème</sup> jours. Alors que, l'élongation est plus favorable sur le milieu MS sans hormone ou additionné à 1 mg/l GA<sub>3</sub>. L'induction des racines est plus efficace sur le milieu MS sans hormone. Dans l'étape de l'acclimatation, 100% des plantules issues par voie directe ont pu survivre dans la tourbe pendant presque 2 mois. Par voie indirecte, 75% des plantules ont pu persister dans la tourbe plus de 1 mois.

## ملخص

يعتمد عملنا على دراسة الزراعة النسيجية في المخبر لعشبه طبية معروفة باسم الزرواند الطويل بالطريقة المباشرة و الغير مباشرة.

تحليل النتائج أدى إلى الوصول إلى أحسن الطرق لتعقيم لعينات النباتية. توضح أن استعمال كلوردات الزئبقي لمدة 10 دقائق أكثر فعالية من كلوردات الكالسيوم.

في ما يخض التكاثر بالطريقة المباشرة في المخبر تبين أن الهرمون النباتية تلعب دور أساسي و فعال في جميع مراحل الزراعة النسيجية. حيث أن إنماء و تطور البراعم يتم في وسط الزرع MS الذي يحتوي على 1.5 غ/ل من BAP و 0.5 غ/ل من ANA. أما مرحلة التطويل فان النتائج أوضحت أن وسط الزرع MS مضاف إليه الهرمونات GA<sub>3</sub> بتركيز 1.5 غ/ل أو GA<sub>3</sub> بتركيز 0.5 غ/ل و ANA بتركيز 1 غ/ل يعطي فعالية كبيرة على البراعم. ولاحظنا أيضا أن نسبة نمو الجذور كانت مرتفعة.

الدراسات العملية التي كانت حول التكاثر بالطريقة الغير مباشرة بينت أن التكون العشوائي للخلايا المعروف باسم Cal يتم في الظلام داخل وسط الزرع MS الذي يحتوي على 20 غ/ل من السكروز 0.5 غ/ل من فيتامين س و الهرمونات (1/1 غ/ل) Kinétine/AIA و (1/1 غ/ل) BAP/AIA, (1/1 غ/ل) BAP/AIB, (1/1 غ/ل) BAP/ANA يبدأ ظهور البراعم مابين اليوم 60 إلى 70. مرحلة التطويل تتم في وسط الزرع MS مضاف إليه GA<sub>3</sub> بتركيز 1 غ/ل. وتكون الجذور أسهل في نفس الوسط بدون هرمونات.

في مرحلة التأقلم خارج غرفة الزرع تبين أن الشتلات المتحصل عليها بالطريقة المباشرة تستطيع الصمود لمدة شهرين في الدبال بنسبة 100% . أما الشتلات المتحصل عليها بالطريقة الغير مباشرة فإنها تصمد لمدة شهر في الدبال بنسبة 75%.

## ABSTRACT

The present work is concerned with the study of the multiplication of a medicinal plant *Aristolochia longa* L. by in vitro farming technique by direct and indirect way. The analysis of the results leads to the determination of a methodology for a better disinfection of explants. The use of  $\text{HgCl}_2$  to 0.6 g/l during 10min is more effective than the calcium hypochlorite. Concerning the micropropagation by direct way, the results obtained went up that the growth hormones play a big role in the various stages of the multiplication. Basic medium MS supplemented with 1.5 mg /l BAP and 0.5 mg/l ANA is the best medium which supports the development of the buds. Whereas, the elongation is more favourable on medium MS with 1.5 mg/l  $\text{GA}_3$  and in MS with 0.5 mg/l  $\text{GA}_3$  et 1 mg/l ANA, the rooting is noticed with high percentages. The tests practised on indirect organogenesis revealed that the callus can appear after 40 days with the darkness in a culture medium MS containing 20g saccharose, 0.1g/l of ascorbic acid and growth hormones BAP/ANA (1/1 mg/l), BAP/AIB (1/1mg/l), BAP/AIA (1/1mg/l) and Kinétine/AIA (1/1mg/l). The appearance of the buds starts from 60<sup>ème</sup> with 70<sup>ème</sup> days. Whereas, the elongation is more favourable on medium MS without hormone or added to 1 mg/l  $\text{GA}_3$ . The induction of the roots is more effective on medium MS without hormone. In the stage of the acclimatization, 100% of the seedlings resulting by direct way could survive in the peat for almost 2 months. By indirect way, 75% of the seedlings could persist in the peat more than 1 month.





*A mes très chers parents  
Pour leur patience et leurs sacrifices  
A mes frères et sœurs  
Pour le soutien moral et l'encouragement qu'ils  
n'ont cessé de me prodiguer  
A mes beaux frères et mes belles sœurs  
A mes très chers amies Affef et Safia  
Je dédie ce modeste travail.*

## REMERCIEMENTS

*\*En cette occasion, Je tiens à témoigner ma profonde gratitude à Mme Saidi Fairouz d'avoir bien voulu diriger mes travaux et pour ses conseils précieux et ses encouragements continus qui ont su me donner confiance en ce travail.*

*Je remercie vivement Mme Cherif, qui a bien voulu accepter de codiriger ce travail et de m'avoir aidé et orienté.*

*Je désire exprimer également mes remerciements à Mr Ben Moussa de me faire l'honneur de présider le jury. Qu'il veuille trouver ici l'expression de ma profonde gratitude.*

*Mme Abdul Hussain qui a gentiment accepté d'examiner ce travail. Je tiens à lui exprimer ma gratitude*

*Mme Chaouch qui bien voulu participer à ce jury en tant qu'examinateur. Qu'elle trouve ici l'assurance de toute ma reconnaissance.*

*Mes vifs remerciements vont aussi à Mr Chelha, directeur de laboratoire de l'ENARP, Mr El Ayebe, principal directeur général de l'ENARP ainsi Mr Mahyedine et à tout le personnel de laboratoire de l'ENARP en particulier Nadia, Nabila et Wahiba pour m'avoir accueilli dans leur laboratoire qu'ils trouvent ici l'expression de ma plus profonde gratitude.*

*Je désire exprimer toute ma reconnaissance à Mme Bouquedoura, professeur à l'USTHB pour m'avoir permis de poursuivre mes travaux au laboratoire des Recherches des Zones Arides.*

*Je ne saurais oublier de remercier mes camarades de promotion Latifa, Redouane, Salma et Sabrina. Je leur souhaite plein de succès et de réussite dans leur vie professionnelle ainsi que personnel*

*Enfin, qu'il me soit permis d'associer à mes remerciements l'ensemble du personnel des départements de Biologie et d'Agronomie, surtout l'ensemble des enseignants de la biologie végétale, ainsi qu'à tous ceux qui ont contribué si aimablement à la réalisation de ce mémoire.*

## TABLE DES MATIERE

RESUME.....	
REMERCIEMENTS.....	
TABLE DES MATIERES.....	
LISTE DES ILLUSTRATIONS, GRAPHIQUES ET TABLEAUX.....	
INTRODUCTION.....	14
1. RAPPELS BIBLIOGRAPHIQUES .....	16
1.1 Historique.....	16
1.2 Ethymologie.....	17
1.3 Systématique.....	17
1.4 Description botanique de la plante.....	18
1.5 Reproduction .....	24
1.6 Répartition.....	25
1.7 Composition chimique d' <i>Aristolochia longa</i> L. ....	25
1.7.1 Composition lipidique.....	25
1.7.1.1 Partie aérienne.....	26
1.7.1.2 Partie souterraine.....	26
1.7.2 Huiles essentielles.....	26
1.7.2.1 Terpenoïdes.....	27
1.7.2.1.1 Monoterpenoïdes.....	27
1.7.2.1.2 Sesquiterpenoïdes.....	28
1.7.3 Alcaloïdes.....	28
1.7.3.1 Acide aristolochique.....	29
1.7.3.2 Aristolactames.....	29
1.8 Utilisation thérapeutique d' <i>Aristolochia longa</i> L.....	30
1.9 Types de culture in vitro.....	32
1.9.1 Multiplication végétative.....	32
1.9.1.1 Prolifération des bourgeons axillaires.....	33
1.9.1.2 Bourgeonnement adventif.....	34
1.9.1.3 Embryogenèse somatique.....	34
1.9.2 Culture de méristème.....	35
1.9.3 Culture des protoplastes .....	35
1.9.4 Culture des suspensions cellulaires.....	36
1.10. Besoins nutritifs des tissus cultivés en conditions aseptiques...	36
1.10.1 Milieux de culture.....	36
1.10.1.1 Sels minéraux.....	37
1.10.1.2 Composés organiques.....	37
1.10.1.3 Régulateurs de croissance.....	38
1.10.1.3.1 Auxines .....	39
1.10.1.3.2 Cytokinines .....	40
1.10.1.3.3 Gibbérellines.....	41
1.10.1.3.4 Acide abscissique.....	42
1.10.1.3.5 Ethylènes .....	42
1.11 Choix de l'explant.....	43

1.11.1 En fonction du stade et de l'âge du pied-mère.....	43
1.11.2 En fonction de la taille et la nature de l'explant.....	43
1.11.3 En fonction de l'époque de prélèvement.....	44
1.12 Facteurs physiques de l'environnement de culture.....	44
1.12.1 Lumière.....	44
1.12.2 Température.....	45
<b>2. MATERIALS ET METHODES.....</b>	<b>46</b>
2.1 Matériel végétal .....	46
2.2 Méthodes .....	46
2.2.1 Stérilisation du matériel végétal.....	46
2.2.2 Milieu de culture.....	47
1. Organogenèse directe .....	49
2. Organogenèse indirecte.....	50
3. Phase d'élongation .....	51
4. Phase d'enracinement .....	51
5. acclimatation.....	52
2.2.3 Conditions de culture.....	52
2.2.4 Méthodes histologiques.....	53
2.2.4.1 Fixation.....	53
2.2.4.2 Inclusion des organes dans la paraffine.....	53
2.2.4.3 La coloration .....	56
2.2.5 Mode d'expression des résultats.....	56
<b>3. ANALYSES ET INTERPRETATION DES RESULTATS.....</b>	<b>58</b>
3.1 Stérilisation du matériel végétal .....	58
3.2 Micropropagation .....	63
3.2.1 Organogenèse directe .....	65
3.2.1.1 Phase de multiplication .....	65
3.2.1.1.1 Effet de BAP avec les auxines .....	65
3.2.1.1.2 Effet de kinétine avec les auxines.....	66
3.2.1.1.3 Multiplication par fragmentation des vitropants obtenues à partir de fragments de tige et l'apex .....	68
3.2.1.2 Phase d'élongation.....	70
3.2.1.2.1 Effet des sub-cultures sur la longueur moyenne de la tige.....	70
3.2.1.2.2 Effet des gibbérellines sur la longueur moyenne de la tige.....	71
3.2.1.3 Phase d'enracinement .....	74
3.2.2 Organogenèse indirecte .....	78
3.2.2.1 Phase de callogenèse.....	79
3.2.2.1.1 Effet des différentes combinaisons hormonales sur le pourcentage des cals...	79
3.2.2.1.2. Effet des différentes combinaisons hormonales sur le poids des cals.....	81
3.2.2.1.3. Effet des différentes combinaisons hormonales sur la texture et la couleur des cals.....	83
3.2.2.1.4 Etude histologique des cal.....	91

3.2.2.2 Phase d'élongation.....	95
3.2.2.2.1 Effet des gibbérellines sur la longueur moyenne de la tige.....	95
3.2.2.2.2 Effet des sub-cultures sur la longueur moyenne de la tige.....	97
3.2.2.3 Phase d'enracinement.....	97
3.3. Organogenèse_déficiente.....	101
3.4. Acclimatation.....	104
CONCLUSION.....	112
REFERENCES.....	
APPENDICES.....	

## LISTE DES ILLUSTRATIONS GRAPHIQUES ET TABLEAUX

Figure 1.1	Tubercule de <i>Aristolochia longa</i> L	19
Figure 1.2	Tiges de <i>Aristolochia longa</i> L	19
Figure 1.3	Forme et Nervures palmées au niveau de la feuille Fleurs de	20
Figure 1.4	<i>Aristolochia longa</i> L	22
Figure 1.5	Structure interne des fleurs de <i>Aristolochia longa</i> L	22
Figure 1.6	Fruits d' <i>Aristolochia longa</i> L	23
Figure 1.7	Grains de <i>Aristolochia longa</i> L	23
Figure 1.8	Poils internes au niveau de la fleur	24
Figure 2.1	Types d'organogenèse contrôlés par les concentrations relatives d'auxine et de cytokinine	49
Figure 3.1	Développement des contaminations fongiques	59
Figure 3.2	Développement des contaminations bactériennes	60
Figure 3.3	Effet de $\text{Ca}(\text{ClO})_2$ et $\text{HgCl}_2$ sur le taux de contaminations	61
Figure 3.4	Nécrose au niveau des fragments des feuilles et des tiges	62
Figure 3.5	Effet de combinaisons hormonales entre BAP et les auxines sur le développement des bourgeons	66
Figure 3.6	Effet de combinaisons hormonales entre BAP et les auxines sur le développement des bourgeons	67
Figure 3.7	Développement des bourgeons après 10 jours d'introduction dans le milieu $M_6$	69
Figure 3.8	Vitro-plant développé	69
Figure 3.9	Pousses ramifiés	69
Figure 3.10	Effet des sub-cultures sur l'allongement moyen de la tige	70
Figure 3.11	Effet de combinaison hormonale sur l'élongation	72
Figure 3.12	Effet des combinaisons hormonales sur l'enracinement	74
Figure 3.13	Plantules enracinées issues d'organogenèse directe	76
Figure 3.14	Touffe des plantules enracinées issues d'organogenèse directe	76
Figure 3.15	Effet des combinaisons hormonales entre le BAP et les auxines	

	sur l'apparition des cals	80
Figure 3.16	Effet des combinaisons hormonales entre la kinétine et les auxines sur l'apparition des cals	81
Figure 3.17	Evolution de la callogenèse exprimée en poids frais de feuilles sur les milieux de culture	82
Figure 3.18	Début de formation des cals	85
Figure 3.19	Aspect des cals issus des milieux M <sub>1</sub> et M <sub>2</sub> à l'obscurité	85
Figure 3.20	Aspect des cals issus du milieu M <sub>3</sub> à l'obscurité	85
Figure 3.21	Aspect des cals issus du milieu M <sub>5</sub> à l'obscurité	85
Figure 3.22	Aspect des cals issus des milieux M1, M2 et M3 à la lumière	88
Figure 3.23	Aspect des cals issus du milieu M <sub>5</sub> à la lumière	88
Figure 3.24	Développement de bourgeon issu du cal (loupe Gx4.5)	88
Figure 3.25	Aspect des cals après 3 à 4 sub-cultures	88
Figure 3.26	Coupe transversale du cal issu après 20 jours de culture	91
Figure 3.27	Coupe transversale du cal issu après 40 jours de culture	91
Figure 3.28	Coupe transversale du cal issu après 40 jours de culture	92
Figure 3.29	Coupe transversale au niveau du foyer cellulaire hautement actif du cal	93
Figure 3.30	Coupe transversale au niveau de procambium du cal	93
Figure 3.31	Coupe longitudinale au niveau d'un bourgeon en voie de formation	94
Figure 3.32	Effet des hormones de croissance sur l'allongement moyen de la tige	96
Figure 3.33	Effet des sub-cultures sur l'allongement moyen de la tige	97
Figure 3.34	Effet des hormones de croissance sur l'enracinement des vitro-plants issus des cals	98
Figure 3.35	Cal enraciné sur le milieu M <sub>1</sub>	100
Figure 3.36	Développement des plantules issues des cals	100
Figure 3.37	Développement des racines des vitro-plants issus des cals	100
Figure 3.38	Aspect des plantules enracinées et vitrifiées	103
Figure 3.39	Pourcentage de réussite d'acclimatation des vitro-plants issus	104
Figure 3.40	Plantules au début d'acclimatation	106
Figure 3.41	Développement des plantules après 3 semaines d'acclimatation	106

Figure 3.42	Début de jaunissement et dessèchement des plantules	106
Figure 3.43	Plantules issues d'organogenèse directe après 40 jours	107
Figure 3.44	Dessèchement et mort des plantules	107
Figure 3.45	Coupe longitudinale de la racine <i>d'Aristolochia longa</i> L obtenue par micropropagation :	108
Figure 3.46	Coupe transversale dans la racine <i>d'Aristolochia longa</i> L obtenue par micropropagation	109
Figure 3.47	Coupe transversale dans la racine <i>d'Aristolochia longa</i> L obtenue par micropropagation	110



Tableau 2.1	Protocole de stérilisation	47
Tableau 2.2	Compositions de solution minérales utilisées lors de l'expérimentation	48
Tableau 2.3	Solution vitaminique de MOREL (1952) en mg pour 100 ml.	48
Tableau 2.4	Combinaisons hormonales d'organogenèse directe	50
Tableau 2.5	Combinaisons hormonales d'organogenèse indirecte.	50
Tableau 2.6	Balances hormonales de milieu d'élongation.	51
Tableau 2.7	Balances hormonales du milieu d'enracinement	52
Tableau 3.1	Effet de gibbérelline sur la longueur moyenne de la tige	73
Tableau 3.2	Effet des hormones de croissance sur le poids frais des cals	83
Tableau 3.3	Couleur et texture des cals à l'obscurité	84
Tableau 3.4	Couleur et texture des cals à la lumière	86
Tableau 3.5	Effet des hormones de croissance sur l'allongement des vitro-plants	96
Tableau 1	Analyse de la variance de la longueur moyenne de la tige après 40 jours de culture	Ap.A
Tableau 2	Analyse de la variance du poids frais des cal après 40 jours.	Ap.A
Tableau 3	Analyse de la variance de l'allongement moyen des vitro-plants après 40 jours de culture	Ap.A
Tableau 4	Structure chimique des huiles essentielles chez d' <i>Aristolochia longa</i> L	Ap D
Tableau 5	Structure chimique des acides aristolochiques et l'aristolactame Ia isolées à partir d' <i>Aristolochia longa</i> L.	Ap E
Tableau 6	Structure chimique des hormones de croissance	Ap F

## INTRODUCTION

Depuis les temps les plus reculés, l'homme cherche dans les végétaux sa nourriture et ses remèdes. Ces connaissances, transmis d'abord oralement, l'ont été ensuite dans les écrits. Il existe des traces de l'emploi des plantes comme remèdes dans les plus anciennes civilisations [1].

Actuellement, la connaissance et l'utilisation des propriétés thérapeutiques des plantes sont en pleine croissance et l'efficacité de la phytothérapie est prouvée. Les recherches ont montré aussi que les plantes médicinales comportent une richesse dans les constituants qui sont élaborés mais à des concentrations variables. Ces constituants ont de nombreuses vertus thérapeutiques. A cause de cette variabilité dans la composition, la récolte et l'utilisation intensive par l'Homme à provoquer la disparition de certaines espèces [2].

Pour surmonter ces difficultés, de nombreux chercheurs font appel aux techniques de la culture *in vitro*. Ces dernières sont de plus en plus employées pour assurer la propagation clonale des génotypes élites pour satisfaire les besoins en agriculture et en horticulture. Par ailleurs, la culture *in vitro* est un outil très efficace au service de la recherche biologique et physiologique [3].

L'Algérie offre une grande diversité de microclimats et de sols. Ces conditions permettent d'envisager une grande richesse en plantes, plus particulièrement les plantes médicinales ce qui a été toujours une source d'évolution de la médecine traditionnelle [4].

Parmi les espèces qui ont un intérêt thérapeutique en Algérie, nous nous sommes intéressées à *Aristolochia longa* L., plante herbacée localement connue sous le nom de Barrastam. Elle appartient à la famille des Aristolochiaceæ, localisée

principalement au centre du pays. *Aristolochia longa* L. est fortement utilisée actuellement en médecine populaire pour son effet anti-cancérigène [5].

Ce travail représente et pour la première fois en Algérie, la multiplication et la conservation de cette espèce. Nous présenterons une approche biotechnologique des différentes étapes de la micropropagation.

- Détermination d'un protocole efficace de la stérilisation des différents explants utilisés.
- L'obtention d'un grand nombre de copies rigoureusement conformes par micropropagation directe à partir des explants de tiges.
- L'initiation de la callogenèse, la multiplication des cals par fragmentation et l'induction de la caulogenèse et de la rhizogenèse à partir des explants de feuilles.
- Essais d'acclimatation des plantules obtenues par les deux modes de la micropropagation à savoir :
  - La culture *in vitro* par voie directe
  - La culture *in vitro* par voie indirecte

# CHAPITRE 1

## BIBLIOGRAPHIE

### 1.1 Historique

*Aristolochia longa* L. ou l'aristoloche longue est une plante médicinale connue depuis longtemps [6].

Le nom *Aristolochia* signifie en latin « bon accouchement », c'est pour cette raison que les médecins grecs l'employaient pour activer l'accouchement et faciliter l'évacuation du placenta. On l'utilise également contre les insuffisances ovariennes [7] [8].

En médecine chinoise populaire et Egypte antique, cette plante est utilisée dans la préparation des drogues qui traitent les morsures de serpent, les plaies infectées et les inflammations [9] [10] [11] [12].

L'aristoloche était largement utilisée chez les arabes, citée par plusieurs auteurs de la médecine arabe tel que Ibn-Sina, Ibn El-baytar et El-Antaki. Ils ont décrit la plante ainsi que ses propriétés médicinales et les maladies traitées par l'aristoloche avec son mode d'emploi [13] [14] [15].

Actuellement, *Aristolochia longa* L. est connue plus particulièrement pour son principe actif, l'acide aristolochique. Ce dernier a la capacité d'augmenter le pouvoir phagocytaire des globules blancs, d'où les propriétés cicatrisantes de cette plante. Elles peuvent être mises à profit au cours du traitement des fistules, ulcère, furonculoses, acnés rebelles et bien d'autres maladies [16] [17] [18].

Par ailleurs, l'aristoloche est utilisée couramment par la médecine populaire pour soigner certaines des tumeurs (bénignes ou malines). Cela est dû aux propriétés antimitotiques que possède son principe actif [19].

## 1.2. Ethymologie

*Aristolochia* : ancien nom latin exprimant les propriétés eutociques de cette plante (facilite l'accouchement), dérive de deux mots :

- *Aristos* : excellent, le meilleur.
- *Lokia* : (lochéra) accouchement car cette plante facilite l'accouchement [20].
- *Longa* : les caractères de leurs souches allongées [5].

En anglais : c'est Birthwort [21] [11].

En arabe : c'est Zaraound El-taouil, selon IBN EL BAYTAR [14].

Appellations locales :

Mousquar, Quattsa El Haya, Boubralla, Afgouce El Rhioul ou Beroustoum et Ajrarkhi en Berbère [5].

## 1.3. Systématique

La systématique adoptée de *Aristolochia longa* L. est celle de MAIRE [22].

- Règne : Plantae
- Phylum : Spermaphyte
- Sous phylum : Angiosperme
- Classe : Dicotylédone
- Sous classe : Apétale
- Série : Dicotylédone à ovaire infère
- Ordre : Aristolochiale
- Famille : Aristolochiaceae
- Genre : *Aristolochia*
- Espèce : *Aristolochia longa* L.
- Sous espèce :
  - Fontanesii :
    - Djurdjurae
    - Multinervis
  - Paucinervis :
    - Typica

- Longilabiata
- Parviflora
- pseudorotunda

La famille des Aristolochiaceae est une petite famille comportant 7 genres qui sont répartis en 625 espèces. Le genre *Aristolochia* seul comporte environ 400 espèces [23] [24] [25].

#### 1.4. Description botanique de la plante

*Aristolochia longa* L. est une herbe vivace rampante.

- Racine

Les racines de *Aristolochia longa* L. sont tubérisées aux formes variées de cylindriques à fusiformes, napiformes ou ovoïdes parfois même lobés (figure 1.1). Les tubercules verticaux peuvent atteindre 8x3 cm [22] [26].

- Tige

Chaque tubercule émet plusieurs tiges simples ou rameuses anguleuses de 30 à 80 cm de long, glabres ou légèrement pubescentes (figure 1.2). Chaque tige porte à sa base quelques écailles puis des feuilles et des rameaux ordinairement plus ou moins étalés [27] [5].

- Feuilles

Les feuilles se disposent alternativement sur presque toute la longueur de la tige. Elles ont une dimension qui varie entre 3,5 à 6 et 3 à 4,5 cm. Leurs pétioles de 0.5 à 1 cm de longueur portent des feuilles sous forme ovale. Chaque feuille est parcourue par un réseau de nervures palmées (figure A 1.3et B1.3) [22] [5].

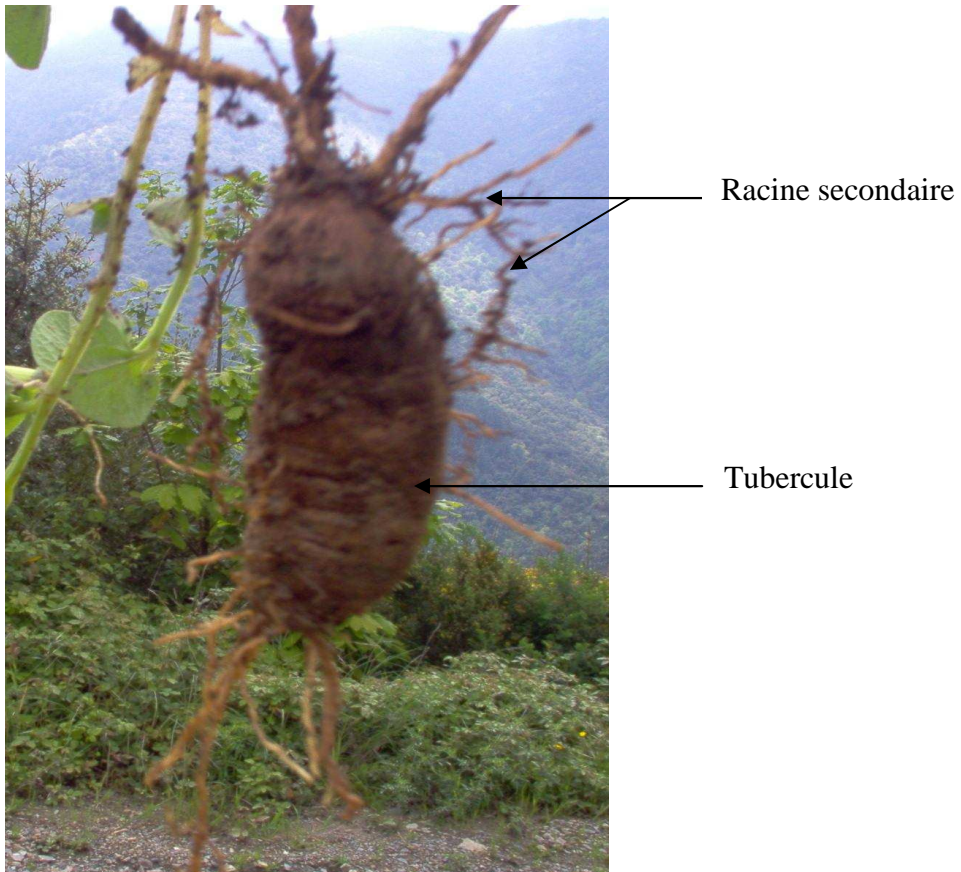


Figure 1.1 : Tubercule de l'*Aristolochia longa* L. (8x3 cm) (originale)

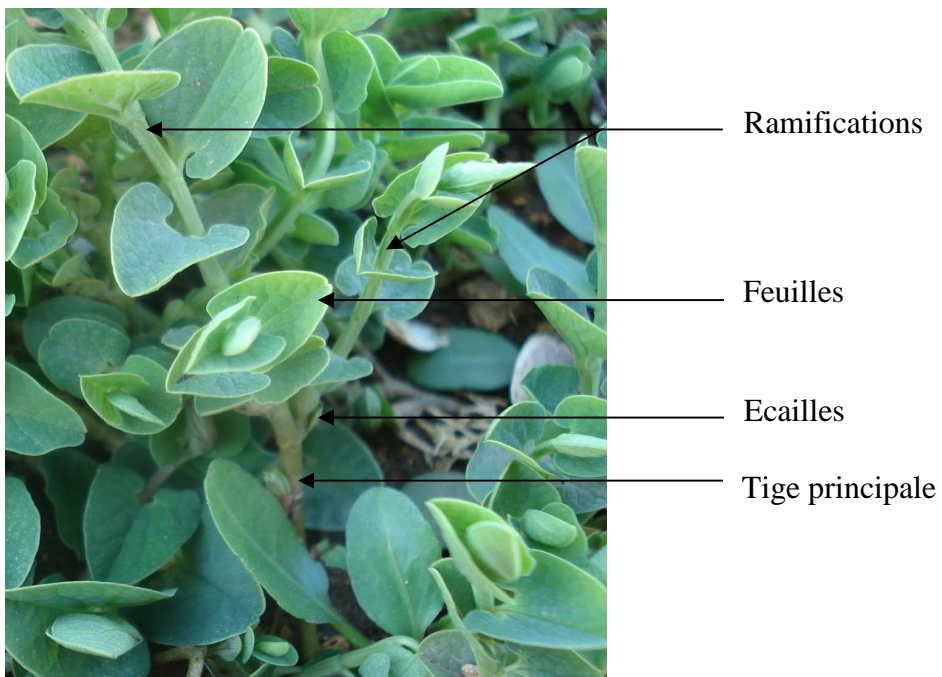


Figure 1.2 : Tiges de l'*Aristolochia longa* L. (originale)

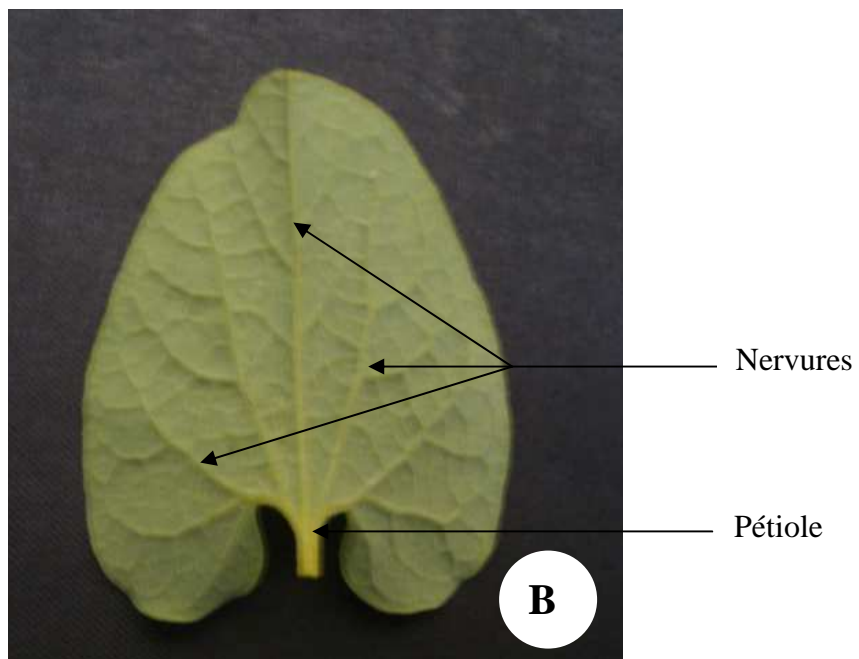
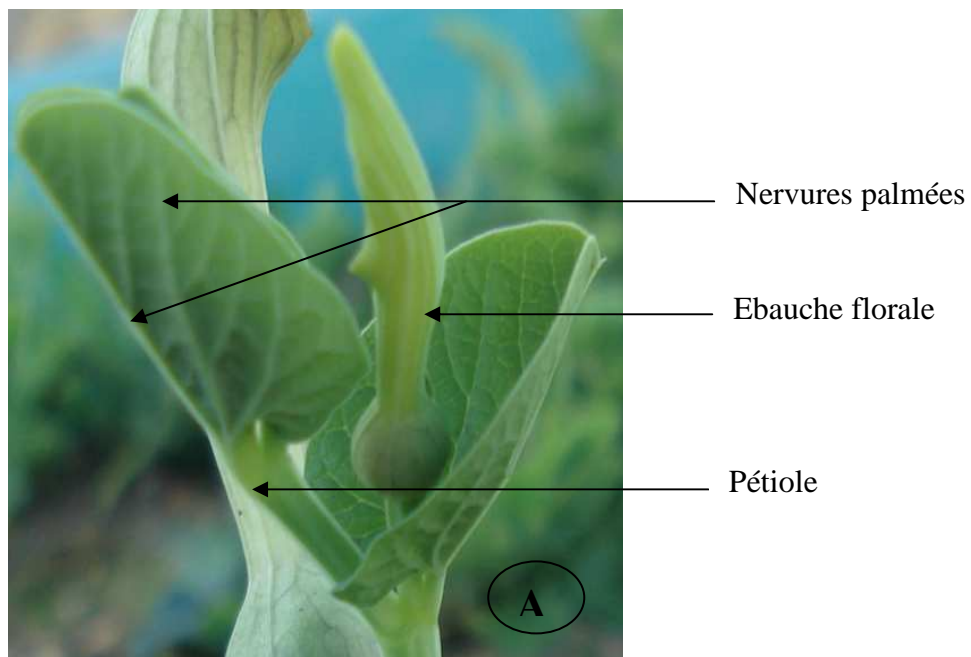


Figure 1.3 : Forme et Nervures palmées au niveau de la feuille  
(A) Vue du plan (B) vue dorsale (originale)



- Fleurs

Les fleurs sont axillaires de couleur verdâtre ou jaunâtre rayées de brun. Le périanthe est soudé en forme de cornet dont le sommet est recourbé en tête de cobra. Il est renflé à la base et garni intérieurement de poils dont la longueur varie entre 3.5 et 8 cm (figure 1.4). Les pièces florales sont portées par un pédoncule de 1cm de longueur [26] [5].

Les fleurs sont hermaphrodites avec des ovaires infères à placentation pariétale. Le nombre d'étamines est de 10 et plus, adnées au gynostème et à anthères extrorses (figure 1.5)[22].

- Fruits

Les fruits d'*Aristolochia longa* L. sont des Capsules ellipsoïdales – subglobuleuses. La déhiscence commence par le sommet (figure 1.6 [A ; B; C; D]). Chaque fruit porte 6 valves [22] [5].

- Graines

Les graines sont brunes, aplaties et triangulaires convexes et chagrinées sur une face, concaves sur l'autre avec un raphé charnu. Elles présentent un embryon droit et minuscule (figure 1.7). Les graines ont une largeur de 4 à 8 mm [22] [28].

- Période de floraison

La période de floraison se situe entre les mois d'avril et de mai [22] [27].

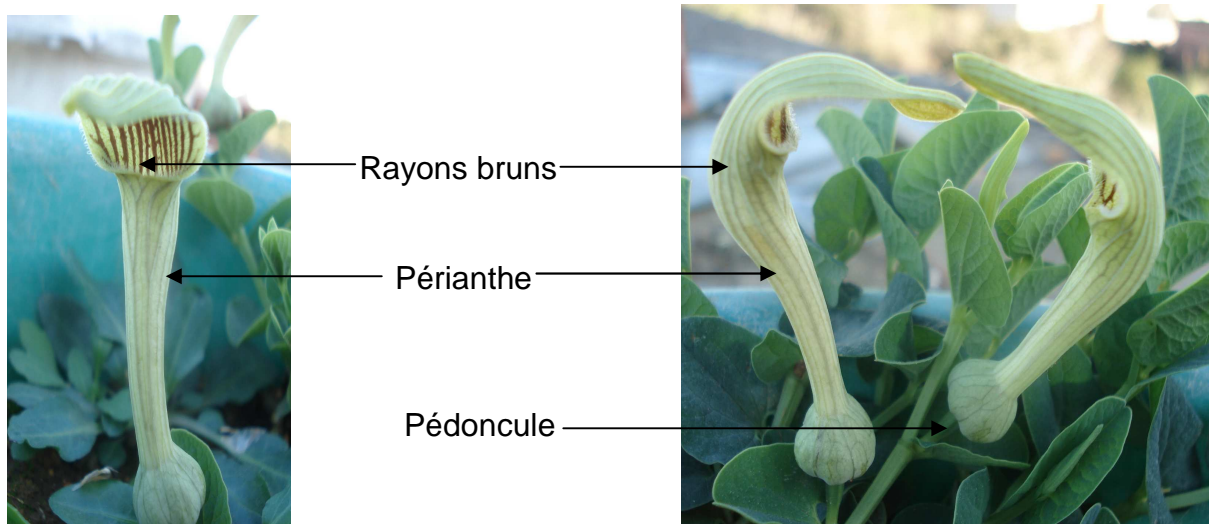


Figure 1.4 : Fleurs de l'*Aristolochia longa* L. (originale)

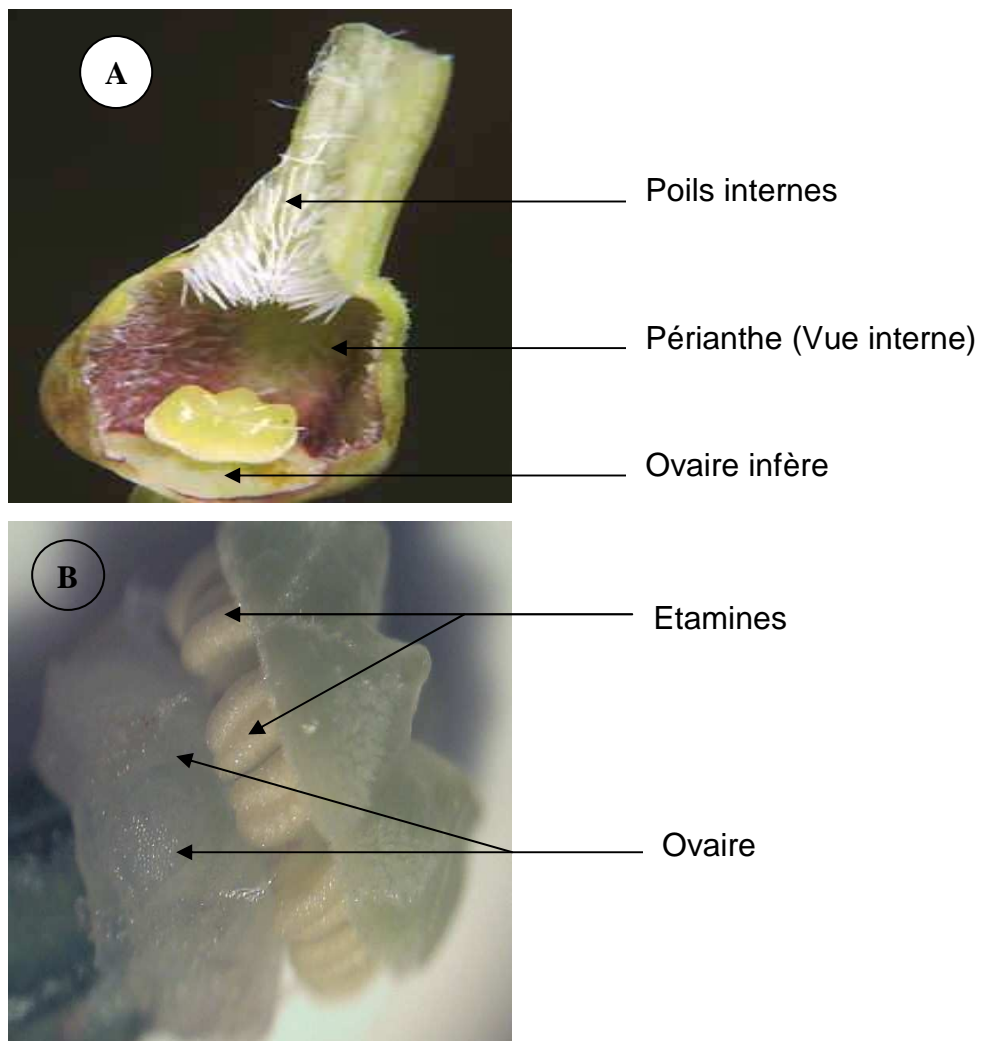


Figure 1.5 : Structure interne des fleurs de l'*Aristolochia longa* L. (originale)

(A) coupe longitudinale de la partie inférieure de la fleur

(B) vue d'ensemble « ovaire et étamines » (loupe G X20)

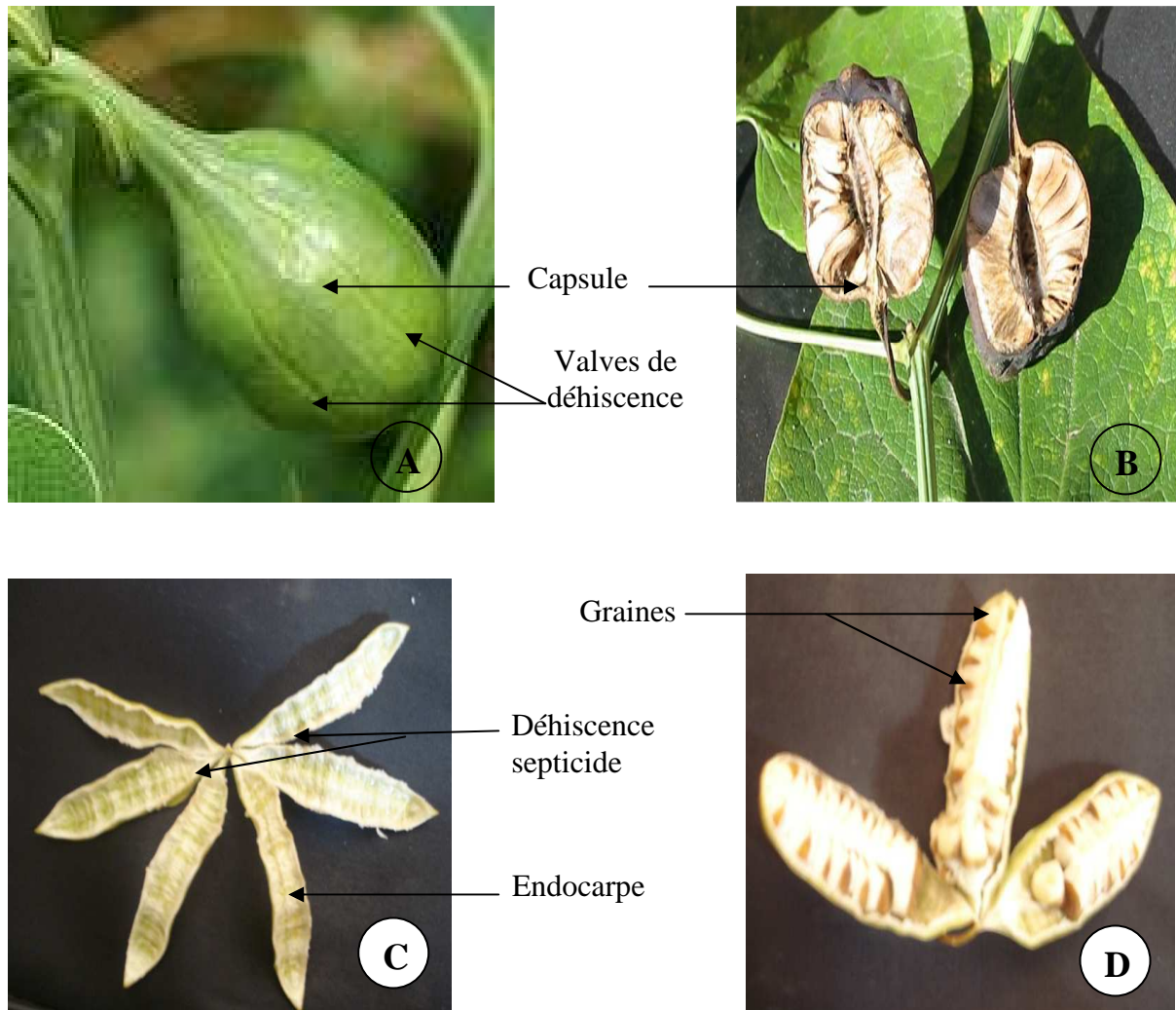


Figure 1.6 : Fruits de l'*Aristolochia longa* L. (originale)  
 (A) Fruits séchés ; (B) Fruits frais ; (C) Vue d'interne ; (D) Insertion des graines

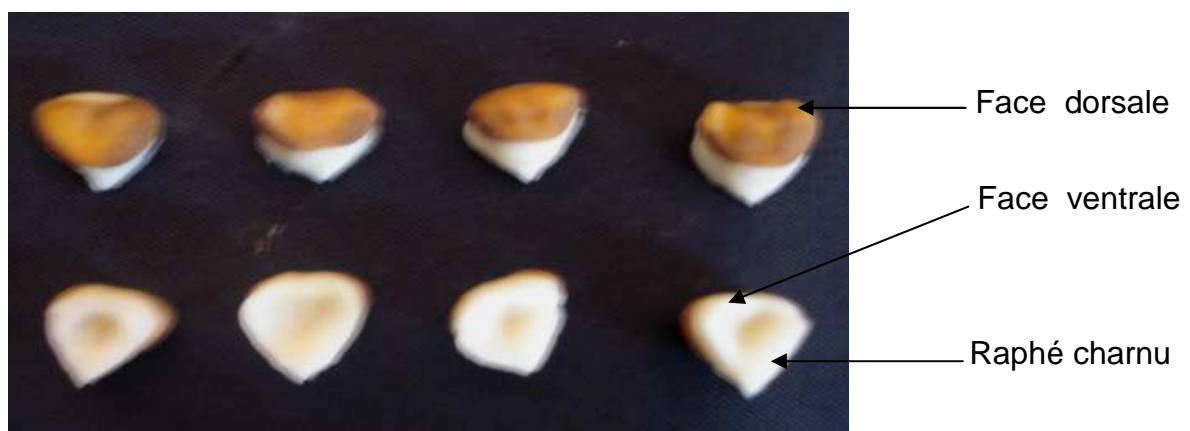


Figure 1.7: Grains de l'*Aristolochia longa* L. (originale)

## 1.5. Reproduction

*Aristolochia longa* L. présente une nette adaptation à la pollinisation par les insectes. Ses fleurs sont un redoutable piège. Les insectes attirés par les odeurs et la couleur, pénètrent dans les fleurs. Une fois dans le réceptacle, les pollinisateurs ne peuvent plus s'échapper à cause des poils du conduit orientés vers le bas (figure 1.8). Ces insectes vont donc se charger du pollen contenu dans les anthères. Les insectes, retenus par les poils jusqu'à prisonniers, s'échappent, se couvrant au passage de pollen. Ils assurent ainsi la reproduction de l'espèce [28] [30].

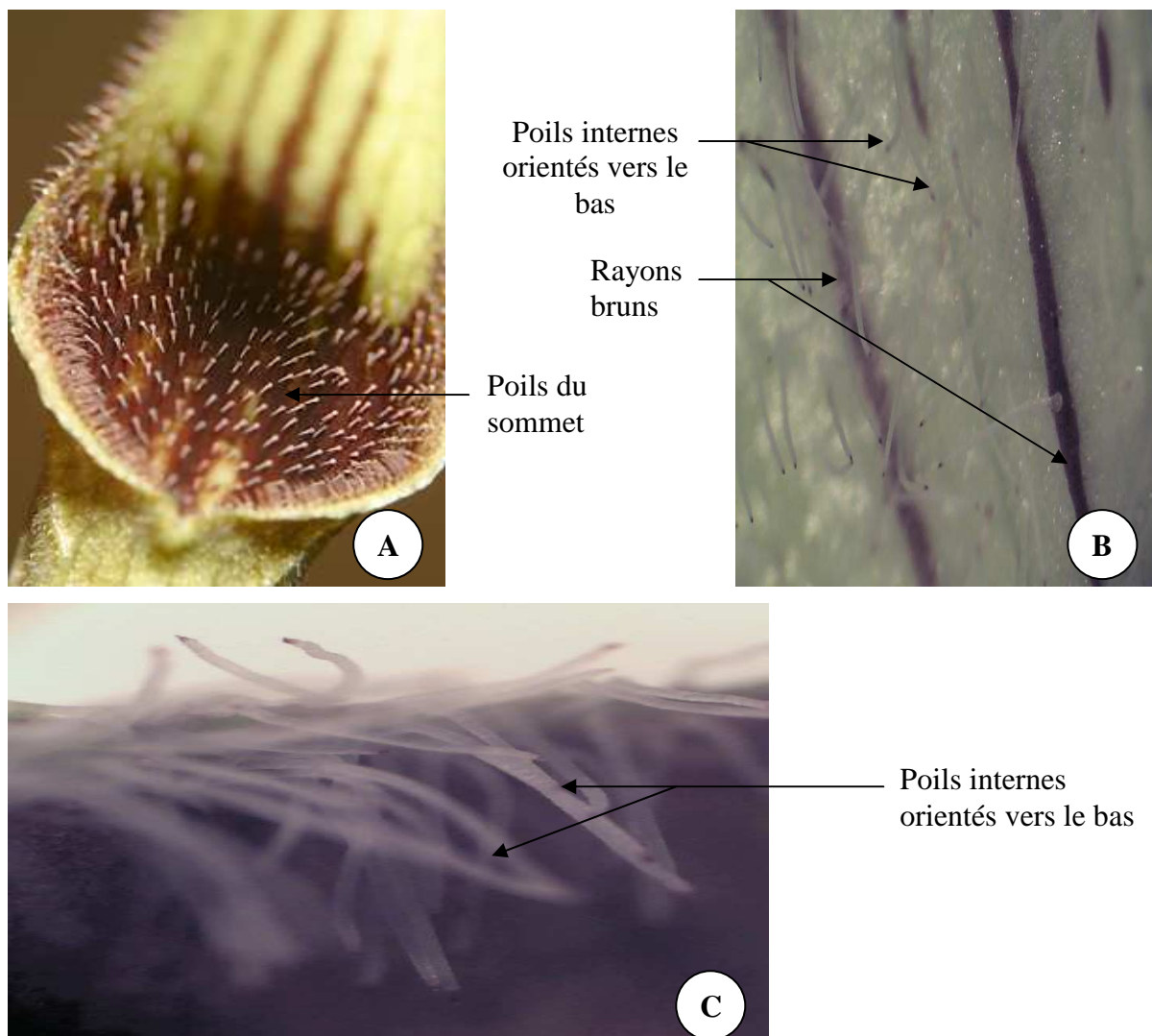


Figure 1.8 : les poils internes au niveau de la fleur (originale)

(A) partie supérieur de la fleur

(B) poils internes vue à la loupe Gx20

(C) poils internes vue à la loupe Gx40

## 1.6. Répartition

D'après MAIRE [22], *Aristolochia longa* L. est une espèce endémique. Elle pousse sur des terres rouges, des lieux humides et souvent sur les broussailles. On la retrouve dans les montagnes jusqu'à une altitude de 1800 m [27].

- *Dans le monde*

Elle se trouve en :

- Europe méridional et rarement en Espagne.
- Macaronésie (les îles Canaries, Madère et Selvagens).
- Assez commune dans les régions tropicales, et sub tropicales d'Asie.
- L'Afrique du nord et dans le sud de l'Amérique [31] [32].

- *Répartition en l'Algérie*

### *Aristolochia longa* L. ssp *paucinervis*

- Assez commune dans le Tell et à l'est de l'Oranie.
- Montagnes de Tlemcen.
- Moyennement commune dans le nord, le centre et l'ouest, dans le moyen Atlas et le grand Atlas

### *Aristolochia longa* L. ssp *Fantanesii*

- Assez commune dans la région de Bougie.
  - Rare : en Kabylie, le littoral algérois et la Mitidja
- Assez commune dans les montagnes de Tlemcen, la vallée de Mostaganem et celle du Chélif [5] [22] [27] [33].

## 1.7. Composition chimique d'*Aristolochia longa* L.

### 1.7.1 Composition lipidique

Ce sont des substances qui englobent, non seulement les matières grasses, mais aussi les esters et les dérivées d'acides gras ayant des propriétés analogues [1].

L'étude qui a été effectuée sur l'extrait d'hexane non volatile de *Aristolochia longa* L. a montré que le taux des composés lipidiques dans la partie aérienne (sans fruit) est de 3.4% contre 0.3% dans la partie souterraine [34].

#### 1.7.1.1 Partie aérienne

L'extrait d'hexane de la partie aérienne (sans fruit) de *Aristolochia longa* L. est essentiellement composé d'acides gras libres (40%) et de leurs dérivés [comme glycérides (9%) et des esters d'acide monohydroxylique (15%)]. Il comporte aussi une quantité considérable de sitostérol (6%), des alcools d'isoprenoïde (3%) et des squalènes sous forme de traces.

L'analyse de la fraction des acides gras libres par chromatographie phase gazeuse a montré la présence de l'acide palmitique (44%), l'acide oléique (10%), l'acide stéarique (5%), l'acide linoléique (22%) et l'acide linoléique [34] [35].

#### 1.7.1.2 Partie souterraine

Les études de DEPASQUAL et *al.* [34] sur l'extrait non volatile de la partie souterraine a montré la présence d'une fraction acide (41%) et une fraction neutre (27%).

- ❖ La fraction acide : est composée de l'acide palmitique (22%), l'acide oléique (23%), l'acide linoléique (40%) et l'acide linoléique (13%), ainsi que peu d'ester non identifié d'acide férulique.
- ❖ La fraction neutre : comporte principalement des glycérides (27%), des esters éthyliques (11%), des sitostérols (10%) et (5%) d'esters isobutyliques. En outre, elle comporte de l'acide palmitique, l'acide oléique, l'acide linoléique et l'acide linoléique.

Le mélange des acides gras obtenu par saponification des glycérides était semblable à celui des acides gras libres. En effet, il ne contient pas de quantités appréciables d'acides stéariques contrairement à la partie aérienne.

#### 1.7.2 Huiles essentielles

Ces produits, appelés communément essences, sont des substances odorantes volatiles contenues dans les végétaux [36]. Les huiles essentielles sont

des mélanges de constituants dont les principaux sont des carbures terpéniques et leurs dérivés oxygénés (alcools, aldéhyde, cétones). Néanmoins, on rencontre aussi des huiles essentielles des composés acycliques tels que les acides gras à faible poids moléculaire mais surtout des dérivés aromatiques (aldéhydes) [37].

#### 1.7.2.1. Terpenoïdes

Des enquêtes approfondies sur les Terpenoïdes du genre *Aristolochia* ont été menées depuis 1935 par différents groupes de chercheurs dans le monde (Brésil [Araraquara], Chine [Beijing], Taiwan [Tainan], Inde [Bombay]) [12].

Ces études ont permis d'isoler et de caractériser plus que 200 types de terpenoïdes qui inclut les mono, di, tri, tétra, sesquiterpenoïdes. Parmi eux, les sesquiterpenoïdes et les diterpenoïdes sont les plus abondants dans le genre *Aristolochia* [38].

*L'Aristolochia longa* L. comporte :

##### 1.7.2.1.1. Monoterpenoïdes

Monoterpenoïdes, largement distribués dans les huiles essentielles des espèces de *Aristolochia* sont pour la plupart du temps présents sous forme de Monoterpenoïdes acyclique : les menthanes, les pinanes et camphanes. En plus de ces types, des thujanes, les caranes, les fenchanes et les monoterpenoïdes tricycliques sont également identifiés, comme composants mineur [12] [39].

Les huiles essentielles des parties aériennes de *Aristolochia longa* L. analysées par GC et CG-MS ont montré la présence des Monoterpenoïdes (tableau App D):

❖ Monoterpenoïdes acycliques :

- linalool –(s)
- Ocimene-β

❖ Monoterpenoïdes bicycliques :

- Camphanes
  - Bornyl acetate
  - Bornanol
- Pinanes

- Pin-2-en-8-ol
- 8-Acetoxy-pin-2-ene [40] [12]

#### 1.7.2.1.2 Sesquiterpénoïdes

Les sesquiterpénoïdes sont des composés à C<sub>15</sub>. Ils sont le résultat de l'assemblage de trois unités d'isoprénoïdes. Il y a un vaste nombre de squelettes de carbone ayant le même précurseur, le pyrophosphate farnésyl, mais ils présentent divers mode de cyclisation [41].

Les sesquiterpénoïdes isolés du genre *Aristolochia* sont au nombre 24 dont les principaux types incluent des cadinanes, des aristolanes, des germacrane et des bicyclogermacrane [42].

Les analyses des composés volatiles (tableau App D ) de l'extrait d'hexane des racines et des parties aériennes de *Aristolochia longa* L. par DEPASCUAL [40] et WU [12] montrent que:

- ❖ Dans la partie souterraine, il y a présence seulement des sesquiterpénoïdes tricycliques calarene, maaliol et aristolone (calarene et 2-oxocalarene). C'est le premier rapport qui signale l'existence de maaliol avec le squelette maaliene dans le genre *Aristolochia*.
- ❖ La partie aérienne est marquée par la présence de β-caryophyllène et caryophyllène oxyde avec un caryophyllène squelettique.

#### 7.3 Alcaloïdes

Ce sont des substances d'origine biologique et le plus souvent végétale. Elles renferment du carbone, de l'hydrogène et de l'azote ; le plus souvent, de l'oxygène. Ces composés constituent, avec les hétérosides et les antibiotiques, la majeure partie des principes actifs des plantes médicinales [1] [44].

La famille des Aristolochiaceae, comprend les genres *Aristolochia* et *Asarum*. Elle est marquée par la présence des acides aristolochiques et ses analogues comme principe actif [45][18]. Les acides aristolochiques sont souvent accompagnés par des aristolactames. Environ 29 des acides aristolochiques et 23 des aristolactames ont été trouvés dans les plantes d'Aristolochiaceae [46] [47].



### 1.7.3.1 Acide aristolochique

L'acide aristolochique est un alcaloïde naturel. Il est synthétisé au niveau des feuilles et accumulé au niveau des tubercules [48] [49].

Le précurseur de l'acide aristolochique est généralement l'acide phénanthrol [3,4-*d*]-1,3-dioxole-6-nitro-5-carboxylique [50] [51].

Les études qui ont été réalisées sur l'extrait de la partie souterraine de *Aristolochia longa* L. par DEPASCUAL [48] et KUMAR [52] ont montré la présence de plusieurs types d'acide aristolochique et ses dérivés (tableau App E) :

- Acide aristolochique I, acide aristolochique méthyle ester Ia.
- Acide aristolochique II, acide aristolochique méthyle ester IIa
- Acide aristolochique III méthyle ester.
- Acide aristolochique IV, acide aristolochique IV méthyle ester
- 2-Phenanthro-[3.4-*d*]-1.3-dioxole-6-nitro-5-carboxamidopropanoïque méthyle ester

Les acides aristolochiques augmentent la phagocytose des leucocytes et montrent une activité inhibitrice sur tumeur [53] [54] [55].

L'acide aristolochique la est un agent mutagène direct sur les *Salmonella typhimurium* [56], *drosophilla* [57]. Il est carcinogène chez le rat [58].

L'acide aristolochique a montré aussi une activité herbicide contre *Chenopodium album*, *Amaranthus repraeflexus*, *Lindemia pyxidaria* et *Setaria viridis* [59].

En général, l'acide aristolochique est un composant très toxique pour les reins. Il provoque des néphrotoxicités qui conduisent à des défaillances rénales nécessitant une transplantation [51] [60].

### 1.7.3.2 Aristolactames

Les aristolactames sont des petits groupes d'alcaloïdes de lactames phénanthrènes structurellement et biogénétiquement liées à des aporphines [61] [62]. La source la plus riche de ce type d'alcaloïdes est les feuilles et les racines des espèces d'*Aristolochia* [63].

Ces lactames phénanthrènes sont considérés comme les principaux métabolites de détoxification de l'acide aristolochique [64].

L'aristolactame Ia a été isolé à partir de l'extrait de la partie souterraine de *Aristolochia longa* L. (tableau App E). Une leucémie lymphoblastique et un carcinome épidermoïde bronchique ont été observés *in vitro* lors d'une cytotoxicité par le mélange de l'aristolactame Ia et de l'acide aristolochique I. Ces composés ont également montré une activité antibactérienne contre *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Streptococcus faecalis*, *Staphylococcus aureus* et *Staphylococcus epidermidis* [65].

### 1.8. Utilisation thérapeutique de *Aristolochia longa* L.

Étymologiquement, le terme phytothérapie vient de deux mots grecs : phyto (plante) et therapeuein (soigner). Il pourrait donc être traduit par : l'art de soigner à l'aide des plantes ou encore la thérapie par les plantes. Au sens large, le mot phytothérapie désignerait donc aussi bien la médecine d'hier que celle d'aujourd'hui. [66]

Les propriétés thérapeutiques des plantes médicinales sont dues aux variations des composés chimiques élaborés par la plante, dont les plus importants sont les principes actifs. Ces derniers peuvent être des minéraux, des huiles essentielles ou des alcaloïdes [67].

L'Algérie, de par son climat et ses terrains fertiles, possède une flore très variée, qui offre des ressources médicinales particulièrement riches.

Parmi les espèces qui ont un intérêt thérapeutique en Algérie on note *Aristolochia longa* L..

En raison de la variation de ces compositions, *Aristolochia longa* L. possède plusieurs propriétés thérapeutiques, dont les plus importantes sont antirhumatisme, emménagogue, stimulante, vulnérable et antimutogène [5].

Cette multitude de propriétés a marqué l'utilisation de cette plante pour soigner certaines maladies, tels que : traitement du cancer et des tumeurs de l'utérus et du nez, la sclérose, les règles insuffisantes, l'asthme, le rhumatisme, les crises épileptiques, le tétanos, les plaies, les douleurs musculaires et l'ulcère profond [2] [5] [52] [68].

Les recherches ont montré que l'action des plantes médicinales est due à quelques constituants élaborés à des concentrations plus ou moins faibles les principes actifs. Le meilleur moyen d'utiliser ces plantes serait celui de préserver toutes les propriétés qui permettent l'extraction et l'assimilation du principe actif. A cause de la faible teneur en principe actif, leur récolte et donc leur utilisation intensive a provoqué la disparition de certaines variétés. Pour cela, un nombre important d'études scientifiques ont été mises en place pour la conservation et la multiplication des espèces en laboratoire par la technique de la culture *in vitro*.

On appelle techniques *in vitro* un corpus de méthodes faisant intervenir, d'une part des éléments d'asepsie et d'autre part, impliquant la mise en place d'un environnement parfaitement contrôlé (milieu défini en particulier) [68]. Ces méthodes s'appliquent tout autant à des plantes entières qu'à des fragments de plants (tissus ou organes) ou à des cellules plus ou moins isolées [69].

D'une manière générale, la mise en culture *in vitro* des plantes apporte une solution élégante à de nombreux problèmes :

- Maintenir l'explant en vie mais aussi en activité.
- La conservation des génotypes dans des conditions idéales de protection contre les intempéries, les agressions, des ravageurs et agents pathogènes.
- La multiplication dans des tubes d'une grande quantité de plants à partir de quelques individus d'où la possibilité de stocker dans un espace peu important des génotypes divers. Cette collection doit être dupliquée et conservée en des lieux géographiques distincts.
- La maintenance permanente d'un stock suffisant d'individus pour assurer la fourniture régulière d'une variété couramment commercialisée.
- La conservation des variétés en voie de disparition.
- La multiplication accélérée et la propagation des plantes dont la sexualité est défailante (cas de certains hybrides) [3] [70] [71].

## 1.9. Types de cultures *in vitro*

La culture *in vitro* des organes ou tissus provoque la reprise des mitoses en favorisant la dédifférenciation cellulaire. Elle permet l'extension à un grand nombre d'espèces et d'exprimer ainsi des potentialités normalement réprimées [72].

La régénération de plantes entières, à partir de fragment d'organe, voire même d'une seule cellule est basée sur le passage d'un état différencié à l'état de cellule méristématique proliférante. Ce passage ne se fait pas sans que des modifications profondes n'apparaissent dans la structure de la cellule. Ces modifications ramènent la cellule adulte à l'état juvénile, capable de s'orienter vers la formation des organes, cela manifeste la totipotentialité de la cellule végétale [3].

La totipotence est la faculté de la cellule végétale spécialisée à perdre cette spécialisation et de se multiplier sous forme d'un tissu indifférencié. Puis, elle retrouve sa spécialisation par une autre différenciation [73] [74].

Les diverses modalités de la culture *in vitro* sont énumérées par :

- ❖ La multiplication végétative (micropropagation).
- ❖ Culture de méristème.
- ❖ Culture des protoplastes.
- ❖ Culture de suspensions cellulaires [3] [70].

### 1.9.1 Multiplication végétative

La multiplication végétative ou micropropagation est une technique qui permet la production des plantes semblables à la plante mère. Son principe consiste à prélever un organe ou fragment d'organe à partir d'une plante qu'on appelle explant (bourgeon, feuille, racine) et à le mettre en culture. Elle est réalisée dans des conditions aseptiques et sur un milieu synthétique capable d'induire rapidement une forte prolifération cellulaire [3] [75].

Un plant régénéré *in vitro* peut être fragmenté puis, remis en culture. Il redonne autant de nouveaux individus qu'il y avait de fragments par la voie directe (développement des bourgeons axillaires sans le passage par les cals) ou par la voie

indirecte (développement des bourgeons par le passage par le cal). Suivant le milieu utilisé, diverses modalités de multiplication végétative existent [69].

Selon le cas, on distingue la micropropagation par :

#### 1.9.1.1 Prolifération des bourgeons axillaires

Dans le cas naturel, un bourgeon ou portion terminale de tige mis en culture ne développe en principe qu'un seul axe par la croissance du méristème caulinaire. Dans le cas de la culture *in vitro*, une accélération est provoquée par la multiplication de tous les bourgeons qui se présentent sur l'explant [68] [76].

Selon la composition du milieu de culture, la micropropagation peut être orientée. Ainsi, sur un milieu approprié comportant peu de cytokinines, le bourgeon débourre et se développe en une tige feuillée. Cette tige peut être découpée en fragments (nœuds et extrémités de la tige). Remis sur le même milieu, elle donne ainsi autant de tiges feuillées qu'il y a de bourgeons.

Dans le cas où l'explant initial est déposé sur un milieu plus riche en cytokinine, le bourgeon développé, donne une tige feuillée qui se ramifie elle-même en rameaux secondaires. Les touffes sont fragmentées et la multiplication se réalise à ce stade [77].

Lorsque le bourgeonnement est intense, une phase d'élongation est nécessaire avant la phase de l'enracinement. Cette dernière peut être réalisée sur un milieu neutre ou enrichi en auxines.

A la fin, les plantules complètes sont alors acclimatées en terre où elles donnent des plantes normales [78].

Il arrive fréquemment que les bourgeons, tout en se développant, forment un cal à leur base. Dans ce cas, des bourgeons sont initiés à partir de celui-ci, générant ainsi les axes-plantules supplémentaires. Les plantules en provenance de cals ne présentent pas toujours la garantie de conformité [68].

### 1.9.1.2 Bourgeoisement adventif

Les bourgeons adventifs sont des bourgeons qui se développent à des endroits inhabituels et proviennent assez généralement de cellules superficielles des organes prélevés.

Dans des cas spécifiques et selon le milieu de culture, ces bourgeons peuvent se former à partir d'un cal qui apparaît après des divisions rapides et fortes d'une manière désorganisée de l'explant initial [72].

L'utilisation de la callogenèse est très intéressante car la source d'explants n'est pas limitée, et le taux de multiplication peut être considérable. Néanmoins, elle présente certains risques.

En effet, les cellules à l'origine des nouveaux individus sont somatiques. Il est possible que des cellules mutées puissent redonner des individus. En outre, avec des taux plus élevés dans la régénération de plants à partir des cals, le rythme de divisions cellulaires de nombreuses cellules peut présenter des modifications génétiques (chromosomiques, comme la polyploïdie ou l'aneuploïdie).

En conséquence, chaque fois que la multiplication végétative demandera le passage par la voie d'un cal, il faudra contrôler la qualité génétique des plants obtenus [3] [69].

### 1.9.1.3 Embryogenèse somatique

C'est l'ensemble des événements provoqués *in vitro* qui conduit à la formation des embryons à partir d'une cellule somatique (à 2n chromosomes), comparables aux embryons zygotiques des graines. On parle alors d'embryogenèse somatique, même si cette forme de régénération n'implique aucune des structures qui participent à la naissance d'un embryon issu de la voie sexuée [79] [80].

Ce développement pseudo embryonnaire fait intervenir successivement des phénomènes de divisions cellulaires habituels pour obtenir un embryon. Il arrive que l'apparition de ces formes embryonnaires soit précédée par la formation d'un cal appelé cal embryogène. C'est à partir de ce cal que se forment des structures embryonnaires souvent multiples mais pas toujours parfaitement fonctionnelles. On parle alors d'embryogenèse indirecte [68] [3].

### 1.9.2 Culture de méristème

L'organogenèse est assurée par les méristèmes, qui sont constitués de massifs de cellules non différenciées, conservant la capacité de se diviser activement. Cette particularité illustre la totipotence des cellules végétales [74].

Plusieurs recherches ont mené au développement des techniques de la culture *in vitro* de méristème. Elle présente plusieurs aspects importants d'application dans :

- Les procédés de la multiplication végétative (micropropagation)
- L'éradication de nombreuses maladies (viroses, mycose, mycoplasmoses et bactérioses) est appelée la sélection sanitaire. Cette technique est très utilisée actuellement et permet de régénérer des variétés saines alors que l'ensemble de la population était virosée.
- Les processus permettant le retour à l'état juvénile et la conservation des souches [69] [72] [79].

### 1.9.3 Culture des protoplastes

Le terme de protoplastes désigne une cellule végétale débarrassée de sa paroi squelettique. Elle apparaît alors sous forme d'une cellule sphérique. Elle est limitée par une membrane plasmique [3] [81].

Une fois les protoplastes obtenus, il faut les mettre en culture pour qu'ils puissent commencer leurs divisions cellulaires et former par la suite une nouvelle plante [70].

L'intérêt des ces cellules « nues » réside dans le fait qu'il est possible, pendant un délai assez court, de pouvoir faire pénétrer dans la cellule des molécules diverses. Ces dernières concernent des ADN porteurs d'informations génétiques, des organites comme les mitochondries ou les chloroplastes, voire même des noyaux ou encore des organismes entiers comme les virus ou les bactéries. Ils offrent un système cellulaire particulièrement approprié pour l'application des techniques de la transformation génétique ou l'exploitation de la variation somaclonage. Enfin, la dernière possibilité est d'obtenir des fusions entre

protoplastes de même origine ou bien appartenant à des cultivars ou même à des espèces différentes [68] [69] [82].

#### 1.9.4 Culture des suspensions cellulaires

La culture des cellules végétales isolées et la mise en évidence de ses potentialités s'inscrivent dans une démarche générale. Celle-ci vise la réduction progressive de la taille de l'explant et constituent le moteur essentiel du développement des biotechnologies végétales [70] [72].

Le passage de la cellule isolée à la plantule se fait souvent par l'intermédiaire de stades dans lesquels il est possible de reconnaître des formes embryonnaires. La méthode qui permet d'obtenir des cultures de cellules isolées consiste à utiliser des cals fiables. Ces derniers sont issus de certaines cultures de tissus dont les cellules périphériques se détachent facilement en culture agitée. Cultivées en présence d'auxines, ces cellules restent en suspension dans des densités compatibles avec le maintien de leur capacité prolifératrice [69][83] [84].

#### 1.10. Besoins nutritifs des tissus cultivés en conditions aseptiques

Les techniques de culture *in vitro* exigent beaucoup de soin dans le maintien des conditions d'asepsie, première condition de la réussite d'une culture. En effet, les milieux de culture sont très favorables au développement des bactéries et des champignons, dont la croissance est bien plus rapide que celle du tissu végétal [3] [72].

Les méthodes d'élimination des sources d'infection sont très vastes. Les plus utilisées dans la culture *in vitro* sont les produits chimiques, la chaleur, les rayons UV, et les systèmes de filtration puissant de l'air [68].

##### 1.10.1 Milieux de culture

Le milieu de culture est une solution aqueuse comprenant des sels minéraux, des éléments organiques (sucres, vitamine) et éventuellement des régulateurs de croissance. Cette solution est la plupart du temps solidifiée par la présence de la gélose. C'est une substance extraite des algues. On l'appelle agar-agar ou gélose.



Au contraire, le milieu liquide ne nécessite pas l'utilisation de la gélose, il est placé dans un agitateur rotatif pour aérer le milieu et éviter ainsi l'asphyxie des échantillons [70][71].

Les constituants choisis pour le milieu de culture doivent être les plus parfaitement adaptés aux besoins nutritifs de la plante étudiée. Ainsi, elle laisse s'exprimer pleinement son potentiel génétique [85].

#### 1.10.1.1 Sels minéraux

En général, le milieu de culture contient les éléments essentiels pour la croissance du végétale. Ces éléments nutritifs sont répartis en deux groupes, les macro-éléments et les micro-éléments appelés aussi oligo-éléments [3] [72].

Les macro-éléments sont le plus souvent utilisés à de grandes quantités. Ils comprennent les six composants nécessaires au développement des plantes et qui sont l'azote, le phosphore, le potassium, le soufre, le magnésium et le calcium. Les micro-éléments sont aussi indispensables à la croissance. Ils interviennent comme activateurs de divers systèmes enzymatiques. Certains auteurs ont mis au point des compositions apportant de 5 à 9 oligo-éléments. Les principaux d'entre eux sont, le fer, le cuivre, le zinc, le manganèse, le molybdène et le bore. Ils sont additionnés à de faibles concentrations [71] [86].

Le fer est certainement un élément essentiel pour la croissance et l'organogenèse. La carence en cet élément provoque des chloroses fréquemment observées en culture. Pour éviter sa précipitation, il est souvent incorporé sous la forme chélatée à l'EDTA [68].

#### 1.10.1.2 Composés organiques

- *Les sucres* : les tissus ou les cellules cultivés ont une assimilation chlorophyllienne insuffisante ou inhibée. Il est donc indispensable d'ajouter des glucides pour fournir une source de carbone et d'énergie mais aussi pour maintenir le potentiel osmotique. Divers oses pourraient être fournis, dont le

saccharose. Il est le plus souvent utilisé. Néanmoins, il peut être remplacé par le mannitol [69] [72].

➤ *Les vitamines* : l'emploi de diverses vitamines favorise le développement des cultures *in vitro*. Le manque de certaines d'entre elles est un facteur limitant de l'organogenèse [3]. Elles appartiennent souvent au groupe B dont les plus efficaces sont :

- La thiamine (B<sub>1</sub>) : elle se décompose à l'autoclavage, mais les produits de dégradation sont eux aussi actifs sur la croissance que la vitamine elle-même.
- La pyridoxine B<sub>6</sub>
- La biotine
- Le pantothénate de calcium
- Le myo-inositol : son effet sur la prolifération des tissus et sur l'activation de l'organogenèse, est parfois très net. Il peut être utilisé à de forte concentration.
- L'acide ascorbique : il n'est pas parfois utilisé, comme vitamine, mais plutôt comme antioxydant pour éviter le brunissement de certains tissus. Il peut être remplacé par le charbon actif [70].

➤ *Les acides aminés* : Les acides aminés et plus encore leurs amides ont un effet bénéfique sur la culture *in vitro* [81]. Des mélanges d'acides aminés paraissent ainsi présenter des effets de synergie, stimulant fortement la prolifération des cals et l'organogenèse [72]. Il faut aussi souligner l'effet antagoniste d'autres acides aminés sur la biosynthèse, ce qui peut conduire à des effets nuisibles aux cultures [68].

### 1.10.1.3 Régulateurs de croissance

Les régulateurs de croissances appelés souvent le phytohormones ou hormones de croissance [72] sont des substances biochimiques endogènes. Elles sont synthétisées par le végétal. Elles agissent à de faibles teneurs et à distance en réponse à une situation interne ou à un stimulus externe (photopériode, choc) [80]. Ils peuvent chacun, indépendamment de l'autre contrôler plusieurs facteurs

(dormance apicale, croissance). Toutefois, leur association peut être indispensable pour agir sur un facteur donné [3].

L'expansion actuelle des recherches sur l'organogenèse et les applications à la multiplication végétative est largement liée à l'utilisation des combinaisons entre les différents types d'hormones.

Les hormones végétales les plus utilisées dans la culture *in vitro* sont les auxines, les cytokinines, les gibbérellines, l'acide abscissique et l'éthylène [71] [72].

#### 1.10.1.3.1 Auxines

Les auxines sont des composés à noyau indole dont la formule brute est  $C_{10}H_9O_2N$ . La synthèse de l'auxine s'effectue dans l'apex des tiges à la base du méristème médullaire, dans les jeunes feuilles des bourgeons apicaux et dans les embryons [80].

L'auxine ou l'acide indole -3 acétique (AIA) (tableau App F), est la première substance de croissance isolée chez les végétaux. L'auxine intervient dans de nombreux phénomènes physiologiques. Son action dépend de sa concentration et de ses interactions avec les autres régulateurs de croissance [87].

- Rôle :

*Elongation cellulaire* : cet effet est dû à une augmentation de la plasticité de la paroi squelettique et à une pénétration de l'eau dans la cellule. La résistance de la paroi diminue et la cellule s'allonge.

*Tropismes* : c'est l'action de l'auxine dans les réactions de croissance et dans les corrélations entre les organes, en particulier dans le phénomène de dormance apicale.

*Action sur le cambium (mérèse)* : cette action est assurée par la stimulation de l'activité mitotique sur les cellules méristématiques d'origine cambiale. Elle conduit aussi à la formation de nombreuses cellules toutes semblables qui forment un cal.

*Organogenèse (caulogenèse, rhizogenèse)* : Une action nette sur la formation des bourgeons et des racines a depuis longtemps marqué le domaine de la culture *in vitro* [78] [81].

- Les auxines de synthèse :

Dès que l' AIA a été identifiée, de nombreux composés de synthèse ont pu être sélectionnés pour leurs activités similaires à celles de l'auxine. Elles sont souvent utilisées à des doses inférieures par rapport à l'auxine naturelle (AIA) mais leurs actions sont plus prolongées.

Les trois principaux groupes des produits usuels sont (tableau App F) :

- Les composés indoliques dans lesquels on place l'acide indole butyrique AIB
- L'acide naphthalène acétique ANA
- Dérivés de l'acide phénoxyacétique, Le plus connus est l'acide 2-4 dichlorophénoxyacétique (2-4D) [3] [80].

#### 1.10.1.3.2 Cytokinines

Les cytokinines sont des adénines substituées synthétisées principalement dans la racine. Elles sont extrêmement intéressantes dans le domaine de la culture *in vitro* et ceci grâce au rôle qu'elles jouent en association avec les autres hormones principalement l'auxine [72].

Les deux principales cytokinines naturelles sont la Zéatine et l'IPA (tableau App F) : La première cytokinine naturelle qui a été isolée est la Zéatine (Zéa = maïs) à partir du Maïs. Son action est dix fois supérieure à la Kinétine. Elle est suivie par la découverte de la deuxième cytokinine l'Isopentenylaminopurine (IPA) qui est produite par une corynebactérie agent de fasciation : *Corynebacterium fascians* [81]

- Les cytokinines de synthèse (tableau App F):

Les cytokinines de synthèse sont nombreuses et d'un emploi courant car, elles sont plus faciles à obtenir et moins coûteuses que les cytokinines naturelles. Les plus utilisées sont la Kinétine (6-furfuryl-aminopurine) et la Benzyladénine (6-Benzyl aminopurine= BAP) [88]

- Rôle :

*Division cellulaire* : elles sont indispensables mais inefficace sans auxine. Elles se complètent. Les auxines favorisent la duplication de l'ADN et les cytokinines permettent la séparation des chromosomes.

*Organogenèse* : les cytokinines stimulent fortement la néoformation des bourgeons mais ce sont des antagonistes de la rhizogenèse et de la dormance apicale.

*Stimulation du métabolisme* : elle est réalisée d'une part en favorisant les synthèses protéiques, et d'autre part, en protégeant les métabolites contre les actions des enzymes hydrolysantes [71] [87].

#### 1.10.1.3.3 Gibbérellines

Les gibbérellines sont des diterpènes présentant un noyau semblable (noyau gibbane). Elles diffèrent entre elles par la qualité et la position des substituants sur le noyau.

Les GAs sont synthétisées dans les apex des jeunes tiges, les extrémités des racines, les bourgeons en activité, et au niveau des embryons (graines en germination).

La première gibbérelline identifiée est l'acide gibbérellique ou GA<sub>3</sub> (tableau App F). Elle est produite industriellement à partir du champignon *Gibberella fujikuroi* [3] [87].

- Rôle :

*Allongement des entrenœuds* :

C'est l'un de leurs effets physiologiques le plus fréquent. Elles influencent le fonctionnement des méristèmes intercalaires.

En effet, elles sont responsables non seulement de l'élongation cellulaire (action renforçant celle de l'auxine), mais surtout de l'accroissement de l'activité mitotique.

*Germination, dormance* :

Une propriété importante des GA<sub>3</sub> est la stimulation des synthèses d' $\alpha$ -amylase dans les semences. Cette enzyme joue un rôle notable dans la germination car, elle hydrolyse les réserves d'amidon contenue dans l'albumen, libérant ainsi les oses utiles pour l'embryon.

Les GA<sub>3</sub> sont parfois capables de lever la dormance des bourgeons et de certaines graines. Elles peuvent remplacer le froid. Ainsi, elles montrent une réaction antagoniste envers l'organogénèse. Il semble qu'elles s'opposent au phénomène de dédifférenciation [74].

#### 1.10.1.3.4 Acide abscissique

L'ABA est synthétisé lorsque les conditions de croissance deviennent défavorables. Il est appelé aussi hormone de détresse (tableau App F). Il est synthétisé dans la coiffe radiculaire, les feuilles sénescentes ou dans des conditions de déficit hydrique [3] [89].

- Rôle :

Selon HOPKINS [81] et NULTSCH [90] :

- L'ABA inhibe de nombreux phénomènes de croissance et de différenciation et stimule les situations de vie au ralenti. Bien que son rôle soit probablement secondaire à celui de l'auxine ou de la cytokinine, l'ABA intervient dans les corrélations d'organes et les équilibres hormonaux :
- Il est antagoniste des gibbérellines
- Il empêche le transport de l'auxine
- Il entraîne des retards dans la croissance des rameaux
- Il prolonge la dormance (ancienne appellation « dormine »)
- Il stimule la tubérisation
- Il contrôle l'ouverture et la fermeture des stomates

#### 1.10.1.3.5 Ethylène

C'est un composé gazeux de formule développée CH<sub>2</sub>=CH<sub>2</sub>. Il est synthétisé par presque toutes les parties de la plante [81].

Les principales propriétés de ce régulateur, dont certaines sont voisines de celles de l'auxine, sont :

- Le déclenchement du processus de maturation des fruits.
- Accélération du processus d'abscission des feuilles et des fruits.
- Induction de la floraison chez certaines familles de plante.

- Action favorisante sur la tubérisation.
- Modification des corrélations de croissance par une baisse de la production d'auxine. L'éthylène inhibe les mitoses et la migration de l'auxine [72] [80].

Sur le plan pratique, depuis la découverte de l'acide 2-chloro-éthane-phosphorique, l'éthylène, n'est plus utilisé. Ce produit est pulvérisé sur les organes végétaux. Il pénètre dans les tissus où il libère de l'éthylène [43].

### 1.11. Choix de l'explant

Les cellules végétales vivantes paraissent potentiellement aptes à entrer en division et à redonner un individu complet semblable à celui sur lequel elles ont été prélevées. Cette capacité nommée totipotence est plus puissante chez certaines cellules par rapport à d'autres.

Il conviendra donc de choisir un groupe de cellules ou explant capable de réagir lors de la mise en culture [3]. Plusieurs critères permettant le choix des explants :

#### 1.11.1 En fonction du stade et de l'âge du pied-mère

Selon le stade et l'âge du pied-mère, les réactions des explants pourront varier dans une mesure très large. En règle générale, la grande partie des résultats en micropropagation *in vitro* a été obtenue sur la multiplication de génotype. Elle est issue de la germination des graines ou de plantes juvéniles, c'est-à-dire sur un potentiel génétique jeune et plus réactif [91]. En effet, il est encore possible d'obtenir de bonnes réactions à partir des tissus prélevés sur les organes reproducteurs chez les plantes au stade reproducteur [3].

Par ailleurs, au stade sénescence, les tissus deviennent trop âgés, les réactions de cyto-dédifférenciation deviennent incomplètes et très rares [92].

#### 1.11.2 En fonction de la taille et la nature de l'explant

La taille du fragment mis en culture présente une grande importance. En effet, plus l'explant est grand, plus les équilibres endogènes seront déterminants et le milieu n'aura qu'une influence limitée. Au contraire, un explant de petite taille sera

plus facilement orienté par les substances contenues dans le milieu. En règle générale, la taille des explants sera en moyenne entre 5 et 10 mm [3] [93].

Les explants les plus aptes à entreprendre une multiplication sont généralement riches en bourgeons ou en zones méristématiques potentielles. Ils varient selon les espèces :

- Les feuilles (ex. Ficus, Saintpaulia, Bégonia)
- Les tiges et les racines (Asperge, Colza)
- Les bourgeons (fraisier, vigne, lilas)
- Inflorescences, fleurs, étamines, pollen, ovules (chou-fleur, gerbera, poireau) [94]

### 1.11.3 En fonction de l'époque de prélèvement

Le problème d'époque de prélèvement se pose pour les espèces vivaces où, schématiquement, on peut distinguer un stade de vie active et un stade de vie ralentie [3]. Pour les plantes herbacées, le prélèvement peut être programmé indépendamment des saisons. Il est souhaitable de travailler sur un matériel pour lequel la dormance a été levée. Cela est dû à des modifications d'équilibre interne des régulateurs de croissance lors des différentes saisons [70].

### 1.12. Facteurs physiques de l'environnement de culture

#### 12.1 Lumière

- Intensité lumineuse

L'éclairage des chambres de culture est généralement fourni par des néons avec une intensité lumineuse variée entre 1 000 à 5 000 Lux ([3], 1988)

Le déclenchement des phénomènes d'organogenèse est généralement observé avec des éclairages du même ordre, parfois plus faibles [72].

- La photopériode :

L'influence de la photopériode sur la croissance des plants cultivés en *in vitro* a été peu étudiée. Dans la pratique, il semble que, la plupart des chambres de culture ont une durée d'éclairage de 16 à 18 heures/jour [68].



### 1.12.2 Température

La température de la chambre de culture est constante. Elle se situe entre de 22 °C et 25 °C.

Cette température peut être plus élevée pour les plantes tropicales (27 °C à 28 °C) où plus basse pour les espèces des régions tempérées. (21°C ± 1) [70].

## **CHAPITRE2**

### **MATERIELS ET METHODES**

#### 2.1 Le matériel végétal

L'étude a porté sur les jeunes feuilles, les nœuds et les entres nœuds d'*Aristolochia longa* L.. Les échantillons sont récoltés au niveau de la station de Chréa (BLIDA). Cette récolte s'est effectuée sur deux périodes durant Mai 2007 et fin Juillet 2007. L'expérimentation de la culture *in vitro* a été réalisée dans le laboratoire de la culture *in vitro* de l'ENARP (Bab El-Ezzouar)

#### 2.2 Méthodes

##### 2.2.1 Stérilisation du matériel végétal

Deux tests ont été réalisés pour la stérilisation des échantillons. Nous avons faits varier les concentrations en hypochlorite de calcium et ceux du chlorure mercurique. Toutes les étapes de désinfection ont lieu sous la hotte à flux laminaire

L'ensemble des expériences est illustré dans le tableau 2.1.

Tableau 2.1: protocole de stérilisation

	Désinfectant	Concentration	Temps de trempage
	Rinçage à l'eau courante		
	Bénomyl	1 g/l	30 min
	Ethanol	70%	30 secondes
Test 1	Hypochlorite de calcium Ca (OCl <sub>2</sub> )	3 mg/l	15 min
		5 mg/l	
		8 mg/l	
		11 mg/l	
Test 2	Chlorure mercurique HgCl <sub>2</sub>	0.2 mg/l	10 min
		0.35 mg/l	
		0.5 mg/l	
		0.8 mg/l	
	Rinçage 5 fois à l'eau distillée stérile		

L'eau distillée qui sert à la préparation des solutions désinfectantes et de rinçage, ainsi que la verrerie et les pinces, sont stérilisées à l'autoclave à une température de 120 °C pendant une heure.

### 2.2.2. Milieu de culture

Tous les milieux utilisés dans cette étude sont stérilisés à autoclavage à 120°C, sous une pression de 1 bar pendant 20 minutes, après ajustement du pH dont la valeur est de 5.7 à 5.8 soit avec NaOH ou avec HCL, selon le milieu, acide ou basique  
Le milieu de culture de base utilisé est celui de MURASHIGE et SKOOG [95](MS), qui comporte (tableua2.2 et 2.3) :

- *Sels minéraux*
  - Les macro-éléments MS
  - Les micro-éléments MS
  - Le Fer –EDTA
- *Vitamines de Morel*
- *Antioxydant* : Acide ascorbique ((0.1g/L)
- *Source de carbone* : Mannitol (20g/l)

➤ *Gélicification* : l'agar-agar 7g/l

La composition de milieu MS est résumée dans les tableaux suivants :

Tableau 2.2 : Compositions de solutions minérales utilisées lors de l'expérimentation

Solutions	Composés	Concentrations (mg/l)
Macroéléments MS	NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	1650
	KNO <sub>3</sub>	1900
	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	170
	CaCl <sub>2</sub> · 2H <sub>2</sub> O	440
	MgSO <sub>4</sub> · 2H <sub>2</sub> O	370
Microéléments MS	MnSO <sub>4</sub> · 4 H <sub>2</sub> O	16.9
	H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	6.2
	ZnSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	8.6
	KI	0.83
	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
	CoCl <sub>2</sub> · 6H <sub>2</sub> O	0.025
Fe EDTA	FeSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	27.8
	Na <sub>2</sub> EDTA	37.3

[68]

Tableau 2.3 : solution vitaminique de MOREL (1952) en mg pour 100 ml.

Vitamines	Concentrations (mg/100ml)
Acide nicotinique	1
Pyridoxine (vitamine B <sub>6</sub> )	1
Thiamine (vitamine B <sub>1</sub> )	1
Pantothénate de Calcium	1
Biotine	0.01
Méso-inositol	100

[68]

➤ *Les régulateurs de croissance:*

SKOOG et MILLER [96] furent les premiers à mettre en évidence le rôle de l'équilibre auxine/cytokinine exogène dans l'orientation de l'organogenèse *in vitro*. Les effets généraux de cet équilibre, selon sa valeur, sont illustrés dans la figure 2.1

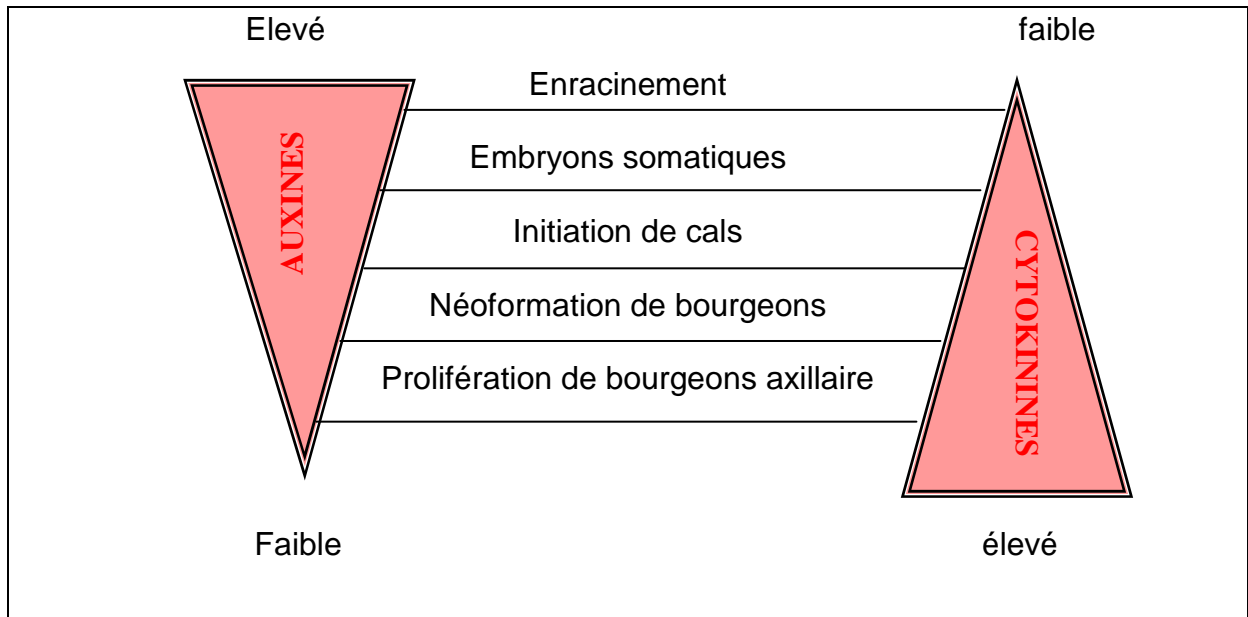


Figure 2.1 : Types d'organogénèse contrôlés par les concentrations relatives d'auxine et de cytokinine [69]

Pour obtenir des plantules à partir de fragment de plante, nous avons utilisé la technique de micropropagation. Deux voies ont été étudiées :

### 1. Organogénèse directe

Les vitro-plants ont été obtenus directement à partir des explants sans passage par la forme de cal.

Dans ce cas, les explants utilisés sont des bourgeons axillaires et l'apex de la tige. Leurs longueurs varient entre 0.5 à 1 cm. Les explants sont repiqués dans le milieu de culture de base MS additionné de différentes quantités d'hormones de croissance en combinaisons suivantes : les BAP avec les auxines et la kinétine avec les auxines (tableau2.4).

Tableau 2.4: combinaisons hormonales d'organogenèse directe

M <sub>1</sub>	Sans hormones
Première combinaison : BAP + auxines	
M <sub>2</sub>	1 mg/l (BAP) + 0.5 mg/l (AIB)
M <sub>3</sub>	1 mg/l (BAP) + 0.5 mg/l (AIA)
M <sub>4</sub>	1 mg/l (BAP) + 0.5 mg/l (ANA)
M <sub>5</sub>	1 mg/l (BAP) + 0.5 mg/l (2.4-D)
M <sub>6</sub>	1.5 mg /l (BAP) + 0.5 mg/l (ANA)
Deuxième combinaison : kinétine + auxines	
M <sub>7</sub>	1 mg/l (Kin) + 0.5 mg/l (AIA)
M <sub>8</sub>	1 mg/l (Kin) + 0.5 mg/l (AIB)
M <sub>9</sub>	1 mg/l (Kin) + 0.5 mg/l (ANA)
M <sub>10</sub>	1 mg/l (Kin) + 0.5 mg/l (2.4-D)

## 2. Organogenèse indirecte

Tous les vitro-plants obtenus passent par la phase de callogenèse. Nous avons utilisés des fragments de feuilles de 0.25 cm<sup>2</sup>. Les combinaisons hormonales utilisées entre les auxines et les cytokinines ont la même concentration (tableau 2.5).

Tableau 2.5: combinaisons hormonales d'organogenèse indirecte.

Première combinaison : BAP + auxines	
M <sub>1</sub>	1 mg/l BAP + 1 mg/l AIA
M <sub>2</sub>	1 mg/l BAP + 1 mg/l AIB
M <sub>3</sub>	1 mg/l BAP + 1 mg/l ANA
M <sub>4</sub>	1 mg/l BAP + 1 mg/l 2.4-D
Deuxième combinaison : Kinétine + auxines	
M <sub>5</sub>	1 mg/l Kin + 1 mg/l AIA
M <sub>6</sub>	1 mg/l Kin + 1 mg/l AIB
M <sub>7</sub>	1 mg/l Kin + 1 mg/l ANA
M <sub>8</sub>	1 mg/l Kin + 1 mg/l 2.4-D

### 3. Phase d'élongation

Nous avons établi des balances hormonales Gibbérelline / cytokinines (tableau 2.6) dans le but de mettre en évidence leur influence sur l'allongement des pousses et des entre-nœuds des vitro-plants obtenus à partir des deux types d'organogenèse directe et indirecte.

Une meilleure élongation de ces derniers permet une bonne fragmentation des vitro-plants issus de l'introduction primaire. Le milieu de base utilisé est celui de MURASHIGE et SKOOG [95]

Tableau 2.6: balances hormonales du milieu d'élongation.

	Gibbérelline (GA <sub>3</sub> )	Cytokinines
M <sub>1</sub>	Sans hormones	
M <sub>2</sub>	1 mg/l GA <sub>3</sub>	0.5 mg/l BAP
M <sub>3</sub>	1 mg/l GA <sub>3</sub>	1 mg/l BAP
M <sub>4</sub>	1.5 mg/l GA <sub>3</sub>	0.5 mg/l BAP
M <sub>5</sub>	1 mg/l GA <sub>3</sub>	----

### 4. Phase d'enracinement

Cette étape se caractérise par la naissance de racines sur les tiges feuillées obtenues au stade de la multiplication. La rhizogenèse, comme tout phénomène d'organogenèse, est déclenchée par des interactions entre les hormones de croissances.

En effet, la différence majeure se situe principalement au niveau de l'équilibre hormonal qui se fera cette fois en faveur des auxines (tableau 2.7).

Tableau 2.7: balances hormonales du milieu d'enracinement

	Gibbérelline (GA <sub>3</sub> )	Cytokinines
M <sub>1</sub>	Sans hormones	
M <sub>2</sub>	0.5mg/l GA <sub>3</sub>	1mg/l 2.4 D
M <sub>3</sub>	0.5 mg/l GA <sub>3</sub>	1 mg/l ANA
M <sub>4</sub>	0.5 mg/l GA <sub>3</sub>	1 mg/l AIA
M <sub>5</sub>	0.5 mg/l GA <sub>3</sub>	1mg/l AIB

## 5. Acclimatation

Il s'agit de la dernière étape qui consiste à acclimater progressivement les micro-plantules enracinées aux conditions externes. Nous commençons en premier lieu, par l'élimination de la gélose à la base des plantules par un lavage à l'eau. Ce dernier contient un fongicide (bénomyl à 1g/l) car le milieu qui subsister sur les racines favorise le développement de micro-organismes.

Les pousses enracinées sont transplantées vers des gobelets contenant soit de la tourbe préalablement stérilisée à 120°C pendant 2 heures soit la tourbe avec la perlite.

Les parties aériennes des plantules sont recouvertes par un cache en plastique transparent de manière à les maintenir dans un environnement qui est voisin de 100 % d'humidité relative [97].

### 2.2.3. Conditions de culture

Les expants sont introduits dans des tubes à essais (20 x 2 cm) ou dans des boîtes de Pétri. Ils sont installés dans deux chambres de culture :

#### **Chambre 1 :**

La température : 27°C ± 2°C.

La photopériode : 16 heures de lumière et 8 heures d'obscurité

#### **Chambre 2 :**

La température : 27°C ± 2°C.

L'obscurité totale (24 heures).



#### 2.2.4. Méthodes histologiques

L'étude histologique est effectuée par l'observation au microscope photonique. Elle se base sur la réalisation des coupes au microtome des organes imprégnés dans la paraffine. Elle nécessite trois étapes fondamentales et qui sont :

- Fixation des organes
- Inclusion des organes dans la paraffine
- Coloration des coupes [98].

##### 2.2.4.1. Fixation

La fixation est une opération où les cellules meurent. 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.

Les fixateurs sont généralement des substances toxiques (un mélange acide-base). Ils possèdent un pouvoir pénétrant très élevé, et leur mode d'action est basé sur la coagulation ou la précipitation des protéines membranaires.

Nous avons utilisé le formol, alcool, acide acétique (FAA). Il est composé de :

- 8 volumes d'éthanol
- 1 volume de formol
- 1 volume d'acide acétique

Un passage sous vide pendant 1 heure est nécessaire pour assurer une pénétration rapide du fixateur dans les tissus et l'élimination de l'eau des cellules. Le temps de fixation est de 48 heures, le fixateur est remplacé par l'alcool 70°. L'éthanol assure une bonne conservation des organes pendant plusieurs mois.

##### 2.2.4.2. 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 des bains d'éthanol à concentration croissante mais à des temps d'exploitation différents.

- 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 + 1 volume) 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 formé par deux barres de LEUKART, ou sur des moules métalliques qui s'associent 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.

#### ➤ *Confection et étalement des coupes*

Avant de passer à la confection des coupes, les blocs issus des barres de LEUKART sont d'abord taillés à l'aide d'un scalpel jusqu'à l'apparition des organes. La confection des coupes est réalisée à l'aide d'un microtome de type « LEICA ». Les coupes sont réalisées dans un laboratoire où la température ambiante se situe entre 20 et 25 °C. Elles présentent une épaisseur de 7 µm.

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 gélative 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.

#### ➤ *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 pendant 10 minutes
- Alcool absolu pendant 10 minutes
- Alcool absolu pendant 10 minutes
- Alcool absolu + formol (4 volume/1 volume) pendant 5 minutes
- Rinçage à l'eau courante.

### 2.2.2.3. La coloration

Nous avons utilisé la double coloration par le biais de l'APS ( l'acide périodique et Schiff) et Aniline blue black, selon le protocole développé au sein du laboratoire de biologie végétale (LRZA).

Cette méthode permet la coloration des polysaccharides en rouge et des protéines en bleu.

#### ❖ *Coloration APS-Aniline blue black:*

Elle colore les parois et les composés polysaccharides dont l'amidon en rouge, les noyaux et les nucléoles en bleu vert. Les réserves protéiques en bleu noir.

- Hydrolyse par l'acide périodique à 1%, pendant 5 mn.
- Lavage à l'eau courante
- Coloration au réactif de Schiff à l'obscurité, pendant 10 mn.
- Lavage à l'eau courante.
- Coloration à l'aniline blue black dans un bain-marie à 60 °C pendant 5mn.
- Lavage rapide à l'eau courante puis à l'acide acétique à 7%
- Déshydratation (par séchage rapide sur une plaque chauffante)

Montage des lamelles : le montage des préparations a un double but, à savoir la protection mécanique des coupes et la conservation aussi longue que possible des colorations ou réactions histochimiques. Dans notre étude, nous avons utilisé le MOUNTEX (MOUNTING MEDIUM) comme liquide de montage. Les coupes sont alors prêtes à l'observation. La conservation des lames se fait dans une boîte de collection.

### 2.2.5. Mode d'expression des résultats

Vu que les conditions de l'environnement sont contrôlées, nous avons opté pour la randomisation totale avec un seul facteur pour cette expérimentation. Ainsi, le

facteur est le milieu de culture. Il comprend des variantes qui sont les hormones de croissance.

Chaque traitement est répété vingt fois. Durant l'expérimentation, les observations réalisées après un mois de mise en culture, portent sur les paramètres suivants :

- Le nombre total moyen et le type de contamination
- Le nombre total moyen des explants qui poussent dans chaque milieu.
- La longueur moyenne de la tige en cm.
- Le nombre total moyen des vitro-plants ayant émis des racines.
- Les poids des cals au cours du développement.
- La couleur et la texture des cals

Afin de comparer la morphogenèse des plants d'une subculture à l'autre et l'influence de celle-ci sur la morphogenèse des vitro-plants, les résultats obtenus sont traités par le calcul du :

- Pourcentage de contamination
- Pourcentage de réussite dans les milieux de multiplication
- Pourcentage d'enracinement
- Pourcentage des cals ayant émis des bourgeons et des racines.
- Croissance en longueur des vitro-plants et le développement des cals sont traités par une analyse de la variance au seuil de signification  $\alpha = 5\%$ . Le test de NEWMAN et KEULS permet de constituer les groupes de traitements homogènes en se basant sur les différences significatives (P.P.D.S). Lorsque la différence observée entre les moyennes extrêmes d'un groupe de K moyennes est inférieure à la P.P.D.S, nous pouvons déduire que les K moyennes constituent des groupes homogènes [99]. Ces calculs sont faits par un logiciel de SPSS 15.0

## CHAPITRE 3

### RESULTATS ET DISCUSSION

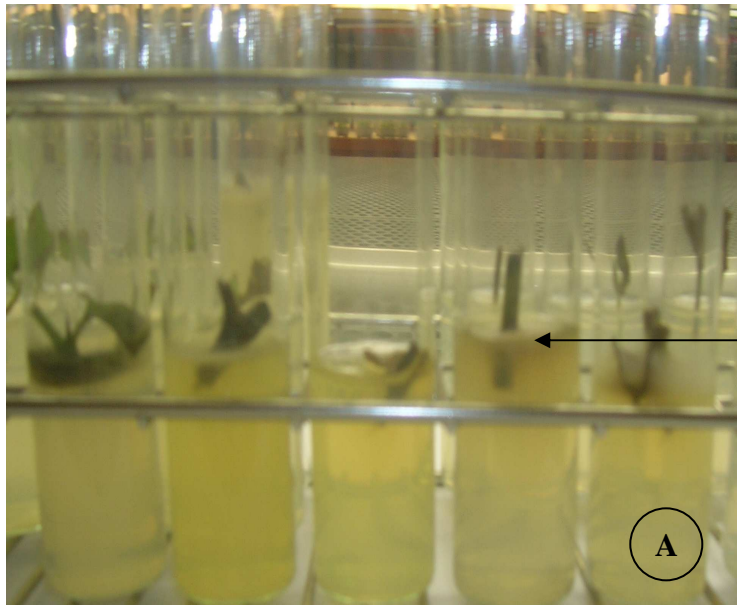
#### 3.1. Stérilisation du matériel végétal

La stérilisation du matériel végétal avant la mise en culture est délicate. Les substances stérilisantes utilisées doivent avoir un double effet :

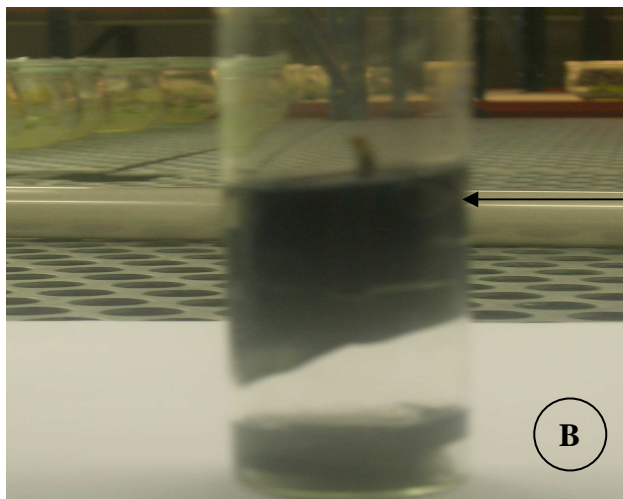
- Eviter l'infection due à la propagation des bactéries et des champignons.
- Eviter le traumatisme des tissus qui pourrait conduire à leur nécrose et à la mort. [100].

En effet, dans la semaine qui suit l'introduction en tube et en boîtes de Pétri des explants, nous remarquons l'apparition de contaminations. Deux types ont été observés au cours de notre travail :

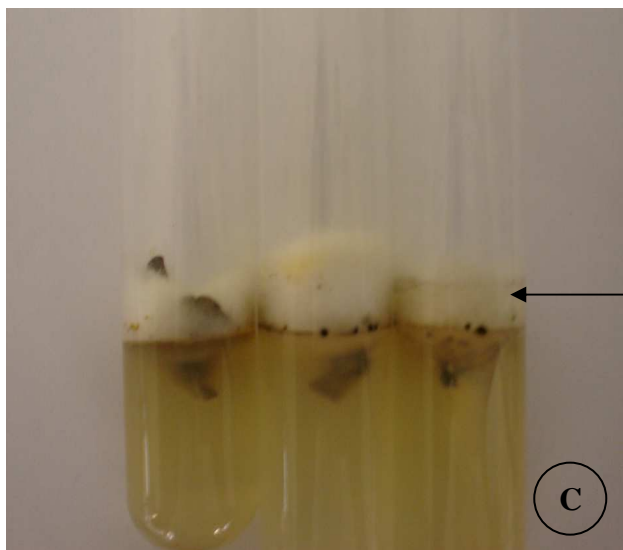
- Des contaminations prenant naissance en un point quelconque sur le milieu gélosé (figure 3.1A) et qui finissent par couvrir toute la surface du milieu de culture. Elles se manifestent par le développement d'un mycélium souvent blanchâtre ou grisâtre, parfois noirâtre (Figures 3.1 [B, C]). Il s'agit de contaminations d'origine fongique [3][101]. Dans la plupart des cas, elles sont dues aux mauvaises manipulations, à une mauvaise stérilisation soit du milieu de culture, soit des instruments ou des explants.
- Des contaminations se présentant sous forme d'un voile opaque laiteux qui se développe à l'intérieur du milieu de culture, limitant la base des explants (figures 3.2 [A, B]). Ensuite, elles se manifestent à la surface sous la forme d'un anneau laiteux, plus blanc que le milieu de culture (figure 3.2 C) ou prenant une couleur orange ou rosâtre (Figures 3.2[D,E]). Ce type de contamination caractérise les infections d'origine bactérienne [3] [101].



Début de l'apparition de contamination fongique sur le milieu de culture



Développement du mycélium noir



Développement du mycélium blanc

Figure 3.1 : Développement des contaminations fongiques

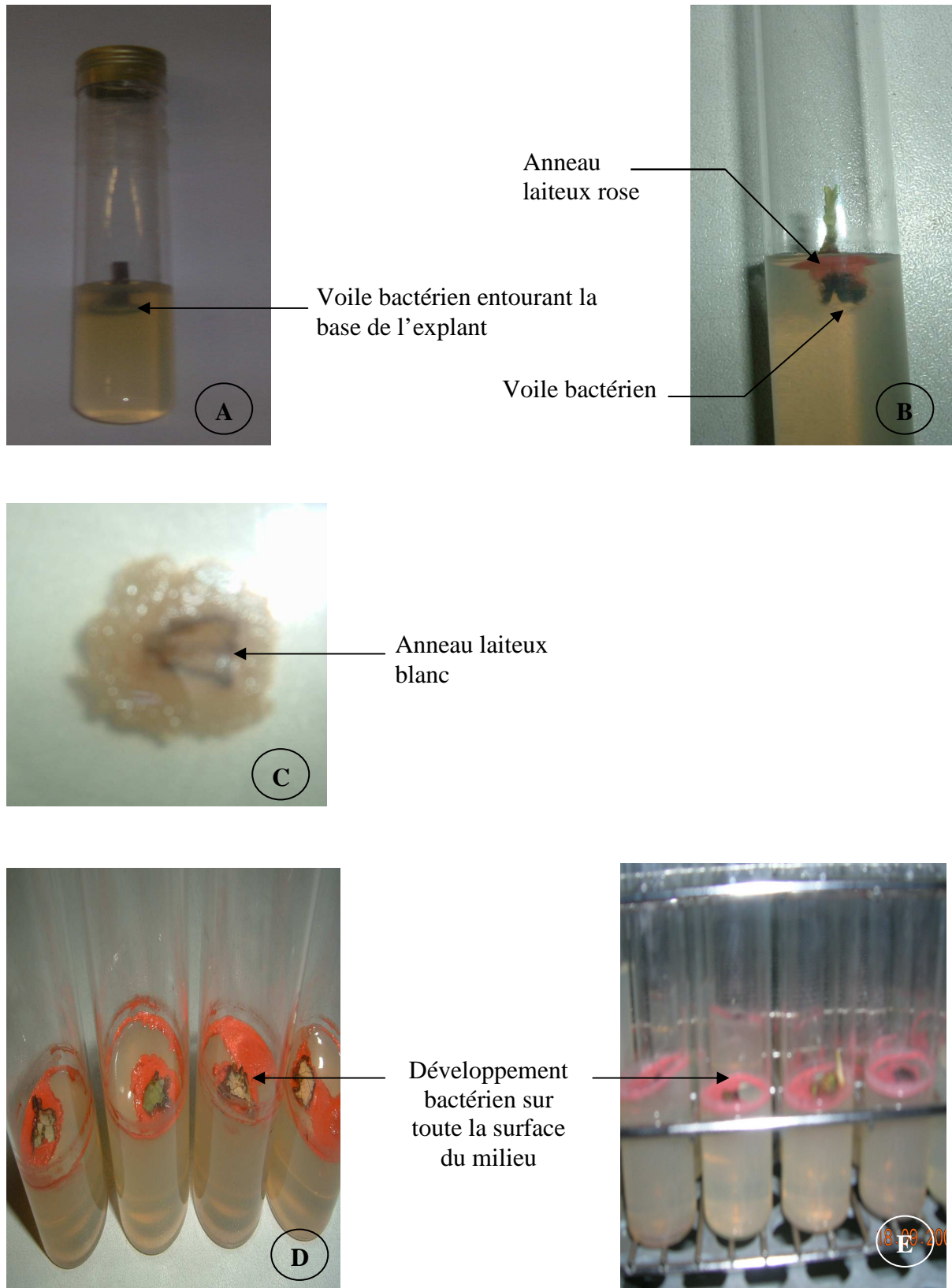


Figure 3.2 : Développement des contaminations bactériennes



En tenant compte du type et de l'origine de la contamination, nous avons tenté d'établir un protocole expérimental basé sur les travaux qui ont été réalisés dans le domaine de la culture *in vitro* surtout concernant les plantes herbacées.

Deux désinfectants ont été utilisés avec une variation des concentrations en hypochlorite de calcium et de chlorure mercurique. Les résultats obtenus, sont illustrés dans la figure 3.3 :

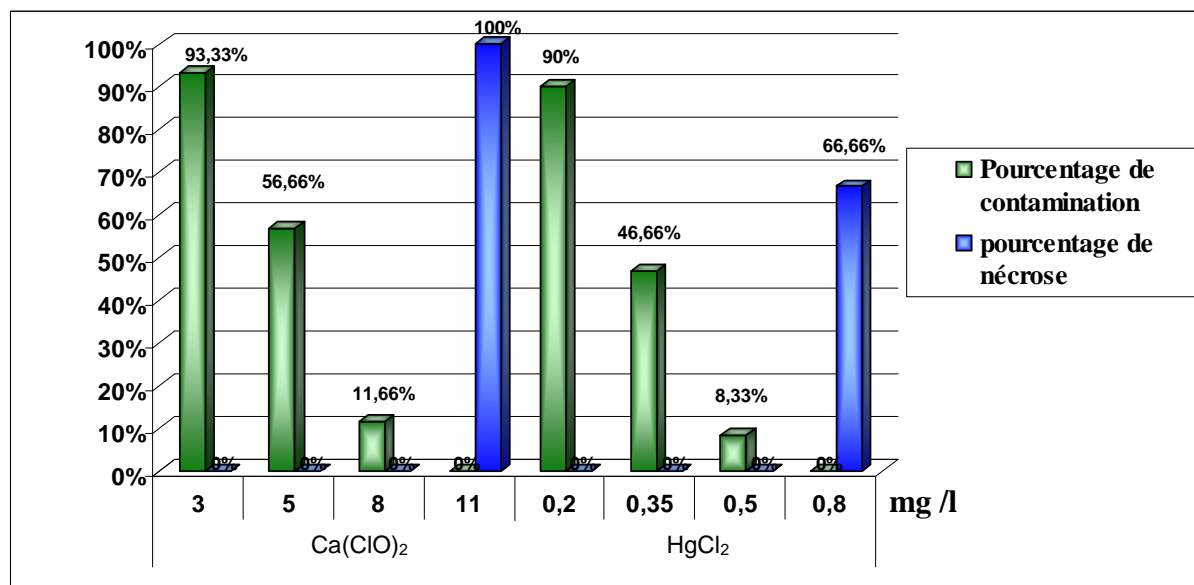


Figure 3.3 : Effet de **Ca(ClO)<sub>2</sub>** et **HgCl<sub>2</sub>** sur le taux de contaminations

Ainsi, les résultats montrent que le taux de contamination peut diminuer jusqu'à 8.33 %, par l'utilisation de **HgCl<sub>2</sub>** à 0.5 mg/l pendant 10 minutes. L'hypochlorite de calcium à 8 mg/l pendant 15 minutes peut abaisser le taux de contamination jusqu'à 11,66 %.

Nous avons remarqué aussi que toutes les contaminations d'origine fongique ont pu être maîtrisées au fur et à mesure de l'expérimentation soit par l'utilisation de **HgCl<sub>2</sub>** ou **Ca(ClO)<sub>2</sub>**.

Cependant, les contaminations bactériennes persistent et semblent être difficiles à éliminer lors de l'utilisation de l'hypochlorite de calcium. Au contraire, avec le chlorure mercurique, nous avons pu les contrôler et le taux de contamination a diminué d'une façon remarquable (mais sans une élimination totale).

Nous avons remarqué aussi, que le taux de contaminations (bactériennes ou fongiques) diminuait au fur et à mesure du transfert des explants d'un milieu à l'autre.

Les autres tests se sont avérés inefficaces à cause de :

- Pourcentage élevé de contaminations (93,33% pour  $\text{Ca}(\text{ClO})_2$  à 3 mg/l contre 90%  $\text{HgCl}_2$  à 0.2 mg/l).
- Au niveau des fragments apparition des noircissements ayant favorisé la formation des nécroses (l'hypochlorite de calcium à doses supérieures à 8 mg/l et chlorure mercurique à 0.8 mg /l) (figure 3.4).

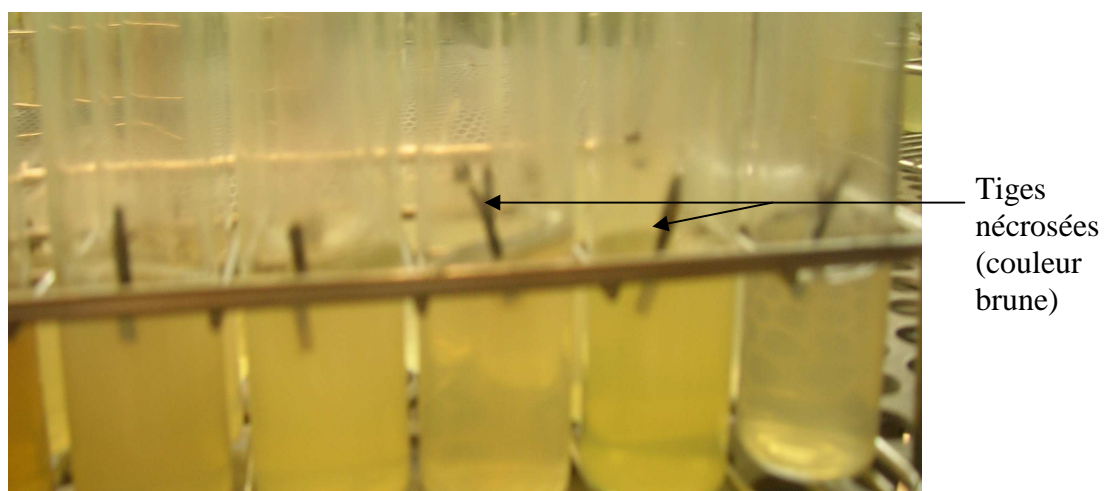
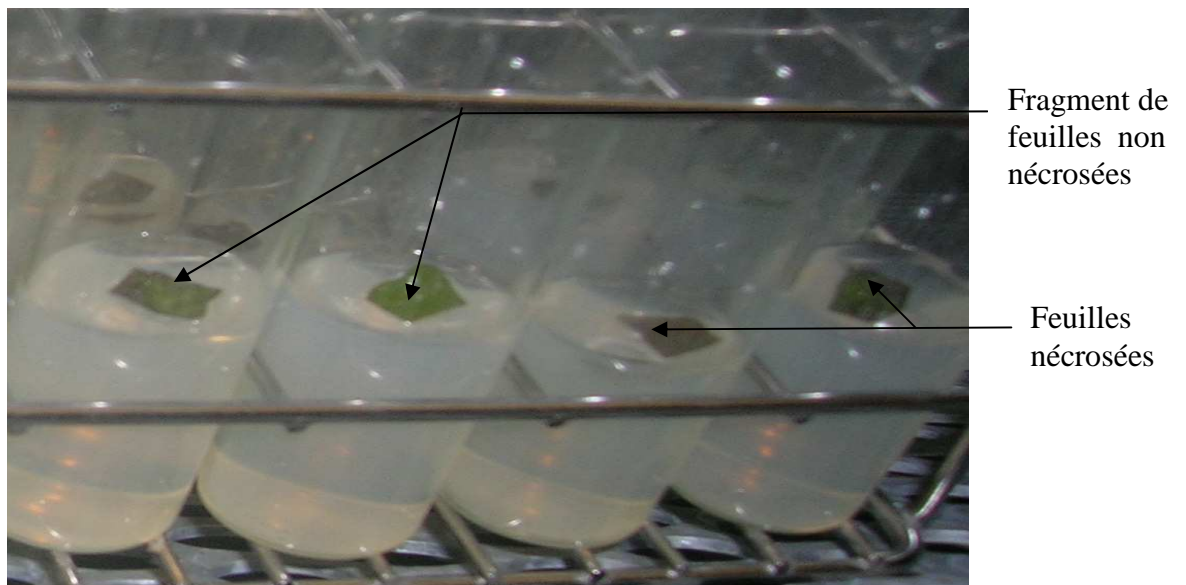


Figure 3.4 : Nécrose au niveau des fragments des feuilles et des tiges

Les travaux menés par AUGÉ et *al.* [3], GAUTHERET [102] et BAJAJ [103] sur la stérilisation du matériel végétal, ont montré que le chlorure mercurique est un produit stérilisant très efficace pour la destruction des micro-organismes. Il doit être utilisé à des doses très faibles, suivi par des rinçages successifs soigneusement faits, car son élimination est difficile. Il a la possibilité de pénétrer dans les tissus, favorisant la formation de nécroses. Cela a été constaté lors de notre travail, par diminution des taux de contamination et l'apparition des nécroses au fur et à mesure que nous augmentions la concentration.

Au contraire, l'hypochlorite de calcium est utilisé à des concentrations plus élevées et des durées plus longues car il ne pénètre pratiquement pas à l'intérieur des tissus.

ZRYD [68], confirme que certains tissus peuvent héberger des parasites internes qui ne peuvent pas être éliminés par les méthodes de désinfection classique. C'est ainsi que certains contaminants peuvent ne pas se manifester avant plusieurs sub-cultures.

### 3.2. Micropropagation

Afin d'obtenir des plantules à partir des fragments d'*Aristolochia longa* L., nous avons tenté d'établir un protocole qui vise à obtenir des bourgeons suivant deux voies et qui sont :

- Directe, c'est le développement des bourgeons axillaires sans le passage par les cals
- Indirecte, c'est le développement des bourgeons avec passage par les cals

#### ❖ Oxydation phénolique

Nous avons remarqué que les explants provenant des fragments de tige ou des feuilles, après leur introduction dans le milieu de multiplication brunissent, ainsi que le milieu environnant. Ce qui a conduit souvent à la mort des explants. Ce brunissement est dû à l'oxydation des phénols qui sont des pièges d'oxygènes. Ces substances sont appelées aussi inhibiteurs de croissance.

Ce problème a été contrôlé par l'addition d'un antioxydant au milieu de culture au moment de la préparation. Deux types d'antioxydants ont été testés :

- L'acide ascorbique à 0.1 g/l
- Le charbon actif à 1 g/l

Les deux antioxydants ont pu stopper la sécrétion des substances phénoliques.

Par ailleurs, nous avons observé que la libération des phénols est de plus en plus faible en passant d'une sub-culture à une autre.

Le brunissement des tissus isolés et cultivés *in vitro* est un phénomène connu. Il est dû à l'oxydation des phénols. Ces derniers s'oxydent très facilement en quinones.

Ce sont aussi des inhibiteurs des métabolismes qui interviennent dans de nombreux processus, soit comme des antagonistes des substances de croissance, soit comme des inhibiteurs des réactions métaboliques [3].

Ces substances sont considérées comme toxiques pour les plantes et conduisent à la mort des explants.

Ce phénomène est plus ou moins répandu. Il est en relation avec un certain nombre de facteurs :

- L'espèce : plus sévère chez les espèces qui contiennent naturellement beaucoup de tanins ou d'autres hydroxy-phénols, comme les ligneux.
- L'âge des tissus : les tissus jeunes brunissent moins que les tissus âgés et surtout ceux lignifiés [104].
- Nature du milieu : la nature du milieu de culture s'est révélée comme étant un facteur important. Selon BOXUS et *al.* [105], les explants de carotte survivent mieux en milieu liquide contenant des antioxydants que dans un milieu solide de même composition. Le manque d'oxygène réduit le potentiel de réduction de la solution (oxydation plus lente).
- Les substances de croissance : En général, la sécrétion des phénols est plus importante dans les milieux contenant des cytokinines. Ces dernières sont connues comme des stimulateurs de la synthèse des composés phénoliques. Par contre, les auxines possèdent un effet bloquant aux synthèses des phénols, les explants ont tendance à brunir moins [81].

### 3.2.1 Organogenèse directe

#### 3.2.1.1 Phase de multiplication

Les fragments de tige de longueur 1 cm qui présentent au moins un noeud sont mis en culture après stérilisation. Le milieu de culture de base est celui de MURASHIGE et SKOOG [95] additionné à des hormones de croissance. Les échantillons sont introduits dans la chambre de culture, la photopériode : 16 heures de lumière et 8 heures d'obscurité.

Nous avons testé plusieurs combinaisons hormonales pour favoriser le développement des méristèmes préexistants.

##### 3.2.1.1.1 Effet de BAP avec les auxines

Nous avons utilisé des milieux contenant la cytokinine (BAP) et les auxines (AIA, AIB, ANA, 2,4-D) à différentes concentrations. Les milieux utilisés sont :

- M<sub>1</sub> : Sans hormones (témoin)
- M<sub>2</sub> : 1mg/l BAP + 0.5 mg/l AIB
- M<sub>3</sub>: 1mg/l BAP + 0.5 mg/l AIA
- M<sub>4</sub>: 1mg/l BAP + 0.5 mg/l ANA
- M<sub>5</sub>: 1mg/l BAP + 0.5 mg/l 2,4 -D
- M<sub>6</sub>: 1.5 mg/l BAP + 0.5 mg/l ANA

Les résultats sont obtenus après 6 mois de culture. Ils montrent qu'une seule combinaison hormonale est favorable au développement des bourgeons, BAP / ANA. Le reste des combinaisons semble inefficace au bourgeonnement (figure 3.5).

Le milieu sans hormone qui est utilisé comme témoin est favorable aussi au développement des bourgeons mais avec un taux très faible de 18 %.

Nous avons remarqué aussi qu'après 10 jours, les explants qui ont été mis en culture dans le milieu M<sub>6</sub> commençaient à pousser (figure 3.7). Les explants du milieu M<sub>4</sub> n'ont donné des résultats qu'après 20 jours de culture. Cette variation remarquable du temps de développement des bourgeons peut être due à

l'augmentation de la concentration de BAP à 1.5 mg/l qui a un effet favorable sur le débourrement.

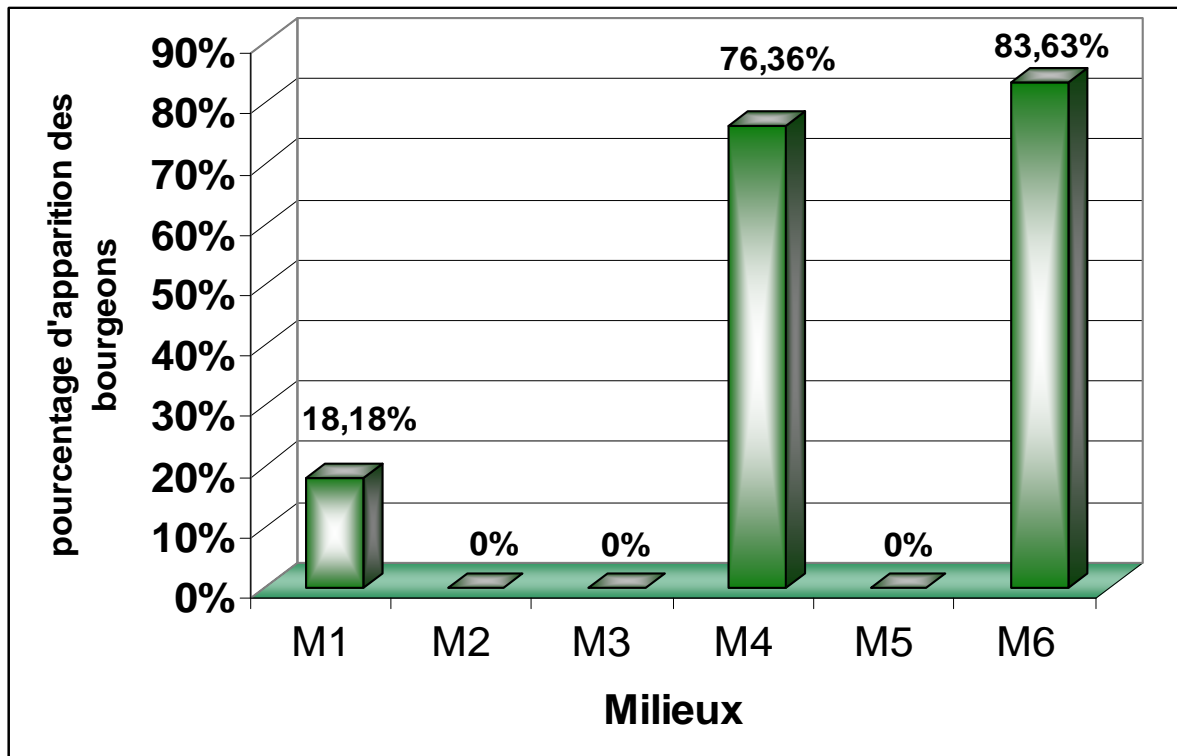


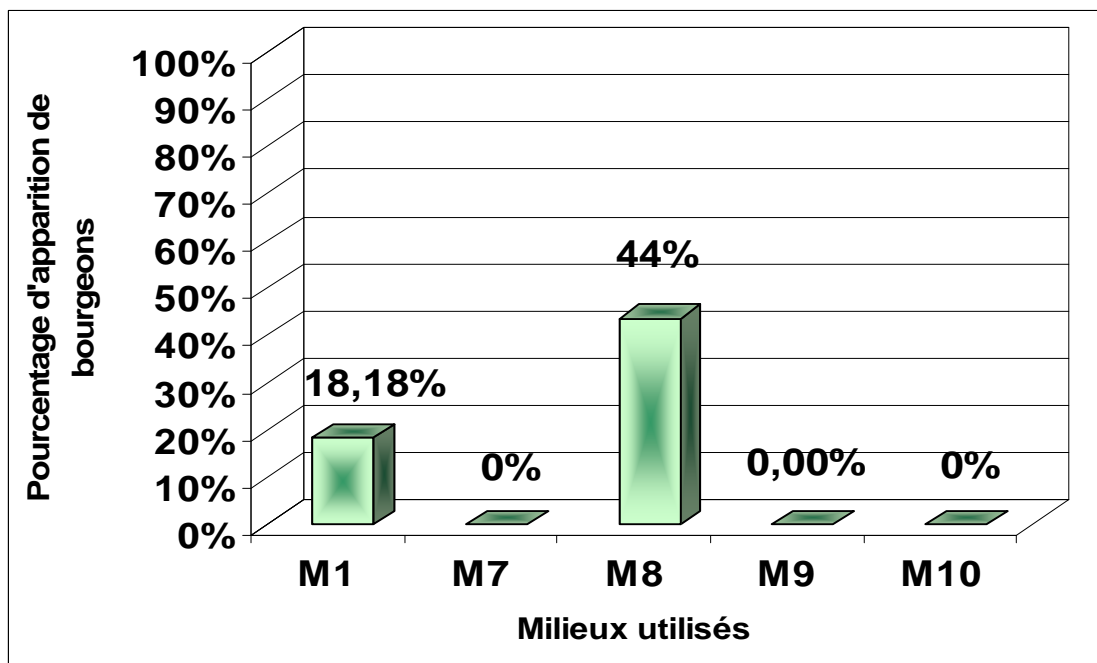
Figure 3.5 : Effet des combinaisons hormonales entre BAP et les auxines sur le développement des bourgeons

#### 3.2.1.1.2 Effet de kinétine avec les auxines

Quatre milieux ont été utilisés avec des combinaisons hormonales comportant la kinétine et quatre types d'auxines. Les milieux sont les suivants :

- M<sub>1</sub> : Sans hormone (témoin)
- M<sub>7</sub> : 1 mg/l Kin + 0.5 mg/l AIB
- M<sub>8</sub> : 1 mg/l Kin + 0.5 mg/l AIA
- M<sub>9</sub> : 1 mg/l Kin + 0.5 mg/l ANA
- M<sub>10</sub> : 1 mg/l Kin + 0.5 mg/l 2,4-D

Les résultats que nous avons obtenus figurent sur la figure 3.6:



**Figure 3.6:** Effet des combinaisons hormonales entre kinétine et les auxines sur le développement des bourgeons

Les observations ont été recueillies sur une période de 6 mois. Ainsi, les résultats ont montré que parmi les quatre combinaisons hormonales utilisées seule la kinétine à 1 mg/l et AIA à 0.5 mg/l ont pu déclencher le débourrement des bourgeons, mais avec un pourcentage plus faible 43.69% que celui du milieu M<sub>4</sub> (BAP/ANA) (figure 3.6).

Selon MARGARA [72], les cytokinines associées aux auxines, favorisent généralement la prolifération *in vitro* des méristèmes préexistés. Ces mêmes résultats ont été observés par les travaux d'AUGE et *al.* [3], qui montra que la concentration élevée de BAP additionnée aux auxines favorise la prolifération des bourgeons.

Pratiquement nous nous pouvons admettre, que selon SKOOG [96], le comportement physiologique de l'explant mis en culture évoluera vers un fonctionnement caulogène lorsque le rapport de l'auxine /cytokinine est élevé. SELVAKMAN [106] a montré que le milieu de base qui favorise la micropropagation d'*Aristolochia indica* est le MS additionné à la BAP ou la kinétine.

### 3.2.1.1.3 Multiplication par microbouturage des vitro-plants obtenues à partir de fragments de tige et l'apex

Après 30 jours de la mise en culture (introduction primaire), les vitro-plants développés indemnes de toutes infections et comportant au moins 5 nœuds (figure 3.8), sont fragmentés en micro-boutures de 1 cm de longueur.

Les micro-boutures ainsi obtenues sont transférées sur le même milieu frais dont sont issues leurs plante-mères et seront à leur tour fragmentées après 20 à 30 jours.

Par ailleurs, nous remarquons que certains explants développent des ramifications qui prennent naissance à partir du bourgeon axillaire à la base. Ces ramifications ne présentent pas un bon allongement, ce qui rend leurs séparations difficiles (figure 3.9).

La réponse aux régulateurs de croissance est fort variable selon la plante. Dans le cas de l'espèce *Aristolochia fimbriata*, l'utilisation de la cytokinine BAP à 1 mg/l seule est suffisante pour induire le développement des bourgeons [107]. Le même résultat est observé pour l'espèce *Aristolochia canadense*. [108]

En outre, AUGÉ et al. [3] rapportent que les tissus et les plantules cultivées *in vitro* présentent une certaine variabilité de croissance d'une culture à l'autre. Ainsi le taux de multiplication et l'intervalle de temps qui sépare deux repiquages peuvent être variables.





Figure 3.7: Aspect des microboutures après 10 jours d'introduction dans le milieu M<sub>6</sub>



Figure 3.8 : Vitro-plant développé



Figure 3.9 : Pousses en touffe

### 3.2.1.2 Phase d'élongation

#### 3.2.1.2.1 Effet des sub-cultures sur la longueur moyenne de la tige

Cette partie a été réalisée sur le milieu M<sub>6</sub> (1.5 mg/l BAP + 0.5 mg/l ANA) de multiplication qui a donné le taux le plus élevé dans la néoformation des bourgeons.

Après un mois de culture, les vitro-plants d'*Aristolochia longa* L. qui présentent un bon allongement sont fragmentés et repiqués sur le même milieu initial (M<sub>6</sub>). Ce repiquage successif est répété 4 fois.

En effet, nous avons remarqué que l'allongement moyen de la tige est nettement plus élevé à la première sub-culture (SbC<sub>1</sub>) avec 4.2 cm par rapport aux autres sub-cultures qui présentent des valeurs de 3.5 cm pour la sub-culture 2 (SbC<sub>2</sub>), 2.8 cm pour la sub-culture 3 (SbC<sub>3</sub>) et 2.4 cm pour la sub-culture 4 (SbC<sub>4</sub>). La culture primaire (Cp) présente, quant à elle, la plus faible valeur qui est de 1.80 cm (figure 3.10).

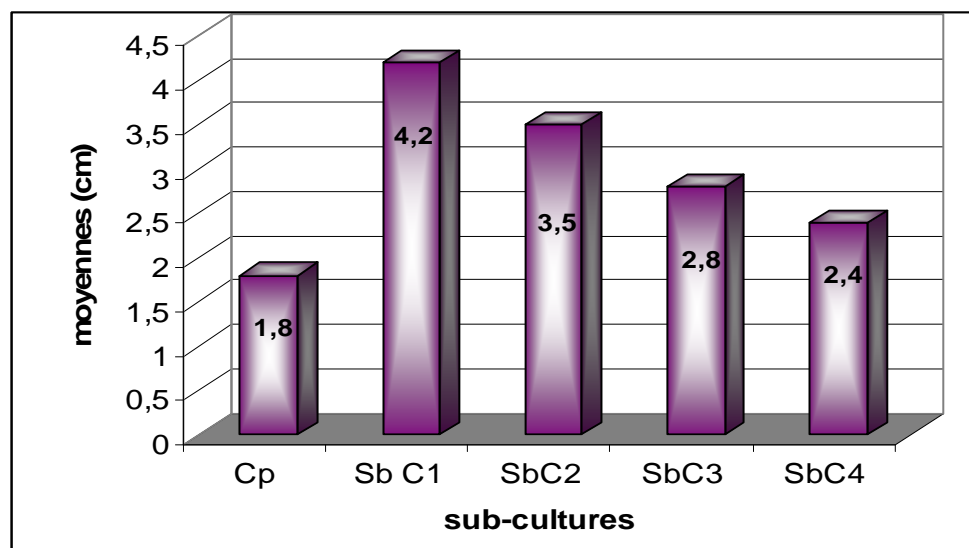


Figure 3.10 : Effet des sub-cultures sur l'allongement moyen de la tige

Les micro-boutures après avoir eu un développement très rapide au cours des deux premières semaines, subissent un ralentissement de l'élongation dans la troisième semaine puis un arrêt plus ou moins important de la croissance. Ce qui

nous a poussé à faire des transferts fréquents dès l'apparition d'un dessèchement du milieu de culture, sur le même milieu frais.

Nous avons pensé que cela pourrait être dû à l'épuisement des constituants du milieu de culture.

Par ailleurs, nos résultats montrent qu'il y a une perte de l'aptitude à la caulogénèse d'une sub-culture à l'autre.

Diverses hypothèses ont été émises sur les causes de ce déclin progressif de l'organogénèse

- L'hypothèse génétique proposée par WRIGHT ET NORTHCOTE [109] met en cause principalement des variations du nombre chromosomique (polyploïde, aneuploïdie) souvent observées en culture *in vitro*. Cependant, les travaux qui ont été menés par SACRISTAN ET MELCHERS [110] sur le Tabac, ont montré que l'altération du caryotype n'entraîne pas toujours l'inaptitude à l'organogénèse.
- L'hypothèse physiologique, qui n'exclut d'ailleurs pas la précédente, fait intervenir la perte de facteurs endogènes, hormonaux ou trophiques [72].

#### 3.2.1.2.2 Effet des gibbérellines sur la longueur moyenne de la tige

Pour faciliter la séparation des pousses et leurs passages en enracinement, nous avons essayé d'améliorer leurs allongements.

Pour cela, les pousses ramifiées, ont été transférées sur des milieux d'allongements. Le milieu de base utilisé est celui de MURASHIGE et SKOOG [95] additionné au GA<sub>3</sub> et BAP à différentes concentrations. Les milieux sont :

M<sub>1</sub> : MS + sans hormones (témoin)

M<sub>2</sub> : MS + 1 mg/l GA<sub>3</sub> + 0.5 mg/l BAP

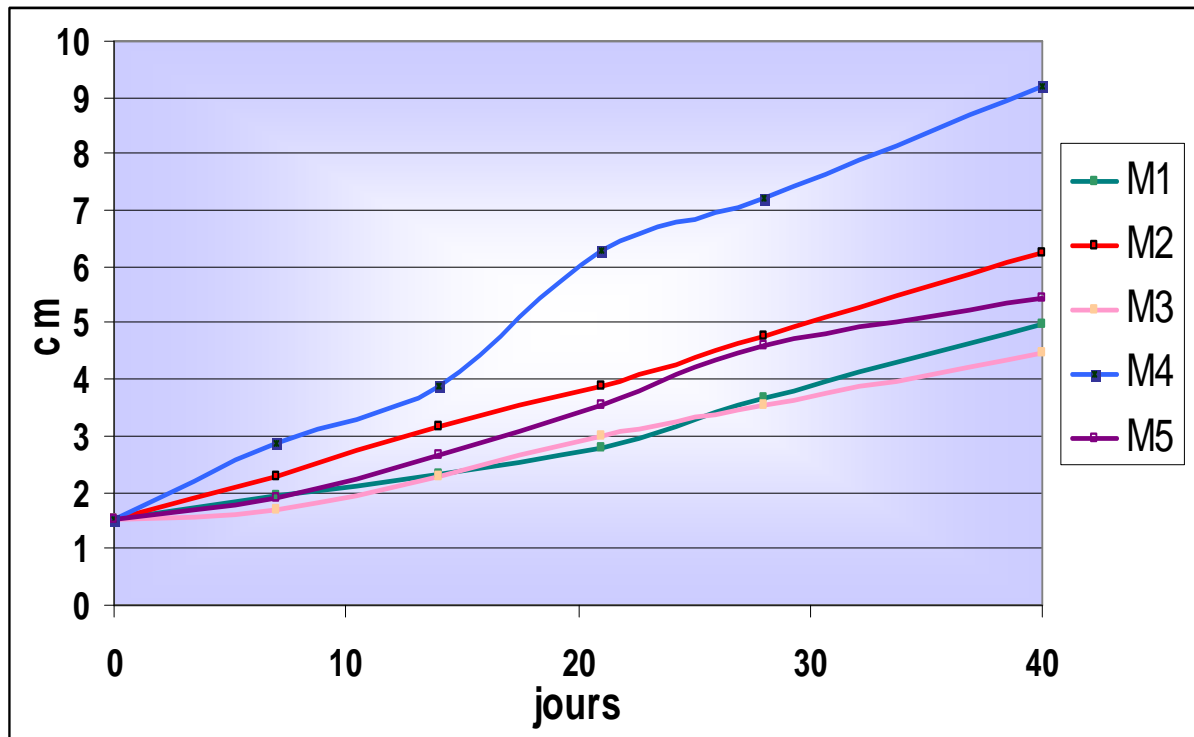
M<sub>3</sub> : MS + 1 mg/l GA<sub>3</sub> + 1 mg/l BAP

M<sub>4</sub> : MS + 1.5 mg/l GA<sub>3</sub> + 0.5 mg/l BAP

M<sub>5</sub> : MS + 1 mg/l GA<sub>3</sub>.

Un contrôle continu des vitro-plants et des mesures de leurs allongements ont été effectués chaque semaine. Après 40 jours de la première introduction dans différents milieux (figure 3.11), les résultats obtenus ont montré que, le meilleur

milieu d'allongement est celui de M<sub>4</sub> avec une longueur des vitro-plants qui peut atteindre en moyenne 9.2 cm suivi par le milieu M<sub>2</sub>, avec 6.2 cm. Le reste des milieux présentent un allongement presque identique avec 4.9 cm pour M<sub>1</sub>, 4.5 cm pour M<sub>3</sub> et 5.45 cm pour M<sub>5</sub>.



**Figure 3.11:** Effet de combinaison hormonale sur l'élongation

L'analyse de la variance effectuée après 40 jours de repiquage dans les milieux d'élongation (tableau 1 annexe 1), au risque  $\alpha = 0.05$ , révèle un effet significatif des milieux testés sur l'allongement moyen des vitro-plants. Le test de NEWMAN et KEULS, fait apparaître 4 groupes homogènes (tableau 3.1).

Les milieux M<sub>1</sub> et M<sub>3</sub> composent un groupe homogène c'est-à-dire ne présentant pas une différence significative entre eux. La même remarque concerne le milieu M<sub>1</sub> et M<sub>5</sub>. En plus, le milieu M<sub>2</sub> représente un groupe seul. Cependant, le milieu M<sub>4</sub>, apparaît être le meilleur milieu utilisé, avec une moyenne très élevée par rapport aux autres groupes. Les résultats s'avèrent affirmatifs.

Tableau 3.1: Effet de gibbérelline sur la longueur moyenne de la tige

Milieu	M <sub>1</sub>	M <sub>2</sub>	M <sub>3</sub>	M <sub>4</sub>	M <sub>5</sub>
Moyenne (cm)	4.97± 0.67	6.27±0.79	4.47±0.39	9.20±0.54	5.45±0.88
Intervalle de confiance	[4.26 -5.67]	[5.43 -7.09]	[4.05 -4.87]	[8.62– 9.77]	[4.52 - 6.37]
Groupe homogène	A-B	C	A	D	B

D'après MARGARA [72] le milieu de MS est caractérisé principalement par une très forte teneur en azote dont le tiers est apporté sous forme réduite (ions NH<sub>4</sub><sup>+</sup>) et une concentration élevée en potassium (K<sup>+</sup>). Ces deux composants, interviennent fortement dans le développement des plantes. En outre, l'azote est l'élément minéral qui favorise le développement végétatif, tandis que le potassium favorise la division cellulaire. Ceci explique la capacité de certaines espèces à se développer et s'allonger après le repiquage dans un milieu MS sans hormone.

Egalement, les travaux de QUOIRIN [111] et DRUART [112] ont montré que, dans de nombreux cas, il suffit de laisser grandir suffisamment les plantules sur le milieu de multiplication avant de les faire passer en enracinement. Si la séparation des vitro-plants est difficile, on permet leur allongement en les cultivant sur un milieu dépourvu de régulateurs de croissance ou additionné de GA<sub>3</sub>.

MOREL et MULLER [113] ont utilisé l'acide gibbérellique pour favoriser l'élongation *in vitro* de certaines espèces, c'est l'un de leurs effets physiologiques les plus fréquents. Leur action s'exerce au niveau de la zone méristématique subapicale en favorisant l'élongation des entre-nœuds de la tige.

Par ailleurs, AUGÉ et *al.* [3] affirment que la GA<sub>3</sub> est active pour de nombreux méristèmes qui, en son absence, présentent un aspect globuleux fait d'empilement de nœuds. Mais dans le domaine de l'organogenèse, les gibbérellines se montrent antagonistes. Il semble qu'elles s'opposent au phénomène de dédifférenciation. C'est pour cette raison, qu'elles ne peuvent être utilisées à cette fin, mais elles trouveront leur emploi pour des explants déjà organisés.

### 3.2.1.3 Phase d'enracinement

L'induction des racines est réalisée sur le milieu de base MS.

M<sub>1</sub>: Témoin sans hormones

M<sub>2</sub>: 0.5mg/l GA<sub>3</sub> + 1mg/l 2.4 D

M<sub>3</sub>: 0.5 mg/l GA<sub>3</sub> + 1 mg/l ANA

M<sub>4</sub>: 0.5 mg/l GA<sub>3</sub> + 1 mg/l AIA

M<sub>5</sub>: 0.5 mg/l GA<sub>3</sub> + 1mg/l AIB

Les observations ont été faites sur deux périodes, après 9 jours de transfert dans le milieu d'enracinement et après un mois de culture.

Les résultats sont illustrés par la figure 3.12.

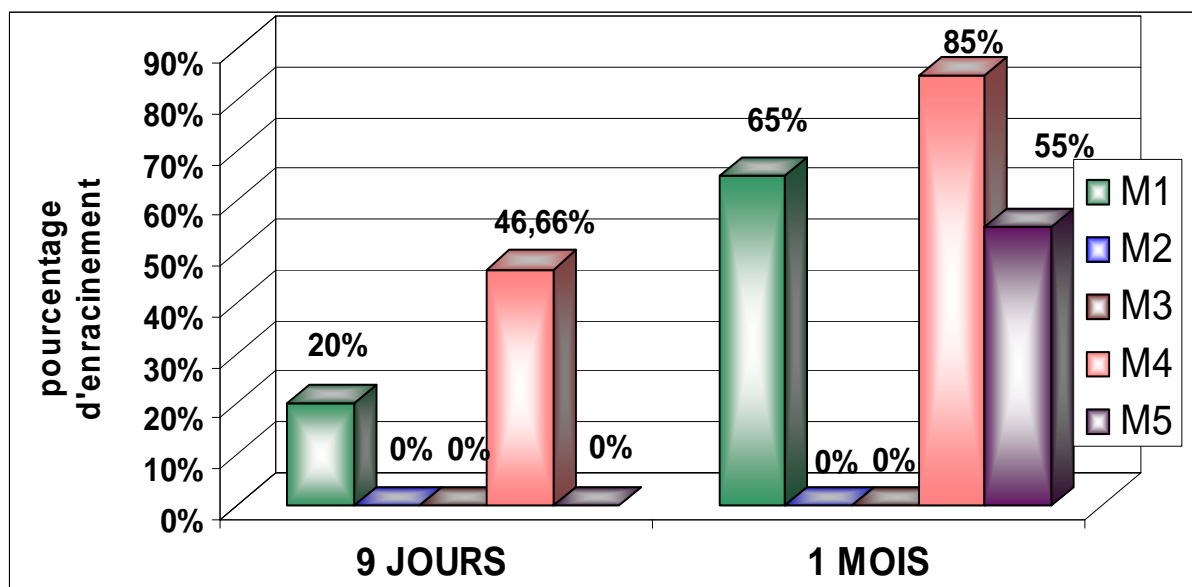


Figure 3.12 : Effet des combinaisons hormonales sur l'enracinement

Après 9 jours de transfert sur le milieu d'enracinement, nous constatons que les milieux M<sub>2</sub>, M<sub>3</sub> et M<sub>5</sub> contenant respectivement GA<sub>3</sub> à 0.5 mg/l additionné à 1 mg/l de 2-4 D, ANA, AIB, n'ont aucun effet.

Cependant sur le milieu M<sub>1</sub> sans hormone 20% les vitro-plants ont donné des racines.

Le milieu M<sub>4</sub> contenant 0.5 mg/l de GA<sub>3</sub> et 1 mg/l de AIA a provoqué l'enracinement de presque la moitié des micro-boutures (46.66%). C'est le meilleur milieu d'enracinement noté après 9 jours.

Après un mois, nous avons constaté que, les milieux M<sub>2</sub> et M<sub>3</sub> ne favorisent pas l'induction de la rhizogenèse, mais l'allongement des vitro-plants se continue. En ce qui concerne le milieu M<sub>1</sub>, le pourcentage des micro-boutures ayant émis des racines a augmenté et a atteint 65%.

Il faut toutefois, signaler que les micro-boutures qui n'ont pas réagi après 9 jours de repiquage dans le milieu M<sub>5</sub>, émettent des racines pour la moitié des échantillons (55%) après 21 jours.

Pour le milieu M<sub>4</sub>, il reste toujours le meilleur milieu d'enracinement testé après 21 jours et où le taux d'enracinement est augmenté et atteint 85%.

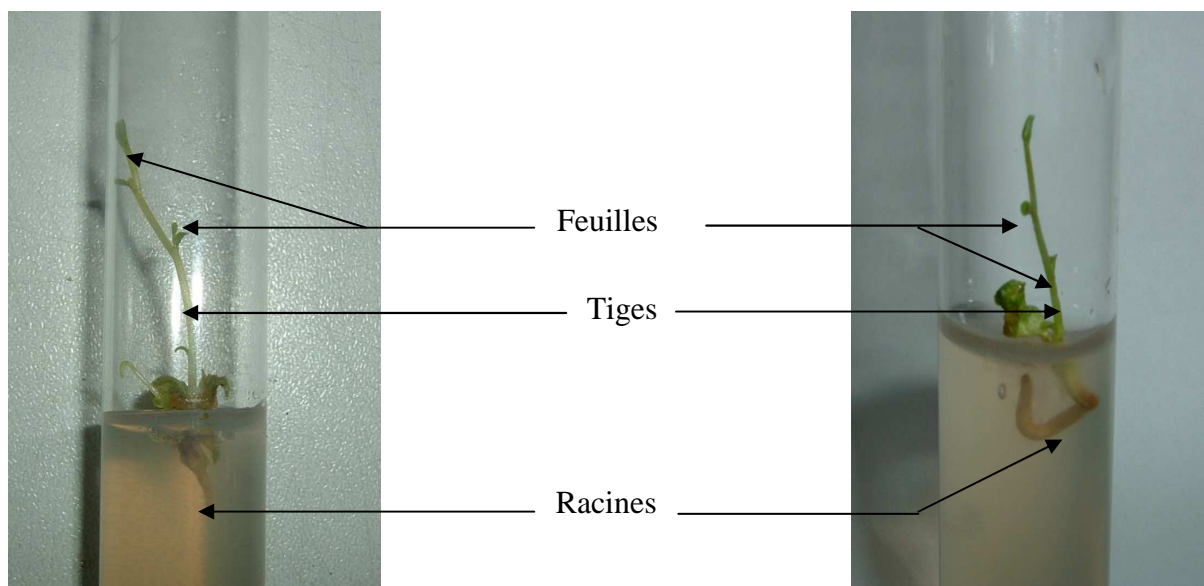


Figure 3.13: Plantules enracinées issues de micropropagation par voie directe

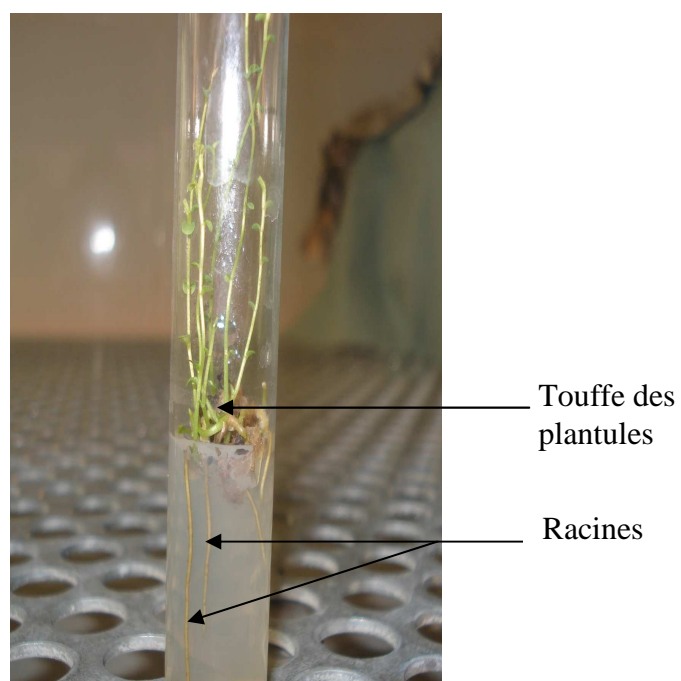


Figure 3.14 : Touffe des plantules enracinées issues de micropropagation par voie directe



Dans la culture *in vitro*, la phase d'enracinement est généralement favorisée par l'addition des auxines dans les milieux de culture. Selon MARGARA [72] et GALLAIS [114], les hormones de croissance les plus usuellement utilisées pour stimuler la rhizogenèse sont l'ANA, AIB et IPA.

Selon ZRYD [68], la rhizogenèse peut être déclenchée chez certain type de plantes lors du transfert de sub-culture d'un milieu qui contient des hormones de croissance vers un autre milieu sans hormone. Lors de notre expérimentation, nous avons obtenu les mêmes résultats.

Les travaux qui ont de BRAVO et *al.* [107] sur *Aristolochia fimbriata*, montrent que pour stimuler la formation des racines, les pousses ont été cultivées sur le milieu MS basique avec un demi de macroéléments, complété de AIB ou ANA. L'AIB a produit des racines avec toutes les concentrations examinées, alors que seule ANA a pu initier l'apparition des racines sans développement.

Par ailleurs, la phase de rhizogenèse étudiée chez *Aristolochia indica*, a montré que l'introduction des sub-cultures dans des milieux contenant AIB peut donner de très bons résultats [115].

Le phénomène de la rhizogenèse est expliqué par LEIFERT [116], qui montre que dès les toutes premières heures qui suivent la blessure faite à des plantules de vigne, de fortes augmentations sont enregistrées pour quatre marqueurs : production d'éthylène, AIA libre, O-dihydroxyphénol et les phénols. Les teneurs des trois derniers composés sont beaucoup plus importantes à la base des plantules plutôt qu'à leur sommet. En même temps, l'activité peroxydasique chute. Après 12 ou 24 heures, les tendances vont s'inverser. Les premiers marqueurs ont tendance à diminuer, tandis que l'activité peroxydasique augmente. Celle-ci continue à augmenter pour atteindre le sommet de la tige. A ce moment les primordiales racinaires apparaissent et l'activité peroxydasique chute. Les composés phénoliques, eux varient en sens opposés à celui de l'activité peroxydasique totale.

Ces variations dans le temps des auxines AIA libres, observées par LEIFERT [116] et confirmées par plusieurs autres, dont MONCOUSIN [117], peuvent expliquer pourquoi des clones présentant une capacité rhizogénétique élevée, peuvent être associés à de fortes ou à de faibles teneurs en auxines endogènes. Ces teneurs dépendent du moment où l'analyse est réalisée.

S'il est admis par tous, que l'auxine joue un rôle prépondérant dans le mécanisme de l'enracinement adventif, c'est cependant, la blessure de la tige au moment du microbouturage qui donne le signal initial. Celui-ci peut ensuite être amplifié par l'apport d'auxine exogène.

Toutefois, cet apport doit être fourni en quantités correctes. Ainsi, lorsque la dose est inférieure ou supérieure à celle exigée par le pommier facile ou difficile à enracer, l'enracinement n'aura pas lieu [118].

Par ailleurs, FAVRE [119] et HARTMANNHT [120], affirment que dans la plupart du temps, la présence de bourgeons est nécessaire à la rhizogénèse. Elle se traduit par l'obtention de meilleurs résultats au niveau du pourcentage des boutures enracinées, de la cinétique d'apparition des racines néoformées et leur nombre.

Comme les bourgeons, la feuille exerce ordinairement un effet stimulateur sur la rhizogénèse. Sa présence à côté du bourgeon est obligatoire pour la réussite de la micropropagation.

Selon MARGARA [72], la néoformation de racines serait déclenchée par l'action d'une substance mobile synthétisée par les feuilles, ensuite, elle migre vers la base de la tige.

Cette substance hypothétique spécifique à la rhizogénèse avait été appelée « rhizocaline », celle-ci se trouve en association avec les auxines [119] [120].

### 3.2.2 Organogenèse indirecte

Dans cette partie, nous avons étudiés la possibilité d'obtenir des plantules complètes par la voie d'organogenèse indirecte en passant par la phase de callogenèse.

### 3.2.2.1. Phase de callogenèse

Les explants utilisés pour l'induction des cals sont des fragments de feuilles avec une surface de  $0.25 \text{ cm}^2$ . Ces derniers sont repiqués sur le milieu de base MS additionné aux différentes combinaisons hormonales avec la même concentration.

Les explants étudiés sont introduits dans deux chambres de culture

Chambre 1 : La photopériode : 16 heures de lumière et 8 heure d'obscurité

Chambre2 : l'obscurité totale (24 heures).

#### 3.2.2.1.1. Effet des différentes combinaisons hormonales sur le pourcentage des cals

##### ❖ Effet de BAP avec auxines

Dans cette partie, quatre combinaisons hormonales ont été étudiées à des concentrations identiques. Les milieux sont :

$M_1 = 1 \text{ mg/l BAP} + 1 \text{ mg/l AIA}$

$M_2 = 1 \text{ mg/l BAP} + 1 \text{ mg/l AIB}$

$M_3 = 1 \text{ mg/l BAP} + 1 \text{ mg/l ANA}$

$M_4 = 1 \text{ mg/l BAP} + 1 \text{ mg/l 2.4-D}$

Après 20 jours dans la chambre de culture 2, les explants ayant pu initié la formation des cals sont transférés dans la chambre 1. La figure 15 illustre les résultats obtenus:

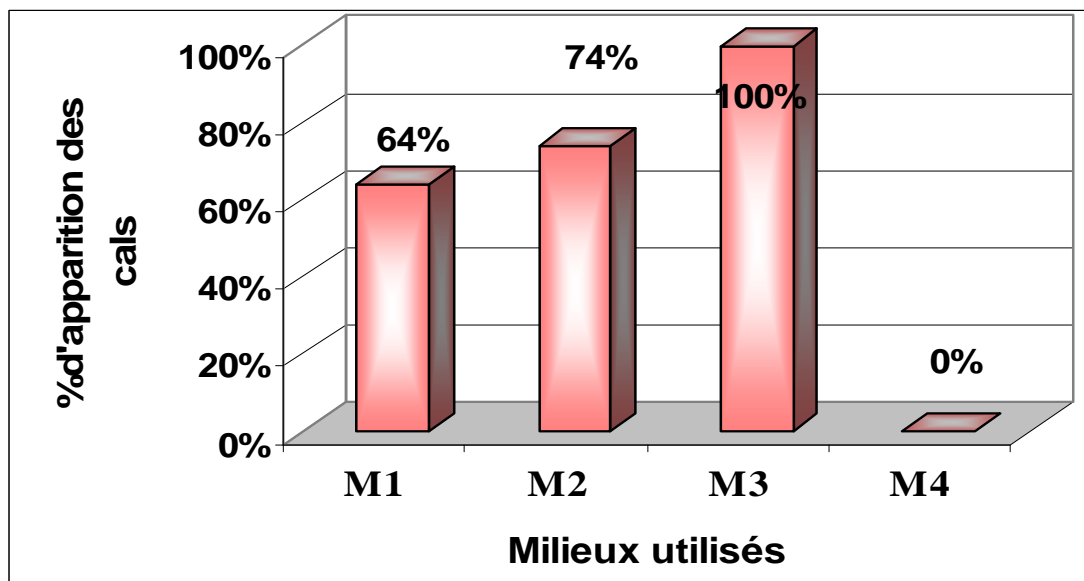


Figure 3.15 : Effet des combinaisons hormonales entre le BAP et les auxines sur l'apparition des cals

D'après les résultats obtenus, nous constatons que le pourcentage des cals obtenus sur le milieu M<sub>3</sub> (100%) est nettement supérieur à celui obtenu pour le milieu M<sub>1</sub> (64%) et M<sub>2</sub> (74%). Le milieu M<sub>4</sub> n'a donné aucun résultat.

Par ailleurs, tous les explants qui ont été introduit dans la chambre de culture 1 n'ont pu pousser. Ils ont brunis et se sont desséchés après 40 jours d'introduction et cela pour toutes les combinaisons hormonales

❖ Effet de la kinétine avec les auxines

Nous avons étudié l'effet de la kinétine avec les auxines sur la callogenèse.

Quatre milieux ont été testés :

M<sub>5</sub> = 1 mg/l Kin + 1 mg/l AIA

M<sub>6</sub> = 1 mg/l Kin + 1 mg/l AIB

M<sub>7</sub> = 1 mg/l Kin + 1 mg/l ANA

M<sub>8</sub> = 1 mg/l Kin + 1 mg/l 2.4-D

Comme dans la première combinaison, les explants qui ont initié la formation des cals sont déplacés vers la chambre de culture 1. (Figure 3.16)

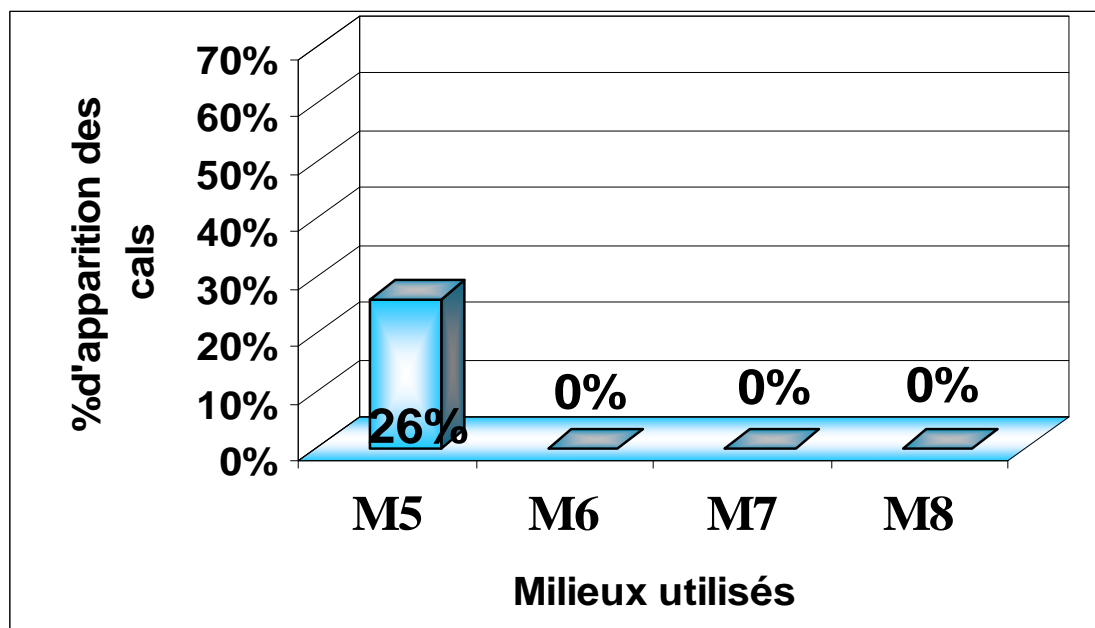


Figure 3.16 : Effet des combinaisons hormonales entre la kinétine et les auxines sur l'apparition des cals

Les résultats obtenus ont montré que seul milieu qui a pu induire l'apparition des cals est celui qui contient les hormones de croissance : la kinétine (1mg/l) et l'AIA (1mg/l). Les trois milieux M<sub>6</sub>, M<sub>7</sub> et M<sub>8</sub> non aucun effet.

En plus, les explants qui sont cultivés à une photopériode de 16 heures de lumière et 8 heures d'obscurité n'ont pas donné de résultats satisfaisantes.

D'après tous les résultats obtenus, nous pouvons déduire que les différentes combinaisons hormonales ainsi que, leurs concentrations n'ont pas le même effet sur l'aptitude à la callogenèse.

#### 3.2.2.1.2. Effet des différentes combinaisons hormonales sur le poids des cals

Les mesures ont été faites sur les milieux ayant initié la formation des cals. Les milieux sont M<sub>1</sub>, M<sub>2</sub>, M<sub>3</sub> et M<sub>5</sub>.

L'évolution du poids frais des cals est suivie pendant 80 jours après l'introduction primaire

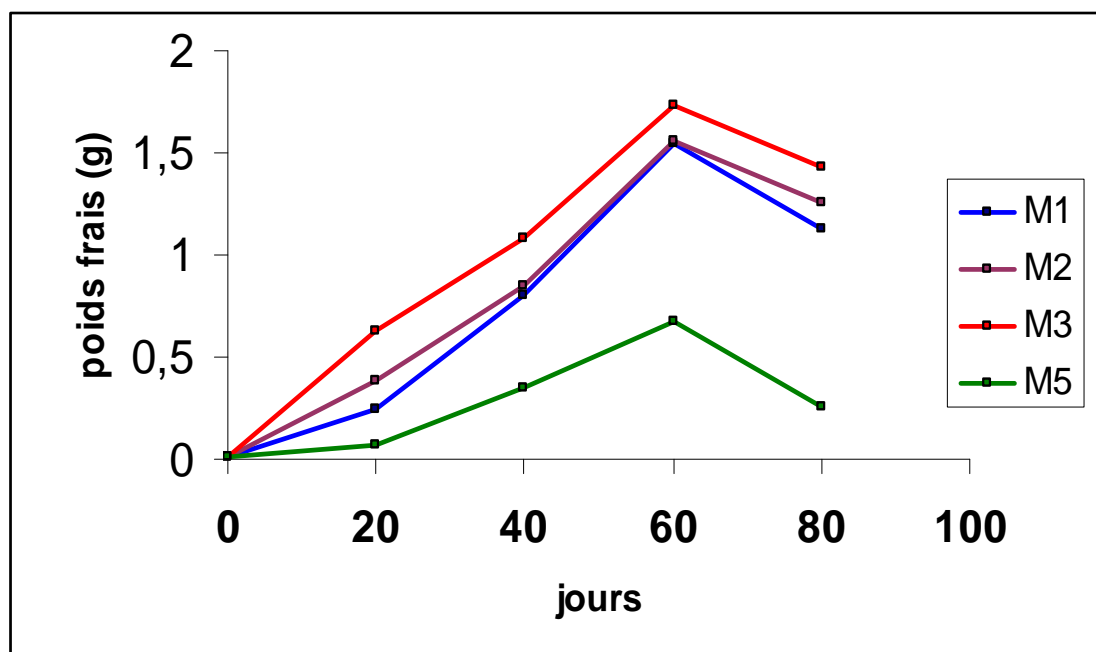


Figure 3.17: Evolution de la callogenèse exprimée en poids frais de feuilles sur les milieux de culture

Les résultats obtenus montrent que, la croissance des cals est continue. Elle atteint son maximum après 60 jours de culture pour les quatre types de milieux de culture. Au-delà, le poids frais chute pour tous les milieux.

Le poids frais le plus élevé des cals est obtenu sur le milieu M<sub>3</sub>, avec une valeur maximale de  $(1.727 \pm 0.35 \text{ g})$ .

En deuxième position, nous avons remarqué que l'évolution du poids frais des cals sur les milieux M<sub>1</sub> et M<sub>2</sub> est presque identique. Il atteint la valeur maximale aussi après 60 jours de l'introduction primaire avec  $(1,545 \pm 0.153)$  pour le milieu M<sub>1</sub> et  $(1,553 \pm 0.235)$  pour le milieu M<sub>2</sub>.

Le milieu M5 présente un pouvoir callogenèse nettement plus faible comparé avec les autres milieux.

Les résultats de l'analyse de la variance (tableau 2, annexe1), nous permettent de dire que la variance interfactorielle présente une action très hautement significative sur le poids frais moyen des cals. Par conséquent, les différentes

combinaisons en régulateurs de croissance entraînent un effet très hautement significatif sur le poids frais des cals.

Après 40 jours de mise en culture, selon le test de NEWMAN et KEULS au seuil de signification  $\alpha=5\%$ , trois groupes homogènes se dégagent (A, B et C) (tableau 3.2).

Tableau 3.2 : Effet des hormones de croissance sur le poids frais des cals

Milieu	M1	M2	M3	M5
Moyenne (g)	0.817 ± 0.218	0.805 ± 0.068	1.069 ± 0.334	0.313 ± 0.294
Intervalle de confiance	[0.782 – 0.852]	[0.794 – 0.815]	[1.016 – 1.122]	[0.267 – 0.360]
Groupe homogène	A	A	B	C

### 3.2.2.1.3. Effet des différentes combinaisons hormonales sur la texture et la couleur des cals

Les cals issus des feuilles diffèrent par leur couleur et leur texture selon les milieux et les conditions de culture dans lesquelles ils se trouvent.

#### ❖ Aspect des cals à l'obscurité

Concernant les feuilles, la callogenèse débute au niveau du contour de l'explant. Elle progresse le long des nervures et s'étale finalement sur le limbe. Les explants des feuilles mis à l'arbi de la lumière, ont donné des cals de couleur beige blanchâtre, ou brune. La texture est friable, parfois peu compacte selon les milieux de culture (Tableau 3.3).

Tableau 3.3 : Couleur et texture des cals à l'obscurité

Milieu	Couleur	Texture
M1	Beige, blanchâtre ou brunâtre	Granuleuse et friable
M2	Blanchâtre ou beige	Granuleuse, compacte ou parfois friable
M3	Beige, jaunâtre ou brun	Noduleuse, friable, parfois peu compacte
M5	Beige ou brun	Dure et friable

Après 60 jours à l'obscurité, quelque soit la composition du milieu de culture, les cals deviennent pulvérulents et virent au brun. Lorsqu'ils sont transférés à la chambre de culture 1, ils gardent le même aspect sans aucun changement notable.



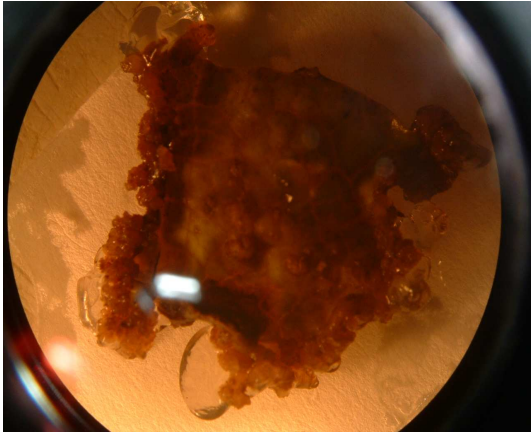


Figure 3.18 : Début de formation des cals



Figure 3.19 : Aspect des cals obtenus sur les milieux  $M_1$  et  $M_2$  à l'obscurité

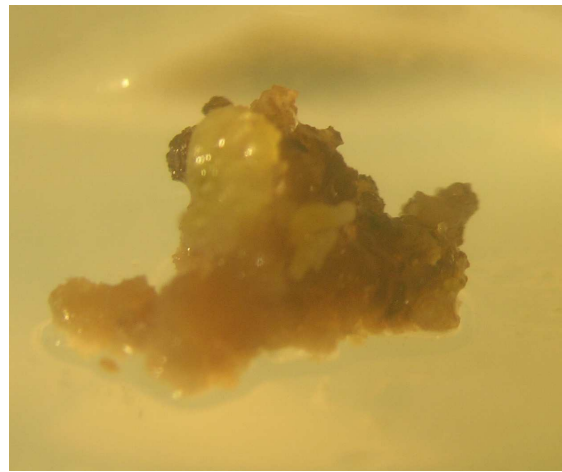


Figure 3.20 : Aspect des cals obtenus sur le milieu  $M_3$  à l'obscurité

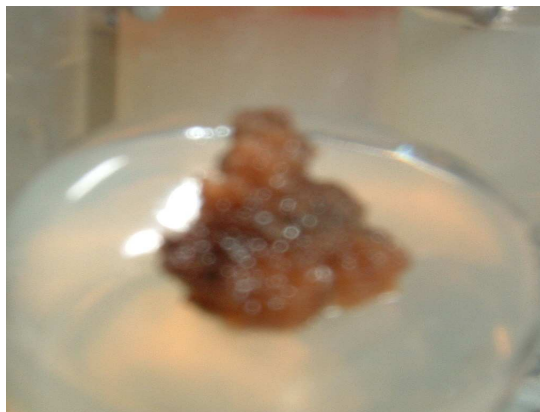


Figure 3.21 : Aspect des cals issus du milieu  $M_5$  à l'obscurité

❖ Aspect des cals à la lumière

Après 20 jours de leur introduction primaire, les explants ayant initié des cals sont transférés dans la chambre de culture 1. L'aspect des cals issus changent selon les milieux de culture (Tableau 3.4).

Tableau 3.4: Couleur et texture des cals après transfert à la lumière

Milieu	Couleur	Texture
M1	Verdâtre ou brunâtre	Granuleuse et friable
M2	Verdâtre, blanchâtre ou brune	Friable et Granuleuse
M3	Verdâtre, beige foncé	Noduleuse, friable parfois dure
M5	Brunes	Desséchés et friable

Nous remarquons ainsi que les cals exposés à la lumière changent d'aspect. Ceux des milieux M<sub>1</sub>, M<sub>2</sub> et M<sub>3</sub>, présentent une couleur beige-vert à blanc-vert, avec une texture noduleuse de consistance molle. Ce type de cals caractérise morphologiquement les cals non embryogènes. Ces derniers sont aptes à être conduit vers une organogenèse bien définie, car la couleur verte indique la présence d'une initiation de bourgeons c'est-à-dire des cals caulogènes.

Cependant, le milieu M5 donne des cals dont la couleur est brune et le développement est réduit. Ils finiront par se dessécher. Ces caractéristiques indiquent la présence de cellules mortes.

Après 40 jours de leur introduction primaire, les cals sont fragmentés et repiqués sur le même milieu initial.

Quelque soit le type du milieu de culture, après 3 à 4 transferts, les cals deviennent durs et la couleur vire vers le brun et parfois au noir. Ils montrent un aspect poudreux.

Après un mois de culture dans la chambre 1, les cals issus des milieux M<sub>1</sub>, M<sub>2</sub>, M<sub>3</sub> vont développer des bourgeons qui s'étalent sur toute la surface des milieux. Ces bourgeons donnent par la suite de petites tiges.

Ces petites tiges sont transférées vers le milieu d'allongement pour assurer une bonne élongation aux poussées qui seront enracinées dans des milieux d'enracinement.

D'après nos résultats, nous constatons que l'aptitude à la callogenèse diffère. Elle dépend non seulement des milieux de culture utilisés mais aussi des conditions de culture.

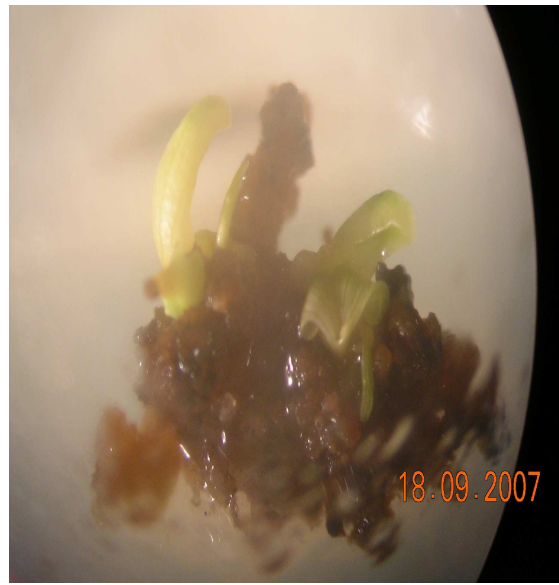


Figure 3.22 : Aspect des cals cultivés milieux M1, M2 et M3 à la lumière

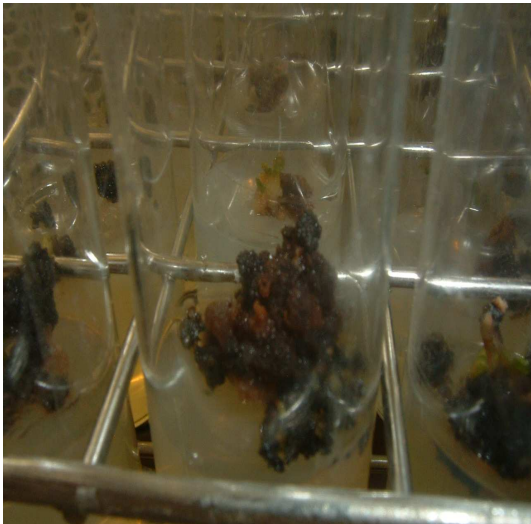


Figure 3.23 : Aspect des cals issus du milieu M<sub>5</sub> à la lumière

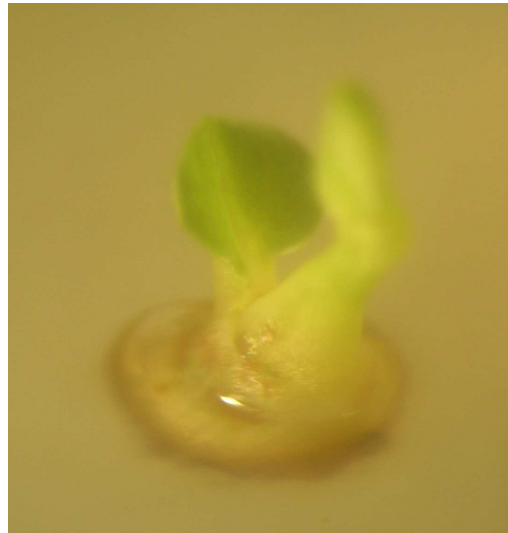


Figure 3.24: Développement de bourgeon néoformé sur cal (loupe Gx4.5)



Figure 3.25 : Aspect des cals après 3 ou 4 sub-cultures

D'après LUTZ [121] et NOZERAN [122], l'initiation de la callogenèse semble être due au bouleversement du comportement des explants. Il est essentiellement lié aux coupures des corrélations entre l'explant et la plante mère, ainsi qu'à son nouvel environnement.

En outre, d'après MARGARA [72], les fragments de tige peuvent présenter une callogenèse abondante à l'obscurité continue, mais ils ne forment jamais de bourgeon. En plus, après plusieurs semaines de séjour à l'obscurité, les cals transférés à la lumière paraissent avoir perdu leur aptitude initiale à la caulogénèse. Dans l'aspect biochimique, THORPE [123], montrent une augmentation de l'activité peroxydasique au cours de la formation de cals issus de différents explants.

La perte de l'activité caulogène d'un cal d'*Arabidopsis* (cultivé trop longtemps sur 2,4-D) correspond à une perte graduelle de l'activité peroxydasique. La récupération de la capacité organogénétique, requiert une reprise de l'activité de la plupart des isoenzymes [124].

Cet accroissement de l'activité peroxydasique préalable à l'initiation des bourgeons végétatifs pourrait être l'indication d'une réduction du niveau auxinique endogène [125].

Par ailleurs, lorsque le cal provient d'un fragment d'organe contenant des tissus divers (feuille, tige et apex), on constate souvent l'aptitude particulière à la caulogénèse chez certaines catégories de tissus (cambium, parenchyme vasculaire ou libérien) [72].

#### 3.2.2.1.4 Etude histologique des cals

BUVAT [126] définit les cals comme des masses cellulaires denses et indépendantes formant des unités sphériques cohésives. Après 20 jours de culture survient la formation des cals. Les premières divisions cellulaires sont généralement des cellules larges, comportant ou non des noyaux (figure 3.26). Ces cellules sont conformes à ce qu'ont montré EL MAATAOUI et *al.*

[127] sur *Quercus suber*. Elles sont formées par la dédifférenciation des cellules des explants de feuilles pour donner un méristème primaire.

Par la suite, après 30 à 40 jours de culture, on observe des zones où des cellules se divisent activement. Ces foyers de cellules hautement actives sont situés à la périphérie de larges cellules non divisées (figure 3.27). Elles occupent plus précisément la périphérie du cal (figure 3.28)

Elles sont caractérisées par des cellules à gros noyaux, à cytoplasme dense et riche en protéines solubles (coloration par le Naphthol Blue-Black). Ces cellules sont isolées du reste du cal par épaissement de leur paroi. Un dépôt de substances polysacchariques est mis en évidence par une coloration au P.A.S. (figure 3.29).

Elles rappellent alors les cellules méristimatiques décrites sur le palmier à huile [128].

Des assises cellulaires plus denses sont visibles au centre des foyers d'activité. Elles sont formées de cellules alignées en division active qu'on appelle communément : le cambium (figure 3.30). Les massifs cellulaires se sont développés très rapidement, pour former le centre vasculaire.

Les coupes histologiques sur les cals ayant formé des bourgeons ont permis de mettre en évidence des apex caulinaires parfaitement structurés (figure 3.31).



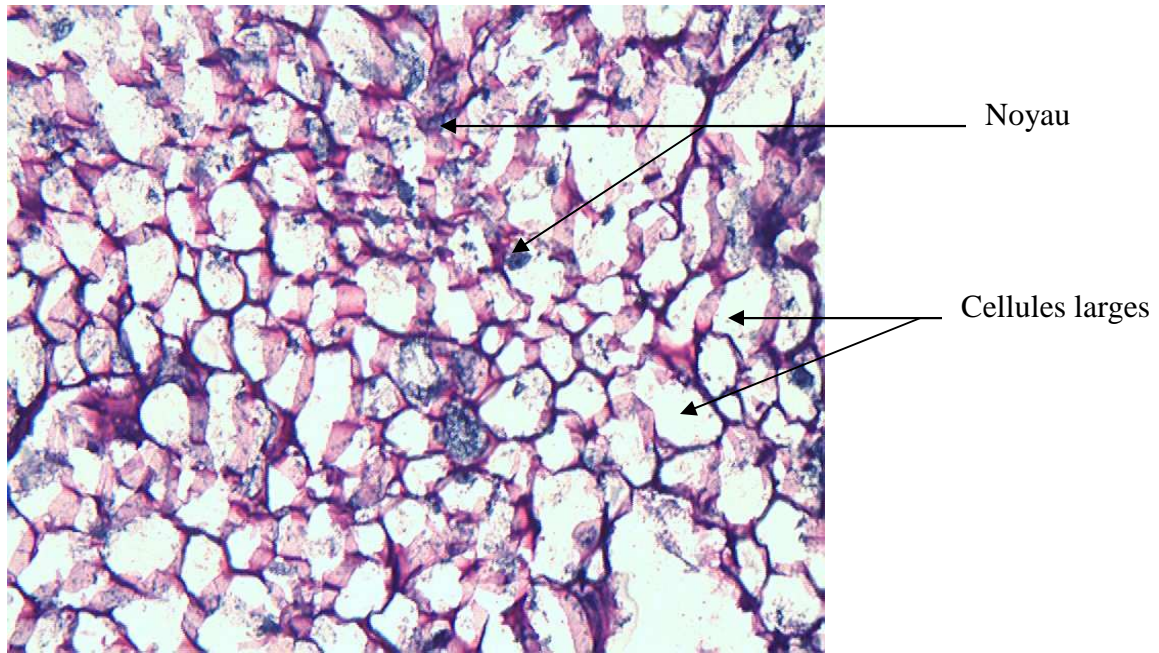


Figure3.26 : Coupe au niveau du cal issu des explants de feuille après 20 jours de culture (Gx100)

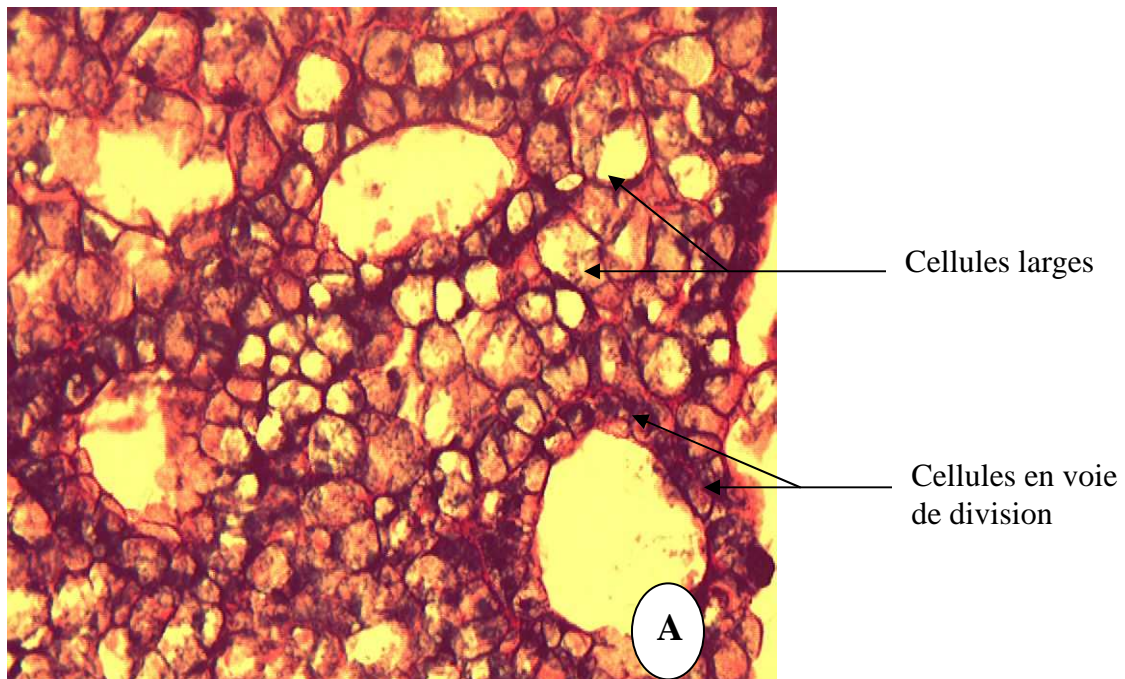


Figure3.27 (A) : Coupe au niveau du cal issu des explants de feuille après 40 jours de culture (Gx100)

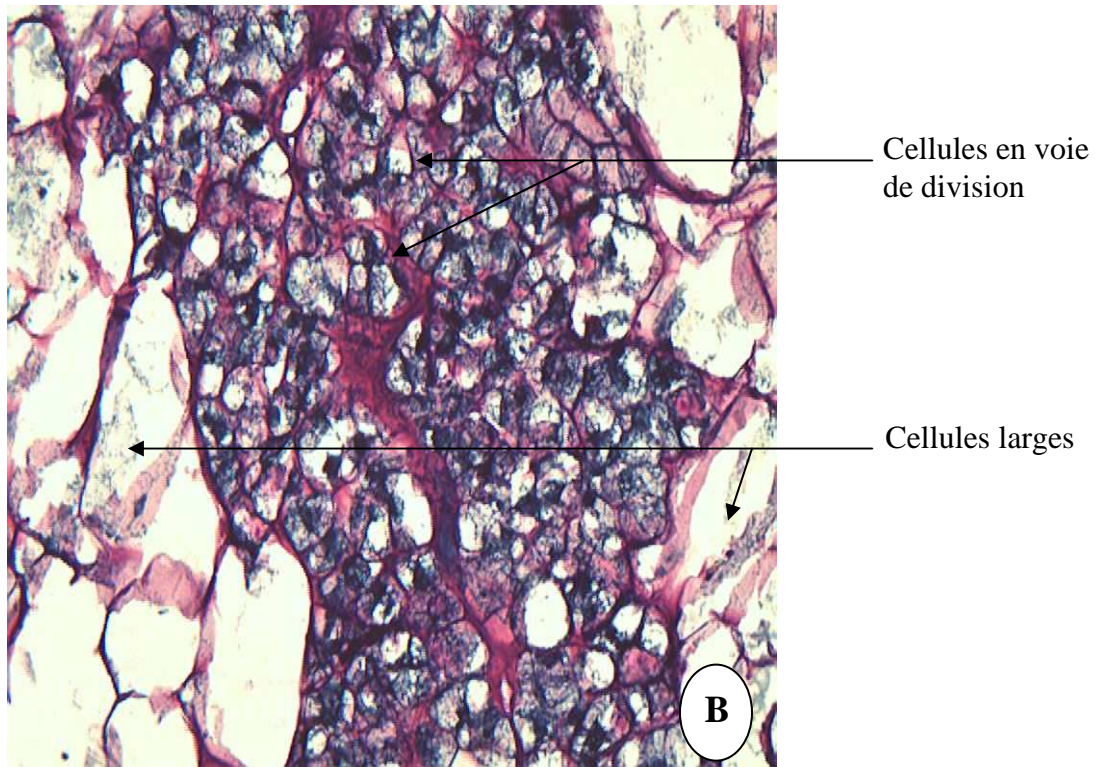


Figure 3.27 (B): Coupe au niveau du cal issu des explants de feuille après 40 jours de culture (Gx400)

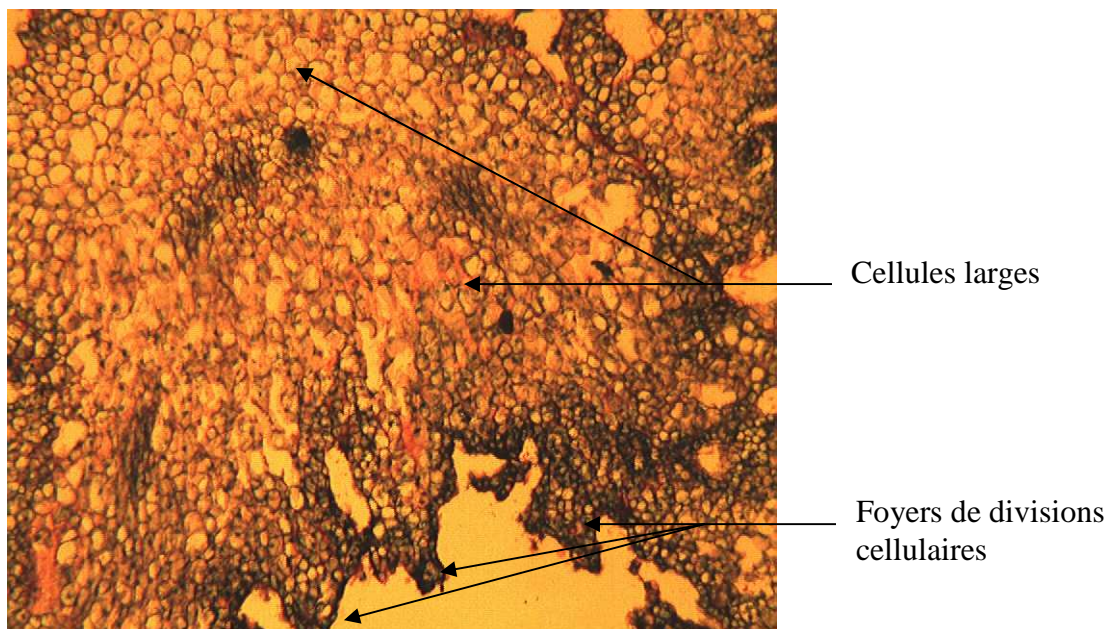


Figure 3.28 : Coupe au niveau du cal issu des explants de feuille après 40 jours de culture (Gx40)



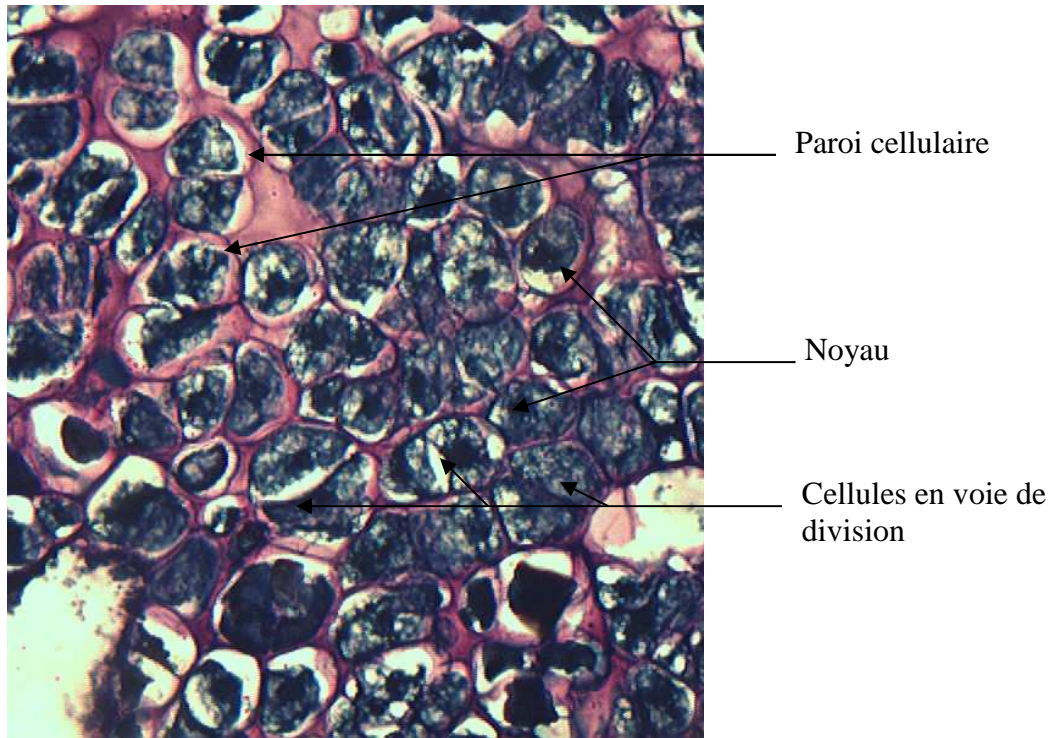


Figure 3.29 : Coupe transversale au niveau du foyer cellulaire hautement actif du cal (Gx400)

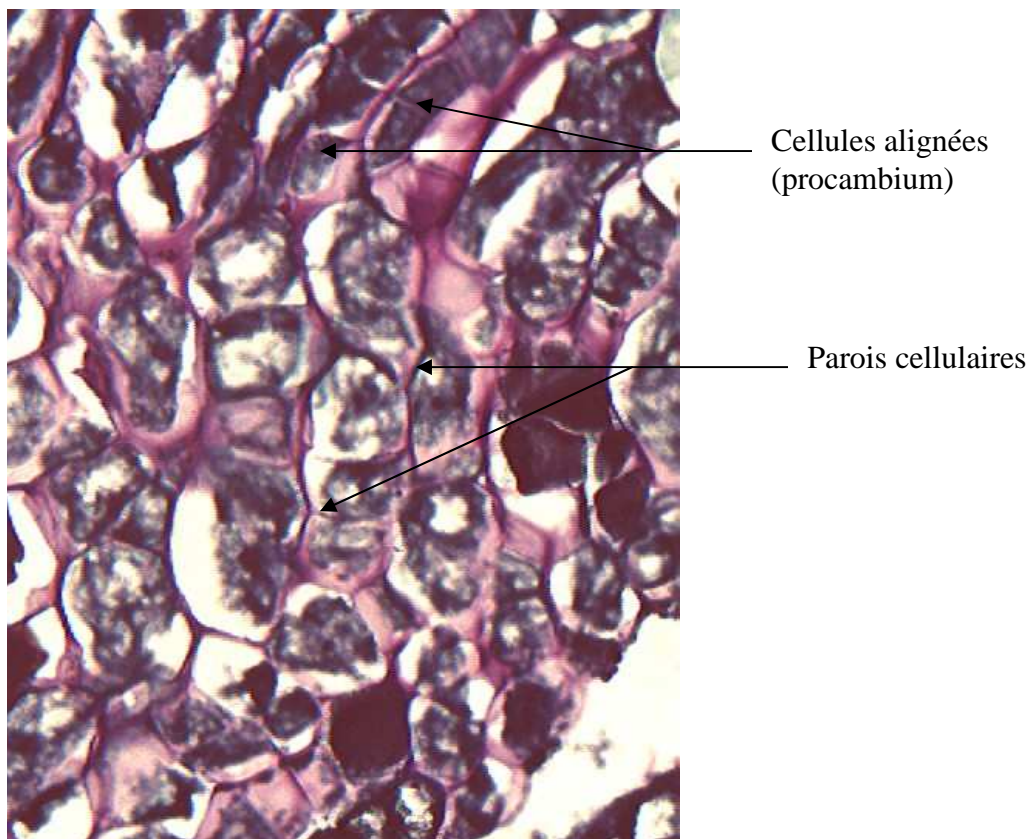


Figure3.30: Coupe transversale au niveau de procambium du cal (Gx400)

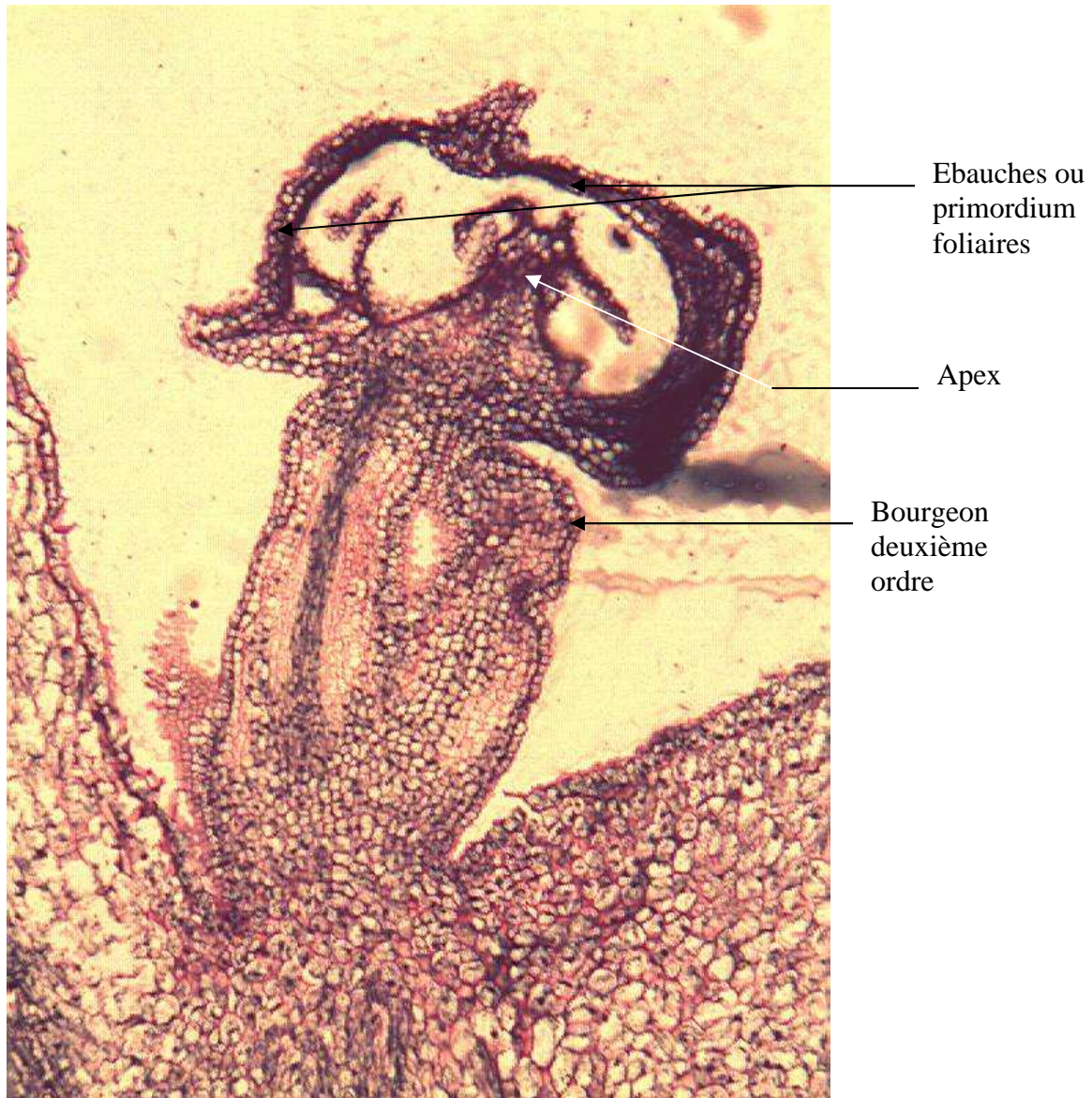


Figure 3.31 : Coupe longitudinale au niveau d'un bourgeon néoformé au niveau du cal (Gx400)

### 3.2.2.2 Phase d'élongation

#### 3.2.2.2.1 Effet des gibbérellines sur la longueur moyenne de la tige

Pour faciliter la séparation des plantules formées sur les cals et leur passage en enracinement, nous avons essayé d'améliorer leurs allongements.

Le milieu de base utilisé est celui de MS (1962) additionné au GA<sub>3</sub> et BAP à différentes concentrations. Les milieux sont :

M<sub>1</sub> : MS + sans hormones (témoin)

M<sub>2</sub> : MS + 1 mg/l GA<sub>3</sub> + 0.5 mg/l BAP

M<sub>3</sub>: MS + 1 mg/l GA<sub>3</sub> + 1 mg/l BAP

M<sub>4</sub>: MS + 1.5 mg/l GA<sub>3</sub> + 0.5 mg/l BAP

M<sub>5</sub>: MS + 1 mg/l GA<sub>3</sub>.

La prise de mesure de la longueur des plantules a été effectuée chaque semaine après leurs repiquages.

Les résultats obtenus (figure 3.32) montrent que l'élongation des vitro-plants présente certaines variabilités d'un milieu à l'autre. En effet, l'allongement moyen des tiges est nettement plus élevé et presque identique pour les milieux M<sub>1</sub> et M<sub>5</sub>. Alors que pour les milieux où nous avons additionné des cytokinines (BAP) au GA<sub>3</sub>, la moyenne d'élongation pendant la période d'observation a été plus faible pour les milieux M<sub>2</sub> et M<sub>4</sub>. Quant au milieu M<sub>3</sub>, il présente le plus faible taux d'allongement. Nous avons remarqué aussi que le taux de néoformation des bourgeons dans les milieux M<sub>2</sub>, M<sub>3</sub> et M<sub>4</sub> a été plus grand en comparaison à celui des milieux M<sub>1</sub> et M<sub>5</sub>.



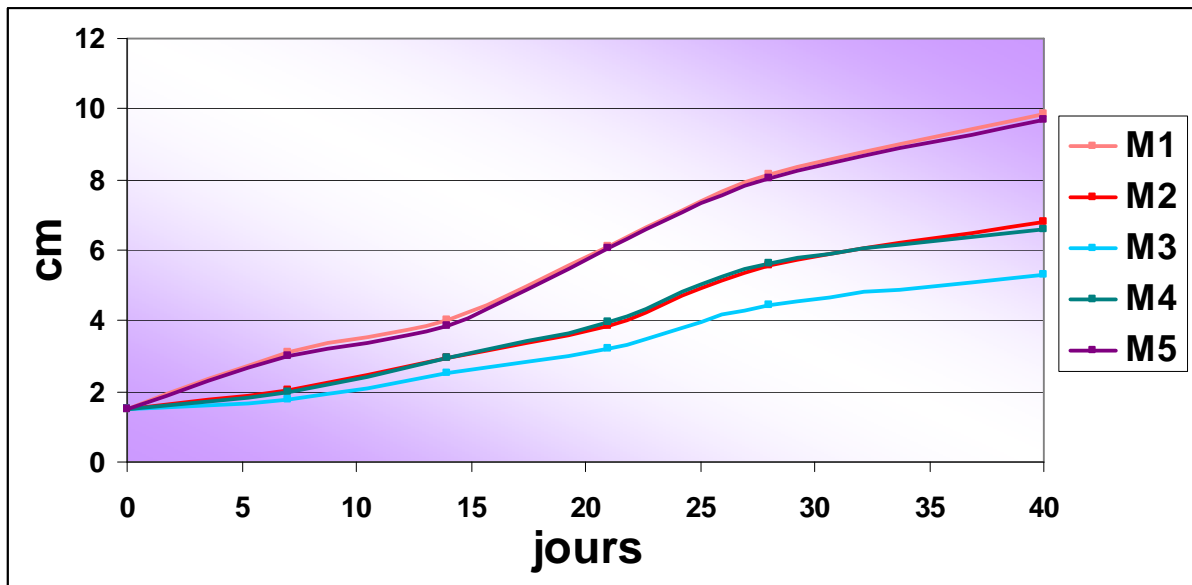


Figure 3.32 : Effet des hormones de croissance sur l'allongement moyen de la tige

Nos résultats ont été appuyés par l'analyse de la variance au risque  $\alpha = 0.05$  (tableau 3, annexe 1). En effet, il existe une différence significative entre les milieux utilisés sur l'allongement moyen des vitro-plants. La comparaison de ces valeurs deux à deux par le test de NEWMAN et KEULS, permet de dégager 3 groupes homogènes (tableau 3.5).

Tableau 3.5 : Effet des hormones de croissance sur l'allongement des vitro-plants

Milieu	M <sub>1</sub>	M <sub>2</sub>	M <sub>3</sub>	M <sub>4</sub>	M <sub>5</sub>
Moyenne (cm)	9.87 ± 0.35	6.82 ± 0.47	5.33 ± 0.17	6.6 ± 0.38	9.71 ± 0.41
Intervalle de confiance	[9.49-10.24]	[6.32 -7.31]	[5.15 -5.51]	[6.20-6.99]	[9.28-10.14]
Groupe homogène	C	B	A	B	C

D'après ZRYD [68], l'élongation des tiges est inhibée dans de nombreux cas par une trop forte concentration en cytokinine. Les plantules seront donc repiquées sur un milieu sans cytokinine ou à des doses très faibles pour qu'elles puissent reprendre leurs allongements.

Par ailleurs, le passage des plantules du milieu de multiplication au milieu dépourvu de régulateurs de croissance ou additionné de GA<sub>3</sub>, peut favoriser leurs allongements [111] [112].

### 3.2.2.2 Effet des sub-cultures sur la longueur moyenne de la tige

Cette partie d'étude a été réalisée sur les milieux M<sub>1</sub> (sans hormones) et M<sub>5</sub> (1 mg/l de GA<sub>3</sub>) qui ont donné les meilleurs résultats concernant les vitro plants. Après un mois de culture, les vitro-plants d'*Aristolochia longa* L. ayant présenté un bon allongement, sont fragmentés et repiqués sur le même milieu initial (M<sub>1</sub> et M<sub>5</sub>). Ce repiquage successif est répété 4 fois.

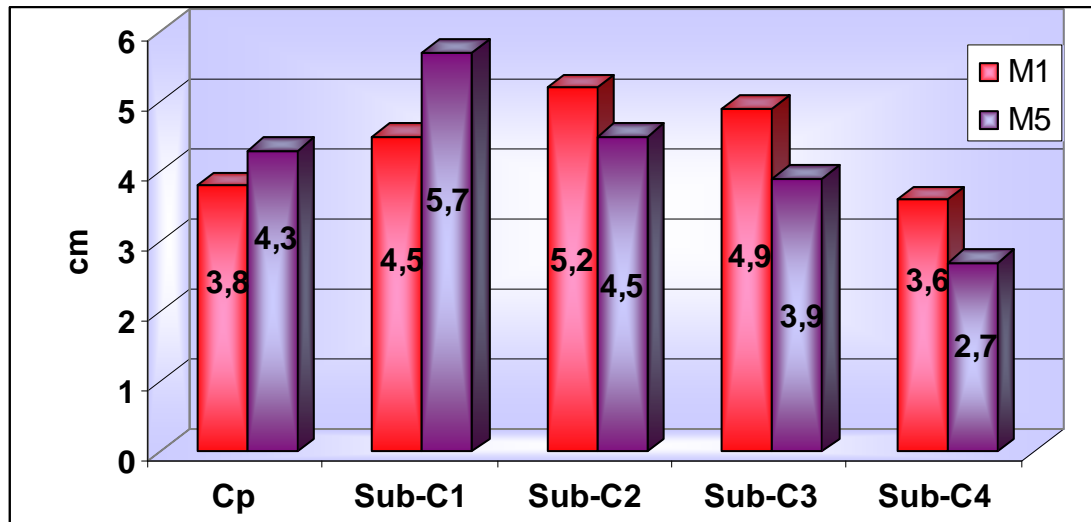


Figure 3.33: Effet des sub-cultures sur l'allongement moyen de la tige

Nous avons remarqué que l'allongement moyen de la tige dans le milieu M<sub>5</sub> est nettement plus élevé à la première sub-culture (SbC1) avec 5.7 cm par rapport aux autres sub-cultures qui présentent des valeurs décroissantes. Par contre, la meilleure élévation a été observée pour le milieu M<sub>1</sub> après la deuxième sub-culture.

### 3.2.2.3 Phase d'enracinement

Après leur développement en tubes, les pousses issues des cals ont été transférées sur un milieu d'enracinement. Les milieux testés sont :

M<sub>1</sub>: Sans hormones (témoin)

M<sub>2</sub>: 0.5mg/l GA<sub>3</sub> + 1mg/l 2.4 D

M<sub>3</sub>: 0.5 mg/l GA<sub>3</sub> + 1 mg/l ANA

M<sub>4</sub>: 0.5 mg/l GA<sub>3</sub> + 1 mg/l AIA

M<sub>5</sub>: 0.5 mg/l GA<sub>3</sub> + 1mg/l AIB

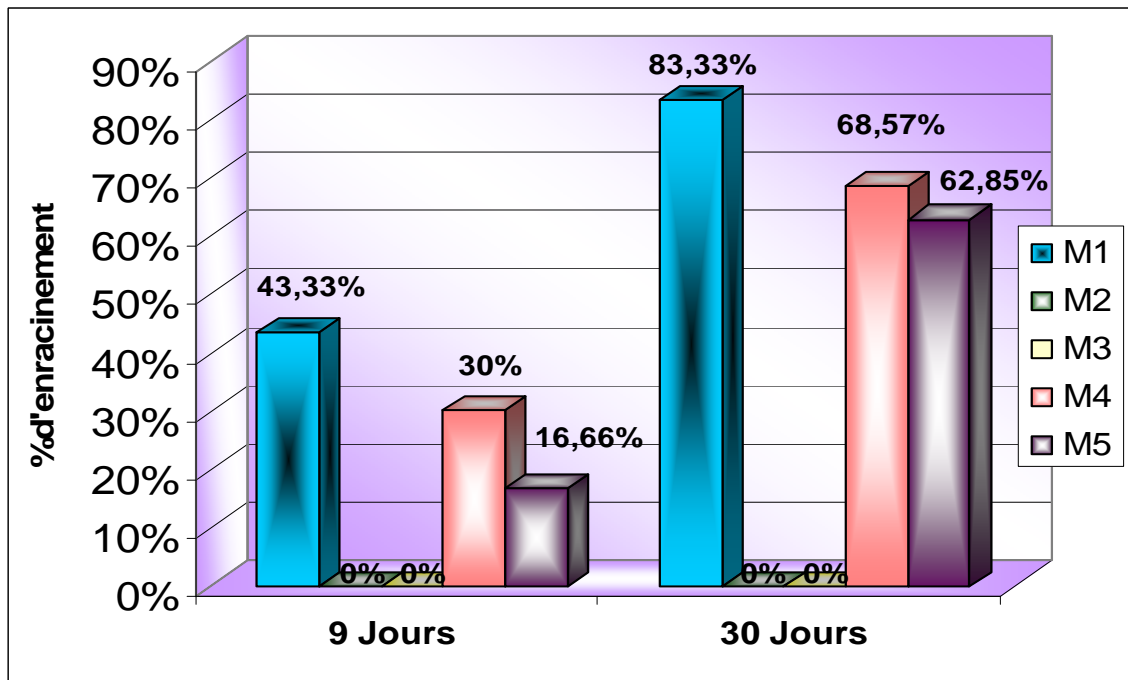


Figure 3.34 : Effet des hormones de croissance sur l'enracinement des vitro-plants issus des cals

Les résultats obtenus (figure 3.34) montrent qu'après un mois de culture, deux combinaisons hormonales ont pu favoriser l'initiation et le développement des racines, (AIA+ GA<sub>3</sub>) et (AIB +GA<sub>3</sub>) avec un taux de 68.67 % pour le milieu M<sub>4</sub> et 62.85% pour le milieu M<sub>5</sub>.

En outre, après la deuxième sub-culture des vitro-plants obtenus sur le milieu M<sub>1</sub> de l'allongement, on remarque le développement de racines. Le pourcentage des pousses enracinées est le plus élevé (84%) par rapport aux autres milieux d'enracinement testés.

En ce qui concerne les milieux M<sub>2</sub> et M<sub>3</sub>, on constate que les combinaisons hormonales utilisées (GA<sub>3</sub> + 2.4 D) et (GA<sub>3</sub> + ANA) n'ont aucun effet sur l'enracinement.

Nous avons noté aussi, l'initiation et le développement de la rhizogenèse après 5 à 10 jours de repiquage des vitro-plants. Ces derniers en deuxième sub-culture évoluent sur le milieu M<sub>5</sub> d'allongement qui contient 1 mg/l de GA<sub>3</sub>.

En outre, nous avons remarqué l'apparition des racines sur des cals avant la formation des bourgeons et cela sur le milieu M<sub>1</sub> sans hormone (figure 3.35).

Selon JONES [129] et GASPAR [130], des substances comme l'acide gibbérellique ou des polyphénols, peuvent se révéler de bons stimulateurs de l'induction des racines si elles sont rajoutées au milieu de culture

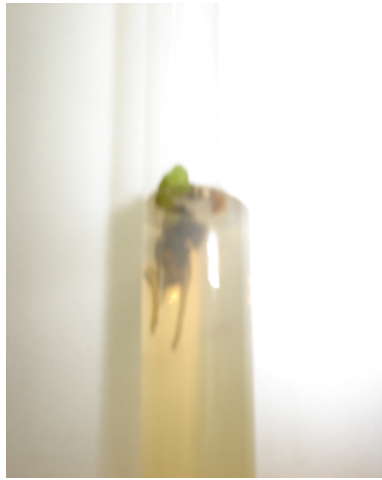


Figure 3.35: Cal enraciné sur le milieu M<sub>1</sub>

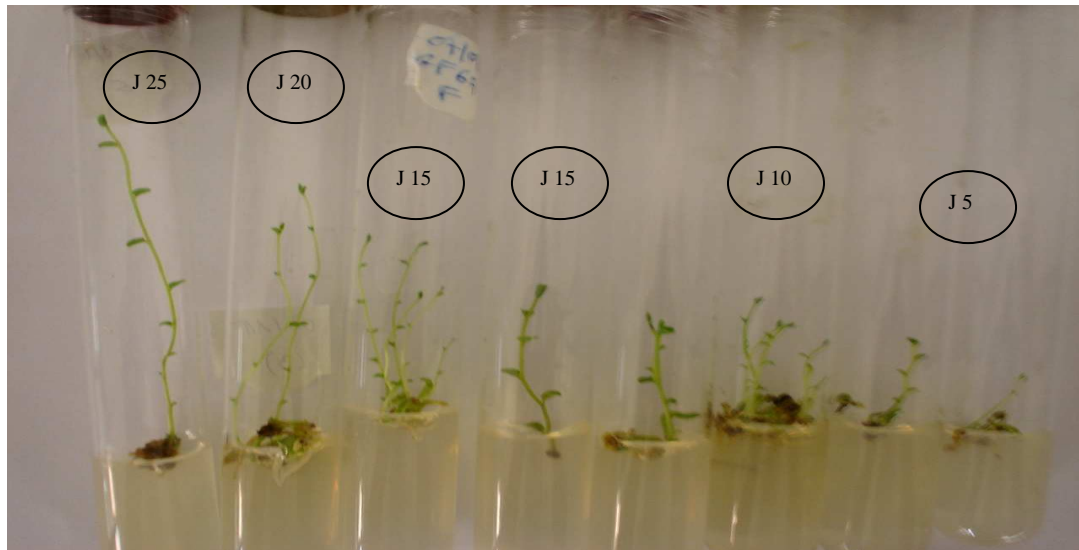


Figure 3.36 : Développement des plantules issues des cal



Figure 3.37: Développement des racines des vitro-plants issus des cals



### 3.3. Organogenèse déficiente

Nous avons remarqué au cours de notre expérimentation, l'apparition de cas de malformations des vitro-plants. Ces malformations sont observées après le transfert des pousses issues des cals vers les milieux d'allongement M<sub>3</sub> et M<sub>1</sub>. Elles sont plus fréquentes sur le milieu M<sub>3</sub> où la concentration en cytokinine (BAP) est de 1 mg/l, en comparaison avec le milieu M<sub>1</sub> sans hormone de croissance. Les vitro-plants obtenus sont caractérisés par des tiges courtes et épaisses avec des feuilles généralement très allongées ou plissées et parfois enroulées (figure 3.38). Sur le milieu M<sub>1</sub>, nous avons observé l'initiation et le développement des racines. Mais le taux de développement des plantules entières était réduit.

D'après GASPAR et *al.* [125], ces malformations rencontrées chez les plantules herbacées en voie de micropropagation *in vitro* sont désignées par le terme de vitrification. Les plantes vitrifiées se caractérisent par des tiges et des feuilles épaisses, vitreuses et plus ou moins translucides. Les aspects les plus apparents de la vitrification sont l'hyperhydricité des tissus et leur hypolignification avec une déficience en cellulose. Il est possible d'expliquer l'hyperhydricité par une turgescence accrue des cellules à cause de la diminution de la rigidité des parois.

En plus, l'assise génératrice libéroligneuse ou cambium dans les feuilles est déficient. Elle donne peu rangées de bois et liber. En outre, ils ont observé une lignification déficiente des vaisseaux de bois.

Par ailleurs, d'après ZRYD [68], La croissance des plantules s'en trouve réduite mais elle s'accompagne surtout d'un taux réduit de multiplication de bourgeons et d'enracinement.

Le taux de réussite de l'acclimatation est aussi réduit puisque les plantules vitrifiées sont susceptibles d'être infectées et perdent beaucoup d'eau. Les principaux facteurs inducteurs ou activateurs possibles de la vitrification sont certaines hormones de croissance (les cytokinines en particulier), certains ions (NH<sub>4</sub><sup>+</sup>), l'humidité du milieu ou de l'atmosphère, l'augmentation de la température et certains gaz (C<sub>2</sub>H<sub>4</sub>) [125].

D'après MURASHIGE et SKOOG [95], la plupart des cas de vitrification mentionnés sont constatés sur le milieu qui est particulièrement riche en nitrate d'ammonium. La vitrification y est donc considérée comme la réponse morphologique à un stress non traumatique (excès d'eau, de cytokinines, de certains ions).

CREVECOEUR [131] considère que le processus de vitrification peut être réversible, soit par un transfert *in vitro* sur un milieu non vitrifiant, ou en serre pour acclimatation. Les plantules peuvent former des organes parfaitement normaux

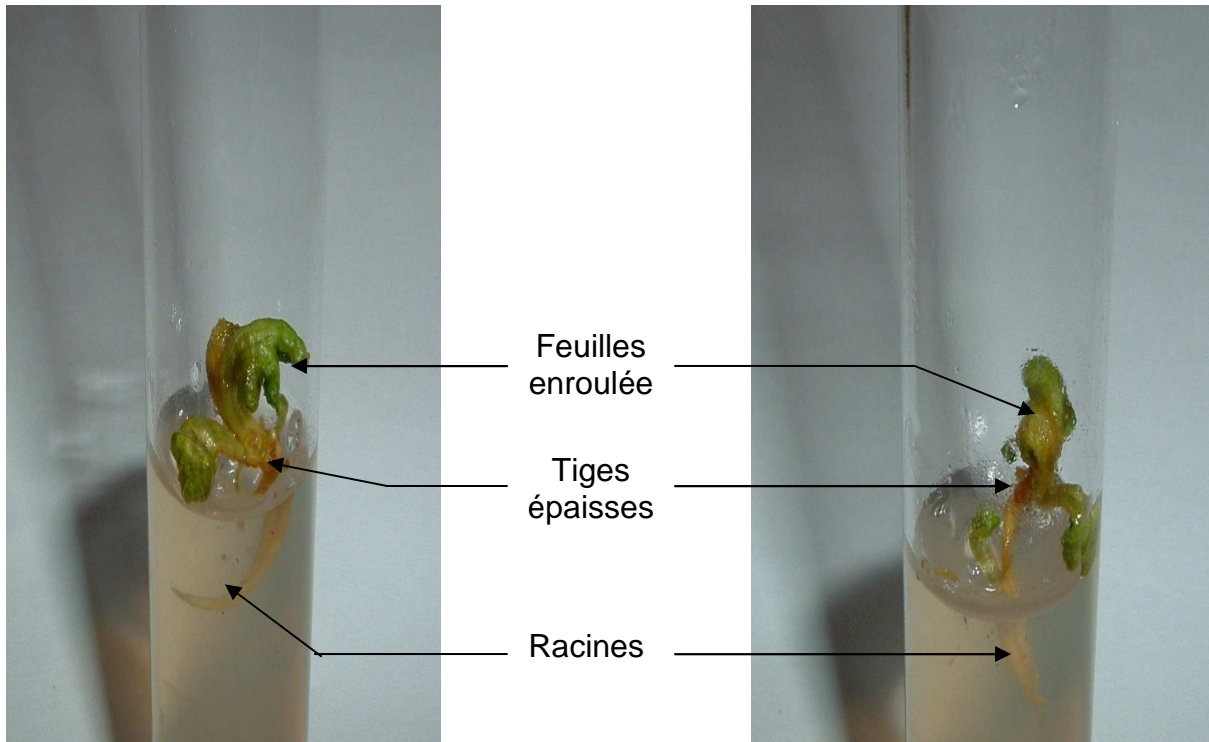


Figure 3.38: Aspect des plantules enracinées et vitrifiées

### 3.4. Acclimatation

Les vitro-plants enracinés obtenus par organogenèse directe et indirecte (figure 3.51) ont été acclimatés sur deux types de substrat :

- Substrat 1 : tourbe + perlite
- Substrat 2 : tourbe seule

Après 2 à 3 semaines de début d'acclimatation, on soulève progressivement les sachets en plastique afin de ramener lentement la plante en contact avec l'atmosphère de la mini-serre (figure 3.39 et 3.40).

Par ailleurs, après un mois d'acclimatation, l'effet des milieux utilisés et l'origine des vitro-plants, ont montré une action très hautement significative sur le pourcentage de réussite de l'acclimatation (figure 3.41).

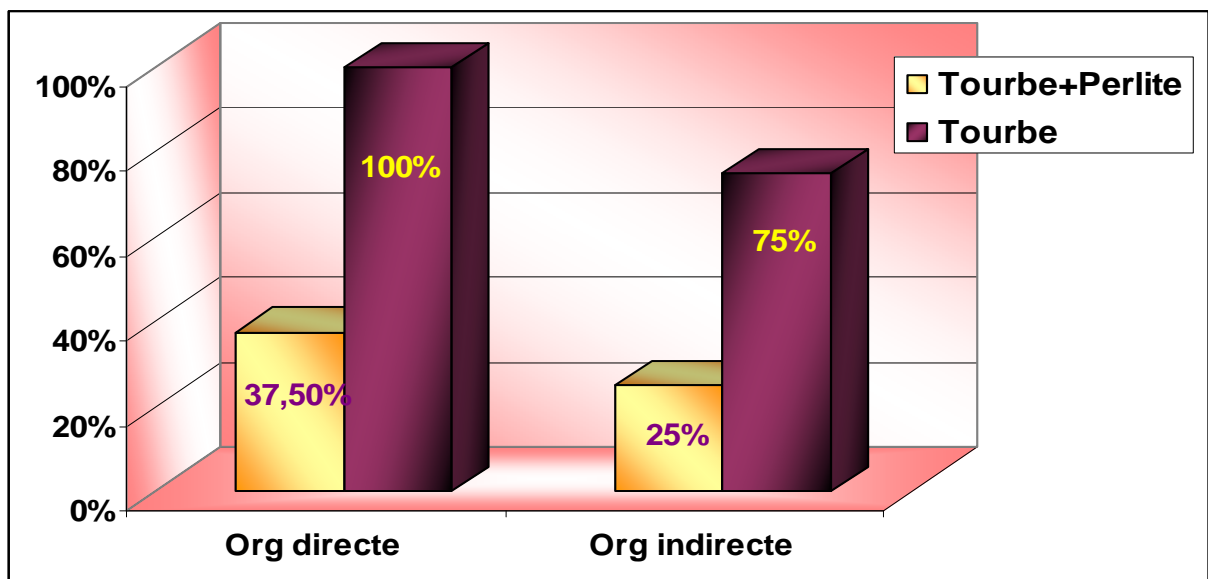


Figure 3.41: Pourcentage de réussite après un mois d'acclimatation des vitro-plants issus de l'organogenèse directe et indirecte après un mois

Les pourcentages de réussite de l'acclimatation des vitro-plants issus de l'organogenèse directe ( $S_2$  37.5% et  $S_1$ 100%,) sont nettement supérieur à celui obtenu par l'acclimatation des vitro-plants issus de l'organogenèse indirecte ( $S_1$  25% et  $S_2$  75%).

En outre, l'utilisation de la tourbe seule est plus efficace. Dans le cas de l'organogenèse directe, les plantules obtenues s'adaptent et survivent à 100% sur le substrat 1. Par contre, le pourcentage diminue à 37.50 % dans le cas du substrat 2. Les mêmes résultats ont été constatés dans le cas d'une organogenèse indirecte. Le pourcentage de réussite de l'acclimatation des vitro-plants est de 75% pour le substrat 1 contre 25 % sur le substrat 2.

En outre, le substrat constitué uniquement de tourbe permet une rétention importante de l'eau. Mais la perlite exige un arrosage fréquent pour compenser les pertes d'eau dues à sa texture.

A partir du 40<sup>ème</sup> jour d'acclimatation, tous les vitro-plants issus de l'organogenèse indirecte sur les deux types de milieux ainsi que les vitro-plants issus d'organogenèse directe cultivés sur le mélange se dessèchent et meurent (figure 3.40). Alors que, les seules plantules qui persistent pendant 2 mois sont celles issues de l'organogenèse directe (figure 3.41), ensuite, elles dessèchent et meurent (figure 3.42). Cela peut être dû à la fragilité des plantules obtenues.

Les coupes histologiques réalisées sur les racines des vitro-plants avant l'acclimatation ont montré que ces racines ne présentent pas une assise subéreuse (figures 3.45 ,3.46 et 3.47).



Figure 3.39: Plantules début de l'acclimation



Figure 3.40: Développement des plantules après 3 semaines de l'acclimation



Début de jaunissement

Figure 3.42: Début de jaunissement et dessèchement des plantules





Figure 3.43 : Plantules issues de l'organogenèse directe après 40 jours

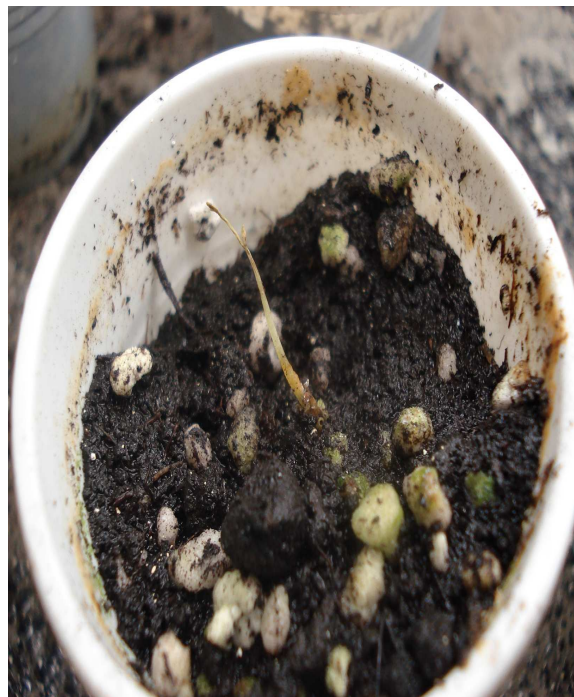


Figure 3.44 : Dessèchement et mort des plantules

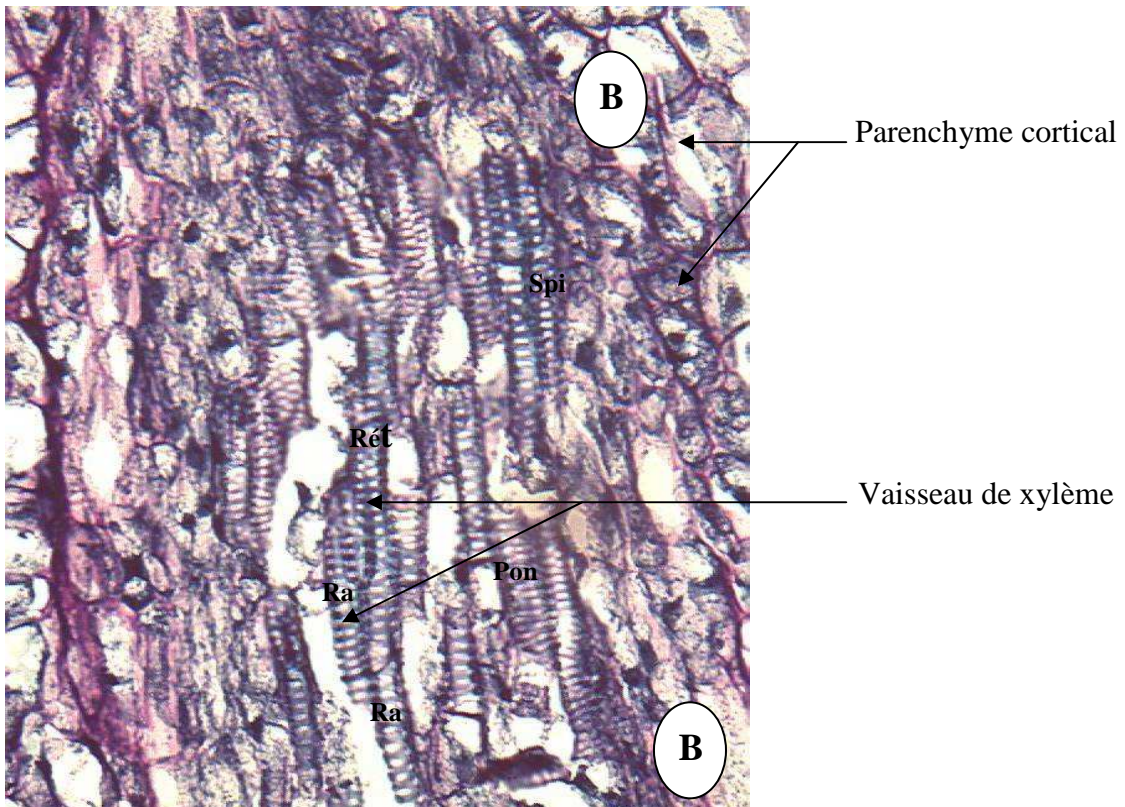
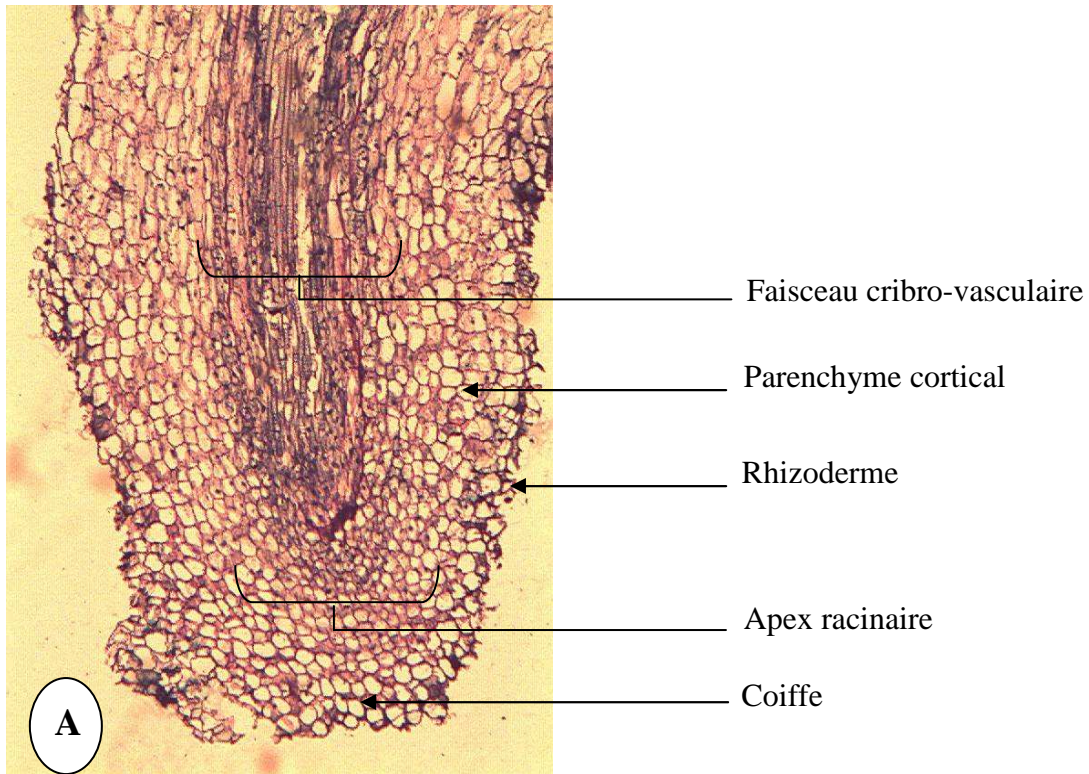


Figure 3.45: Coupe longitudinale de la racine d'*Aristolochia longa* L. obtenue par micropropagation : A (Gx100) ; B (Gx400)



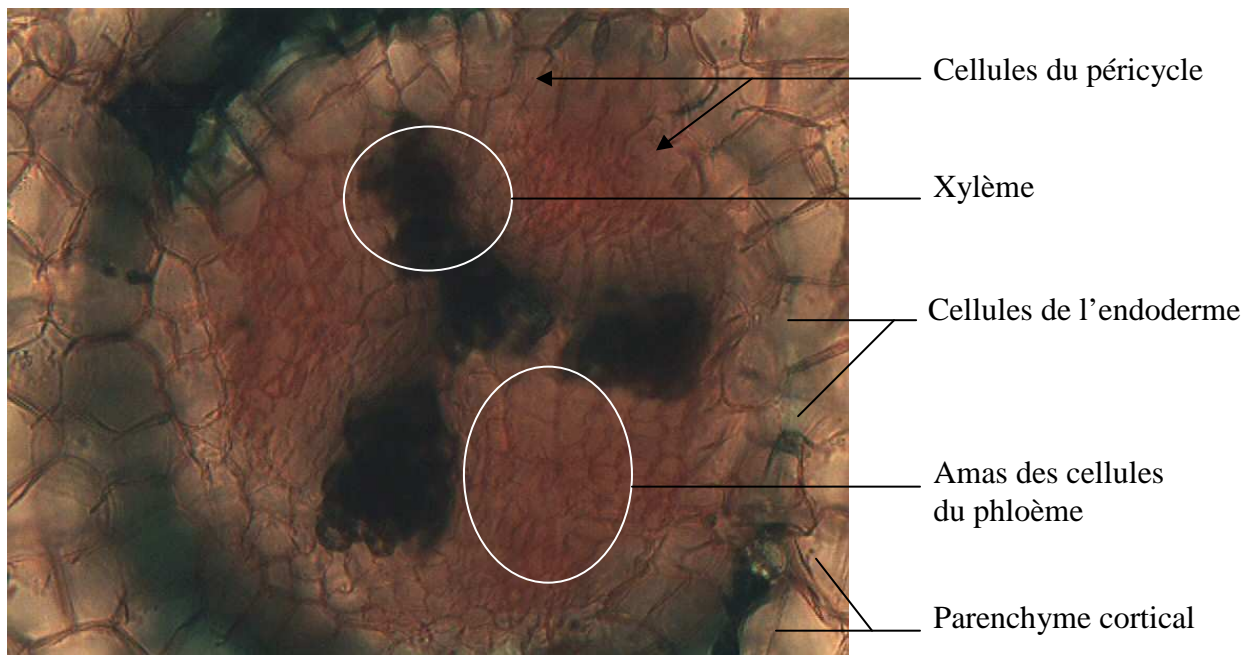
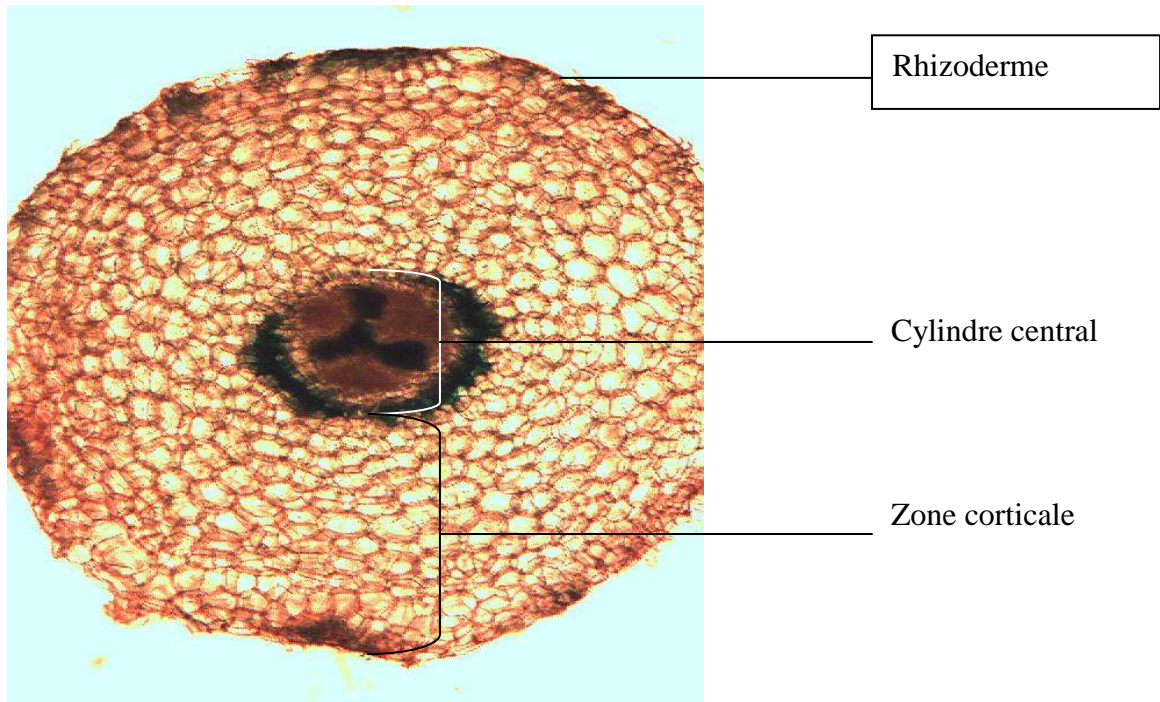


Figure 3.46 : Coupe transversale dans la racine d'*Aristolochia longa* L. obtenue par micropropagation: A (Gx40) ; B (Gx400)

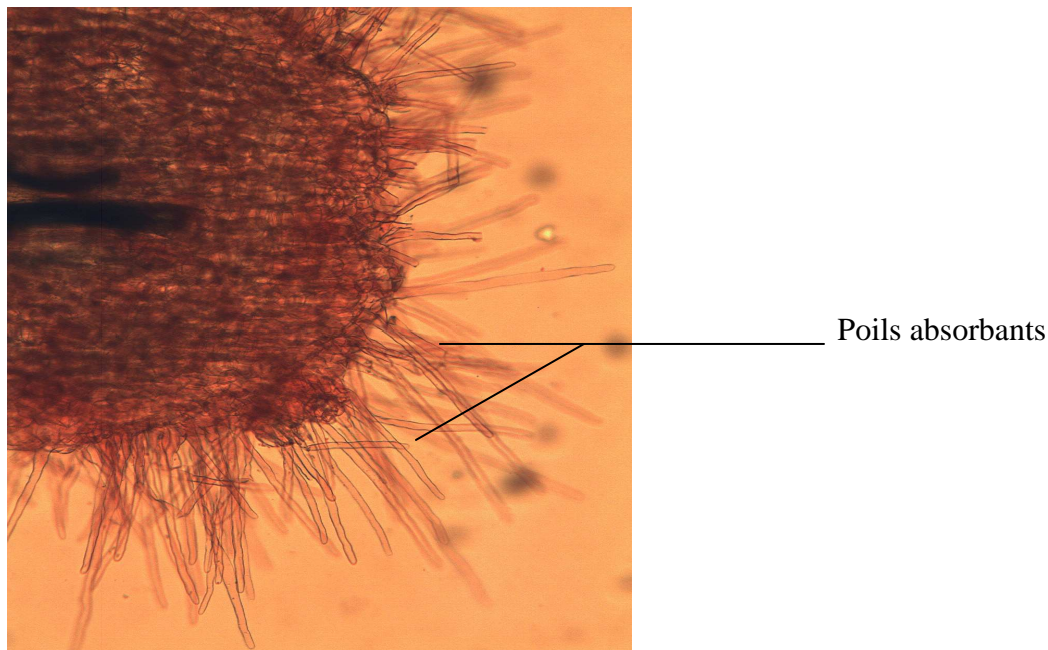


Figure 3.47 : Coupe transversale dans la racine d'*Aristolochia longa* L. obtenue par micropropagation (Gx40)

D'après AUGE et *al.* [3], les facteurs de réussite de l'acclimatation sont basés surtout sur le contrôle des conditions extérieures. Le mélange 2/3 tourbe et 1/3 sable (ou perlite) est fréquemment employé comme substrat d'acclimatation. En plus, l'humidité relative est l'un des facteurs les plus importants. Passant d'un micro-climat strictement contrôlé au climat d'une serre, le plant doit être placé le plus rapidement possible dans une atmosphère à humidité relativement élevée et bien contrôlée.

SKIRVIN [97] ajoute que, les stomates de jeunes feuilles cultivées *in vitro* demeurent constamment ouverts et laissent donc s'échapper l'eau de la transpiration de manière continue. Les risques de dessèchement sont très élevés. C'est pour cette raison qu'on recouvre les pots d'acclimatation par un film polyéthylène et on doit attendre la croissance de nouvelles feuilles fonctionnelles avant d'enlever progressivement la pellicule de recouvrement.

Avec certaines espèces tubérifères, il est quelquefois nécessaire de passer par une période de froid pour lever la dormance. En effet, les tubercules peuvent entrer en dormance après leur transfert en pot.

Les vitro-plants possédant un cal, au contact du milieu de culture présentent des vaisseaux du système racinaire mal raccordés à ceux de la tige. Ce qui peut expliquer des insuccès lors du transfert en pot [130].

Le plus souvent, les jeunes racines formées en tubes ont un rhizoderme non subérifié. Lorsqu'elles sont placées au contact du substrat de culture, elles se dessèchent et meurent. Il faut attendre la formation de nouvelles racines pour que la plantule s'alimente normalement. Pendant cette phase, nous devons éviter le dessèchement des plantes en les plaçant en atmosphère confinée (humidité relative) pendant une à trois semaines et surveiller un développement éventuel de maladies. Les plantes peuvent être progressivement traitées comme celles issues d'une multiplication traditionnelle [132].

## CONCLUSION

Au terme de ce travail, l'objectif que nous nous étions proposé au départ a été atteint, au moins en partie, puisque nous avons pu mettre au point un protocole complet de la micropropagation de *Aristolochia longa* L. *in vitro*.

Les résultats obtenus lors de nos essais et ceux obtenus sur d'autres essais relatifs à la stérilisation du matériel végétal ont montré l'importance de la désinfection pour l'obtention d'une culture stérile. Dans nos essais, Les contaminations les plus courantes observées ont été d'origine fongique et bactérienne. La détermination d'une méthode de désinfection où le taux de contamination est très faible (8.33%) est basé sur l'utilisation du chlorure mercurique à une concentration de 0.5 mg/l pendant 10 minutes. Il s'avère plus efficace que l'hypochlorite de calcium.

Les résultats que nous avons obtenus montrent qu'à partir des explants d'*Aristolochia longa* L., deux modes de micropropagation sont réalisables :

- La micropropagation par voie directe
- La micropropagation par voie indirecte

En ce qui concerne l'organogenèse par voie directe, la multiplication des explants de tiges a permis de conclure que :

Le milieu de culture Murashige et Skoog (MS) s'est avéré efficace dans notre cas pour toutes les étapes de multiplication. Cette espèce est caractérisée par une grande capacité au bourgeonnement dans le milieu MS contenant 1.5 mg/l BAP + 0.5 mg/l ANA. L'élongation est favorisée sur un milieu MS additionné au GA<sub>3</sub> avec une concentration de 1.5 mg/l et 0.5 mg/l BAP. Pour la rhizogenèse, les résultats ont montré que l'enracinement s'améliore après un mois de l'introduction primaire dans le milieu MS, en présence de l'AIA à 1mg/l.

En ce qui concerne la micropropagation par voie indirecte, pour l'induction des cals à partir des explants de feuilles sur le milieu MS avec des variations hormonales, nous pouvons conclure que :

La variabilité de la callogenèse vis-à-vis des explants dépend de deux facteurs :

- En premier lieu : le type et la concentration des hormones de croissance utilisées.
- En deuxième lieu : les conditions de culture et plus précisément la photopériode.

Ces résultats mettent en évidence la grande aptitude de la callogenèse des feuilles dans le milieu MS contenant 1 mg/l BAP + 1 mg/l ANA, cultivé pendant 20 jours à l'obscurité. Cependant, la phase de l'allongement a montré que le transfert des vitro-plants obtenus sur un milieu sans hormone ou additionné à 1 mg/l de GA<sub>3</sub> peut donner une très bonne élongation. En ce qui concerne la phase de l'enracinement, le milieu sans hormone a pu induire l'apparition des racines.

Cependant, *Aristolochia longa* L. fait partie des espèces qui présentent un phénomène de vitrification des pousses feuillées, qu'il faut réduire en utilisant une solution diluée et de faibles concentrations hormonales.

En tenant compte des conditions de culture optimales, la capacité au bourgeonnement des explants soit par voie directe ou indirecte, diminue au cours du transfert d'une sub-culture à l'autre.

La micropropagation d'*Aristolochia longa* L. par voie directe a permis d'obtenir un nombre élevé de clones conformes aux pied-mères adultes sélectionnés. Ainsi, la pré-acclimatation des plantules obtenues par cette voie a marqué plus de succès que des plantules obtenues par voie indirecte. Pour résoudre ce problème, la mise en place d'une serre appropriée suffirait à la solutionner.

Si les résultats sont encourageants et ouvrent de belles perspectives, le travail reste néanmoins à approfondir. Par l'étude de :

- Sa reproduction
- Sa multiplication par graines.
- Des coupes histologiques et des analyses histochimiques plus approfondies des cals et des explants seraient nécessaires pour montrer plus précisément les étapes de la formation des bourgeons et des racines.

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. Paris. R.R « Précis de Matière Médicale » Masson, Paris, 1976
2. Boullard. B « Plantes Médicinales du monde réalités et croyances» édition Estem, 2001, pp.660.
3. Auge. R. et al. « La culture *in vitro* t des applications horticoles » Lavoisier, 1989.
4. Belloued. A « Plantes médicinales d'Algérie » office des publications universitaire, Alger, 1976, pp. 277.
5. Baba-aissa. F « Encyclopédie des plantes utiles, flore d'Algérie et du Maghreb ; substances végétales d'Afrique » édition moderne Rouiba, Algérie, 1999.
6. Matthioli. P.A « De plants epitome utilissima » Francfort, 1586.
7. Blanc-daire. L « Plantes et régimes» édition Nathan, 1983, pp.207.
8. Belin . H « Pivres herbo, botaniques », Paris, 2003, pp.655.
9. Schauenerg et al. « Guide des plantes médicinales» édition Delachaux et Niestlé, Paris, 1977, pp.360.
10. Arihiro. K, Inai.K. « Diagnostic Transmission Electron Microscopy of Tumors» Erlandson ,2002. pp.893-901.
11. Jourdan. A.J.L « Pharmacopoea universalis » Landes industrie comptoirs, 1830, pp.762.
12. Wu. T. S « Terpenoids of *Aristolochia* and their biological activities » National Cheng Kung University, Tainan, Taiwan, Septembre2004,pp.596-624
13. El-Antaki. D.B.O « تذكرة اولى الالباب و الجامع للعجب العجائب الجزء » volume 1, édition bibliothèque culturelle, Beyrouth, 1978,pp.206.
14. Ibn El-baytar. F « الجامع لمفردات الادوية و الاغذية» volume 1, édition dar el dawa, beyrouth, 1982, pp.179.
15. Ibn Sina. A « القانون في الطب » 3<sup>ème</sup> édition, Beyrouth, 1983, pp.336.
16. Bruneton. J « Pharmacognosie : élément de phytochimie et pharmacognosie » 3<sup>ème</sup> édition, TEC et DOC, Paris, 1999, pp.1990.
17. Zhou. S, Koh. H.L, Gao. Y, Gong. Z.Y, Lee. E.J « Herbal bioactivation : the good, the bad and the ugly » life sciences, vol. 74, January 2004, pp.935-968
18. Yuan. J et al. « Simultaneous determination of nine aristolochic acid and analogues in medicinal plants and preparations by high-performance liquid

chromatography» state key laboratory of chemo/biosensing & chemometrics, chemistry & chemical engineering college, hunan university, changsha, china, 2007, pp. 644-650.

19. Wu et al. « Complexities of the herbal nomenclature system in traditional Chinese medicine (TCM): Lessons learned from the misuse of Aristolochia-related species and the importance of the pharmaceutical name during botanical drug product development» Center for Drug Evaluation and Research, FDA, Silver Spring, USA, 2007, pp.273-279.
20. Lechevalier. P « Arbre et fleurs de pleine terre » vol2. Paris, 1952, pp.384.
21. Vries. L « French-English, Science dictionary for students in agricultural» edition MC Graw-Hill, iniversité du Michigan, 1962,pp. 655.
22. Maire. R. «Flore de l'Afrique du nord » édition Paul Lechevalier , volume VIII, Paris ,1961,pp.216-221.
23. Heywood. G.J «Flowering plants of the words» Batsford, London, 1971, 336 pp
24. Mulder. Ch « Aristolochiaceae » Laboratory of Palaeobotany and Palynology, Utrecht University, Utrecht, The Netherlands, 2003, pp. 47-55.
25. Carla S. Francisco. C.S, Messiano . G.B, Lopes. L. M, Aristeu G. Tininis. A.G, Oliveira. J.E , Lindolpho Capellari Jr. « Classification of Aristolochia species based on GC–MS and chemometric analyses of essential oils »Phytochemistry 69, 2008, pp. 168–175
26. Gicunochet. M. « Flore de France » édition centre national de la recherche scientifique, volume3, fascicule 3, Paris, 1978, pp.858.
27. Quezel. P, Santa. S « Nouvelle flore de l'Afrique et des régions désertiques méridionales » centre national de la recherche scientifique, Paris, 1962, pp.283
28. Walter. S et al. « Botanique Systématique, Une perspective phylogénétique » ISBN, Boeck université, 2001, pp.173.
29. Cronquist. A et al. « Integrated system of classification of flowering plants » edition Columbia University Press, 1981.
30. Boullard. B « Plantes et champignons : dictionnaire» édition Estem Botany, 1997, pp.653.
31. Hutchinson. J «The families of flowing plants»Clarendon, Press Oxford, 1973, pp.510.
32. Hou. D « Flora of Taiwan, editorial Committee of the flora of Taiwan» volume2, Taipei, Taiwan, 1996, pp.637.



33. Battandier et al. « Flore analytique et synoptique de l'Algérie et de la Tunisie » édition Giralt, Alger, 1902, pp.460.
34. Depascual. J et al. « Lipid components of *Aristolochia longa* » university of Salamanca, Spain, Juin 1983, pp.461-462.
35. Panda. H « Medical plants, cultivation and their uses » édition national institute of industrial, 2000, pp.196.
36. Gildemeister. E et al. « Botanique systématique, une perspective, les huiles essentielles » édition J-B Balliere et fils, paris, 1922
37. Huard. D, Huard. I « Les huiles essentielles : l'aromathérapie » Quebecor, 1994, pp.200.
38. Kaiser. R « Meaningful scents around the world Olfactory, chemical, biological » édition John Wiley et sons, university du Michigan, 2006, pp.304
39. Francisco. C.S « Classification of *Aristolochia* species based on GC-MS and chemometric analyses of essential oils » instituto de quimica, universidade esludual paulista, UNESP, Brazil, 2008, pp.168-175.
40. Depascual. J et al. « Monoterpene derivatives from the essential oil of *Aristolochia longa* » university of Salamanca, Spain, Mars 1983, pp.2753-2754.
41. Farrer-Halls. G « The aromatherapy, Bible the definitive guide of using essential oils » edition Sterling, 2005, pp.400
42. Buckingham. J « Dictionary of natural products » édition CRS Press, 1993, pp.8584.
43. Raven. P.H et al. « Biologie végétale » édition Eichlorn, 2000, pp.968.
44. Roberts. M.F, Wink. W « Alkaloids, biochemistry, ecology and medical application » edition Springer, 1998, pp.508.
45. Shi. L.S et al. « The alkaloids and other constituents from the root and stem of *Aristolochia elegans* » department of chemistry, national Cheng Kung University, Tainan, Taiwan, 2004, pp.439-446.
46. Mix. D.B, Guinaudeau. H « Determination of aristolochic acids in medical plant and herbal production by liquid chromatography » Nat. Prod , 1982, pp.657.
47. Yuan. J et al. « Simultaneous analysis of six aristolochic acids and five aristolactams in herbal plants and their preparations by high-performance liquid chromatography-diode array detection-fluorescence detection » state key laboratory of chemo/biosensing & chemometrics, chemistry & chemical

engineering college, hunan university, changsha, china, February 2008, pp. 85-92.

48. Depascual. J et al. « An aristolochic acid derivative from *Aristolochia longa* » university of Salamanca, Spain, Mars 1983, pp.2745-2747.
49. Ioset. J-R et al. «Detection of aristolochic acid in Chinese phytomedicines and dietary supplements used as slimming regimens» institut de pharmacognosie et phytochimie, BEP, university de Lausanne, switzerland, july 2003, pp.29-36.
50. Wu et al. « Stereoselective synthesis of piperamide alkaloids by a modified ramberg –bäcklund reaction» State Key Laboratory of Applied Organic Chemistry, College of Chemistry and Chemical Engineering, Lanzhou University, Lanzhou, 1994, pp.631-634.
51. Hsieh et al. «Determination of aristolochic acid in chinese herbal medicine by capillary electrophoresis with laser-induced fluorescence detection» department of medicine, Taipei medical university, Taipei, Taiwan, 2006, pp.127-134.
52. Kumar. V et al. « Naturally occurring aristolactams, aristolochic acids and dioxoaporphines and their biological activities » Bioorganic Laboratory, Department of Chemistry, University of Delhi, India, Octobre, 2003, pp.565-583.
53. Kupchan. S.M et al. «Tumor inhibitors, I, aristolochic acid, the active principle of *Aristolochia indica* » Department of Pharmaceutical Chemistry, University of Wisconsin, Wisconsin, May 1962. pp.657
54. Munavalli. S, Viel. C « Chemical, taxonomic and pharmacological study of Aristolochiaceae» Ann Pharm, France, 1969, pp.449-464.
55. Gadhi. C.A « Anti-helicobacter pylori activity of *Aristolochia paucinervis* Pomel extracts » laboratory of phytochemistry en medicinal plants, department of biology, faculty of sciences semlalia, university cadi ayyad, marocco, 1999. pp. 203-205.
56. Robish. G et al. « Aristolochic acid is a direct mutagen in *Salmonella typhimurium* » Mutat press, Octobre 1982, pp.105-201.
57. Chakrabarty. A et al. « Aristolochic acid an antifertility agent is non-mutagenic to bacterial system» Indian Institute of Chemical Biology Jadavpur, Calcutta, 1987, pp.26-31.
58. Feri.H, Wurgler. F.H and Juon. H « *Experientia* », 1983, pp. 33- 685.
59. Myakado .M, Miyakado. M, Yanagi. K and Watanabe. K, *Jpn. Kokai Tokyo Koho JP 60, 209, 502,(85, 209, 502)*, 4pp. (*Chem.Abstr.*, 1986, 104, 47184).

60. Poon. W.T et al. « Aristolochia acid nephropathy : the hong kong perspective » volume 9, issue1, edition hong kong journal of nephrology, April 2007, pp.7-14.
61. Shamma. M et al. « Isoquinoline alkaloids » Plenum, New York , 1978,
62. Castedo. L « In the alkaloids » volume39, brossi academic, new york, 1990, pp.39-99.
63. Rosenmund. H, Reichstein. T , *Pharm. Acta Helv.* 18,1943, pp. 243
64. Stiborova. M, Fernando. R. C, Schmeiser. H.H « Characterization of DNA adducts formed by aristolochic acids in the target organ (forestomach) of rats by <sup>32</sup>P-postlabelling analysis using different chromatographic procedures » *Carcinogenesis*, Oxford University Press, 15, 1994, PP.1187-1192..
65. Himosu J et al. « Cytotoxic and antimicrobial principles from roots of *Aristolochia longa* », 1990
66. Rwangabo. P.C, Anton. R « La Médecine traditionnelle au Rwanda » KARTHALA, 1993, pp. 258.
67. Fluck. H « Petit guide panoramique des herbes médicinales » Delachaux, Paris, 1977, pp.187.
68. Zryd. J.P « Cultures de cellules, tissus et organes végétaux » Presses polytechniques Romandes, 1988.
69. Tourte. Y « Génie génétique et biotechnologie » édition Dunod, Paris, 2002. 2002
70. Haicour. R « Biotechnologie végétales, Techniques de laboratoire » Lavoisier, Paris, 2002.
71. Doré. C, Varoquaux. F « Histoire et amélioration de cinquante plantes cultivées » édition Quae, 2006.
72. Margara. J « Bases de la multiplication végétative, Les méristèmes et l'organogenèse » INRA, Paris, 1982.
73. Neil. A et al. « Biologie » édition Boeck Université, 2006, pp.1482.
74. Raven. P.H et al. « Biologie végétale » Boeck Université, 2003, pp.968.
75. Kyte. L, Kleyn. J.G « Plants from test tubes, an introduction to micropagation » edition Timber Press, 1996, pp.240.
76. Debergh. P.C, Zimmerman. R.H « Micropropagation technology and application » 2DITON Kluwer Academic, 1991, pp. 512.
77. Chaussat et al. « La multiplication végétale des plantes supérieures » édition Gauthier-Villars, 1980, pp.277.

78. Gautheret. R.J « La culture des tissus végétaux, techniques et réalisations » édition Masson, 1959, pp.863.
79. Gallais. A, Bannerot. H « Amélioration des espèces végétales cultivées, objectifs et critères de sélection » édition Quae, 1992, pp.768.
80. Lafon. J.P et al. « Biologie des plantes cultivées » Tome 2, édition Technique et Documentation Lavoisier, 1998, pp.150.
81. Hopkins. G « Physiologie végétale » édition Boeck Université, 2003.
82. Kalm. A « Les plantes transgénétiques en agriculture » édition John Libbey Eurotext, 1996.
83. Chlyah. H, Demarly. Y « Le progrès génétique passe-t-il par le repérage et l'inventaire des gènes? » troisièmes journées scientifiques du réseau Biotechnologies végétales, Rabat, publié par John Libbey Eurotext , 1993, pp.259.
84. Bajaj. Y.P.S « High-tech and Micropropagation » Birkhäuser, 1997, pp.292.
85. Coacolou. J et al. « Multiplication végétative et culture des plants in vitro » édition INRA, Paris, 1988, pp.
86. Guignard. J.L « Biochimie végétale » édition Dunod, Paris, 2000, pp. 274.
87. Gautheret. R.J « La culture des tissus végétaux, techniques et réalisations » édition Masson, 1959, pp.863.
88. Mok. W.S et al. « Cytokinins chemistry, activity and function » édition CRC Press, 1994, pp. 338.
89. Bulard. C « Acide Abscissique, structure, synthèse et métabolisme » édition Palais des académies, 1972, pp.42.
90. Nultsch. W « Botanique générale » édition Boeck université, 1998, pp.624.
91. Heller. R « Physiologie végétale, tome 2 développement » édition Masson, paris, 1982, pp.215.
92. Boxus. P.H « La maîtrise des techniques de multiplications *in vitro* : réalités et perspectives » édition annales de Gembloux, 1990, pp.33-42.
93. Dermalry. Y , Sibi. M « Amélioration des plantes et biotechnologie » édition J. Libbery, Madison, 1989, pp. 160.
94. CIDES « Cahier de références techniques : micropropagation pour entreprise serricole » Centre d'Information et de Développement Expérimental en serriculture , 1999.

95. Murashige. T, Skoog. F «A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures» *physiol. Plant* 15, 1962, pp.473-497.
96. Skoog. F, Miller. C.O « Chemical regulation of growth and organ formation in plant tissues cultured in vitro» *symp, soc, exp, boil*, 1957, pp.118-130.
97. Skirvin. R.M « Introduction to horticulture » *Stripes Pub*, 2004, pp.425.
98. Gabe.M « Techniques histologiques » *Masson*,1968, pp.1113.
99. Dagnelie. P « Statistique théorique et applications » *Boeck université*, 2007, pp.512.
100. Bouderrah, M « Comparaison de deux modes de vitro propagation à partir de vitro semis d'eucalyptus camaldulentsis provenance » 1988
101. Meyneir.V « Application de quelques techniques de multiplication in vitro à la propagation végétative du Noyer *Dea* biologie et physiologie végétale » *Université NANCY* , France, 1982, pp.48.
102. Gautheret. R « La culture des tissus végétaux» édition *Masson*, Paris, 1959, pp.863
103. Bajaj. Y.P .S «Biotechnology in agriculture and forestry: high-tech and micropropagation» édition *Springer*, 1997, pp. 133.
104. Ait chitt. M « Problèmes rencontrés en culture *in vitro* du palmier (*Phoenix dactylifera* L.) par la technique d'organogenèse » *In compte rendu du deuxième séminaire maghrébin sur la multiplication rapide du Palmier dattier*, Institut National de la Recherche Agronomique, Marrakech, Morocco, 9-12 octobre 1989, pp.27-36.
105. Boxus. P.H « La maîtrise des techniques de multiplication in vitro : réalités et perspectives » *Annales de Gembloux*, 96, 1990, pp.33-42.
106. Selvakumar V, Balakumar. T., 2006 « In vitro propagation of the medicinal plant *Aristolochia indica* L. through nodal explants» *University of Florida*, pp.3019
107. Bravo. C, Yormann. G, Liorente. B « Micropropagation of *Aristolochia fimbriata*» *Congress medical and aromatic plants*, 1997, pp. 502.
108. Hedman. Y «Studies of root formation of micropropagated shoots *in vitro* and cuttings from light treated mother plants *ex vitro* of Manchurian Dutchman's pipe (*Aristolochia anshuriensis*)» *Horticultural Science, ALNARP*, 2005, pp.36.
109. Wright. K, Northcote. D « Differences of ploidy and degree of intercellular contact in differentiating and non differentiating sycamore calluses» *J. Cell.Sci*, 12, 1973, pp.37-53.

110. Sacristan. M, Melchers. G « The caryological analysis of plants regenerated from tumorous and other callus cultures of tabacc» Molecular and General Genetics MGG, Springer Berlin / Heidelberg, 1969, pp.317-333.
111. Quoirin. M, Boxus. Ph, Gasper. Th « Root initiation and isoperoxidases of stem tip cutting from mature *Prunus* plants» *physiologie végétale* 12, School of Agriculture, Aristotle University Thessaloniki, Greece, 1974, pp.165-174.
112. Druart. P, Kevers. C, Boxus. Ph, Gasper. Th « *In vitro* promotion of root formation by apple shoots through darkness effect on endogenous phenols and peroxidases » *Z. P. flanzensphysiol* 108, 1983, pp.429-3-436.
113. Morel. G, Muller. J.F «La culture *in vitro* du méristème apical de la pomme de terre» *C.R.* 258, 1964, pp.5250-5252.
114. Gallais A, Bannerot. H. « Amélioration des espèces végétales cultivées, objectifs et critères de sélection » édition Quae, pp.768.
115. Selvakumar. V, Balakumar. T « *In vitro* propagation of the medicinal plant *Aristolochia indica* L. through nodal explants» university of Florida, 2006, pp.3019.
116. Leifert. C, Ritchie. J.Y, Whites. W.M « Contaminants of plant tissue and cell cultures» *world J. microbial and biotech.* 7, 1991, pp.542-469.
117. Moncousin. C «Rooting of in vitro cuttings. In biotechnology in agriculture and forestry, high tech and micropropagation » vol.17, Bajaj, Springer-Verlag, Berlin, 1991, pp.231-261.
118. Auderset. G, Gavillet. S, Michel. J, ribaux. M «Histological analysis and the evolution of biochemical markers during the in vitro rooting of *Me domestica* » *Borekh, Jork* 9, *Adv, Hort.Sci.*8, 1984, pp.5-10.
119. Favre. J.M « La rhizogenèse, aspects divers d'un processus d'organogenèse végétale» uni, Paris, 1977, pp.37-52.
120. Hartmannht. T, Kester. D.E « Plant propagation principales and practices »Hall, INC, Engenvod, Chiffs N.S, USA 4, 1993, pp. 727.
121. Lutz. A« L'expression de la variabilité morphologique après régénération dans le cultures de tissus et de cellules» *Bulletin Scientifique botanique* 132, France, 1985, pp.35-50.
122. Nozeran. R «L'expression de la variabilité dans les cultures d'organes » *Actualités botaniques*, Paris, 1985, pp.11-21.

123. Thorpe. T.A, Gasper. Th « Changes in isoperoxidases during shoot formation in tobacco callus» *in vitro* 14, 1978, pp.522-526.
124. Negrutiu. T, Jacobs, Gasper. Th« Leaf formation from *arabidopsis callus*» *Z.P. flenzenphysiol.* 91, 1979, pp.119-126.
125. Gaspar. Th, Kevers. C, Debergh. R « Vitrification: morphological, physiological and ecological aspects, in : cell and tissue culture in forestry» volume1, general principles and biotechnology, edition: Bonga, Dordrecht, 1987, pp.152-166.
126. Buvat. R «Recherches sur la dédifférenciation des cellules végétales» thèse, édition Mason, Paris, 1944, pp.228.
127. El Maâtaoui M., Espagnac H., Michaux–Ferrière N «Histology of callogenesis and somatic embryogenesis induced in stem fragment of cork oak (*Quercus suber*) cultured *in vitro* ». *Ann. Bot.* 66, 1990, pp. 183–187.
128. Verdeil J.L., Buffard-Morel J. et Pannetier C. « Embryogenèse somatique du Cocotier (*Cocos micifera* L.) à partir de tissus foliaires et inflorescenciels -Bilan des recherches et perspectives ». *Oléagineas*, 44, 1989, pp. 403-411
129. Jones. O.P « Effect of phloridzin and phloroglucinol on apple shoots» *nature* 626, 1976, pp.392-393.
130. Gaspar. Th, Smith. D, Thorpe. T «Arguments supplémentaires en faveur d'une variation inverse du niveau auxinique endogène au cours des deux premières phases de la rhizogenèse» *C.R. Acad. Sci. Série D* 285, Paris, 1977, pp. 327-330
131. Crevecoeur. M, Kevers. c, greppin. H, Gasper. Th « A comparative biotechnical and cytological characterization of normal and habituated sugarbeet calli » *Biologia Plantarum*19, 1987, pp.1-6.
132. Lee. N, Wetzstein. H.Y, Sommer. H. E « Effect of quantum flux density on photosynthesis and chloroplast ultrastructure in tissue-cultured plantlets and seedling of *liquidambar styraciflua* L. towards improved acclimatization and field survival » *plant physiology* 78, 1985, pp.637-641.

## APPENDICE A

Tableau 1 : la variance de la longueur moyenne de la tige après 40 jours de culture

<i>Source des variations</i>	<i>Somme des carrés</i>	<i>Degré de liberté</i>	<i>Moyenne des carrés</i>	<i>F</i>	<i>Probabilité</i>	<i>Valeur critique pour F</i>
Entre Groupes	27,286	4	6,821	2,511	0,074	2,866
A l'intérieur des groupes	54,325	20	2,716			

Tableau 2 : la variance du poids frais des cals après 40 jours.

<i>Source des variations</i>	<i>Somme des carrés</i>	<i>Degré de liberté</i>	<i>Moyenne des carrés</i>	<i>F</i>	<i>Probabilité</i>	<i>Valeur critique pour F</i>
Entre Groupes	1,312	3	0,437	1,346	0,294	3,238
A l'intérieur des groupes	5,197	16	0,325			

Tableau 3 : la variance de l'allongement moyen des vitro-plants après 40 jours de culture

<i>Source des variations</i>	<i>Somme des carrés</i>	<i>Degré de liberté</i>	<i>Moyenne des carrés</i>	<i>F</i>	<i>Probabilité</i>	<i>Valeur critique pour F</i>
Entre Groupes	31,525	4	7,881	1,570	0,220	2,866
A l'intérieur des groupes	100,384	20	5,019			



## APPENDICE B

### LISTE DES SYMBOLES ET DES ABREVIATIONS

- AIA : Acide Indole -3 Acétique
- AIB : Acide Indole Butyrique
- ANA : Acide Naphtalène Acétique
- App : APPENDICE
- APS : Acide Périodique et Schiff
- BAP : Benzyladénine = 6-Benzyl AminoPurine
- 2-4D : Acide 2-4 Dichlorophénoxyacétique
- ENARP : Entreprise National d'Aménagement des Réserves des Parcs nationaux et de loisirs
- FAA : Formol, Alcool, Acide acétique
- GA<sub>3</sub> : Acide Gibbérellique
- IPA : IsoPentenylAminopurine
- Kin : Kinétine = 6-furfuryl-aminopurine
- LRZA : Laboratoire des Recherches des Zones Arides
- M : Milieu
- MS : Murashige et Skoog
- Ra : Rayé
- Rét : Réticulé
- Pon : Ponctue
- SbC : Sub-Culture
- Spi : Spirale

## APPENDICE C

### ❖ *Préparation de l'acide périodique Schiff (APS) :*

- 1 g de fushine basique dans 200 ml d'eau bouillante, laisser refroidir à 50°C, puis filtrer.
- A 30 °C, ajouter 2g de métabisulfite de sodium anhydre et 20 ml d'HCL (N).
- Laisser reposer 24 heures dans un flacon hermétique et à l'obscurité
- Ajouter 0.5 g de charbon actif, agiter et filtrer rapidement.

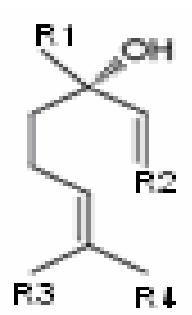
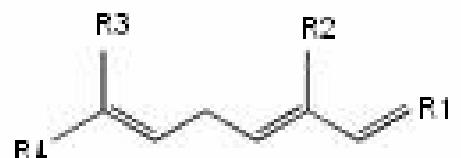
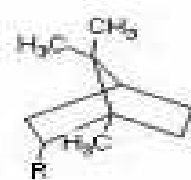

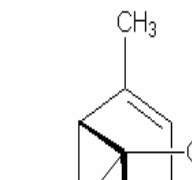
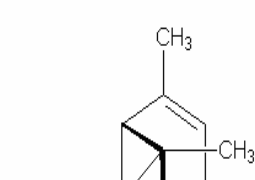
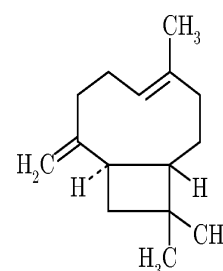
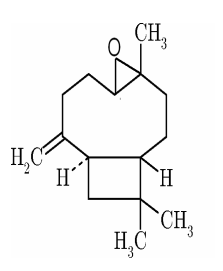
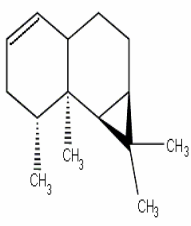
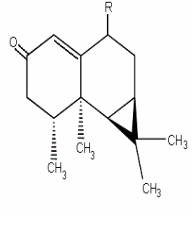
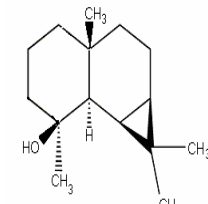
A utiliser à l'abri de la lumière.

### ❖ *Préparation de l'aniline blue black :*

Naphtol blue black à 1% dans 7 % d'acide acétique.

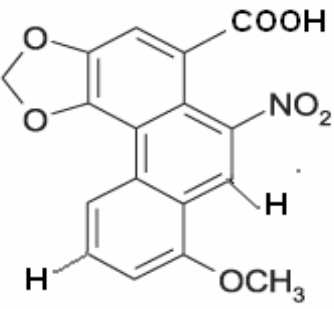
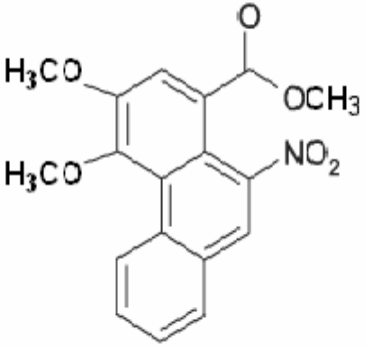
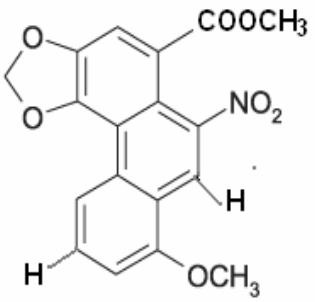
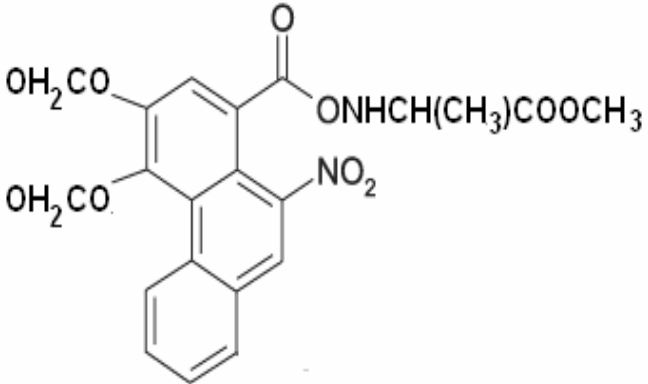
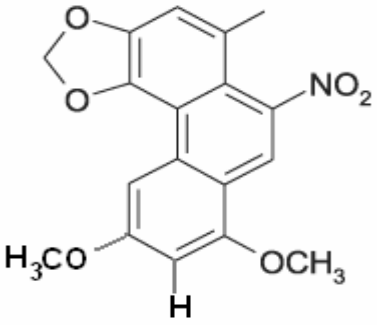
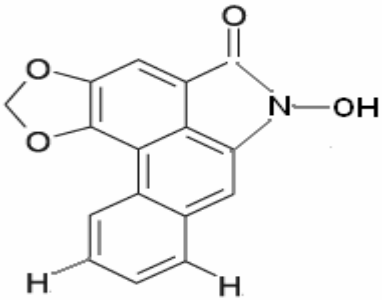
## APPENDICE D

Tableau 4: Structure chimique des huiles essentielles chez d'*Aristolochia longa* L.

Monoterpanoïdes acycliques				
 <p style="text-align: center;">R<sub>1</sub>=R<sub>3</sub>=R<sub>4</sub>=CH<sub>3</sub> R<sub>2</sub>=CH<sub>2</sub></p> <p style="text-align: center;">Linalool -(s)</p>	 <p style="text-align: center;">R<sub>2</sub>=R<sub>3</sub>=R<sub>4</sub>=CH<sub>3</sub> R<sub>1</sub>=CH<sub>2</sub></p> <p style="text-align: center;">Ocimene-β</p>			
Monoterpanoïdes bicycliques				
Camphanes		Pinanes		
 <p style="text-align: center;">R=COCH<sub>3</sub></p> <p style="text-align: center;">Bornyl acétate</p>	 <p style="text-align: center;">Bornanol</p>	 <p style="text-align: center;">Pin-2-en-8-ol</p>	 <p style="text-align: center;">8-Acétoxy-pin-2-ene</p>	
Sesquiterpanoïdes				
Caryophyllanes		Aristolanes		
 <p style="text-align: center;">β-Caryophyllene</p>	 <p style="text-align: center;">Caryophyllene oxyde</p>	 <p style="text-align: center;">Δ-Aristolene (calarene)</p>	 <p style="text-align: center;">Δ-arestone (2-oxocalarene)</p>	 <p style="text-align: center;">Maaliol</p>

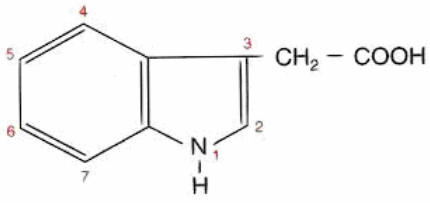
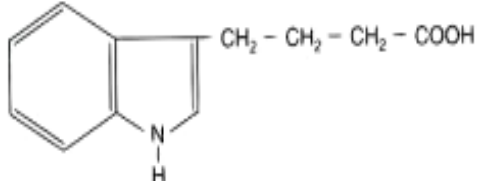
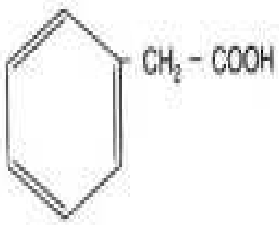
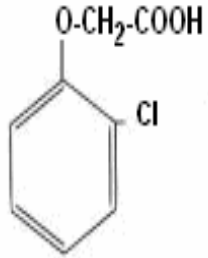
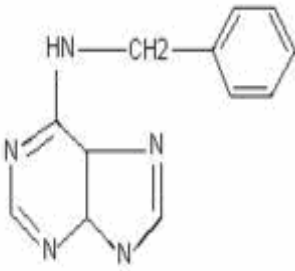
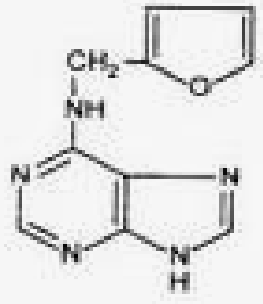
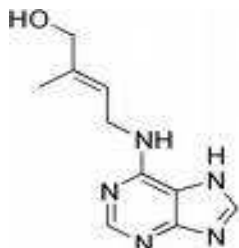
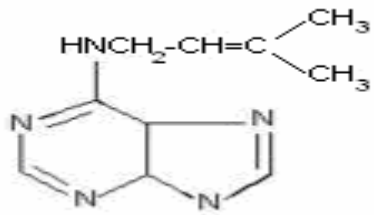
## APPENDICE E

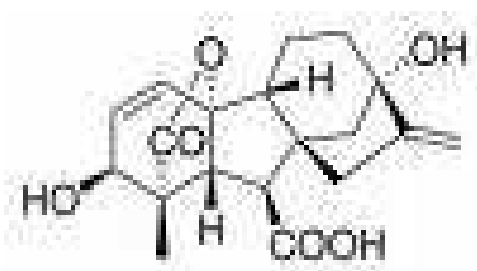
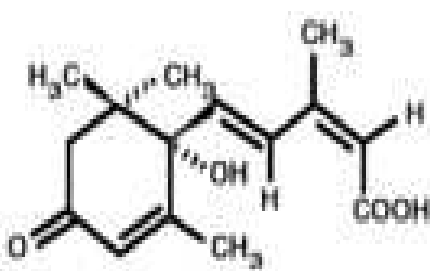
Tableau 5: structure chimique des acides aristolochiques et l'aristolactame la isolées à partir d'*Aristolochia longa* L.

Les acides aristolochiques		
		
Acide aristolochique I	Acide aristolochique II	Acide aristolochique III
		
Acide aristolochique IV methyl ester	2-Phenanthro-[3.4- <i>d</i> ]-1.3-dioxole-6-nitro-5-carboxamidopropanoique methyl ester	
Aristolactames		
		
Aristolactame Ia		

## APPENDICE F

Tableau 6: Structure chimique des hormones de croissance

Les auxines	
 <p><b>Acide indole 3- acétique (AIA)</b></p>	 <p><b>Acide indole butyrique (AIB)</b></p>
 <p><b>Acide naphthalène acétique (ANA)</b></p>	 <p><b>Acide 2-4 dichlorophénoxyacétique (2-4D)</b></p>
Les cytokinines	
 <p><b>6-Benzyl aminopurine (BAP)</b></p>	 <p><b>Kinéine</b></p>
 <p><b>Zéatine</b></p>	 <p><b>Isopentenylaminopurine.</b></p>

Gibbérelline	Acide abscissique
 <p style="text-align: center;"><b>GA<sub>3</sub></b></p>	

**APPENDICE G**  
**ETAPES DE PREPARATION DES COUPES HISTOLOGIQUES**



Déshydratation des organes



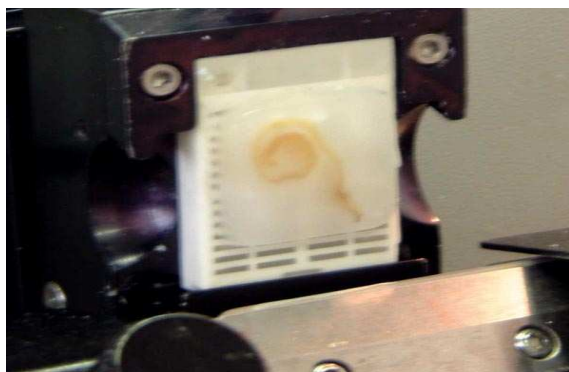
Un moule est rempli de paraffine liquide



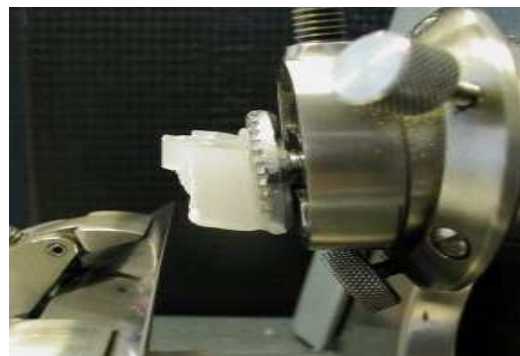
Le prélèvement est mis en place



Démoulage, après refroidissement



Mise en place du bloc sur le microtome des cassettes et des blocs





Confection des coupes : le ruban



Etalement sur lame



Coloration



## GLOSSAIRE

- *Cal* :

le cal qui se produit à la suite d'une blessure est un tissu cicatriciel généralement homogène formé de cellule se divisant activement

En culture *in vitro*, le cal est un tissu de néoformation produit par l'explant initial ou à la suite de repiquage successifs.

Sa formation résulte à la fois de la levée d'inhibition consécutive à la séparation de l'explant et de l'action excitatrice des substances tropiques (milieu minéral, sucres ....) et des régulateurs de croissance (auxines, cytokinines....) du milieu de culture.

Le cal peut être localisé au niveau des blessures ou s'étendre à des régions indemnes. Sa croissance peut être indéfinie au cours des repiquages. Il peut être homogène ou hétérogène, son hétérogénéité pouvant être initiale, provenant de l'hétérogénéité des tissus de l'explant ou secondaire. Il peut produire notamment des formations cribrovasculaires ou des ébauches méristématiques. Le cal peut être à croissance active ou lente, homogène ou nodulaire, plus ou moins dissocié ou compact, incolore ou plus rarement chlorophyllien ou anthocyane.

- *Callogenèse* :

Néoformation d'un cal

- *Caulogenèse* :

Ce terme signifie, étymologiquement, formation d'une tige. Mais il est communément employé pour désigner la formation des bourgeons à l'origine des tiges feuillées. Dans le cas de l'organogenèse *in vitro* il est souvent utilisé comme synonyme de néoformation de bourgeons.

- *Dédifférenciation cellulaire* :

Retour progressif de cellules différenciées vers l'état méristématique. Les cellules dédifférenciées comme les cellules méristématiques possèdent à des degrés divers les caractéristiques cytologiques des cellules embryonnaires : vacuome réduit, rapport « nucléo-plasmique » élevé, plastes peu différenciés ou proplastés .

Elles recouvrent l'aptitude aux divisions (activité mitotique). Elles peuvent devenir également capables d'exprimer la « totipotence » fondamentale de la cellule, en produisant à la suite de divisions successives des embryoides ou des proméristèmes

évoluant en méristèmes primaires de racine ou de tige. Elle est souvent favorisée par les conditions de la culture *in vitro*.

- *Différenciation cellulaire* :

Perte progressive des caractères cytologiques et physiologiques des cellules embryonnaires et acquisition des caractéristiques des cellules adultes, éventuellement liée à la spécialisation.

La cellule végétale adulte est généralement caractérisée par sa grande vacuole centrale, le rapport « nucléo-plasmique » faible.

- *Emménagogue* :

Stimulation du flux sanguin dans la région pelvienne et l'utérus.

- *Explant* :

Fragment d'organisme (apex, organe, fragment d'organe ou fragment tissulaire) excisé et éventuellement mis en culture *in vitro*.

- *Multiplication végétative* :

Synonyme de reproduction asexuée. Elle aboutit à la constitution de clones homogènes.

- *Néoformation* :

Formation de structures nouvelles : tissus, méristèmes, embryoides. La néoformation est l'aboutissement d'une dédifférenciation.

- *Organogenèse* :

Formation des organes. L'organogenèse végétative se situe essentiellement au niveau des méristèmes.

- *Rhizogenèse* :

Formation de racines

- *Totipotence cellulaire* :

Aptitude des cellules à exprimer la totalité des potentialités du génome. Cette aptitude se révèle dans les cas d'embryogenèse somatique.

Propriétés eutociques : qui est relatif à l'eutocie ; accouchement qui se déroule de façon normale.

- *Vulnérable* :

En médecine et en pharmacie qui aide à la guérison des blessures.

