

**UNIVERSITE DE BLIDA 1**

**Faculté des Sciences de la nature et de la vie**  
Département de Biologie et physiologie cellulaire

## **MEMOIRE DE MAGISTER**

En Biologie

Spécialité : Biotechnologie végétale

ORGANOGENESE DU CAPRIER *Capparis spinosa* L. ET ESSAI  
D'OPTIMISATION IN VITRO DE LA PRODUCTION DES POLYPHENOLS

Par

**Youmna MELZI**

Devant le jury composé de :

Mme. F. SAIDI	Professeur, U. de Blida 1	Présidente
Mme. C. CHAOUIA	MCA, U. de Blida 1	Examinatrice
Mme. S. BELHADJ	Professeur, U. de Djelfa	Examinatrice
M. M. S. HAMAI	Professeur, U. de Blida 1	Promoteur
Mme. F. HAMAI	MCA, U. de Blida 1	Co-promotrice

Décembre, 2015

## RESUME

Dans le cadre de la valorisation, la multiplication et la conservation d'une plante médicinale *Capparis spinosa* L. poussant spontanément à Hammam Melouane, un protocole d'organogenèse directe, à partir de culture des nœuds, a été réalisé avec succès sur milieu WPM additionnée de 1mg/l BAP et 0,1 mg/l AIA avec un taux de débourrement de 42,10% permettant l'obtention de pousses vigoureuse et suffisamment longues. La multiplication est optimale sur le même milieu contenant 1mg/l BAP + 0,05 mg/l AIA + 0,1 mg/l GA3. La régénération des pousses indirectement a été réussie après 4 semaines de culture sur milieu MS contenant 1mg/l BAP et 0,1 mg/l AIA après transfert des cals d'origine nodale.

L'étude histologique révèle que *C. spinosa* L. poussant à l'état spontanée possède une feuille isobilatérale et homobarique. Les vaisseaux conducteurs sont de diamètre important et les tissus de soutiens abondants. Les pousses normales régénérées in vitro sont de caractère juvénile tandis que celles touchées par le phénomène d'hyperhydricité présentent des altérations structurales principalement localisées au niveau de la feuille.

Certains cals développés à partir des explants nodaux ont une origine interne à savoir le cambium interfasciculaire, tandis que d'autres, principalement nodulaire, sont d'origine externe épidermique.

L'induction de la callogenèse à partir des disques foliaires a été concluante sur les deux milieux MS et B5 contenant une auxine forte le 2,4-D avec un taux de 100%. Le 2,4-D à une concentration de 1mg/l améliore le poids frais des cals ainsi que leur diamètre. Le milieu MS additionné de 1mg/l 2,4-D et 1,5 mg/l BAP favorisant la croissance des cals est retenu comme milieu de multiplication.

La teneur des cals de *Capparis spinosa* L. en polyphénols totaux est de  $55,3 \pm 0,61$  mg EAG/ g ES, un taux relativement faible par rapport à celui des feuilles récoltées en mois d'octobre qui est égale à  $112,2 \pm 1,81$  mg EAG/ g ES.

**Mots clés :** *Capparis spinosa* L., organogenèse, étude histologique, callogenèse, polyphénols.

## SUMMARY

As part of the valuation, multiplication and conservation of medicinal plant *Capparis spinosa* L. spontaneously pushing in Hammam Melouane, a direct organogenesis protocol from nodes culture, has been successfully maintained on Woody plant medium (WPM) containing 1mg/l BAP and 0.1 mg/l IAA with a bud rate of 42.10% and obtainment of robust and sufficiently long shoots. Multiplication is optimal on the same medium containing 1 mg/l BAP + 0.05 mg/l + IAA 0.1 mg/l GA3. Shoot regeneration indirectly was successful after 4 weeks of culture on MS medium containing 1 mg/l BAP and 0.1 mg/l IAA after transfer of the nodal calli.

Histological study revealed that *C. spinosa* L. pushing to spontaneous state has isobilateral and homobaric leaf. Drivers are large diameter vessels and abundant supporting tissues. Normal shoots regenerated in vitro have juvenile character whereas those affected by the phenomenon of hyperhydricity exhibit structural alterations mainly localized at the leaf.

Some callus developed from nodal explants, are interfascicular cambium original, while others, mainly nodular have epidermal tissue like origin.

Induction of callus from leaf discs was successful on both MS and B5 media containing high auxin 2,4-D with a rate of 100%. 2,4-D at a concentration of 1mg/l improves the fresh weight of callus and their diameter. MS medium supplemented with 1 mg/l 2,4-D and 1.5 mg/l BAP promoting the growth of callus was selected as multiplication medium.

The content of *Capparis spinosa* L. callus total polyphenol is  $55.3 \pm 0.61$  mg AGE/g DE, a relatively low rate compared to that of the leaves harvested in October which equal to  $112.2 \pm 1.81$  mg AGE / g DE.

**Keywords:** *Capparis spinosa* L., organogenesis, histology, callus, polyphenols.

## الملخص

عملا على التثمين، الاكثار والحفاظ على النبتة الطبية *Capparis spinosa* L. التي تنمو عفويا في منطقة حمام ملوان، تم وضع بروتوكول توالد مباشرة من العقد بنجاح على وسط WPM مضاف اليه 1 ملغ/ل BAP و 0.1 ملغ / لتر IAA مع معدل تبرعم 42.10% مع الحصول على براعم قوية وطويلة بما فيه الكفاية. تحصلنا على التكاثر الأمثل في نفس الوسط مضاف اليه 1mg/L BAP + 0,05 mg/L AIA + 0,1 mg/L GA3 وكان التوالد بشكل غير مباشر ناجح بعد 4 أسابيع من الزراعة على الوسط MS الذي يحتوي على 1 ملغ / لتر BAP و 0.1 ملغم / لتر IAA بعد نقل الكالوس الناتج عن العقد. وكشفت الدراسة النسيجية أن *Capparis spinosa* L. البري لديه ورقة *isobilatérale* و *homobarique*. الاوعية الناقلة للنسغ كبيرة القطر وأنسجة الدعم وفيرة العدد. النبيتات العادية المتحصل عليها في المختبر بعد زراعة العقد لا تحتوي على خصائص التناغم. أما النبيتات المتضررة من ظاهرة فرط التمثية فانها تعاني من تشوهات متمركزة أساسا في الورقة.

بعض الكالوس المتشكلة من العقد ذات أصل داخلي حيث يعتبر الكامبيوم هو المولد لها، والبعض الآخر، ذو أصل خارجي متمثل في البشرة.

كان تحريض الكالوس من الأقراص الورقية ناجحا في كل من الوسطين MS و B5 اللذان يحتويان على أوكسين قوية 2,4-D بمعدل 100%. 2,4-D بتركيز 1 ملغ/ل يحسن من الوزن الطازج للكالوس وقطرها. تم اختيار الوسط MS المضاف اليه 1 ملغ/ل 2,4-D ، و 1.5 ملغم / لتر BAP المعزز لنمو الكالوس كوسط للتكاثر.

محتوى كالوس *Capparis spinosa* L. للبوليفينول الكلي هو  $0.61 \pm 55.3$  ملغ EAG / غ ES، وهو معدل منخفض نسبيا مقارنة بمحتوى الأوراق التي تم اقتطافها في اكتوبر والمتمثل في  $112.2 \pm 81$  1 ملغ EAG / غ ES.

كلمات المفتاح: *Capparis spinosa* ، توالد الأعضاء، علم الأنسجة، الكالوس، البوليفينول.



## REMERCIEMENTS

Le présent travail est le résultat d'un soutien permanent et de nombreux encouragements d'un collectif de personne que je tiens à remercier amplement.

Plus particulièrement, M. M. S. HAMAIDI Professeur à l'université de Blida 1 et Mme Fella HAMAIDI, Maitre de conférences à l'université de Blida 1, qui ont accepté de m'encadrer. Je les remercie pour leurs encouragements, leurs conseils précieux et le temps qu'ils m'ont consacré.

Mes Vifs remerciements s'adressent à Mme Fairouz SAIDI, Professeur à l'université de Blida 1, qui a accepté de présider le jury de ce mémoire. Je tiens à la remercier chaleureusement d'avoir bien veillé au bon déroulement de notre formation de post-graduation.

J'exprime ma profonde gratitude et ma très grande considération à Mme Safia BELHADJ, Professeur à l'université de Djelfa, qui m'a fait l'honneur de juger ce travail.

Mes sentiments de reconnaissance vont à Mme Cherifa Chaouia, Maitre de conférences à l'université de Blida 1, qui a accepté d'examiner ce travail en l'enrichissant par son savoir et ses réflexions.

Je tiens à remercier vivement Mme Fatma-Zohra Chaouche, maitre de conférences à l'université de Blida 1, de m'avoir accueillie dans son laboratoire et de m'avoir fourni le matériel nécessaire pour la réalisation d'une partie importante de ce travail.

Merci à toute l'équipe du laboratoire de micro-propagation industrielle de l'unité Paysagisme et Espaces Verts (UPEV) de Bab Ezzouar, plus spécialement, Mme Wahiba, responsable du laboratoire in vitro, pour son orientation, M. Kamel, pour les quantités énormes des milieux de culture passées à l'autoclave, Mme Lila et Mme Nadia pour leur aide précieuse concernant la désinfection du matériel végétal.

Je tiens à remercier également, Professeur W. Ouahioune, Chef de service d'anatomie pathologique du CHU Frantz Fanon de Blida, de m'avoir ouvert les

portes de son laboratoire pour la réalisation de l'étude histologique. Merci, à D<sup>r</sup> M.A. MELZI pour ses conseils toujours pertinents, Dr. S. AHMED ALLEL et Dr. IFAIDI pour le protocole de déshydratation et la mise en bloc. Merci à M. ASSAD et M. M. AYAD de m'avoir appris l'art du microtome.

Merci à Nassima et Nabila mes camarades de promotion, pour l'entraide et la bonne ambiance. Merci à Lamia avec qui j'ai beaucoup apprécié le dosage des polyphénols.

J'adresse mes sincères remerciements à mes amis Zohra, Nadira, Réda, Manel et Imène qui étaient pour moi une source inépuisable de soutien moral. Merci à Chakib dont l'enthousiasme contagieux n'a jamais cessé de me pousser vers l'avant.

Je tiens à remercier infiniment ma famille qui m'a tant aimée et soutenue. Merci à ma chère Rose qui a toujours été là pour moi, à Lulu pour les débats interminables et à Aimene pour l'imagination et la créativité.

A la fin, Je ne peux achever mes remerciements sans une pensée particulière à mes parents qui ont fait de moi ce que je suis aujourd'hui : « Je ne vous remercierai jamais assez... »

*A la mémoire de mon grand-père,  
Homme de savoir, un révolutionnaire...*

*En hommage à mon père,  
Mon héros éternel...*

## TABLE DES MATIERES

RESUME	
REMERCIEMENTS	
TABLES DES MATIERES	
LISTE DES ILLUSTRATIONS ET TABLEAUX	
INTRODCUTION	6
1. ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE	9
1.1 Botanique du câprier épineux	9
1.1.1. Systématique	9
1.1.2. Description botanique	11
1.2. Ecologie et répartition géographique	14
1.3. Importance économique du Câprier	17
1.3.1. Propriétés nutritionnelles	17
1.3.2. Propriétés médicinales	19
1.3.3. Propriétés écologiques	26
1.4. Multiplication du Câprier	26
1.4.1. Multiplication par semis	27
1.4.2. Multiplication par bouturage	28
1.4.3. Multiplication in vitro	29
2. MATERIEL ET METHODES	34
2.1. Matériel végétal	34
2.2. Milieux de culture	39
2.3. Désinfection du matériel végétal	39
2.4. Organogenèse in vitro	41
2.4.1. Mise en culture	41
2.4.2. Néof ormation de pousses à partir des cals	42
2.4.3. La multiplication	43
2.4.4. L'enracinement	44
2.5. Etude histologique de <i>Capparis spinosa</i> L.	45

2.5.1 Confection des coupes histologiques au microtome avec inclusion à la paraffine	45
2.5.2. Coloration des coupes	45
2.5.3. Montage et observation des coupes au microscope	47
2.6. Essai d'optimisation in vitro de la production des polyphénols	47
2.6.1. Induction de la callogenèse	48
2.6.2. Multiplication des cals	49
2.6.3. Dosage des polyphénols	50
2.7. Etude statistique	51
3. RESULTATS ET DISCUSSION	52
3.1. Organogenèse du <i>Capparis spinosa</i> L.	52
3.1.1. Effet des traitements de désinfection sur l'état de l'explant mise en culture	52
3.1.2. Effet des milieux de culture sur le débourrement	54
3.1.3. Effet des milieux de culture sur le nombre de pousses régénérées par explant	58
3.1.4. Effet des milieux de culture sur la longueur de pousses régénérées par explant	58
3.1.5. Effet des milieux de culture sur le nombre de feuilles régénérées par explant	60
3.1.6. Effet des milieux de culture sur le taux de callogenèse et organogenèse indirecte	63
3.2. Multiplication des pousses de <i>C. spinosa</i> L.	69
3.2.1. Effet des combinaisons hormonales sur le nombre de pousses régénérées par explant	69
3.2.2. Effet des combinaisons hormonales sur la longueur des pousses régénérées	72
3.2.3. Effet des combinaisons hormonales sur le nombre des feuilles régénérées par pousses	74
3.3. La Rhizogenèse des vitroplants de <i>Capparis spinosa</i> L.	76
3.4. Etude histologique de <i>Capparis spinosa</i> L.	78
3.4.1. Anatomie des Feuilles	78

3.4.1.1. Anatomie des feuilles <i>in situ</i>	78
3.4.1.2. Anatomie des feuilles in vitro	84
3.4.1.3. Anatomie des Feuilles vitrifiées	86
3.4.2. Anatomie des tiges	91
3.4.3. Anatomie des apex caulinaires	98
3.4.4. Ontogenèse d'un cal	101
3.5. Essai d'optimisation in vitro de la production des polyphénols	107
3.5.1. Induction de la callogenèse à partir des explants foliaires	107
3.5.1.1. Effet de 2,4-D sur l'induction de la callogenèse	107
3.5.1.2. Effet des milieux MS et B5 sur l'induction de la callogenèse	113
3.5.2. Multiplication des cals de <i>Capparis spinosa</i> L.	114
3.5.3. Effet du choc thermique des explants foliaires sur la callogenèse	117
3.5.4. Dosage des polyphénols	117
CONCLUSION	120
APPENDICES	123
A. LISTE DES ABREVIATIONS	123
B. COMPOSITION DES MILIEUX DE CULTURE	124
C. CONFECTION DES COUPES HISTOLOGIQUES	127
D. COLORATION DES COUPES HISTOLOGIQUES	131
E. ETUDE STATISTIQUE	133
F. COURBE D'ETALONNAGE DE L'ACIDE GALLIQUE	140
REFERENCES	141

## LISTE DES ILLUSTRATIONS ET TABLEAUX

Figure 1.1	Détail de <i>Capparis spinosa</i> L.	10
Figure 1.2	<i>Capparis sp</i> dans sans milieu naturel	12
Figure 1.3	Détails morphologiques du <i>Capparis spinosa</i> L.	13
Figure 1.4	La répartition naturelle du câprier dans l'Eurasie et en Afrique du Nord	15
Figure 1.5	Récapitulatif des enquêtes de terrain	16
Figure 1.6	Morphologie des graines germées du <i>Capparis spinosa</i>	28
Figure 1.7	Bouture lignifiée enracinée de <i>Capparis spinosa</i> L.	29
Figure 1.8	Effets classiques de l'équilibre auxines/cytokinines sur l'organogénèse in vitro des végétaux	31
Figure 1.9	Principales étapes de la multiplication végétative in vitro	32
Figure 2.1	Situation géographique du site Hammam Melouane	34
Figure 2.2	<i>Capparis spinosa</i> L., présentant des tiges tentaculaires, dans son milieu naturel –Hammam Melouane, Parc National de Chréa.Chréa	35
Figure 2.3	<i>Capparis spinosa</i> L., présentant des tiges dressées, dans son milieu naturel –Hammam Melouane, Parc National de Chréa	35
Figure 2.4	<i>Capparis spinosa</i> L., pendant sur une falaise, dans son milieu naturel –Hammam Melouane, Parc National de Chréa	36
Figure 2.5	Epines recourbées caractéristiques de l'espèce <i>Capparis spinosa</i> L. de la région de Hammam Melouane, Parc National de Chréa	37
Figure 2.6	<i>Capparis spinosa</i> L., présentant des feuilles à base tronquée et à apex rétusé et des boutons floraux globuleux, récolté de la région de Hammam Melouane, Parc National de Chréa	37
Figure 2.7	<i>Capparis spinosa</i> L., présentant des branches lignifiées et des fleurs non encore épanouies à gynophore dressé, récolté de la région de Hammam Melouane, Parc National de Chréa	38

Figure 2.8	Fruit de <i>Capparis spinosa</i> L. de la région de Hammam Melouane, Parc National de Chréa	38
Figure 2.9	Quelques étapes de la désinfection des explants avant leur mise en culture	40
Figure 2.10	Mise en culture des fragments nodaux de <i>Capparis spinosa</i> L.	42
Figure 2.11	Explants de <i>Capparis spinosa</i> L. sur milieu de multiplication	43
Figure 2.12	Blocs de paraffine contenant les échantillons à couper	45
Figure 2.13	Echantillons colorés à l'hématoxyline/Eosine et montés entre lame et lamelle	47
Figure 2.14	Disques foliaires du <i>C. spinosa</i> L. mis en culture sur milieu de callogenèse	49
Figure 3.1	Etat des explants soumis aux traitements A et B après une semaine de culture	52
Figure 3.2	Effet des traitements de désinfection sur l'état des explants mis en culture	53
Figure 3.3	Réponse des explants nodaux représentée par le débourrement des bourgeons axillaires en fonction de la durée de la mise en culture sur milieu WPM et milieu MS.	54
Figure 3.4	Réponses des fragments nodaux mise en culture sur WPM	55
Figure 3.5	Effet des milieux de cultures MS et WPM combinés à des hormones de croissance (1mg/BAP + 0,1 mg/l AIA) sur le taux de débourrement des bourgeons.	57
Figure 3.6	Effet des milieux de culture sur la longueur des pousses régénérées	59
Figure 3.7	Pousses régénérées à partir des fragments nodaux de <i>C. spinosa</i> L.	59
Figure 3.8	Nombre de feuilles régénérées par pousse sur les milieux MS et WPM	61
Figure 3.9	Forme des feuilles des vitroplants de <i>Capparis spinosa</i> L. obtenues après culture des nœuds sur milieu WPM et MS aditionnés de 1mg/l BAP + 0,1 mg/l AIA.	62



Figure 3.10	L'effet des milieux de culture sur la présence de callogenèse autour des explants	64
Figure 3.11	Différents types de cals obtenus sur explants nodaux de <i>C. spinosa</i> L.	65
Figure 3.12	Pousses adventives régénérées sur cals formé à partir des fragments nodaux de <i>C. spinosa</i> L. sur milieu MS contenant 1mg/l BAP + 0,1 mg/l AIA.	68
Figure 3.13	Effet des combinaisons hormonales sur la multiplication des pousses de <i>Capparis spinosa</i> L.	70
Figure 3.14	Multiplication des pousses de <i>Capparis spinosa</i> L. sur milieu WPM	72
Figure 3.15	Effet des combinaisons hormonales sur la longueur des pousses régénérées	73
Figure 3.16	Pousse obtenue sur milieu WPM + 1mg/l BAP + 0,05mg/l AIA + 0,1mg/l GA3 après 4 semaines de culture.	74
Figure 3.17	Effet des combinaisons hormonales sur le nombre de feuilles par pousse régénérée par explant.	75
Figure 3.18	Pousses de <i>C. spinosa</i> L. cultivées sur milieu d'enracinement.	77
Figure 3.19	Coupe transversale dans une feuille de <i>Capparis spinosa</i> L. récolté à Hamman Melouane au mois d'octobre	79
Figure 3.20	Coupe transversale du limbe de la feuille de <i>Capparis spinosa</i> L. récolté à Hamman Melouane au mois d'octobre	80
Figure 3.21	Coupe transversale dans une nervure centrale de <i>Capparis spinosa</i> L. récolté à Hamman Melouane au mois d'octobre	81
Figure 3.22	Coupe transversale dans une feuille de <i>Capparis spinosa</i> L. récolté à Hammam Melouane au mois d'octobre présentant tissus conducteurs sans extensions périvasculaires	82
Figure 3.23	Coupe transversale d'une partie du mésophylle d'une feuille de <i>Capparis spinosa</i> L. récolté à Hammam Melouane au mois d'octobre	83
Figure 3.24	Coupe tangentielle du mésophylle d'une feuille de <i>Capparis spinosa</i> L. régénérée in vitro	84

Figure 3.25	Coupes transversales dans des feuilles vitrifiées (fragiles et facilement détachables de leurs tiges) de <i>Capparis spinosa</i> L	86
Figure 3.26	Coupe transversale dans des feuilles vitrifiées (d'aspect épai) de <i>Capparis spinosa</i> L.	87
Figure 3.27	Coupe transversale du mésophylle d'une feuille vitrifiée (fragiles et facilement détachables de leurs tiges) de <i>Capparis spinosa</i> L.	88
Figure 3.28	Coupe transversale du mésophylle d'une feuille vitrifiée (d'aspect épais) de <i>Capparis spinosa</i> L.	89
Figure 3.29	Nervure centrale en coupe transversale d'une feuille vitrifiée (d'aspect épais) de <i>Capparis spinosa</i> L.	90
Figure 3.30	Coupe longitudinale dans une tige de <i>Capparis spinosa</i> L. récolté à Hammam Melouane au mois d'octobre	92
Figure 3.31	Coupe longitudinale dans une tige de <i>Capparis spinosa</i> L. régénérée in vitro	93
Figure 3.32	Coupe transversale dans une tige de <i>Capparis spinosa</i> L. récolté à Hammam Melouane au mois d'octobre	94
Figure 3.33	Coupe longitudinale dans une tige de <i>Capparis spinosa</i> L. récolté à Hammam Melouane au mois d'octobre	95
Figure 3.34	Coupe transversale dans une tige de <i>Capparis spinosa</i> L. régénérée in vitro	96
Figure 3.35	Coupe tangentielle du bois hétéroxylé de <i>Capparis spinosa</i> L. récolté à Hammam Melouane au mois d'octobre	97
Figure 3.36	Coupe longitudinale dans un apex caulinaire de <i>Capparis spinosa</i> L. régénérée in vitro	99
Figure 3.37	Coupe longitudinale dans un apex caulinaire de <i>Capparis spinosa</i> L. régénérée in vitro et présentant une hyperhydricité	100
Figure 3.38	Coupe transversale dans un explant de tige de <i>Capparis spinosa</i> L. cultivé sur milieu MS+ 1mg/l BAP + 0,1 mg/l AIA	102

Figure 3.39	Coupe transversale dans un explant de tige de <i>Capparis spinosa</i> L. cultivé sur milieu MS+ 1mg/l BAP + 0,1 mg/l AIA montrant la déformation des tissus conducteurs par les tissus néoformés	103
Figure 3.40	Coupe transversale dans un explant de tige de <i>Capparis spinosa</i> L. cultivé sur milieu MS+ 1mg/l BAP + 0,1 mg/l AIA	104
Figure 3.41	Parenchyme néoformé d'un cal à texture friable issu d'explant de tige de <i>Capparis spinosa</i> L. sur milieu MS+ 1mg/l BAP + 0,1 mg/l AIA	105
Figure 3.42	Coupe transversale de Nodules verts néoformés sur cals à partir du néoparenchyme	106
Figure 3.43	Effet de 2,4-D sur le poids des cals induits sur milieu MS	109
Figure 3.44	Effet de 2,4-D sur le diamètre des cals induits sur milieu MS	110
Figure 3.45	Effet de 2,4 D sur le poids des cals induits sur milieu B5	111
Figure 3.46	Effet de 2,4-D sur le diamètre des cals induits sur milieu B5	112
Figure 3.47	Cals de <i>Capparis spinosa</i> L. obtenus après 5 semaines de mise en culture	114
Figure 3.48	Effet des hormones de croissance sur le poids des cals	115
Figure 3.49	Effet des hormones de croissance sur le diamètre des cals	116
Figure 3.50	Cal sur milieu MS 1,0 mg/l 2,4-D et 1,5 mg/l BAP après 8 semaines de culture	116
Tableau 1.1	Valeur nutritionnelle des câpres <i>Capparis spinosa</i> L. par 100g de conserve selon USDA	19
Tableau 1.2	Utilisations médicinales du Câprier par les peuples anciens	20
Tableau 1.3	Quelques activités médicinales des extraits de <i>Capparis spinosa</i> L.	23

Tableau 2.1	Traitements de désinfection des explants avant leur mise en culture.	40
Tableau 2.2	Milieux utilisés pour la mise en culture des fragments nodaux du <i>C. spinosa</i> L.	41
Tableau 2.3	Différents milieux de caulogenèse à partir des cals de <i>C. spinosa</i> L.	42
Tableau 2.4	Milieux de multiplication in vitro de <i>Capparis spinosa</i> L.	43
Tableau 2.5	Différents milieux d'enracinement testés pour la rhizogenèse de <i>C. spinosa</i> L.	44
Tableau 2.6	Colorations des coupes histologiques de <i>C. spinosa</i> L.	46
Tableau 2.7	Milieux utilisés pour l'induction de la callogenèse à partir des disques foliaires du <i>Capparis spinosa</i> L.	48
Tableau 3.1	Effet des hormones de croissance supplémenté au milieu WPM sur la multiplication in vitro de <i>Capparis spinosa</i> L.	69
Tableau 3.2	Poids et diamètre des cals induits sur milieu MS contenant différentes concentration de 2,4-D	108
Tableau 3.3	Poids et diamètre des cals induits sur milieu B5 contenant différentes concentration de 2,4-D	110
Tableau 3.4	Poids et diamètre des cals cultivés sur milieu MS contenant 1 mg/L 2,4-D + 1,5 mg/L BAP.	114
Tableau 3.5	Extraits méthanoliques de <i>Capparis spinosa</i> L.	117
Tableau 3.6	Taux des polyphénols totaux des extraits secs de <i>C. spinosa</i> L.	118

## INTRODUCTION

Plusieurs millénaires avant Jésus-Christ, en certains pays (Inde, Chine, Mésopotamie, Egypte,...), l'Homme savait déjà utiliser systématiquement des remèdes d'origine végétale. De ce fait, la phytothérapie occupait donc (sans en porter encore le nom) une place indiscutable dans les traitements d'affections diverses [1]. Pendant des siècles, Les plantes médicinales ont été utilisées pour leur effet antihypertenseur, anti-asthmatique, anti-diabétique, leurs activités antimicrobiennes, et aujourd'hui, leurs effets sont prouvés scientifiquement par la reconnaissance et l'isolement de composés phytochimiques bioactifs [2].

En fait, ces dernières années, les recherches scientifiques s'intéressaient aux composés des plantes qui sont destinés à l'utilisation dans le domaine phytopharmaceutique. Les molécules issues des plantes dites naturelles sont considérées comme une source très importante de médicaments ; sachant que plus de 120 composés provenant de plantes sont aujourd'hui utilisés en médecine moderne et près de 75% d'entre eux sont appliqués selon leur usage traditionnel [3]. Actuellement, l'Organisation Mondiale de la Santé OMS estime qu'environ 80% des habitants de la planète ont recours aux médecines traditionnelles à base de plantes en tant que soins de santé primaire [3].

Cependant, l'exploitation intensive des plantes peut devenir néfaste si elle dépasse le seuil tolérable de renouvellement et de régénération des ressources utilisées [4]. Pour résoudre ce problème, des méthodes alternatives pour la propagation massive des plantes comme des techniques de culture de tissus végétaux et d'autres méthodes biotechnologiques sont utilisés pour la production de plantes médicinales, isoler des molécules secondaires d'intérêt pharmaceutique, la conservation et la propagation rapide des espèces végétales précieuses, rares et menacées [5].

Le câprier est une plante médicinale très intéressante de part ses propriétés médicinales, condimentaires ou écologiques avec laquelle la population rurale algérienne a tissé des liens solides. Des quantités énormes de rameaux feuillés et

de baies sont prélevées et fournies aux herboristes. De surcroît, les femmes, les enfants et les personnes âgées, sans cultiver la plante, ramassent en abondance les câpres qui sont traitées et exportées [6]. Malheureusement, cette plante n'a pas été subjuguée à son plein potentiel que ce soit par les scientifiques ou les agriculteurs [7].

Peu d'études ont été faites sur la propagation de cette espèce ; la majorité des recherches se sont intéressées à ses propriétés thérapeutiques [8].

En effet, les méthodes classiques de propagation de *Capparis spinosa* L. par graines et par bouturages ne sont pas appréciées en raison des faibles pourcentages de germination et d'enracinement [9] [8] [10]. Toutefois, La culture in vitro de *Capparis spinosa* L. peut résoudre ces problèmes de multiplication en garantissant la production en masse de matériel végétal sans menacer les ressources naturelles. Elle offre aussi la possibilité d'améliorer et de conserver cette espèce [8]. En outre, la culture in vitro produit des plantes exemptes de maladies [9] et fournit une source constante et fiable des tissus pour la production des molécules pharmaceutiques.

Afin d'essayer de résoudre ces problèmes, la présente étude porte sur plusieurs aspects de la culture in vitro de *Capparis spinosa* L. à savoir :

- La caulogenèse à partir des segments nodaux dans le but de conserver l'espèce de l'érosion génétique ;
- La multiplication des pousses régénérées in vitro afin d'améliorer la production en masse de la plante ;
- L'étude histologique de l'espèce récoltée in situ et régénérée in vitro ainsi que les plans présentant des malformations afin de bien mettre en évidence les différentes structures anatomiques de *Capparis spinosa* L. liées à son mode d'adaptation au milieu aride et aux phénomènes d'hyperhydricité in vitro ;
- La valorisation de l'espèce exprimée par le dosage des polyphénols totaux des feuilles et essai d'optimisation de la callogenèse à partir

des disques foliaires pour améliorer la production des métabolites secondaires (polyphénols totaux) des cals obtenus.

## CHAPITRE 1

### ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE

#### 1.1 Botanique du câprier épineux

##### 1.1.1. Systématique

Le genre *Capparis* appartient à la sous-famille Capparoideae (Capparaceae) et comprend environ 250 espèces réparties dans les régions tropicales et subtropicales de l'Ancien et du Nouveau Monde. Le polymorphe *C. spinosa* L. complexe montre une grande répartition paléotropicale et subtropicale, avec plusieurs entités enregistrées à partir de l'Europe du Sud, du Nord et d'Est d'Afrique, de Madagascar, du Sud et centre d'Asie, en Australie et en Océanie [11] [12].

Dans la région méditerranéenne, son traitement taxonomique reste critique en raison de la variabilité des caractères végétatifs qui sont habituellement considérés comme un critère de classification (par exemple la texture, la taille et la forme de la feuille, la morphologie des stipules...etc.) [12].

ZOHARY [13] a reconnu que dans la Méditerranée et les pays du Proche-Orient trois espèces extrêmement variables et entrecroisées : *C. spinosa*, *C. ovata* Desf. et *C. leucophylla* DC. Un concept d'espèce plus large a été adopté par JACOBS [14] et qui inclut dans la variation intraspécifique de *C. spinosa* les taxons connus des différentes régions de l'Ancien Monde [12].

*Capparis spinosa* L. var. *spinosa* est l'espèce dont on possède les traces les plus anciennes, grâce à la découverte faite à Tell es-Sawwan en Irak des graines fossilisées datant à peu près de l'an 5800 avant notre ère [15]. Aujourd'hui, c'est la variété la plus répandue dans le nord du bassin méditerranéen. ZOHARY [13] déduit des exicata qu'il a pu voir qu'elle est présente en Espagne, à Minorque, en France, en Italie, en Yougoslavie, en Grèce, à Chypre, en Algérie, en Egypte, en Turquie et en Irak. Mais, selon toute probabilité, d'autres populations présentes dans d'autres pays d'Afrique du Nord (Tunisie, Maroc) et en Europe (Portugal) appartiennent également à cette variété. Toujours selon ZOHARY [13], il s'agit d'un écotype mésophysique de la variété *aegyptia* sélectionné par l'homme pour ses gros



boutons floraux, qui a fini par se différencier considérablement de sa forme originale (Figure 1.1). Cette variété est surtout cultivée en Italie et en Espagne [16].



Figure 1.1 : Détail de *Capparis spinosa* L. [17]

- 1) *Capparis spinosa* L., 2) Etamine, 3) Fruit, 4) Coupe transversale du fruit, 5) Graine, 6) Coupe transversale de la graine, 7) Embyon, 8) Diagramme floral.

INOCENCIO et *al.* [18] ont procédé à une révision de la systématique du genre *Capparis* sect. *Capparis* du centre et ouest d'Asie, de l'Afrique du Nord et de l'Europe en se basant sur des critères morphologiques, géographiques et moléculaires. Dix espèces ont été reconnues y compris deux nouvelles espèces : *Capparis atlantica* et *C. zoharyi*. Ces travaux ont confirmé l'existence du *C. ovata*, *C. orientalis*, *C. sicula* et *C. zoharyi* en Algérie.

En 2014, les Travaux de FICI [19] ont confirmé la présence naturelle de *Capparis spinosa* subsp. *spinosa* var. *spinosa* en Algérie. Cette espèce se caractérise par des brandilles glabres ou légèrement pubescentes. Épines

stipulaires recourbées, jaunâtres, allant jusqu'à 6 mm de long. Pétiole de 0,5-1 cm de long. Limbe ovale, ovale-orbiculaire, coriace, glabre ou glabrescent, 2.4-5-7 × 2-4-6 cm, avec base tronquée, arrondie ou cordée et apex obtus, arrondis, rétus parfois aiguë avec un mucron de 0,1-0,5 mm. Fleurs légèrement zygomorphes. Sépales 1,5-2,5 cm de long. Pétales de 2-3,5-4 cm de long. Fruit piriforme, ovoïde ou ellipsoïde de 2-3,5-4,5 cm de long (Figure 1.1).

### 1.1.2. Description botanique

Les Câpriers sont de petits arbustes, qui peuvent atteindre environ un mètre de hauteur. Cependant, les câpriers sauvages sont plus souvent observés pendants, drapés et tentaculaires se démenant sur le sol et les roches [20].

C'est un arbrisseau très ramifié dressant des tiges flexueuses, pourvues de petites épines recourbées protégeant les rameaux contre pâturage. Elles sont tendres à l'état juvénile, sèches et cassantes à l'âge supportant des feuilles alternes, épaisses, pétiolées, ovales-arrondies [21] [22] [1] [20].

*C. spinosa* L., une espèce à feuilles caduques l'hiver, est l'un des quelques arbustes pérennes qui poussent et fleurissent entièrement pendant l'été [23].

Les fleurs solitaires et axillaires sont complètes, agréablement parfumées, voyantes, avec quatre sépales et quatre pétales blanc à blanc rosé, de nombreuses longues étamines violettes, qui élèvent bien haut leur ovaire sur un long gynophore. Elles sont nées sur les branches de la première année et fleurissent pendant 24 heures, puis meurent [21] [1] [20].

Le fruit du câprier est une baie charnue ellipsoïde, ovoïde ou obovoïdes à péricarpe mince. Les grains ont un diamètre de 3-4 mm, globuleux, lisses et bruns [1] [20]. Les tiges, les feuilles et les fruits sont teintés de rouges sur les sols schisteux, couleurs probablement liées aux anthocyanes [6].

A maturité, *C. spinosa* développe un système racinaire très puissant, large et étendu qui pénètre profondément dans le sol [6] [24].



Figure 1.2 : *Capparis sp* dans son milieu naturel [18].

A) *Capparis zoharyi* à tige dressée dessiné à partir d'une photo prise à Llano del Beal, Murcia, Espagne, B) *Capparis spinosa* à tiges tentaculaires dessiné à partir d'une photo prise Llubí, Murcia, Espagne , C) *C. orientalis* pendant sur un mur dessiné à partir d'une photo prise Palma de Mallorca, Espagne.



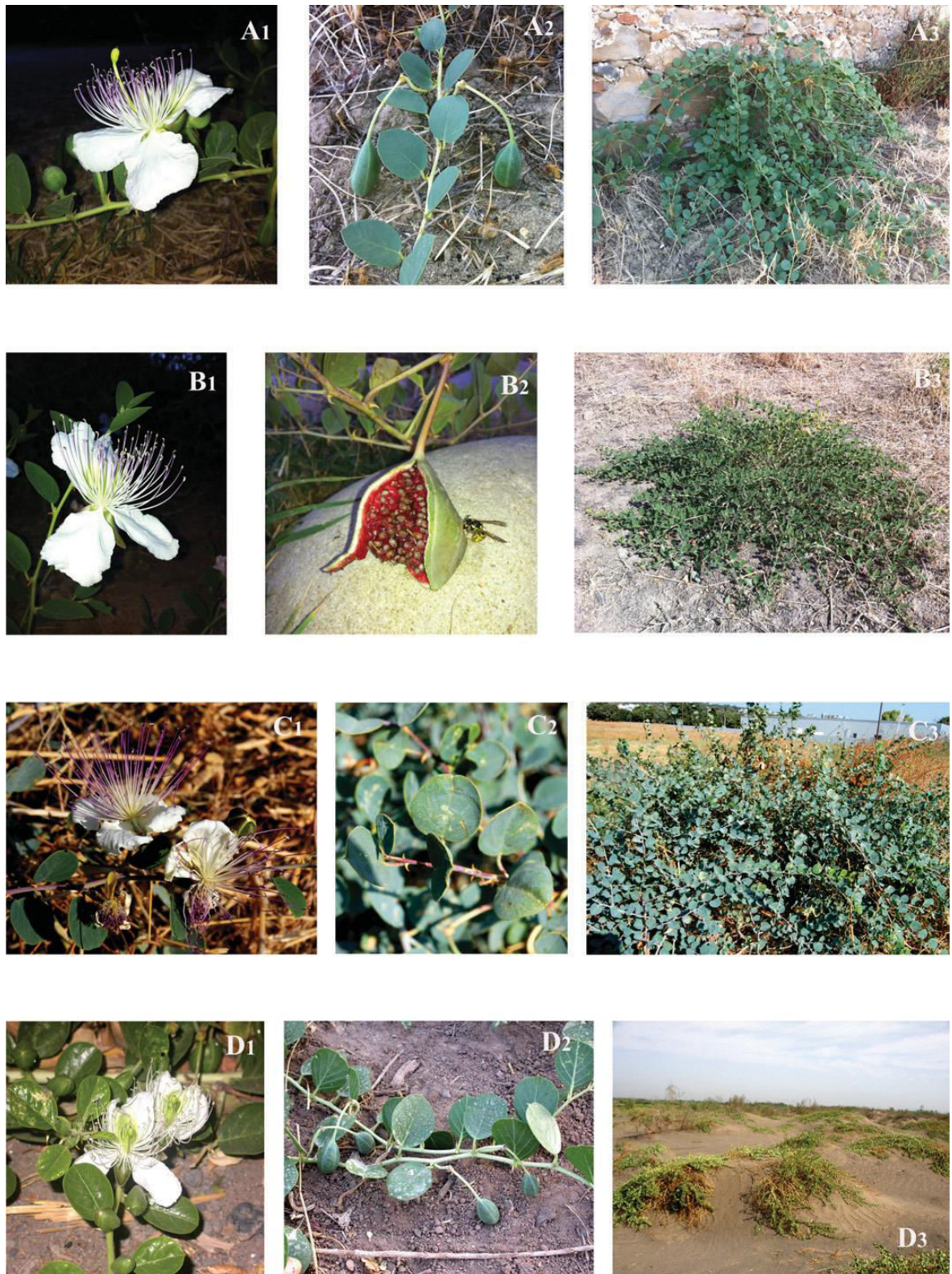


Figure 1.3 : Détails morphologiques de *Capparis spinosa* L. [19].

A) *C. spinosa* var *spinosa*: A1) Fleur, A2) Branche fructifère, A3) Habitat. B) Var. *canescens*: B1) Fleur, B2) Fruit, B3) Habitat. C) Var. *aegyptia*: C1. Fleur, C2) Branche, C3) Habitat. D) Var. *herbacea*: D1) Fleurs, D2) branches fructifères, D3) Population dans son habitat naturel.

## 1.2. Ecologie et répartition géographique

Le câprier croît spontanément dans les fissures et les crevasses des rochers et des vieux murs en pierre, dans des pentes caillouteuses, les falaises, les sols calcaires, argileux, marneux, et gypseux sur une altitude allant de 0 à 800 m. Il s'adapte aux sols pauvres dont l'eau et les sels minéraux sont un facteur limitant majeur [19].

Les câpriers sont tolérants au sel et s'épanouissent le long des côtes dans les zones des embruns. Ils sont aussi tolérants au vent et à la sécheresse. Ils constituent un excellent couvert végétal couvrant la surface du sol, ce qui contribue à conserver les réserves d'eau et à réduire l'érosion et la dégradation des sols [25] [20].

En effet, en dépit d'être une dépendsière d'eau, l'espèce survit dynamiquement même dans les heures les plus chaudes de la journée et dans des conditions de sécheresse. Ses longues racines et sa large amplitude écologique lui permettent de résister à des environnements difficiles. *C. spinosa* L. semble donc être un bon candidat pour la protection des zones dégradées. [26].

Le câprier est cultivé pour ses boutons floraux, même si il est lent et difficile à germer, il pousse rapidement dans les climats chauds et très secs. La chaleur sèche et la lumière intense du soleil rendent l'environnement plus favorable pour la productivité des câpres. Les plantes sont productives dans les zones ayant seulement 200 mm de précipitations annuelles (en hiver et au printemps) et il survit facilement à des températures estivales supérieures à 40 ° C. Cependant, c'est une espèce qui craint le froid et dispose d'une gamme de rusticité de température semblable à l'olivier (- 8 ° C) [20].

Il existe une forte association entre le câprier, les océans et les mers. *C. spinosa* est dit être originaire du bassin méditerranéen, mais sa gamme s'étend des côtes de l'Atlantique des îles Canaries et du Maroc de la mer Noire en Crimée et l'Arménie, et à l'est, de la mer Caspienne jusqu'en Iran (Figure 1.4). Le Câprier est probablement originaire des régions sèches de l'ouest ou du centre d'Asie [27].

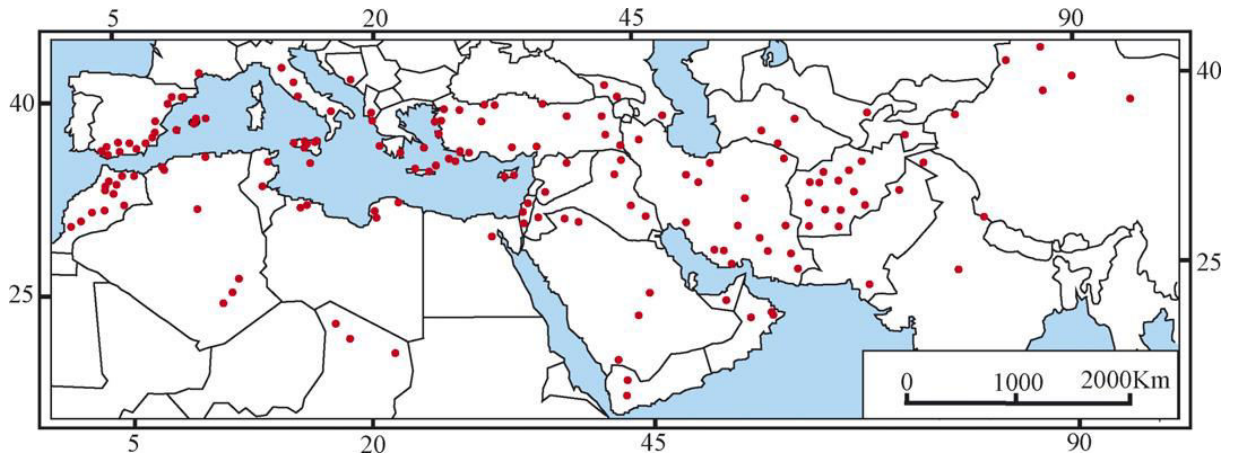


Figure 1.4 : La répartition naturelle du câprier dans l'Eurasie et en Afrique du Nord selon INOCENCIO et *al.* (2006) et Lin (2003) [28].

En Algérie, le Câprier couvre de vastes surfaces mais de manière éparse. Il a été redécouvert depuis peu par les forestiers qui ont alors engagé l'étude de son développement (Figure 1.5). Les expositions sud est sud-est, les sols marneux et schisteux très fragiles, les rochers calcaires concentrent les plus importants peuplements de câpriers. Ils sont également présents sur les pentes argileuses, les terres légères, graveleuses et les sols sablonneux secs. Le pH courant est de 7,5 à 8 [6].

D'un point de vue climatique, on le rencontre souvent dans les secteurs semi-arides et en second lieu dans le subhumide [6].

Lors de la campagne de terrain algérien, BENSCHIR-BOUKHARI et SERIDI [6] ont observé que deux câpriers phénotypiquement différents peuvent être présents ensemble sur une même station, sans facteur de variation écologique. Des variétés moins épineuses intermédiaires à la variété *inermis* sont présentes, dont certaines semblent rarement donner des fruits. Les espèces végétales accompagnatrices les plus fréquentes dans les relevés sont le jujubier sauvage, l'olivier, le pistachier lentisque et quelques fois le pin d'Alep avec une constante écologique correspondant à un décor minéral toujours ensoleillé : gorges, falaises, pentes rocailleuses, éboulis, ravins et vieux murs de pierres en zones urbaines (Figure 1.5).

Wilaya	Localités	Géographie*	Bioclimats	Topographie	Ecotype [épineux-inerme]	Utilisations principales
<b>Mostaganem</b>	La Macta	MO	Semi-aride chaud	Berges	épineux	Non décrit
<b>Relizane</b>	Périmètre de La mina	MO	semi aride chaud/doux	Versant	échantillons altérés	Non décrit
<b>Alger</b>	Raïs Hamidou	MA	Subhumide chaud	Versant	Epineux	Consommation de câpres
<b>Bejaia</b>	Falaises Cap Carbon, Gorges de Kherrata Ighhil Ali :Akbou, Barbacha à Oued Amizour	MN MT	Subhumide chaud/ Frais	Falaises, Gorges,	Epineux/inerme	graines -asthme racines rhumatisme consommation de câpres
<b>Annaba</b>	Jardin en zone urbaine [quelques pieds]	MN	Subhumide chaud	Vieux murs	Inerme	consommation de câpres
<b>Sétif</b>	Ain el Kebira, Maouia :Beni Azziz, Béni Oussine et Hammam el Guergour :Bougaa, Tizi N'bechar, Amoucha, Oued Sebt :Béni Ourtilane, cité antique de Djemila	MT	Subhumide frais Semi-aride chaud/frais	Berges Talus Versant	Epineux	graines -asthme racines - rhumatisme baies - diverses consommation de câpres miel de câprier
<b>Mila</b>	Ferdjioua, Ferdj Mzala, Radjas, Rouached,Djimla	MT	Subhumide frais	Versant, Berges Talus Vieux murs	Epineux	graines - asthme racines -rhumatisme baies - diverses feuilles :digestion
<b>Constantine</b>	Zone urbaine :Les abattoirs, murs à Bellevue [quelques pieds]	MT	Subhumide frais	Vieux murs Talus	Epineux	divers soins consommation de câpres
<b>Skikda</b>	Autour du barrage Beni Haroun	MT	Subhumide frais/chaud	Versant	Epineux	divers soins consommation de câpres
<b>Jijel</b>	Autour du barrage Beni Haroun épineuse	MT	Subhumide frais/chaud	Versant	Epineux	divers soins
<b>Tizi-ouzou</b>	Ain El Hammam, Takhoukht	MT	Subhumide doux	Versant	Epineux	consommation de câpres
<b>Bouira</b>	Gorges de Palestro Souk Lethnin	MT	Semi-aride frais	Berges Talus	Epineux	consommation de câpres
<b>Blida</b>	Hammam Melouane	MT	Subhumide frais	Talus	Epineux	non décrit
<b>Bordj Bou Arreridj</b>	El Mhir, Chertioua à Zemmoura, Abou Charef	SC MT	Semi-aride chaud/frais	Versant Berges Talus Oueds caillouteux	Epineux	baies/feuilles[c] - digestion consommation de câpres miel de câprier
<b>Biskra</b>	El Kantara, Ain Zaatout	SSC	Semi-aride frais Saharien doux	Gorges Versant Sols rocheux	échantillons altérés	feuilles/tiges - digestion et céphalées consommation de feuilles
<b>Khenchella</b>	Ain Cherchar	SSC	Semi-aride frais	Berges	Inerme	non décrit
<b>Tebessa</b>	Djebel El Ma El Abiod, Djebel Darmoun	SSC	Semi-aride frais	Berges Versant	Inerme	divers soins
<b>Ghardaia</b>	Gorges de Metlili	RS	Saharien doux	Gorges	échantillons altérés	divers soins consommation de baies
<b>Touggourt</b>	localité non précise	RS	Saharien doux	Rochers humides	échantillons altérés	tous les organes - divers soins

Figure 1.5 : Récapitulatif des enquêtes de terrain [6].

\*MA : Domaine maurétanien méditerranéen : secteur algérois. MN : Domaine maurétanien méditerranéen : secteur numidien. MO : Domaine maurétanien méditerranéen : secteur oranais - MT : Domaine maurétanien méditerranéen : secteur tell méridional - SC : Secteur des hauts plateaux constantinois - SSC : Secteur saharien constantinois - RS : Région saharienne.



### 1.3. Importance économique du Câprier

La relation entre les câpres et l'être humain remonte à l'âge de pierre. Des vestiges de *Capparis spinosa* ont été découverts dans les sites archéologiques dès le bas Mésolithique [27]. Des boutons floraux carbonisés et des fruits verts ont été découverts dans un bocal sur le site es-Sweyhat en Syrie, daté à environ 2400-1400 avant JC, et ont été considérés comme stockées sous forme de condiments [29]. Des graines ont été découvertes dans les tombes Yanghai, Turpan (2800 ans B.P) dans le district Xinjiang, en Chine [28]. Les chercheurs ont en déduit que le câprier était utilisé à des fins médicinales.

IPGRI [30] considère *Capparis spp.* comme une plante spontanée à fort potentiel économique à la fois comme plante aromatique et comestible. En fait, le câprier est probablement la seule espèce arbustive capable d'offrir autant de qualités et d'usages : condiment en alimentation humaine, médecine traditionnelle, fourrage, protection contre l'érosion, adaptation à la sécheresse, plante mellifère et ornementale [31]. En effet, La câpriculture offre l'avantage d'être peu exigeante en eau, en investissement, et d'être tolérante aux conditions édaphiques les plus sévères (températures extrêmes, vents forts, sols pauvres, manque d'eau...) [32]. Grâce à ces propriétés, plusieurs pays et institutions se sont intéressés récemment au câprier en citant au moins une espèce du *Capparis spp* dans leur programme de recherche [30].

#### 1.3.1. Propriétés nutritionnelles

Le câprier fournit un condiment recherché, la câpre, qui correspond au bouton floral de la plante et un fruit dont la saveur est fruitée et délicate : le caperon [20] [31]. Les câpres sont souvent mangées confites dans du vinaigre, conservées dans du vin ou saumurées dans le sel. Elles sont récoltées au printemps avant épanouissement. Les jeunes pousses et jeunes fruits tendres du câprier sont aussi utilisés dans l'alimentation humaine. Ces parties comestibles sont d'une valeur nutritionnelle considérable [33] [34] [35] [36].

En effet, *Capparis spinosa* est l'une des plantes aromatiques les plus utilisées dans la cuisine méditerranéenne : les câpres vinaigrées ont, pour longtemps, été utilisées dans les recettes de salades, pasta, viandes, sauces et garnitures afin



d'ajouter un goût épicé et aromatique à la nourriture. Par conséquent, elles ont gagnées une place importante dans l'industrie alimentaire et dont l'Espagne représente le premier producteur mondial suivie par le Maroc, premier exportateur mondial, l'Italie et la Turquie [6] [36].

Le fruit mûr est riche en protéines, lipides, glucides, vitamines, minéraux (Ca, P, Zn, Fe, Mn) et fibres [37]. En dehors de la Méditerranée et les montagnes du Caucase, les câpres ne sont pas très connues, bien que les fruits marinés de certaines espèces d'Asie centrale sont utilisés comme légumes en Afghanistan et au nord-ouest du Pakistan [35] [38].

Les câpres sont riches en anti-oxydants [37] et contiennent un niveau sain de vitamines comme la vitamine A, la vitamine K, la niacine et la riboflavine. En outre, elles sont riches en minéraux comme le calcium, le fer, le cuivre [39] le potassium, le magnésium et le phosphore [40] (Tableau1.1). Les niveaux élevés de sodium sont dûs à l'ajout du sel de mer granulaire (chlorure de sodium) [39].

Elles sont également riches en acide caprique qui confère une saveur aromatique distinctive accentuée par le saumurage [20].

La présence d'huile, contenue dans les graines et les fleurs accompagnée de sucre et de protéines justifie la valeur nutritionnelle du câprier [37].

Tableau 1.1 : Valeur nutritionnelle des câpres *Capparis spinosa* L. par 100g de conserve selon USDA [39].

Eléments	VN	% AJR	Eléments	VN	% AJR
Energie	23 kcals	1%	Phyto-nutriments		
Glucides	4.89g	4%	Carotène $\beta$	83mg	
Matières grasses	2.36g	4%			
Cholestérol	0	0%			
Fibres	3.2g	8%			
Vitamines			Minéraux		
Folates	23mg	6%	Calcium	40mg	4%
Niacine	0.65mg	4.5%	Cuivre	0.374mg	42%
Ac. pantothénique	0.02mg	0.5%	Fer	1.67mg	21%
Pyridoxine	0.02mg	2%	Magnésium	33mg	8%
Riboflavine	0.13mg	11%	Manganèse	0.078mg	3%
Thiamine	0.018mg	1.5%	Phosphore	0mg	1%
			Selenium	1.2mg	2%
			Zinc	0.32mg	

VN : Valeur nutritionnelle ; % AJR : Pourcentage en apport journalier recommandé.

### 1.3.2. Propriétés médicinales

#### 1.3.2.1. Ethnobotanique et activités biologiques

*Capparis spinosa* L. est connue pour avoir des valeurs médicinales diversifiées dans plusieurs formes de médecine traditionnelle : iranienne, unani, chinoise, ayurvédique et gréco-arabe [41]. En fait, racines, feuilles, bourgeons, fruits, écorce et graines étaient utilisés par les peuples anciens à des fins médicinales, pour traiter certaines maladies telles que le rhumatisme, les problèmes d'estomac, des maux de tête et de dents (Tableau 1.2).

Tableau 1.2 : Utilisations médicinales du Câprier par les peuples anciens [42].

Maladies traitées	Utilisateurs	Références
Hémorroïdes, maladies des reins, de la peau, du foie et diabète.	Anciens arabes	[43] [44]
Nettoyage des ulcères, douleur de dents, paralysie, douleurs de rate et de menstruations, la sciatique.	Anciens romains/grecques	[45]
Pourriture des dents et des gencives, problèmes d'estomac, accélérer les menstruations, piqûres de scorpion, obstruction dans le foie, susciter l'appétit, maladies rénales.	Anciens égyptiens	[45] [46]

Dans la médecine traditionnelle arabe, *C. spinosa* est utilisé pour le traitement de diverses maladies humaines, y compris les problèmes gastro-intestinaux, l'hypertension, la dysurie, l'inflammation, emménagogue, l'anémie, les troubles hépatiques, les rhumatismes et l'hydropisie, comme antispasmodique, antidiabétique, analgésique, vermifuge, antihémorroïdaires, laxatif, désobstruant, dépuratif, diurétique, expectorant et tonique général du corps. Les fruits secs de *C. spinosa* sont avalés avec un verre d'eau pour guérir l'hypertension et les problèmes diabétiques. De même, les décoctions de l'écorce et de la racine ont été utilisées dans la médecine traditionnelle pour guérir l'hydropisie, l'anémie et les rhumatismes [47].

En fait, au Maroc *C. spinosa* est surtout tenu pour antirhumatismal, efficace contre la goutte ou la sciatique. L'écorce de ses racines est antidiarrhéique, diurétique et recommandé pour soigner la rate. Les cataplasmes de fleurs s'appliquent sur l'eczéma. Les graines soignent les dysménorrhées et la stérilité féminine [48]. Quant au fruit, il est utilisé pour guérir le diabète [49].

Exclusivement en Tunisie, *Capparis* est utilisé comme galactogène [50].

En Lybie, *C. orientalis* est utilisé comme un remède pour les maux d'estomac. Le fruit de certaines d'espèces de *C. aegyptia* est utilisé par les Bédouins Khushmaan Ma'aza d'Égypte pour faire des cataplasmes soignant les rhumatismes et par les Bischarins pour soigner la fièvre et les maux de tête.

En Somalie, les feuilles sont consommées pour traiter la toux. Au Bahreïn, les gens utilisent *C. sicula* comme tonique et expectorant [42].

En Iran, les racines, les fruits et l'écorce de *C. spinosa* sont utilisés comme diurétiques, toniques, contre le paludisme et les maladies articulaires [42].

Au Pakistan, les gens utilisent toutes les parties du *Capparis* comme anti-rhumatismale, diurétique, désinfectant pour les reins, tonique, pour réduire les flatulences et améliorer les fonctions du foie, pour guérir l'artériosclérose et la migraine ; ils utilisent les feuilles de *C. spinosa* comme analgésique, anti-hémorroïde, antirhumatismal, apéritif, désobstruant, dépuratif et diurétique [42]. L'écorce de la racine est employée pour les troubles mentaux [51].

En Inde, les bourgeons et les racines de *C. spinosa* sont utilisés dans le traitement des furoncles ; les feuilles sont utilisées en tant que contre-irritant et en cataplasme contre les gonflements; les racines sont utilisées pour traiter la fièvre, le rhumatisme, la paralysie, les maux de dents. L'écorce est utilisée dans le traitement de la toux, de l'asthme et de l'inflammation [42].

En Chine, le fruit de *C. spinosa* a été utilisé pour traiter l'arthrite rhumatismale et la goute [52].

En Turquie, l'extrait aqueux des boutons floraux était utilisé dans la médecine traditionnelle comme diurétique, anti-hypertenseur, cataplasme, tonique et pour d'autres propriétés [53].

En Algérie, la population rurale a tissé des liens solides avec cette plante. En effet, les feuilles et fruits sont utilisés pour les troubles digestifs, les racines pour soigner le rhumatisme et les graines pour traiter l'asthme [6]. Le câprier est réputé de soigner les troubles liés au radicaux libres tel que les inflammations [54]. *C. ovata* est utilisé dans le Hoggar comme anti-inflammatoire, pour traiter les maux de tête, et les maux d'estomac [42].

Plusieurs études et recherches basées principalement sur l'ethnobotanique prouvent et appuient les propriétés médicinales de *Capparis spinosa* L. (Tableau 1.3).

GADGOLI et MISHRA [55] ont montré que l'acide p-méthoxy benzoïque isolé de la fraction soluble méthanolique de l'extrait aqueux de *Capparis spinosa* L. possède une activité anti-hépatotoxique significative contre le tétrachlorure de carbone et le paracétamol, hépatotoxicité induite in vivo, et contre le thioacétamide et le galactosamine, hépatotoxicité induite dans les hépatocytes isolés du rat, en utilisant la technique in vitro.

En 2008, YU et al. [56] ont constaté que les alcaloïdes totaux de *Capparis spinosa* peuvent inhiber la prolifération des cellules d'adénome gastrique humaines SGC-7901.

Une protéine présentant une séquence d'acides aminés N-terminale d'une certaine similitude avec l'imidazoleglycerol phosphate synthase a été purifiée à partir des graines fraîches de *Capparis spinosa* a inhibé la prolifération des cellules de l'hépatome HepG2 des cellules HT29 du cancer du côlon et des cellules MCF-7 du cancer du sein avec une IC50 d'environ 1, 40 et 60 pM, respectivement. Elle inhibe également la transcriptase inverse du VIH-1 avec une CI50 de 0,23 pM. Elle possède une activité antifongique en inhibant la croissance mycélienne du champignon *Valsa Mali* [57].

Tableau 1.3 : Quelques activités médicinales des extraits de *Capparis spinosa* L.

<b>Extrait de la plante</b>	<b>Activités médicinales</b>	<b>Références</b>
<b>Fruit</b>	Antiarthritique	[58]
	Anti-tumorale	[59]
	Anti-quorum, anti-biofilm	[60]
	Hypoglycémiante, Anti-obésité	[49] [61]
	Vaso-relaxante	[62]
	Brancho-relaxante	[63]
	Anti-inflammatoire	[64] [65]
	Analgésique, Anti-nociceptive	[66]
<b>Fleurs</b>	Antioxydante, antimicrobienne	[67]
	Contre les infections de la peau.	[68]
<b>Boutons floraux</b>	Antioxydante, photoprotectrice	[69]
	Antimicrobienne	[70]
	Antiallergique, antihistaminique	[71]
	anti-virale, immunomodulatrice	[72]
<b>Feuilles</b>	Antioxydante, antihémolytique	[73] [54]
	Anti-inflammatoire, analgésique	[65]
<b>Partie aérienne</b>	Antihelminthique	[74]
	Antioxydante	[75]
	Inhibition de la prolifération des fibroblastes de la sclérose systémique progressive.	[76]
	Anticancéreuse	[77]
<b>Racines</b>	Antioxydante, antihémolytique	[75] [54]
	Anti-inflammatoire, analgésique	[65]
	Antimicrobienne	[78]
<b>Ecorce de la racine</b>	Hépto-protectrice	[79]
<b>Graines</b>	Brancho-relaxante	[63]

En 2009, LAM et *al.* [80] ont purifié un dimère de 62 kDa présentant une nouvelle séquence N-terminale d'acides aminés à partir des graines de *Capparis spinosa* : la lectine. Cette molécule a puissamment inhibée la transcriptase inverse du VIH-1 avec une CI50 de 0,28  $\mu$ M et la prolifération de deux hépatome HepG2 ainsi que celle des cellules MCF-7 du cancer du sein avec une CI50 d'environ 2  $\mu$ M. Elle a également induit l'apoptose des cellules HepG2 et des cellules MCF-7. Elle a manifesté une activité mitogène plus faible sur les splénocytes des souris de ConA (concanavaline A). En outre, Elle a inhibé la croissance du mycélium Valsa Mali avec une CI50 de 18  $\mu$ M.

L'huile essentielle des feuilles et boutons floraux de *Capparis spinosa* L. a montré un effet inhibiteur élevé sur la prolifération cellulaire de la lignée de cellules de carcinome du côlon humain HT-29. En outre, elle a conduit à l'inhibition du facteur nucléaire kB (NF-kB) dépendamment de la dose et du temps [77].

SHER et ALYEMENI [47] rapportent que *Capparis spinosa* L. est une plante sans risque et qu'il n'existe aucun travail scientifique qui met l'accent sur une toxicité quelconque de cette espèce.

Toutes ces activités biologiques attribuées au *Capparis spinosa* ont motivé les chercheurs d'avantage à identifier les molécules chimiques qui la caractérisent et spécialement pour trouver de nouveaux composés avec des propriétés requises.

#### 1.3.2.1. Composition chimique

*C. spinosa* contient un large éventail de composés phytochimiques, qui sont présents dans diverses parties de la plante, tel que les alcaloïdes (Capparispine), les flavonoïdes (Rutine), les lipides, les polyphénols, les terpènes, les glucosinolates, les indoles et les glucosinolates aliphatiques.

Les graines de *C. spinosa* contiennent de l'acide palmitique, l'acide oléique et l'acide linoléique [81]. Les glucosinolates comme la sinigrin, le glucoiberin et le glucocleomin ont été isolés à partir des graines et des feuilles de *C. spinosa* [36]. En outre, MATTHÄUS et BÖZCAN [82] rapportent que les huiles des graines *Capparis spinosa* de différentes régions de la Turquie sont riches en tocophérols :  $\gamma$ -tocophérol, de;  $\delta$ -tocophérol et  $\alpha$ -tocophérol. Elles contiennent du sitostérol, du

campestérol et du stigmastérol ainsi qu'un taux élevé de  $\Delta^5$ -avenastérol (entre 138,8 et 599,4 mg / kg).

YANG et *al.* [83] ont constaté que le fruit de *C. spinosa* contient une quantité importante de composés à de nombreuses vertus thérapeutiques dont trois nouveaux alcaloïdes : Capparisine A, Capparisine B, et Capparisine C et deux alcaloïdes connus : 2-(5-hydroxyméthyl-2-formylpyrrol-yl)-lactone de l'acide propionique et N-(3'-maleimidyl)-5formaldéhydehydroxyméthyl-2-pyrrole.

En Turquie, l'indole-3-glycosides d'acétonitrile et (6S) hydroxy-3-oxo- $\alpha$ -ionolglucosides ont été isolés des fruits mûrs de *C. spinosa* [84] [85].

Selon un criblage phytochimique préliminaire des Triterpénoïdes comme  $\alpha$ -amyrine, des stérols, de la  $\beta$ -carotène et des saponines ont été identifiées à partir de *C. spinosa* L. [86].

Récemment, les études d'AL-SOQEER [87] ont révélé que les antioxydants des extraits aqueux de *C. spinosa* étaient de 115.66 $\mu$ mol par 100 ml.

Les travaux de RODRIGO et *al.* [88] ont permis d'identifier des flavonoïdes à partir de *Capparis spinosa* à savoir : la rutine, le kaempférol-3-glucoside, le kaempférol-3-rutinoside et le kaempférol-3-rhamnourutinoside et dont la rutine constitue le flavonoïde le plus abondant. En effet, *Capparis spinosa* manifeste une teneur en Rutine variable selon la région et les parties botaniques de la plante étudiées [89].

Outre la rutine, le quercetin 3-O-glucoside et quercetin 3-O-glucoside-7-O-rhamnoside, l'extrait méthanolique de la partie aérienne de *Capparis spinosa* contient un nouveau flavonoïde : le quercetin 3-O-[6'''- $\alpha$ -l-rhamnosyl-6''- $\beta$ -d-glucosyl]- $\beta$ -d-glucoside [90].

Les homologues polyprénols : cappaprenol-12, cappaprenol-13 et cappaprenol-14 de 12, 13 et 14 unités isoprène, respectivement, ont pu être isolés par HPLC préparative à partir d'extraits alcooliques de *Capparis spinosa* [91].

Huit composés ont été isolés à partir du fruit de *Capparis spinosa* par des méthodes chromatographiques à savoir :  $\beta$ -sitostérol, l'acide vanillique, l'acide p-



hydroxybenzoïque, l'acide protocatechuric, daucosterol, l'uracile, l'acide butanedioïque et l'uridine [92].

### 1.3.3. Propriétés écologiques

*Capparis spinosa* est l'une des espèces qui viennent à l'avant-garde de surmonter l'appauvrissement du couvert végétal. En effet, c'est une espèce à système racinaire profond, tolérante à la sécheresse et résistante au feu, par conséquent, elle produit un grand couvert végétal qui protège les sols de la perte d'eau et de l'érosion, et peut être très utile pour la prévention de la dégradation des terres. Elle peut également être utile pour la remise en état des sols salins, les sols calcaires et les terres en jachère [26].

Les adaptations remarquables du câprier, face aux effets de l'érosion combinés à ceux de la chaleur et de la xéricité du climat, peuvent lui conférer une certaine importance dans des régions climatiques et édaphiques où d'autres espèces semblent ne pas s'adapter [6].

### 1.4. Multiplication du Câprier

*Capparis spinosa* peut être propagé par semis, bouturage, marcottage et greffage sur variété *inermis* ou encore in vitro [22].

En effet, le câprier a été traditionnellement multiplié par germination des graines avec, comme conséquence, une variabilité génétique des plantes cultivées très évidente en terme de rendement, de croissance, ainsi qu'en qualité de câpres due principalement à l'importante hétérozygotie de sa semence [93]. En outre, Le rendement de la germination des graines est médiocre. Cela est dû au problème lié à la dormance [94] et à la présence d'une couverture perméable à l'eau extrêmement dure [95].

DERCK et *al.* [96] décrivent la latence ou la dormance comme l'échec temporaire des graines pour compléter la germination, même lorsque les conditions sont favorables à cette fin. Ce procédé permet la dispersion des graines dans l'espace et dans le temps.

Le bouturage du câprier reste peu utilisé suite aux problèmes liés à l'enracinement des boutures qui reste faible et limité à des petites surfaces.

L'utilisation de boutures évite une grande variabilité en termes de production et de qualité. Néanmoins, les plantes cultivées à partir de boutures sont plus sensibles à la sécheresse pendant la première année de la plantation [97].

#### 1.4.1. Multiplication par semis

Les graines sont minuscules et sont lentes à germer comme semis transplantables. Cependant, elles germent facilement quand elles sont fraîches, mais avec un faible pourcentage [98] [99]. Afin d'obtenir un pourcentage de germination élevé, la stratification à froid doit être appliquée sur les graines fraîches. Pour cela, les graines sont placées dans un milieu humide pendant 60 jours en chambre froide à 4.2 °C [100].

Les téguments des gaines de câprier sont très résistants afin de retenir les réserves en eau [99]. En effet, la graine du genre *Capparis* est bitégumentée. La couverture est de 0,2-0,3 mm d'épaisseur, avec des parois cellulaires lignifiées, certaines avec un épaississement peu distinct ; les téguments se composent d'une couche lignifiée extérieure fibreuse, de quatre à dix-cellule d'épaisseur, il s'agit de l'exo-tégument. Et un endo-tégument lignifié composé de cellules parallélépipèdes contiguës, avec des parois radiales fortement épaissies. Seul le mésophylle entre l'endotégument et l'exotégument est non lignifié. La germination des graines de câprier montre une dépendance à l'égard de l'intégrité des structures de la couverture.

Les embryons viables germent en 3 à 4 jours après retrait partiel des téguments lignifiés [98]. Les téguments et le mucilage entourant les graines peuvent être une adaptation écologique mise en place pour éviter la perte d'eau et préserver la viabilité des semences pendant la saison sèche [98].

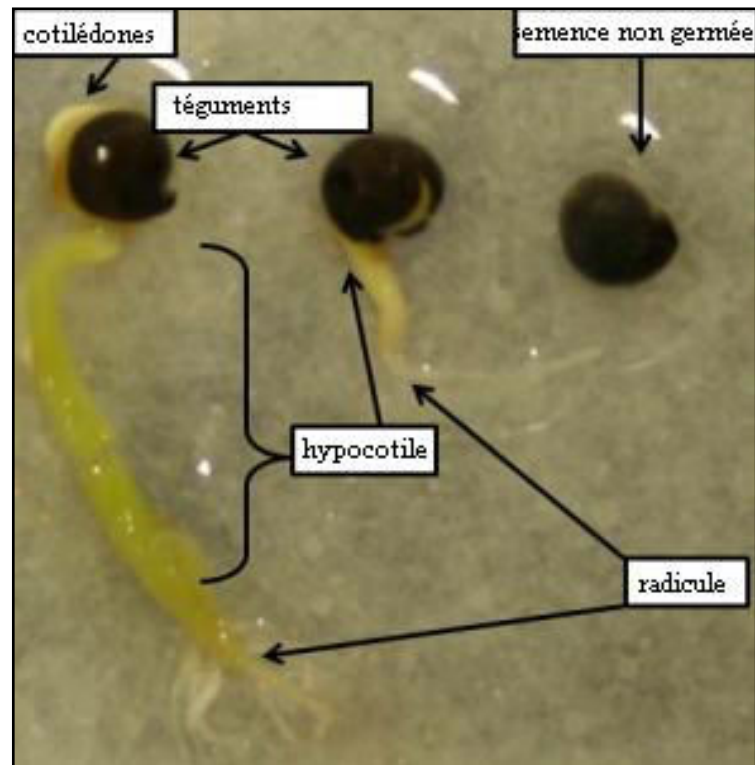


Figure 1.6 : Morphologie des graines germées du *Capparis spinosa* [101]

L'utilisation des régulateurs de croissance des plantes, en particulier les gibbérellines, a été rapportée d'augmenter le niveau de la germination des graines sèches de *Capparis spinosa* de 22% à 64% [24] [102].

#### 1.4.2. Multiplication par bouturage

Les boutures du câprier sont difficiles à enraciner pour cela, la meilleure période de collecte est Février, Mars ou Avril dans les régions méditerranéennes. Les boutures peuvent être préparées à partir des parties basales, supérieur à 1 cm de diamètre et de 8 cm de longueur avec 6-10 bourgeons [99]. Un traitement au captafol et une stratification dans une chambre à 3-4 ° C est parfois nécessaire. Ces boutures semi-ligneuses sont plantées en août et septembre où des taux de survie faibles (moins de 30 %) ont été atteints [98].

La propagation à partir de boutures ligneuses, collectées au mois de mai, de 15 et 50 cm de longueur et de 1 et 2,5 cm de diamètre est la méthode standard utilisée pour la culture de la variété «Majorque», «Italien» et «Nocella 'à Salina» en Espagne [98].



Figure 1.7 : Bouture lignifiée enracinée de *Capparis spinosa* L. [102]

Les milieux d'enracinement doivent être bien drainés. La teneur en eau doit être soigneusement contrôlée. Les boutures y sont plantées dans une serre en vertu d'un système de brouillard avec chaleur de fond ; 150 à 200 boutures / m<sup>2</sup> peuvent être plantés [99] [98].

Le traitement des boutures ligneuses par les auxines AIB et ANA semble améliorer le taux d'enracinement d'environ 79% .Cependant, ce taux ne concerne pas le nombre et la qualité des racines formées [102].

Suite aux problèmes associés à la propagation de *Capparis spinosa* L., liés essentiellement à la dormance de ses graines et le faible taux d'enracinement de ses boutures, la culture in vitro reste une alternative de la production en masse, l'amélioration et la conservation de ce dernier [8].

#### 1.4.3. Multiplication in vitro

L'utilisation des différentes techniques de la culture in vitro reste la meilleure solution qui peut surmonter les problèmes de multiplication du câprier épineux. Outre la production en masse, cette technique limite le risque de disparition engendrée par la collecte non contrôlée de l'espèce.

L'organogenèse se réfère à la formation et le développement in vitro d'organes tels que les racines (rhizogenèse) et les pousses (caulogenèse), soit directement à partir des explants ou via la différenciation des cals [103]. Elle est la base fondamentale de la multiplication végétative laquelle s'appuie toujours sur la formation de méristèmes nouveaux [104].

La formation de pousses multiples directement à partir d'un explant est souvent appelée micro-propagation. Elle est utilisée commercialement pour la production des plantes à grande échelle [103].

Véritablement, la croissance et le développement de la plante in vitro sont déterminés par les hormones végétales qui sont nécessaires en très petites concentrations. Ces régulateurs contrôlent la distribution de tous les types de substance dans la plante et sont responsables de la division cellulaire et de la croissance. Les auxines (AIA, AIB, ANA, ou 2,4-D) sont responsables de l'allongement et la division cellulaire, le gonflement des tissus, la formation de cals et la formation de racines adventives, tandis que les cytokinines (kinétine, BAP, 2ip, ou zéatine stimulent la croissance et le développement. Ils améliorent la division cellulaire et induisent la formation de pousses adventives en diminuant la dominance apicale [105].

De ce fait, le déclenchement ou la stimulation du bourgeonnement en culture in vitro résulte de l'emploi de cytokinines, éventuellement associées aux auxines. Ainsi, la caulogenèse exige un rapport cytokinines sur auxines élevé [104].

En revanche, il ne semble pas exister de règle générale concernant l'efficacité des différentes auxines et cytokinines sur la caulogenèse, les effets paraissent varier essentiellement avec le matériel végétal [104].

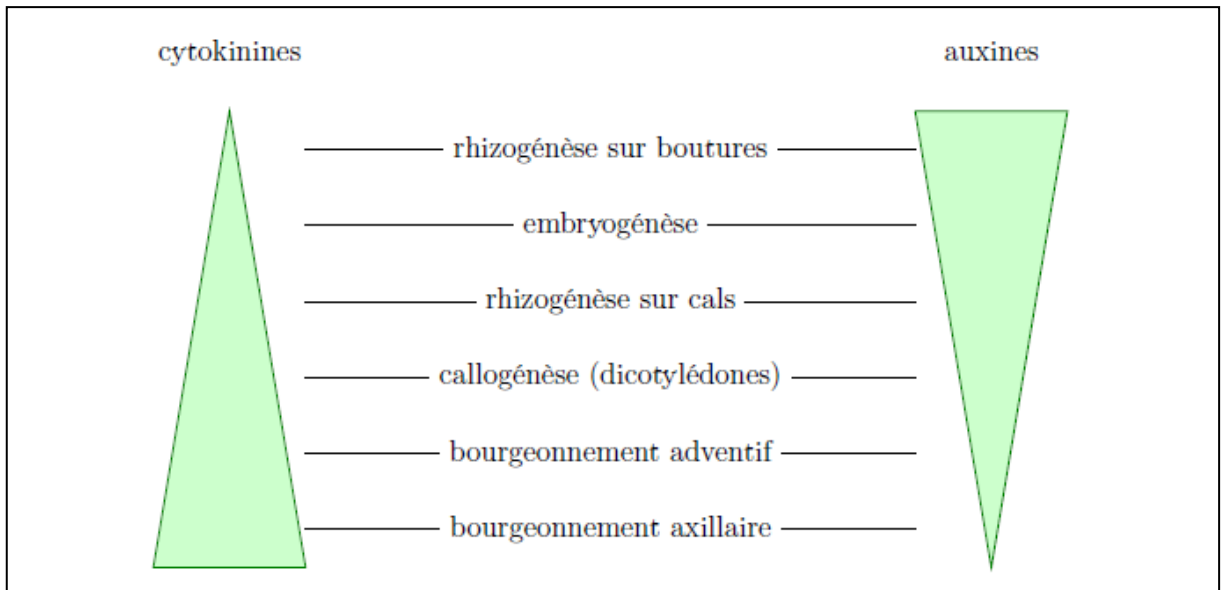


Figure 1.8 : Effets classiques de l'équilibre auxines/cytokinines sur l'organogénèse in vitro des végétaux [106] in [107].

En effet, la culture in vitro de *Capparis spinosa* L. a été réalisée pour la première fois en 1984 [108]. Par la suite, la propagation a été rapportée par plusieurs auteurs à partir de segments nodaux [10] [109] [110] [111] [112] [8] [9] [113] [7], mais aussi à partir du méristème apical [114] ou encore des explants floraux [93].

La propagation à partir de segment nodaux semble la méthode la plus utilisée pour la multiplication in vitro de *Capparis spinosa* L. En fait, c'est une technique qui consiste à isoler le bourgeon avec une partie de la tige afin de former une mini-bouture permettant au bourgeon de se développer (Figure 1.10). Cette méthode est la méthode la plus naturelle de la multiplication végétative des plantes in vitro et in vivo [115].

Toutefois, cette technique manifeste certains problèmes qui se présentent principalement lors de l'établissement de la culture axénique [112] [113]. En outre, l'enracinement in vitro qui reste une étape cruciale difficile à réussir [93], même si plusieurs auteurs ont pu atteindre un taux élevé d'enracinement, cela requière des concentrations élevées d'auxines engendrant un pourcentage important de callogénèse qui semble inapproprié pour le transfert des boutures ex-vitro [112] [8].

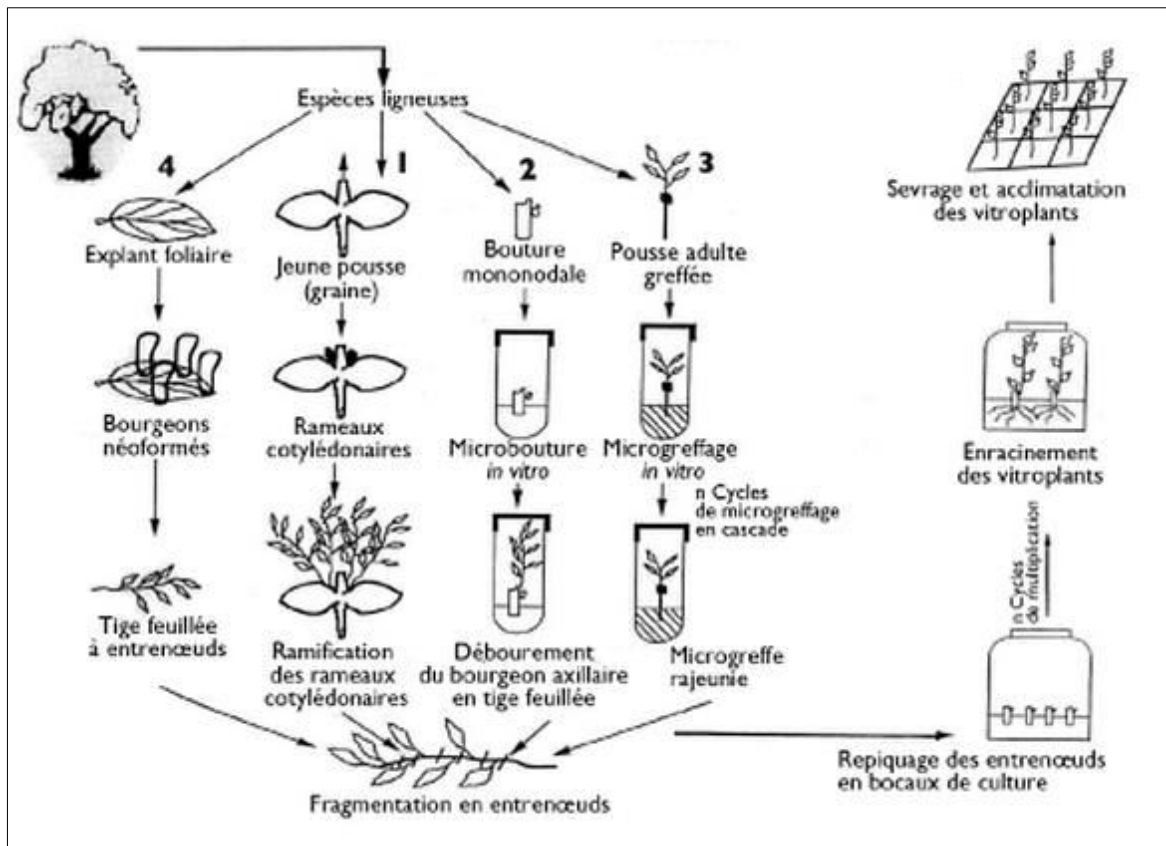


Figure 1.9 : Principales étapes de la multiplication végétative in vitro [116].

Le tissu calleux est une prolifération en masse des cellules du parenchyme qui est produite en réponse à la blessure de l'explant. Tous types d'organes (racines, tiges, feuilles, ... etc.) et de tissus peuvent être utilisés pour induire la croissance des cals [115].

D'une part, la culture de tissus ou callogenèse peut constituer un moyen de multiplication très efficace, en fait, un cal pouvant produire beaucoup plus de bourgeons adventifs qu'une micro-bouture de bourgeons axillaires [117] mais, La régénération de pousses à partir du cal peut se traduire par une variation somaclonale, qui dépend du génotype, l'âge et le type du cal, le milieu de culture, et le type de régulateurs de croissance de la plante utilisée ainsi que le nombre de sous-cultures [118]. Néanmoins, la variation somaclonale, tout en étant indésirable pour la propagation clonale, reste idéale pour la création de variabilité génétique qui peut être utile pour l'amélioration des plantes [119].

D'autre part, la callogenèse constitue une source constante et fiable de tissus à utiliser pour la production de métabolites. Cela est principalement du au contrôle

des conditions de culture chimiques et physiques qui permet de garantir une production standard de métabolites secondaires, contrairement, à l'ex vitro où les plantes cultivées sont souvent exposées aux conditions environnantes et leurs constituants peuvent varier en conséquence [120].

Sur le plan physiologique, au cours de la formation d'un cal, il ya un certain degré de dédifférenciation à la fois morphologique et métabolique. Une conséquence importante de cette dédifférenciation est que la plupart des plantes en culture perdent leur capacité à réaliser la photosynthèse et le profil métabolique ne sera probablement pas semblable à celui de la plante mère [121].



## CHAPITRE 2

### MATERIEL ET METHODES

Cette étude a été réalisée au sein du laboratoire de micro-propagation industrielle de l'unité Paysagisme et Espaces Verts (UPEV) situé à Bab Ezzouar dans la wilaya d'Alger.

L'extraction et dosage des polyphénols ont été effectués au laboratoire de recherche des biotechnologies végétales du département Biologie et physiologie cellulaire de l'université Blida 1.

L'étude histologique a été réalisée dans le laboratoire d'anatomie pathologique au niveau du Centre hospitalier universitaire Frantz Fanon de Blida.

#### 2.1. Matériel végétal

Le câprier épineux a été récolté dans la région de Hammam-Melouane située à la pointe Nord-Est du Parc National de Chréa à une altitude de 313 mètres (Figures 2.1 et 2.2).



Figure 2.1 : Situation géographique du site Hammam Melouane [Google satellite, 2014].





Figure 2.2 : *Capparis spinosa* L., présentant des tiges tentaculaires, dans son milieu naturel –Hammam Melouane, Parc National de Chréa. [Originale, 2014].



Figure 2.3 : *Capparis spinosa* L., présentant des tiges dress es, dans son milieu naturel –Hammam Melouane, Parc National de Chréa. [Originale, 2014].





Figure 2.4 : *Capparis spinosa* L., pendant sur une falaise, dans son milieu naturel – Hammam Melouane, Parc National de Chréa. [Originale, 2014].

Trois récoltes ont été effectu es :

- Octobre 2013 : branches lignifi es.
- Mai 2014 : jeunes branches  g es d’un à deux mois contenant feuilles et bourgeons floraux.
- Octobre 2014 : Feuilles et bourgeons floraux.



Figure 2.5 : Epines recourbées caractéristiques de l'espèce *Capparis spinosa* L. de la région de Hammam Melouane, Parc National de Chréa [Originale, 2014].



Figure 2.6 : *Capparis spinosa* L., présentant des feuilles à base tronquée et à apex rétusé et des boutons floraux globuleux, récolté de la région de Hammam Melouane, Parc National de Chréa [Originale, 2014].





Figure 2.7 : *Capparis spinosa* L., présentant des branches lignifiées et des fleurs non encore épanouies à gynophore dressé, récolté de la région de Hammam Melouane, Parc National de Chréa [Originale, 2014].



Figure 2.8 : Fruit de *Capparis spinosa* L. de la région de Hammam Melouane, Parc National de Chréa [Originale, 2014].

## 2.2. Milieux de culture

Les milieux de culture utilisés sont :

- Milieu MS [122]
- Milieu B5 [123]
- Woody Plant Medium WPM [124] (Appendice B)

Les milieux sont préparés à partir des solutions mères de stockage selon la quantité désirée. Ce sont des solutions concentrées des sels minéraux des milieux de culture utilisés, préparées avec de l'eau pure qui se conservent au frais afin de ralentir la prolifération microbienne.

Pour l'ensemble des milieux utilisés, le pH est ajusté à 5.8 après ajout d'acide ascorbique et du myoinositol à une concentration de 100mg/l chacun. Les milieux sont ensuite placés sur une plaque chauffante en additionnant 30g/L sucre, 6g/l agar et 500mg/l charbon actif.

L'ajout des hormones de croissance se fait avant l'autoclavage des milieux de culture à partir des solutions mères préparées en dissolvant 0,01 g d'hormone dans 100 ml d'eau distillée après ajout de quelques gouttes de KOH pour les auxines et HCl pour les cytokinines.

Les milieux sont autoclavés pendant 20 minutes à une température égale à 120°C et une pression de 1bar. Ils sont conservés au frais jusqu'à leur utilisation.

## 2.3. Désinfection du matériel végétal

Pour pallier aux problèmes de contamination des explants mis en culture, surtout d'ordre fongique, deux traitements de désinfection ont été testés à savoir le traitement A et le traitement B (Tableau 2.1).

Tableau 2.1 : Traitements de désinfection des explants avant leur mise en culture.

	Thiophanate- methyl 70% (g/L)	Durée (min)	Alcool (°)	Durée (min)	Eau Javel (NaOCl°)	de	Durée (min)
Traitement A	1	20	70	1	6		15
Traitement B	2	20	70	1	13		15

Pour cela, le matériel végétal découpé en petits fragments et défeuillé est d'abord rincé par l'eau courante de robinet ensuite lavé par un désinfectant (ISIS liquide vaisselle). Plusieurs rinçages ont été effectués pour éliminer les traces du désinfectant. Sous hôte à flux laminaire, le matériel végétal est trempé dans un fongicide à base de Thiophanate-methyl 70% sous agitation continue pendant vingt minutes suivi d'un rinçage à l'eau distillée stérile. Ensuite, un trempage dans de l'alcool 70° pendant une minute a été effectué suivi d'un rinçage à l'eau distillée stérile. A la fin, le matériel végétal est trempé pendant quinze minutes dans une solution d'eau de Javel contenant du NaOCl et rincé à l'eau distillée stérile six fois de suite pendant dix minutes chacune (Figure 2.9).

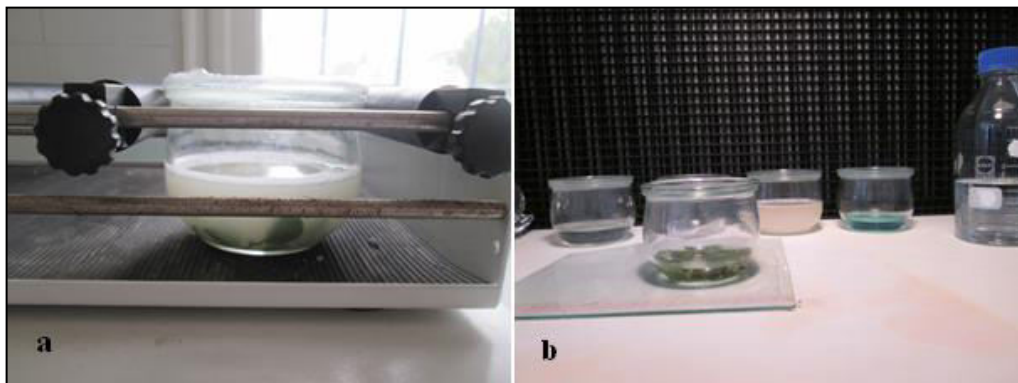


Figure 2.9 : Quelques étapes de la désinfection des explants avant leur mise en culture.

a) Végétal trempé dans une solution de Thiophanate-methyl 70% sous agitation continue b) Rinçage à l'eau distillée suivi par des trempages dans de l'alcool 70° et l'eau de Javel sous hotte à flux laminaire.

Après une semaine de mise en culture le taux de contamination et le taux de nécrose ont été calculé pour les deux traitements A et B.

#### 2.4. Organogenèse in vitro

La micro-propagation du câprier épineux a été réalisée par voie directe : organogenèse directe, à partir des cultures des nœuds provenant des jeunes branches récoltées au mois de mai. L'ensemble des manipulations du matériel végétal depuis sa mise en culture jusqu'à son enracinement ont été réalisées sous hotte à flux laminaire à l'aide de scalpels et de pinces préalablement stérilisés.

Les pousses régénérées directement sont ensuite multipliées et enracinées. Quant aux explants nodaux callogènes, ils sont transférés dans des milieux de néoformation.

Les tubes et bocaux contenant les explants sont placés dans une chambre de culture à une température de  $25^{\circ}\text{C}\pm 2$  et une photopériode de 16 heures de lumière et 8 heures d'obscurité.

##### 2.4.1. Mise en culture

Afin de déterminer quel milieu est favorable à la caulogenèse de *Capparis spinosa* L., des fragments de tige défeuillés et désinfectés ont été découpés en explants de 5 mm de long mono ou binodaux et mis en culture, verticalement, dans des tubes de 25 X 150 mm contenant 20 ml de milieu de culture (Figure 2.10) à savoir :

- Milieu MS +1mg /L BAP+ 0.1 mg/L AIA
- Milieu WPM +1mg /L BAP+ 0.1 mg/L AIA

En raison de 40 explants par milieu (Tableau 2.2).

Tableau 2.2 : Milieux utilisés pour la mise en culture des fragments nodaux de *C. spinosa* L.

Combinaisons	Milieu	BAP (mg/l)	AIA (mg/l)
M <sub>1</sub>	MS	1	0.1
W <sub>1</sub>	WPM	1	0.1



A partir de la 4<sup>ème</sup> semaine de culture plusieurs paramètres ont été observés et étudiés à savoir : le taux de débourrement des bourgeons, le nombre, la longueur et la vigueur des pousses régénérées, le nombre et la couleur des feuilles, le taux de callogenèse, la couleur et la friabilité des cals, le taux de vitrification et de néoformation des bourgeons ont été mentionnés et cela pendant 4 mois de culture.



Figure 2.10 : Mise en culture des fragments nodaux de *Capparis spinosa* L.

#### 2.4.2. Néoformation de pousses à partir des cals

Les cals obtenus après 4 mois de culture ont été transférés aux milieux MS contenant différentes concentrations et combinaisons hormonales (Tableau 2.3) et ce, afin de déterminer la meilleure concentration hormonale favorisant l'organogenèse indirecte (caulogenèse).

Six explants contenant différents type de cals ont été utilisés pour chaque milieu (100 ml de milieu par bocal contenant 6 explants).

Tableau 2.3 : Différents milieux de caulogenèse à partir des cals de *C. spinosa* L.

Milieu MS	BAP (mg/l)	AIA (mg/l)
D <sub>0</sub> (Témoin)	0	0
D <sub>1</sub>	1	0
D <sub>2</sub>	1	0,1
D <sub>3</sub>	2	0

A partir de la 4<sup>ème</sup> semaine de culture, le taux de caulogenèse, le nombre et la longueur des pousses régénérées, le nombre et la couleur des feuilles ainsi que le nombre de bourgeons axillaires ont été mentionnés pour chaque milieu.

### 2.4.3. La multiplication

Afin de déterminer quelle est la combinaison hormonale qui favorise le mieux la multiplication de *Capparis spinosa* L. in vitro, les pousses régénérées par voie directe ont été fragmentées en explants de 5mm et cultivées sur milieu de multiplication WPM contenant différentes concentrations/combinaisons d'hormones de croissance (Tableau 2.4).

Tableau 2.4 : Milieux de multiplication in vitro de *Capparis spinosa* L.

	WPM	BAP (mg/l)	AIA (mg/l)	GA <sub>3</sub> (mg/l)
M <sub>0</sub> (Témoin)	+	0	0	0
M <sub>1</sub>	+	1	0	0
M <sub>2</sub>	+	1	0.1	0
M <sub>3</sub>	+	1	0.05	0.1

Six explants sont utilisés pour chaque milieu (un bocal contenant 100 ml de milieu de culture et six explants) (Figure 2.7).

Après six semaines de culture, le taux de multiplication, le nombre et la longueur des pousses régénérées, le nombre et la couleur des feuilles ainsi que le taux de callogenèse et de vitrification ont été mentionnés pour chaque combinaison.



Figure 2.11 : Explants de *Capparis spinosa* L. sur milieu de multiplication

#### 2.4.4. L'enracinement

Afin d'étudier l'effet des hormones de croissance sur la rhizogenèse chez *Capparis spinosa* L., des pousses de 5mm de diamètre ont été cultivées sur différents milieux d'enracinement. Pour cela, deux sortes de traitements ont été employées concernant les hormones de croissance pour l'induction de la rhizogenèse.

La première consiste à cultiver les explants dans des milieux MS contenant 1,5 mg/l AIA, AIB ou ANA. La deuxième, quant à elle, consiste à tremper les explants dans des solutions d'hormones AIA, AIB, ANA à 100mg/l à l'obscurité pendant une heure et de les cultiver ensuite sur milieu MS dépourvu d'hormones de croissance (Tableau 2.5).

Sept explants sont utilisés pour chaque milieu (un bocal contenant 100 ml de milieu de culture et 7 explants).

Après quatre semaines de culture, le taux de rhizogenèse, le nombre et la longueur des racines régénérées ainsi que le taux de la callogenèse ont été mentionnés pour chaque milieu.

Tableau 2.5 : Différents milieux d'enracinement testés pour la rhizogenèse de *C. spinosa* L.

			Hormone ajoutées au milieu de culture (mg/l)			Solution de trempage à base d'hormone (mg/l)		
			AIA	AIB	ANA	AIA	AIB	ANA
Culture sur milieu MS sans prétraitement	M <sub>0</sub> (Témoin)	0	0	0	-	-	-	
	M <sub>1</sub>	1,5	0	0	-	-	-	
	M <sub>2</sub>	0	1,5	0	-	-	-	
	M <sub>3</sub>	0	0	1,5	-	-	-	
Culture sur milieu MS après prétraitement	T <sub>0</sub> (Témoin)	0	0	0	0	0	0	
	T <sub>1</sub>	0	0	0	100	0	0	
	T <sub>2</sub>	0	0	0	0	100	0	
	T <sub>3</sub>	0	0	0	0	0	100	

## 2.5. Etude histologique de *Capparis spinosa* L.

L'objectif de cette étude étant de mieux connaître l'organisation des différents tissus de la partie aérienne de *Capparis spinosa* L., de mettre en évidence d'éventuelles adaptations histologiques profondes de la plante et d'essayer de comprendre le phénomène de vitrification ainsi que ceux de la callogenèse et la néoformation des bourgeons, des coupes histologiques de différentes parties végétales ont été effectuées suivies par différentes colorations.

### 2.5.1 Confection des coupes histologiques au microtome avec inclusion à la paraffine

Les techniques histologiques comprennent 4 étapes essentielles : la fixation, la déshydratation, l'inclusion, puis la confection des préparations. Le protocole utilisé est celui proposé par SPENCER LOPES [125] modifié (Appendice C).



Figure 2.12 : Blocs de paraffine contenant les échantillons à couper.

### 2.5.2. Coloration des coupes

Selon les objectifs de l'étude plusieurs colorations ont été réalisées (Appendice D) :

### 2.5.2.1. Coloration Vert de méthyle-Rouge Congo

Cette coloration a pour but de mettre en évidence la structure anatomique, c'est-à-dire l'agencement des différents tissus. En effet, Le Rouge Congo est retenu par les épaissements pectocellulosiques, tandis que le vert de méthyle est retenu par la lignine et ses dérivés.

### 2.5.2.2. Coloration topographique à l'hématoxyline et à l'éosine

Cette coloration met en évidence de façon très nette les cellules méristématiques. En effet, l'éosine est un colorant acide, qui a une affinité sélective pour le cytoplasme cellulaire ; elle se fixe de préférence aux molécules basiques telles que les groupements positifs des protéines cytoplasmiques. En revanche, l'hématoxyline (l'hématéine) (NH<sup>+</sup>) colorant basique, va se fixer sur les acides phosphoriques des noyaux. Le résultat de leur action étant noyaux colorés en bleu et cytoplasme en nuances de rose, l'observation au microscope va permettre de repérer les cellules méristématiques à rapport nucléocytoplasmique élevé.

Tableau 2. 6 : Colorations des coupes histologiques de *C. spinosa* L.

Organes	Coloration des coupes
Feuilles in situ	-Vert de méthyle/ Rouge Congo - Hématoxyline et éosine
Tiges in situ	-Vert de méthyle/ Rouge Congo - Hématoxyline et éosine
Feuilles in vitro	-Vert de méthyle/ Rouge Congo - Hématoxyline et éosine
Tiges et apex in vitro	-Vert de méthyle/ Rouge Congo - Hématoxyline et éosine
Feuilles vitrifiées	-Vert de méthyle/ Rouge Congo - Hématoxyline et éosine
Apex vitrifiés	- Hématoxyline et éosine
Explants callogènes	-Hématoxyline et éosine

### 2.5.3. Montage et observation des coupes au microscope

Les lames ont été parsemées de quelques gouttes d'Eukit (Montage Eukit) et recouvertes de lamelles sans faire de bulles. Après séchage les lames peuvent être conservées indéfiniment.

L'observation a été réalisée à l'aide d'un microscope photonique à différents grossissements.



Figure 2.13 : Echantillons colorés à l'hématoxyline/Eosine et montés entre lame et lamelle.

### 2.6. Essai d'optimisation in vitro de la production des polyphénols

Un essai d'optimisation de la production des polyphénols totaux à partir des feuilles de *Capparis spinosa* L. a été conduit in vitro comme suit :

## 2.6.1. Induction de la callogenèse

### 2.6.1.1. Préparations des explants

Après leur désinfection comme décrit précédemment, des jeunes feuilles découpées en disques de 5mm ont servi comme explants.

### 2.6.1.2. Mise en culture

Les disques foliaires ont été cultivées dans des boîtes de Pétri contenant 20ml de milieu de culture.

Afin de déterminer le milieu favorable pour l'induction de la callogenèse chez *Capparis spinosa* L. Les milieux MS et B5 ont été testés combinés ou non à l'hormone de croissance 2,4-D à 0, 0.5 et 1 mg/l (Tableau 2.11).

Tableau 2.7 : Milieux utilisés pour l'induction de la callogenèse à partir des disques foliaires du *Capparis spinosa* L.

Combinaisons	Milieu	2,4-D mg/l
MC <sub>0</sub> (Témoin)	MS	0
MC <sub>1</sub>	MS	0.5
MC <sub>2</sub>	MS	1
BC <sub>0</sub> (Témoin)	B5	0
BC <sub>1</sub>	B5	0.5
BC <sub>2</sub>	B5	1

Les boîtes ont été placées dans la chambre de culture à l'obscurité avec 10 répétitions pour chaque combinaison (10 explants par boîtes) (Figure 2.10).

Le taux de callogenèse, le diamètre, le poids, la couleur et la friabilité des cals ont été mentionnés pour chaque milieu après 5 semaines de culture.

Les cals obtenus ont été sub-cultivés sur milieu MS + 1mg/l 2,4-D afin d'obtenir assez de cals pour les expérimentations suivantes.

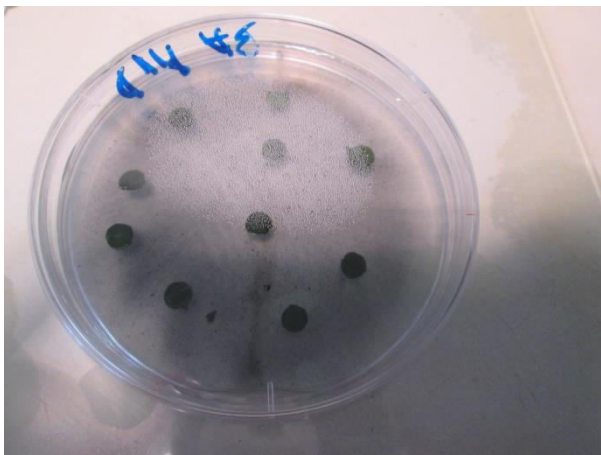


Figure 2.14 : Disques foliaires du *C. spinosa* L. mis en culture sur milieu de callogenèse

### 2.6.1.3 Prétraitement au froid

Dans une autre expérimentation et afin d'étudier l'effet du prétraitement au froid sur l'induction des cals et la production des polyphénols, des feuilles jeunes du *Capparis spinosa* L. ont été conservées à 4°C pendant 4 mois. Elles ont été désinfectées comme nous l'avons décrit précédemment puis découpées en disques de 5 mm et mise en culture dans des boîtes de Pétri de 9 cm de diamètre contenant milieu MS additionné de 1mg/l 2,4 D + 1,5 mg/l BAP, en raison de 10 explants par boîte.

Les boîtes sont placées à l'obscurité dans la chambre de culture. Après 7 semaines, le taux de callogenèse, le diamètre des cals la couleur et la consistance sont mentionnées.

### 2.6.2. Multiplication des cals

Afin d'obtenir assez de cals pour les expérimentations à venir, les cals induits ont été sub-cultivés sur milieu MS contenant 1mg/l 2,4 D + 1,5 mg/l BAP.

Les boîtes contenant 20 ml de milieu de culture et 10 cals de 5mm de diamètre sont placées à l'obscurité dans la chambre de culture.

Le poids, la couleur et la friabilité des cals sont enregistrés après 8 semaines de culture.



### 2.6.3. Dosage des polyphénols

#### 2.6.3.1. Préparation des extraits bruts

Les extraits bruts sont préparés à partir de différents matériel végétal à savoir :

- Feuilles de *C. spinosa* récoltées en mois d'octobre
- Cals de *C. spinosa* cultivé sur milieu MS + 1mg/l 2,4-D + 1.5 mg/l BAP.

Les extraits hydrométhanoliques (70 %) sont préparés par dissolution de 1 g de la matière végétale dans 20 ml de solvant. Après une macération de 24 heures sous agitation continue à température ambiante, le mélange est filtré.

L'opération est répétée trois fois avec renouvellement du solvant toutes les 24 heures. Les trois fractions filtrées sont regroupées et évaporées à sec [126].

#### 2.6.3.2. Dosage par spectrophotométrie

Les différents extraits ont été solubilisés dans le méthanol pour le dosage des polyphénols totaux.

Le taux de polyphénols totaux est déterminé par spectrophotométrie en utilisant le réactif de Folin-Ciocalteu. La coloration produite, dont l'absorption maximale est comprise entre 700 et 760 nm, est proportionnelle à la quantité de polyphénols présente dans les extraits végétaux [127].

Le dosage de ces polyphénols est réalisé selon la méthode décrite par VERMERIUS et NICHOLSON [128]. Pour cela, 0,1 ml de l'échantillon est mélangé avec 2 ml d'une solution de carbonate de sodium à 2 %. Après agitation et d'incubation de cinq minutes, 100 µl du réactif de Folin-Ciocalteu à 1 N sont additionnés ; après 30 minutes d'incubation à température ambiante, la lecture des densités optiques (DO) est faite à 700 nm contre un blanc. Une courbe d'étalonnage est réalisée en parallèle dans les mêmes conditions expérimentales en utilisant l'acide gallique comme contrôle positif à concentrations finales allant de 0,1 à 1 mg/ml par palier de 0,2.

## 2.7. Etude statistique

L'étude statistique a été réalisée par le logiciel Statistica 8.0 de Statsoft Inc, Tulsa, USA.

Pour les taux et pourcentages, le test khi carré a été employé afin de vérifier l'indépendance entre variables. Pour les petits échantillons, la correction de Yates et le test de Fisher ont été effectués.

Du fait que nos données ne sont pas normalement distribuées, des tests non paramétriques ont été établis afin de vérifier la signification des résultats à un risque  $\alpha = 0,05$ .

Le test U de Mann-Whitney est utilisé pour la comparaison entre deux échantillons indépendants.

Le test d'analyse de variance ANOVA de Kruskal Wallis est employé pour la comparaison de plusieurs échantillons. Si une différence existe entre les échantillons, un test U de Mann-Whitney est utilisé pour comparer les échantillons deux à deux à un risque  $\alpha = 0,05/n$  (où n est le nombre d'échantillons) afin de cibler les groupes responsables de cette différence.

## CHAPITRE 3

### RESULTATS ET DISCUSSION

#### 3.1. Organogenèse de *Capparis spinosa* L.

##### 3.1.1. Effet des traitements de désinfection sur l'état de l'explant mis en culture

Les deux traitements utilisés pour la désinfection des explants avant la mise en culture, à savoir, le traitement A et le traitement B semblent mener une action différente sur les explants.

Le traitement B semble plus efficace que le traitement A avec un taux de contamination de 28,57 %, un taux de nécrose de 19% et un taux de survie des explants de 52,38%. En revanche, le traitement A permet d'enregistrer un taux élevé de contamination égale à 75,34%, ainsi que des taux faibles de nécrose et de survie des explants de 6,84% et 32,87% respectivement (Figure 3.1).

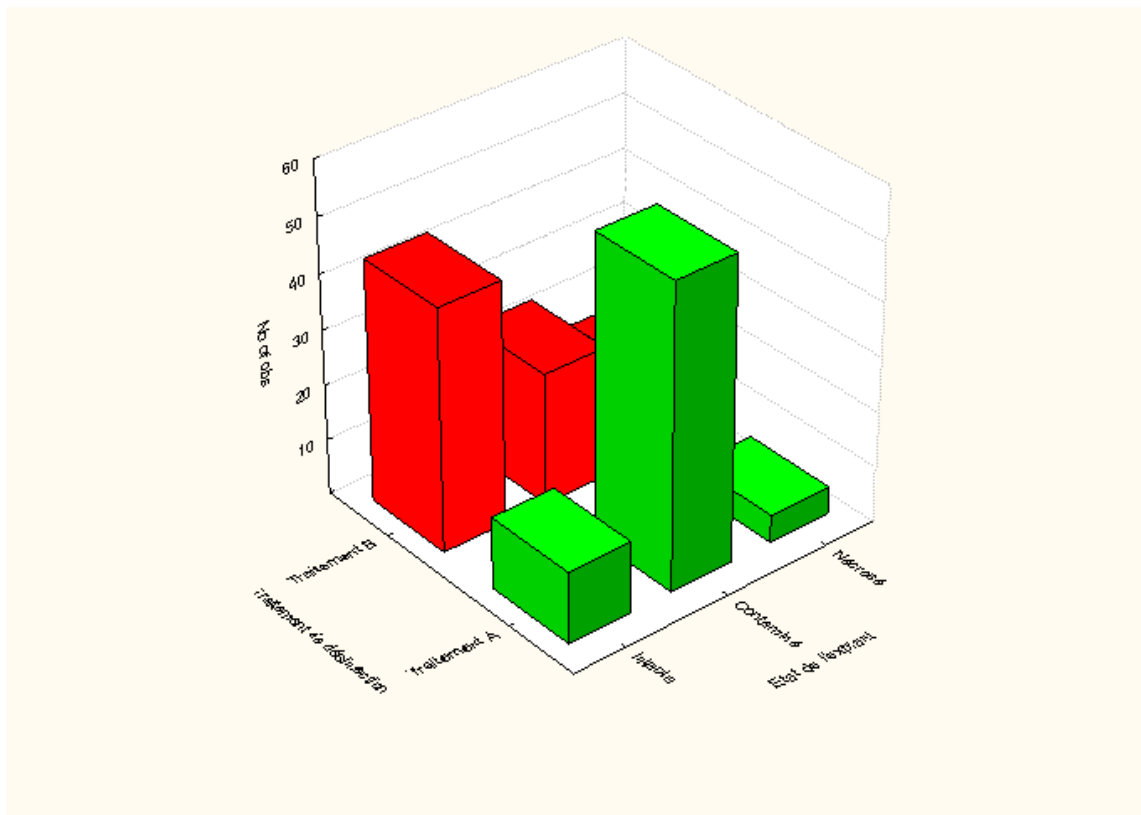


Figure 3.1 : Etat des explants soumis aux traitements A et B après une semaine de culture

Le test khi carrée de Pearson montre que la différence observée est très hautement significative (khi carré = 34,1832,  $p=0,000000$ ) entre le traitement A et le traitement B (Appendice E.1).

L'analyse des résidus (Appendice E.2) montre que les explants ont moins tendance à être contaminés quand ils sont traités par le traitement B, ce qui explique leur taux élevé de survie mais aussi leur aptitude à se nécroser, ce qui est probablement due à la concentration élevée d'hypochlorite de sodium ( $13^\circ$ ) dans le traitement. En revanche, les explants soumis au traitement A ont plus tendance à se contaminer principalement par des champignons et par conséquent ont moins de chance à rester intacte pour le débourrement. Cela est dû à la faible concentration en Thiophanate-methyl (1g/l) et en hypochlorite de sodium ( $6^\circ$ ) ce qui explique en contre partie leur taux de nécrose moins important (Figure 3.2).

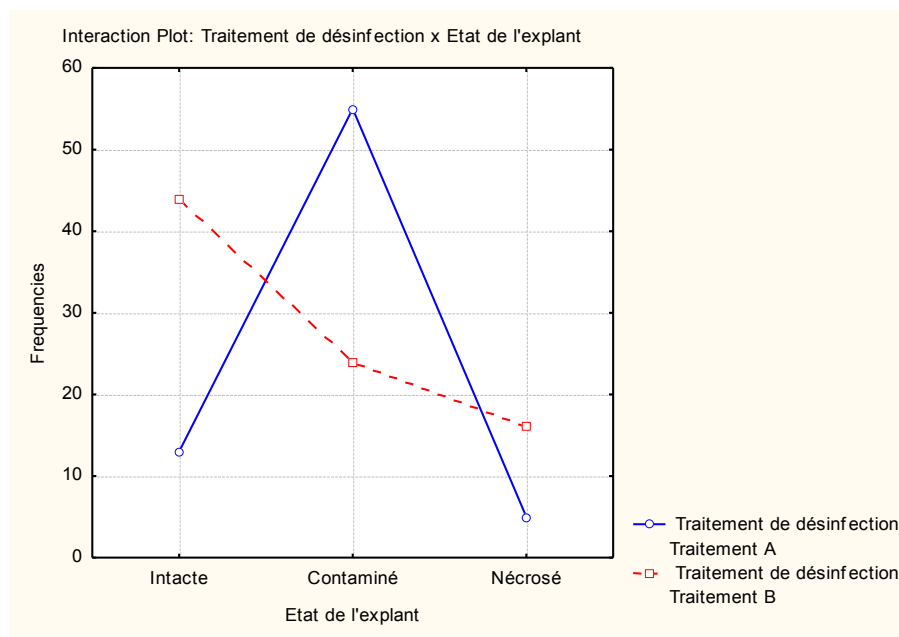


Figure 3.2 : Effet des traitements de désinfection sur l'état des explants mis en culture

L'introduction du câprier in vitro pourrait être très difficile par la présence des micro-organismes sur la surface du matériel végétal collecté de son milieu naturel, ceci pourrait limiter l'initiation d'une culture axénique [93].

L'utilisation du matériel jeune et frais est habituellement préférée, mais cela limite la période de la collecte. Les recherches ont montré que le matériel végétal

récolté pendant la fin de l'été est très difficile à introduire in vitro ; en effet quand les explants sont introduits in vitro, un pourcentage élevé de ceux-ci meurent à cause des contaminations bactérienne et fongique [113].

Dans nos essais préliminaires, nous avons désinfecté par l'eau de Javel et l'alcool le matériel récolté à la fin du mois d'octobre, les résultats ont montré un pourcentage très élevé, dépassant les 90% de contamination fongique. Ceci montre l'importance de l'utilisation d'un fongicide pendant l'étape de désinfection.

Cependant, MUSALLAM et *al.* [8] ont pu obtenir un taux de contamination inférieur à 5% en traitant les explants nodaux de *Capparis spinosa* L. avec une solution d'eau de Javel 15% contenant 5,25% d'hypochlorite de sodium. Contrairement à ces résultats, CHALAK et ALBITAR [112] n'ont pas dépassé les 57% de réponses des explants par utilisation d'une solution d'hypochlorite de sodium moins concentrée (0,2%).

Selon MUSALLAM et *al.* [8] les fragments nodaux semblent être constitués de bons explants pour l'initiation de la culture in vitro de *Capparis spinosa* L. car ceux-ci supportent mieux les concentrations élevées des désinfectants que les méristèmes apicaux.

### 3.1.2. Effet des milieux de culture sur le débourrement

Deux milieux de culture MS et WPM (combinés à des hormones de croissance : BAP à 1mg/l et AIA à 0,1 mg/l) ont été testés pour leur efficacité sur le débourrement des bourgeons des fragments nodaux (Figures 3.3 et 3.4).

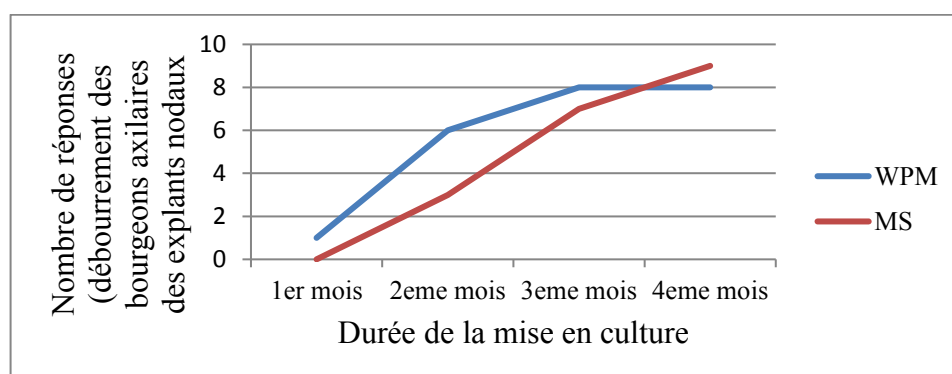


Figure 3.3 : Réponse des explants nodaux représentée par le débourrement des bourgeons axillaires en fonction de la durée de la mise en culture sur milieu WPM et milieu MS.

Le débourrement des bourgeons axillaires des fragments nodaux a été observé après 15 jours de mise en culture sur le milieu WPM. Les réponses observées n'étaient pas uniformes dans le temps. Ainsi la régénération de nouvelles pousses s'est produite pendant 4 mois de la mise en culture de façon intermittente (Figures 3.3 et 3.4).

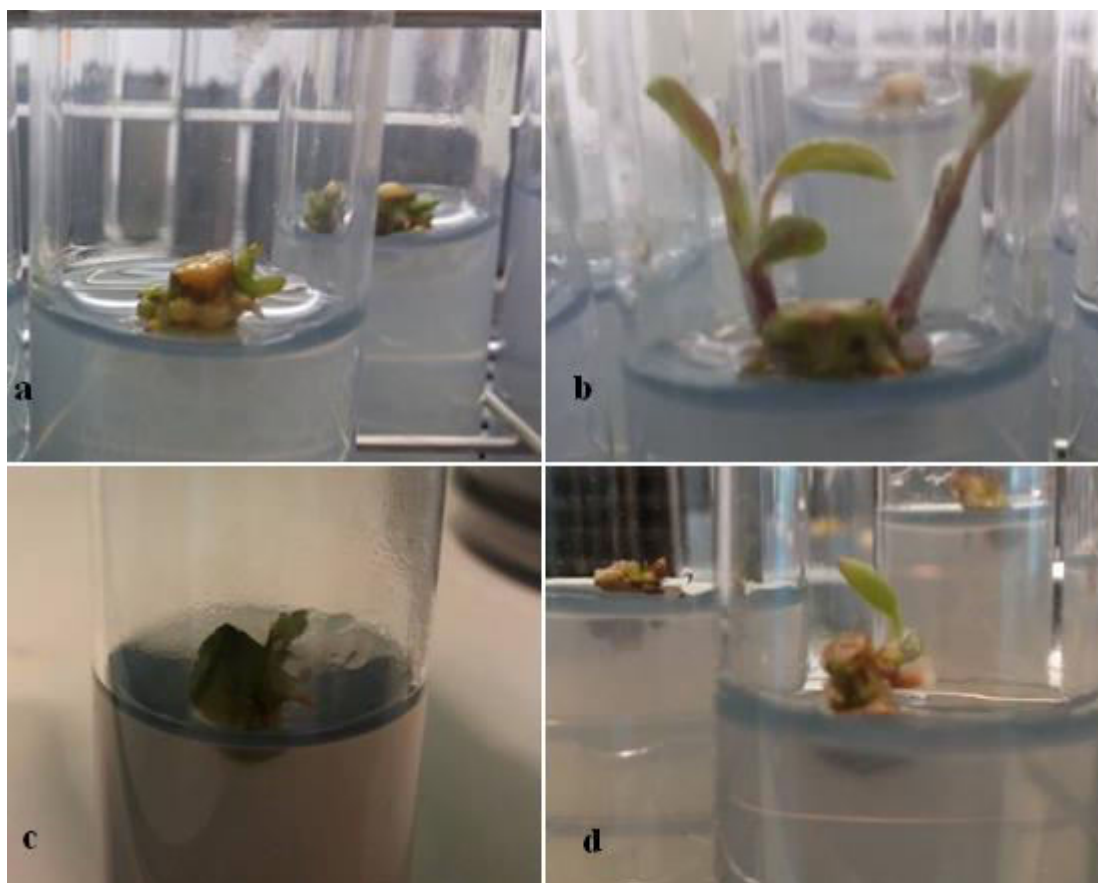


Figure 3.4 : Réponses des fragments nodaux mise en culture sur WPM

a) Bourgeons débourrés après 4 semaines de mise en culture, b) 1<sup>ères</sup> pousses régénérées sur milieu WPM après 4 semaines de mise en culture, c et d) bourgeons débourrés après 6 semaines de mise en culture.

Ce phénomène pourrait être expliqué par l'origine des explants nodaux collectés à partir de différents pieds mères et ensuite prélevés au hasard des tiges de ceux-ci.

Selon DEBERGH et MAENE [129], pour garantir une réponse uniforme des explants, on utilise souvent comme source d'explants des plantes mères cultivées dans des conditions optimales, du point de vue physiologique. En effet, l'âge physiologique de la plante mère peut avoir une influence déterminante sur la

réponse de l'explant [104]. De même, l'état physiologique et la période de prélèvement influencent considérablement cette étape du fait de l'intervention des substances de croissance endogènes surtout au niveau des explants semi-ligneux. En fait, la période printanière qui correspond à une activité physiologique importante et un flux ascendant est la période la plus favorable à une multiplication intense d'axillaires [130].

La localisation originelle des fragments nodaux sur les tiges des plantes mères pourrait influencer le débourrement des bourgeons axillaires. Des expériences menées sur des plantes de pois concluent que le fait que les bourgeons situés à différents nœuds montrent des degrés de réactivité variables, vis-à-vis la décapitation du bourgeon apical et / ou le traitement de cytokinines, suggère que la localisation du bourgeon sur la tige peut influencer son excroissance potentiel. Selon DUN et *al.* [131], il existe trois zones morphologiques de la croissance et du développement des végétaux : la zone d'enrichissement qui représente la région où les inflorescences se développent; la zone de l'inhibition, adjacente à la zone d'enrichissement où il y a peu d'excroissance de bourgeons et la zone de l'innovation à la base de la plante, où les bourgeons, sont soit restés en dormance ou ils se sont développés en branches axillaires plus ou moins phénocopies de la tige principale. Ces zones morphologiques influencent la réactivité des bourgeons axillaires vis-à-vis des signaux comme la cytokinine [132], l'auxine [133] et le SMS [134].

Concernant l'efficacité des deux milieux de culture WPM et MS sur le taux de débourrement, le test exact de Fisher ne montre aucune différence significative (Appendice E.3). Les deux milieux WPM et MS semblent avoir une action similaire sur le développement des bourgeons axillaires ayant des taux de débourrement respectivement de 42,10% et 32,14% (Figure 3.5).

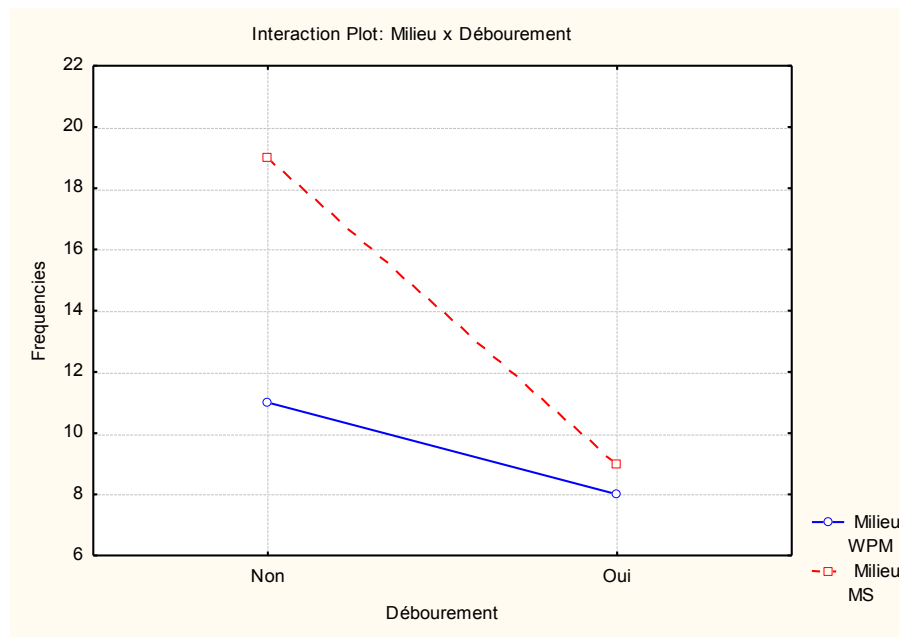


Figure 3.5 : Effet des milieux de cultures MS et WPM combinés à des hormones de croissance (1mg/BAP + 0,1 mg/l AIA) sur le taux de débourement des bourgeons.

Plusieurs auteurs ont réussi la mise en culture à partir des fragments nodaux sur les milieux WPM et MS combinés ou non à des hormones de croissance [10] [109] [110] [111] [112] [8] [9] [113] [7].

Les travaux de CHALAK et ELBITAR [112] ont montré un taux de réponses de 30,6 % sur milieu MS supplémenté avec 1mg/l BAP après deux mois de la mise en culture.

TIAN et *al.* [135] ont pu induire la régénération de pousses à partir des bourgeons axillaires sur milieu DKW combiné à une cytokinine et à une auxine (0,3 mg/l BAP + 0,05 mg/l ANA).

L'initiation de la mise en culture des segments nodaux a été faite avec succès sur milieu WPM et milieu MS par MUSALLAM et *al.* [8].

AL-MAHMOOD et *al.* [7] ont réussi l'initiation du matériel végétal *in vitro* en sub-cultivant des fragments nodaux toutes les six semaines sur milieu MS supplémenté avec 1mg/l BAP et 0,1 mg/l AIA.



### 3.1.3. Effet des milieux de culture sur le nombre de pousses régénérées par explant

Après 4 mois de la mise en culture, nous avons enregistré une moyenne de 1,23 pousse par explant sur l'ensemble des milieux utilisés. Cependant, le nombre maximal observé de pousses régénérées est de deux pousses par explant obtenues sur les deux milieux WPM et MS. Le test U de Mann-Whitney ne montre aucune différence significative entre le nombre de pousses régénérées par milieu de culture (Appendice E.4). Les deux milieux semblent agir d'une manière similaire.

Les résultats des travaux de MUSALLAM et *al.* [8] ont montré une moyenne de 1,68 pousse par explant en initiant la culture des nœuds du *Capparis spinosa* L. sur cinq différents milieux : MS,  $\frac{3}{4}$  MS,  $\frac{1}{2}$  MS,  $\frac{1}{2}$  MSD et WPM. Après six semaines de culture, ils n'ont observée aucune différence significative entre le nombre de pousse régénérée par explant pour chacun des milieux de culture.

Plusieurs pousses ont été obtenues à partir de bourgeons nodaux à la fois sur milieu MS et milieux MS modifiés contenant une cytokinine et une auxine combiné ou non à une gibbérelline (1,5 mg/l BAP + 0,05 mg/l AIB  $\pm$  0,1 mg/l GA3), à des intervalles de 4 semaines [110].

AL-SAFADI et ELIAS [9] ont rapporté que la combinaison cytokinine/auxine (2 mg/l ZR et 1 mg/l ANA) favorise la régénération de pousses via des nœuds de *Capparis spinosa* récolté de son milieu naturel.

### 3.1.4. Effet des milieux de culture sur la longueur de pousses régénérées par explant

L'influence du milieu de culture utilisé sur l'élongation des pousses semble importante. Le teste U de Mann-Whitney révèle une différence hautement significative (U = 16, p = 0,004) entre les longueurs des pousses enregistré sur milieu WPM et milieu MS (Appendice E.5).

Le milieu WPM semble favoriser l'élongation des pousses régénérées avec une moyenne de 18,63 mm contre 4,5 mm enregistré sur le milieu MS après 4 mois de culture. La longueur maximale des pousses est de 35 mm observé sur le milieu WPM (Figure 3.6).

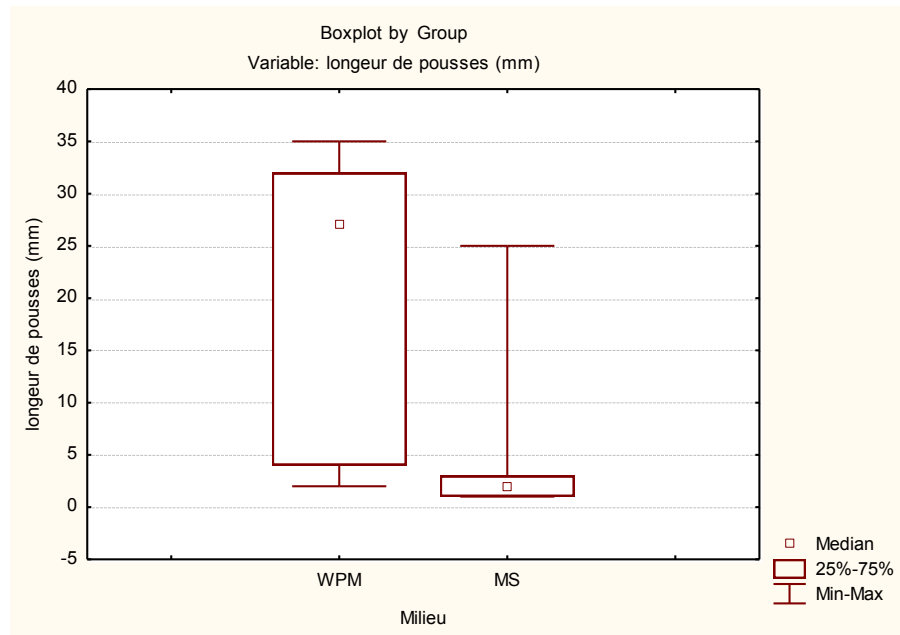


Figure 3.6 : Effet des milieux de culture sur la longueur des pousses régénérées

Les bourgeons débouffés sur milieu MS ont montré un développement très limité, donnant le plus souvent naissance à des feuilles et sont incapables de s'organiser en tigelle. En revanche, celles induites sur milieu WPM paraissent identiques aux pieds-mère à l'état juvénile et présentent des nœuds plus ou moins espacés (Figure 3.7).

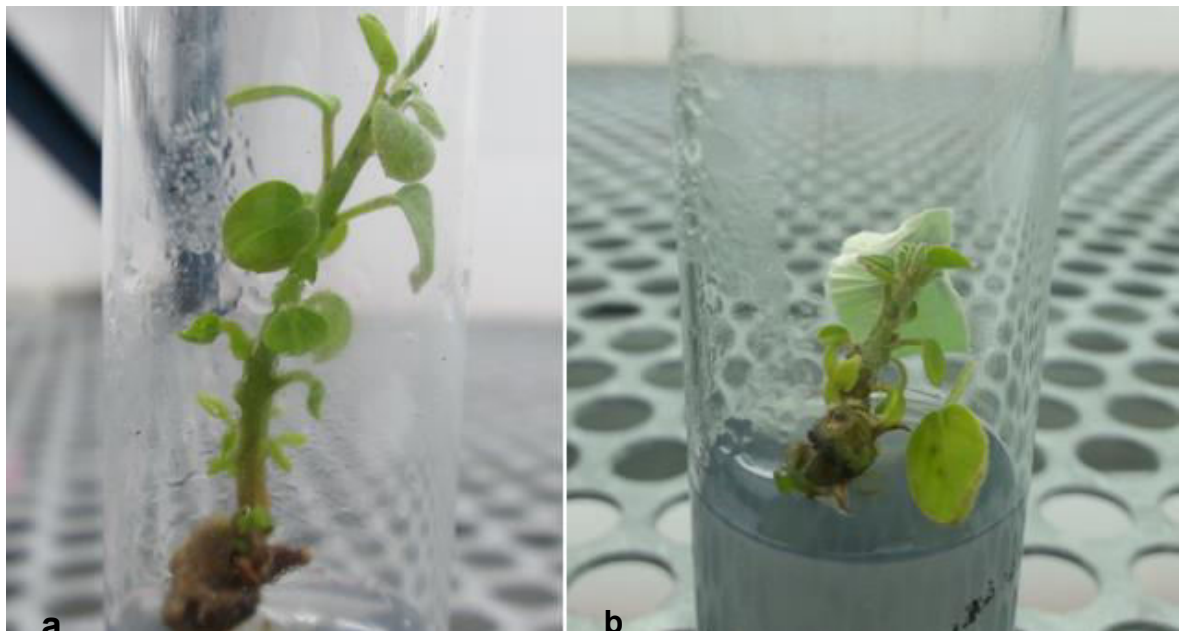


Figure 3.7 : Pousses régénérées à partir des fragments nodaux de *C. spinosa* L.

- a) Pousse régénérée après 4 mois de culture sur WPM + 1mg/l BAP + 0,1mg/l AIA, b) Pousse régénérée après 4 mois de culture sur MS + 1mg/l BAP + 0,1mg/l AIA.

MUSALLAM et al. [8] ont obtenu une moyenne de 18,9 mm après mise en culture de fragment nodaux de *Capparis spinosa* L. sur milieu WPM exempt d'hormones de croissance, en sub-cultivant toutes les trois semaines contre seulement une moyenne de 9,3 mm sur milieu MS en maintenant les mêmes conditions.

En initiant la mise en culture des segments nodaux de *Capparis spinosa* L. issus après germination des graines, CHALAK et al. [110] ont rapporté que l'utilisation du milieu ½ MS modifié était favorable. Il est de même pour RODRIGUEZ et al. [10] qui ont testés l'effet des deux milieux MS et MS modifié sur la croissance des pousses régénérées par segments nodaux de *Capparis spinosa* L. Le milieu MS modifié est le plus favorable. Ainsi le degré de croissance varie considérablement avec le milieu. La nécessité des sels du WPM et ½ MS montrent l'effet négatif des concentrations élevées des sels sur le développement des pousses du *Capparis spinosa* L [8] En effet, le WPM se caractérisent par une teneur moyenne en azote total dont le tiers est fourni sous forme de  $\text{NH}_4^+$ , et par une teneur élevée en  $\text{SO}_4^-$ . En effet, plusieurs espèces répondent à différentes variation du milieu MS, mais d'autre préfèrent une faible concentration en sels minéraux sur milieux B5 ou WPM [136].

Par ailleurs, La combinaison de cytokinines et auxines a été signalée stimulatrice de la multiplication in vitro et la croissance des pousses de plusieurs espèces [137].

En plus de la longueur, les pousses régénérées sur les deux milieux sont rigoureuses, duveteuses et de couleurs verdâtres, celles régénérées sur WPM virent vers le rouge après quelques semaines de croissance. En effet, cette couleur rougeâtre est observée in vivo sur des pieds de *Capparis spinosa* L. vivant sur des sols schisteux [6]. En l'occurrence, cela pourrait s'expliquer par les différentes concentrations et la nature des sels minéraux des milieux de culture.

### 3.1.5. Effet des milieux de culture sur le nombre de feuilles régénérées par explant

Le test U de Mann-Whitney ne montre aucune différence significative entre le nombre de feuilles régénérées par pousses enregistré sur le milieu MS et celui enregistré sur le milieu WPM (Appendice E.6).

Nous avons constaté que 7, 54 feuilles ont été régénérée par pousse en moyenne sur milieu WPM contre 5,9 sur le milieu MS. Ainsi, le nombre de feuilles le plus important est enregistré sur le milieu WPM avec 23 feuilles par pousse. En revanche 17 feuilles par pousse est le nombre maximal enregistré sur le milieu MS (Figure 3.8).

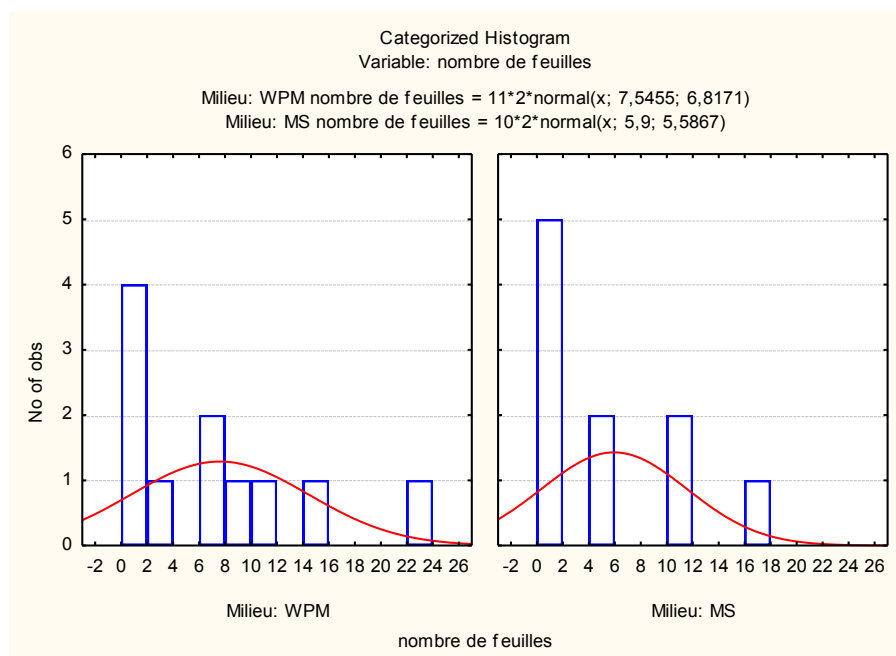


Figure 3.8 : Nombre de feuilles régénérées par pousse sur les milieux MS et WPM

Les feuilles des vitroplants sont de forme ovale-arrondie à base tronquée avec apex obtus présentant un mucron. Elles sont chlorophylliennes avec des tâches rouges ressemblant aux feuilles jeunes des pieds-mères et renfermant parfois un bourgeon à leurs aisselles. Certaines sont de forme allongée, elles se gorgent d'eau au fur et à mesure et deviennent cassante avec le temps et se vitrifient. La vitrification observée se caractérise par des feuilles allongées d'un vert jaunâtre taché parfois de rouge, luisantes et épaisses. Elles s'enroulent plus ou moins et se recourbent (Figure 3.9).

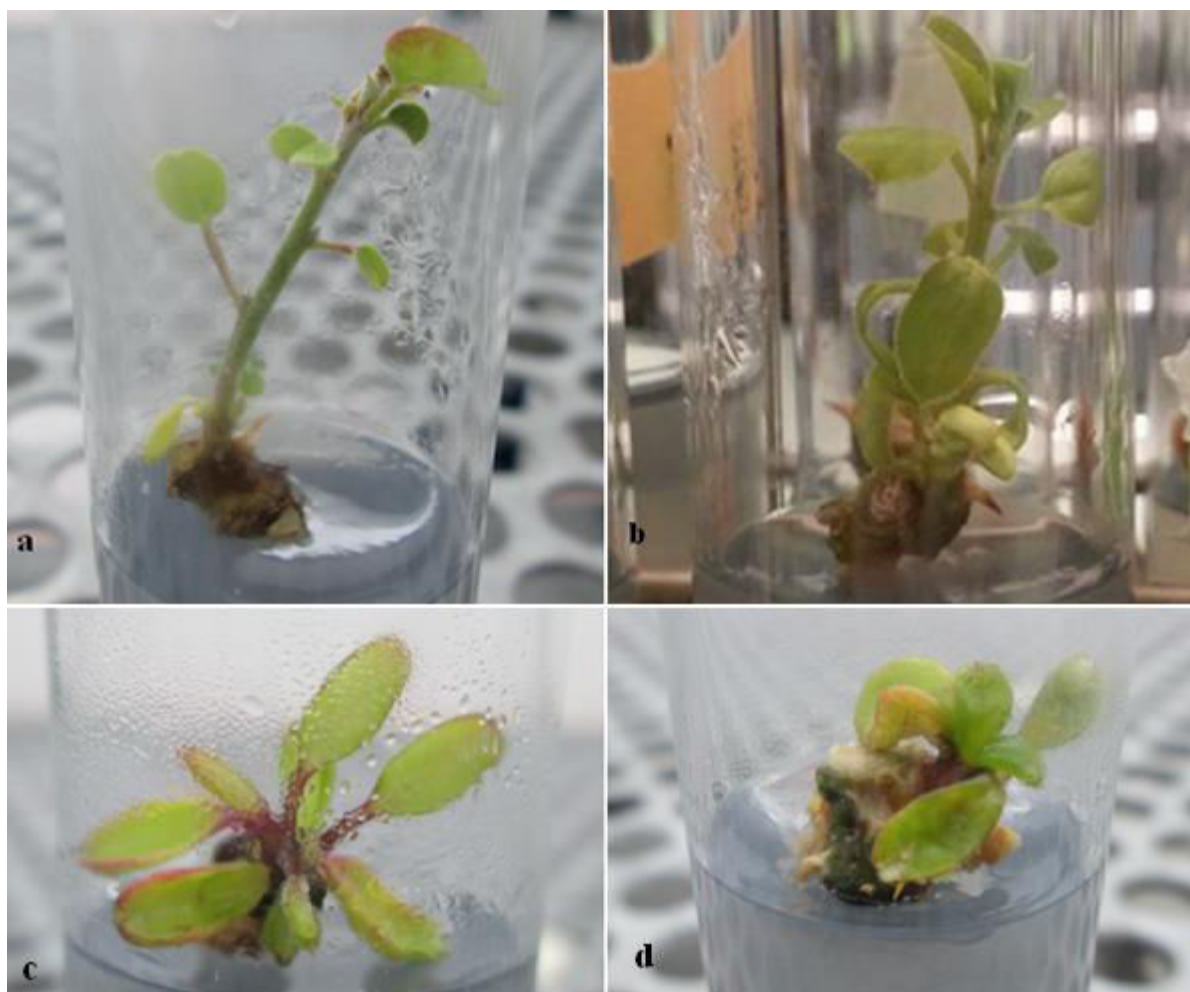


Figure 3.9 : Formes des feuilles des vitroplants de *Capparis spinosa* L. obtenues après culture des nœuds sur milieu WPM et MS.

a) Pousse régénérée après 4 mois de culture sur milieu WPM+1mg/l BAP + 0,1 mg/l AIA, présentant des feuilles ovale-arrondie à base tronquée avec apex obtus présentant un mucron, b) Pousse régénérée après six semaines de culture sur milieu MS+1mg/l BAP + 0,1 mg/l AIA, présentant des feuilles allongées cassantes, c) Pousse vitrifiée après 4 mois de mise en culture sur milieu MS+1mg/l BAP + 0,1 mg/l AIA présentant des feuilles coriaces, allongées et recourbées longitudinalement, d) Pousse vitrifiée après 2 mois de mise en culture sur milieu MS+1mg/l BAP + 0,1 mg/l AIA présentant une tige enflée, et feuilles déformées.

En effet, un taux de vitrification de 33% était observé sur le milieu MS. En revanche, ce taux est nul sur le milieu WPM. L'implication de plusieurs facteurs a été reconnue dans l'induction de ce phénomène, à savoir des concentrations élevées de BAP [112] et de  $\text{NH}_4^+$  [138] par l'utilisation du milieu liquide [139] et les faibles concentrations en  $\text{Ca}^{++}$  [140].

Les malformations et la vitrification de *Capparis spinosa* L. cultivé in vitro sont liées à la durée de culture. En effet, plus la durée de celle-ci augmente plus la

vitrication est fréquente [141]. Ainsi CHALAK et ALBITAR [112] ont observé ce phénomène de vitrication des pousses de *C. spinosa* L. à partir de la 5<sup>ème</sup> subculture sur milieu MS additionné à une cytokinine.

MUSALLAM et *al.* [8] ont rapporté que WPM constitue le milieu favorable pour la régénération des feuilles sur les vitroplants du *Capparis spinosa* L issus de la culture des nœuds suivi par le ½ MSD. Ils n'ont mentionné aucun cas de vitrication.

Le nombre de feuilles régénérées par pousse constitue un important critère de caulogénèse puisqu'il correspond généralement aux nombre de nœuds et donc une éventuelle existence de nouveaux bourgeons.

#### 3.1.6. Effet des milieux de culture sur le taux de callogenèse et organogénèse indirecte

La présence des cals est considérée comme indésirable pendant la propagation clonale à cause d'une éventuelle possibilité de formation de pousses adventives à partir des bourgeons néoformés. En effet, le défaut principal de la formation de plantules à partir des cals est de faciliter la production de « variants » [104]. Cependant, celle-ci est très appréciée dans le domaine de l'amélioration des plantes [119].

Durant la phase de la mise en culture des segments nodaux de *Capparis spinosa* L. nous avons observé une formation de cals de différentes couleurs et consistance autour de l'explant et cela sur les deux milieux de culture utilisés.

Le test exact de Fisher montre qu'il y a une différence hautement significative ( $p = 0,006$ ) sur la présence de callogenèse entre le milieu MS et le milieu WPM (Appendice E.7). Le milieu MS additionné de 1mg/l BAP et 0,1 mg/l AIA semble favoriser l'apparition de cals sur les explants nodaux avec un taux de 92,85 %, tandis que ce taux n'a pas dépassé 57,89 % sur le milieu WPM (Figure 3.10).

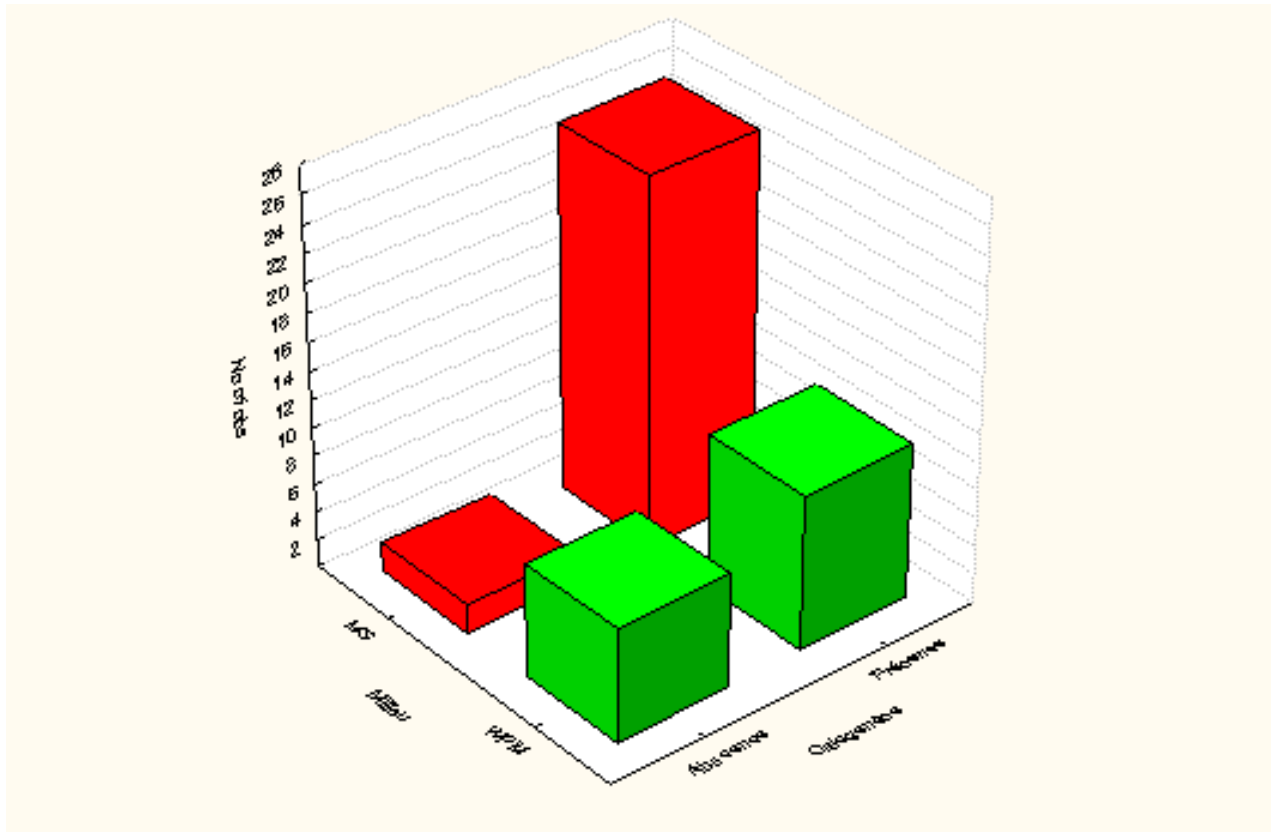


Figure 3.10 : L'effet des milieux de culture sur la présence de callogenèse autour des explants

La formation de cals est observée à partir de la 4<sup>ème</sup> semaine de la mise en culture sur la base de certains explants nodaux dont les bourgeons axillaires préexistants ont débouffés. En revanche, elle se propage tout autour des explants n'ayant pas débouffés au fur et à mesure et couvre la totalité de la surface. Le même phénomène est observé sur les explants ayant données des pousses une fois celles-ci excisées et les explants remis dans le milieu de culture.

Nous avons observé plusieurs types de cals et remarqué la présence de ceux-là sur le même explant. Certains sont primaires se développent directement sur l'explant tandis que d'autre se développent sur des cals déjà formés, ils sont secondaires ou tertiaires à savoir : (Figure 3.11).



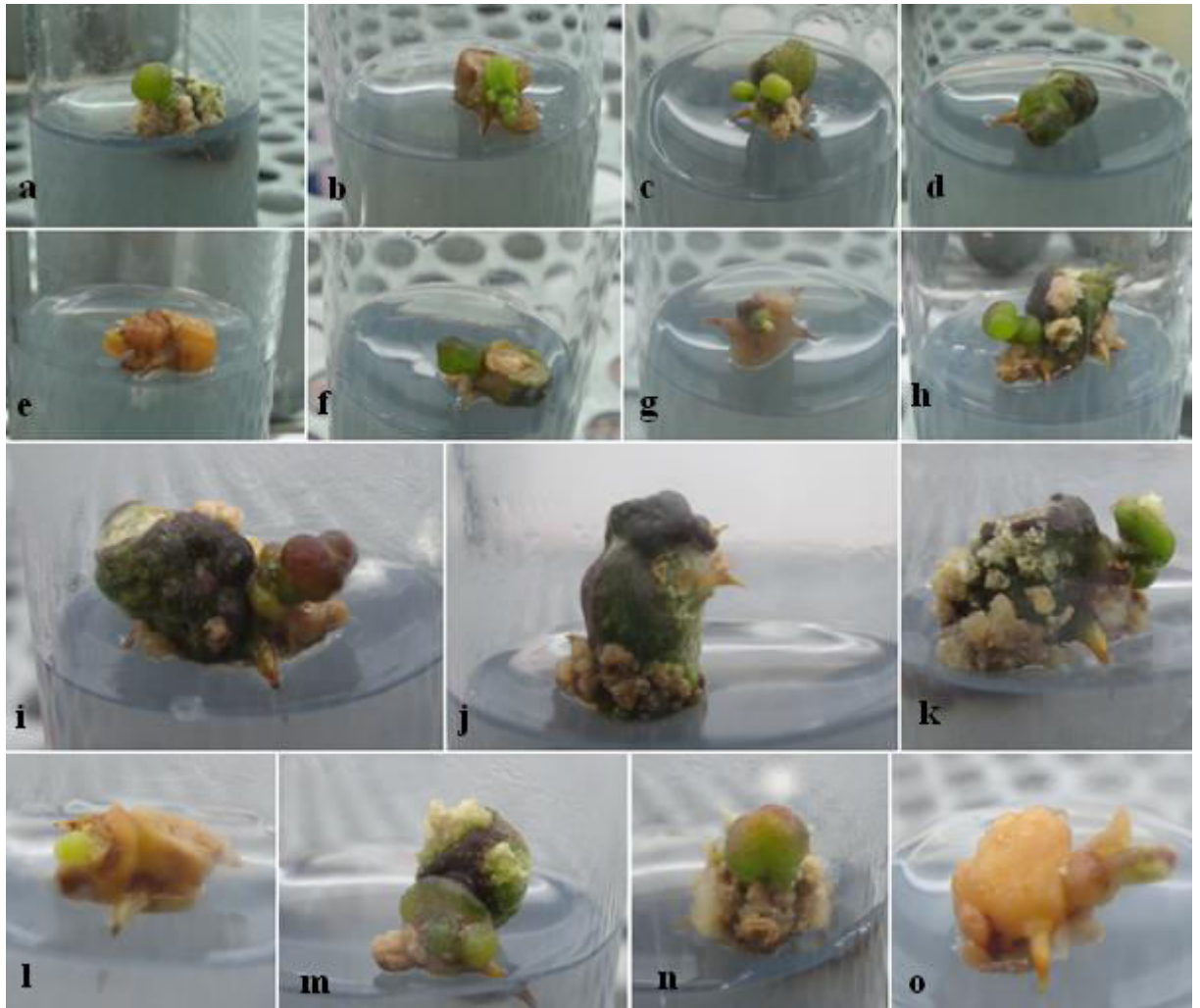


Figure 3.11 : Différents types de cals obtenus sur explants nodaux de *C. spinosa* L.

a) Cal nodulaire vert développé sur cal blancs friables\*, b) Cals nodulaires vert développé sur cal marron compact\*, c) Cals nodulaires développés sur cal dur vert\*, d) Cal vert dur, e) Cal marron compact\*, f) Cal nodulaire hyperhydrique vert foncé\*, g) Petit cal nodulaire développé sur cal vert violacé dur développé sur explant bruni\*\*, h) Cals blancs friables développés sur cal vert violacée dur\*, i) Cals nodulaires violacés développés sur cal dur violacé\*\*\*, i) Cal nodulaire violacé j) Cals nodulaires beiges développés sur la base de l'explant\*\*\*, k) Cals compact beiges développés sur cal violet dur\*\*\*, l) cal nodulaire vert clair développé sur cal marron compact\*\*\*, m) Cals friable vert clair développé sur cal violet dur\*\*\*, n) Cal nodulaire vert rougeâtre développé sur cal blanc compact\*\*\*, o) cal compact de couleur miel\*\*\*\*.

\*explants mis en culture sur milieu MS + 1mg /l BAP + 0,1 mg/l AIA après 3 mois de culture, \*\* explant mis en culture sur milieu WPM + 1mg /l BAP + 0,1 mg/l AIA après 3 mois de culture, \*\*\* explant mis en culture sur milieu MS + 1mg /l BAP + 0,1 mg/l AIA après 4 mois de culture, \*\*\*\* explant mis en culture sur milieu WPM + 1mg /l BAP + 0,1 mg/l AIA après 4 mois de culture.



- Cals de couleur vert-clair à vert jaunâtre durs susceptibles de donner naissance à des embryons somatiques ;
- Cals de couleur violacée durs susceptibles de donner naissance à des embryons somatiques ;
- Cals beiges friables utiles pour la culture cellulaire ;
- Cals de couleur miel susceptibles de donner naissance à des embryons somatiques ;
- Cals marron compacts ;
- Cals blancs compacts ;
- Cals blancs friables utiles pour la culture cellulaire ;
- Cals nodulaire verts, vert clair, vert violacé ou vert rougeâtre susceptibles de donner naissance à des embryons somatiques ;
- Cals nodulaires hyperhydriques.

CHALAK et ALBITAR [112] ont observé la formation de cals sur les explants nodaux de *Capparis spinosa* L. mis en culture sur milieu MS supplémenté de 2 mg/l zéatine accompagnant le débourrement des bourgeons axillaires.

AL-SAFADI et ELIAS [9] rapportent que le meilleur milieu pour l'induction de cals à partir des fragments de tiges de *Capparis spinosa* L. contient 1mg/l BAP et 0.1 mg/l ANA.

Des cals verts et compacts se sont développés à partir d'explants nodaux de *Sida cordifolia* L. cultivés sur milieu MS additionné de différentes concentrations de cytokinines et en combinaison avec des auxines après 4 semaines d'incubation [142]. Les résultats des travaux de SIVANESEN et BYOUNG [143] ont montré la régénération directe à partir d'explants nodaux de cette même espèce sans intermédiaire de cal sur un milieu MS additionné de 2,0 mg /L BAP et 0,5 mg/L de ANA.

En l'occurrence, nous avons observé le débourrement des bourgeons axillaires et la formation de callogenèse simultanément sur le même explant ou séparément sur milieux contenant 1mg/l BAP et 0.1 mg/l AIA. En effet, les différences dans la réponse des explants concernant la callogenèse et la régénération des pousses peuvent être attribuées au degré de variation de la

concentration d'hormones végétales endogènes qui sont essentielles dans l'expression de gènes responsables de la différenciation cellulaire [144]. Des études récentes montrent que les phytohormones contrôlent la transcription de gènes impliqués dans la différenciation [145] [146]. En outre, si les régulateurs de croissance sont équilibrés de manière appropriée, l'extrémité de la pousse s'allonge, les bourgeons latéraux se brisent et commencent la croissance, et de pousses adventices sont également produites sur la pièce de tige [147].

#### 3.1.6.1. Organogenèse indirecte

Les cals obtenus sur les fragments nodaux de *Capparis spinosa* L. ont été transférés sur milieu MS contenant différentes concentrations d'hormones végétales à savoir 0, 1, 2 mg/l BAP ou 1mg/l BAP + 0,1 mg/l AIA.

Après 4 semaines de cultures nous n'avons observé aucune régénération de pousses sur les milieux contenant la BAP seule. En revanche, des pousses ont été régénérées sur milieu MS contenant 1mg/l BAP + 0.1 mg/l AIA avec un taux de régénération de 28,57% (Figure 3.12).

AL-SAFADI et ELIAS [9] ont obtenu des pousses adventives à partir des cals formés sur fragments de tige de *Capparis spinosa* L. transféré sur milieu MS additionné de 1 mg/l de kinétine et 0.1 mg/l AIA.

En effet, la combinaison cytokinines/auxines est nécessaire pour l'induction de pousses indirectes comme l'on rapporté SKOOG et MILLER [148]. De même, MARTIN [149] a observé l'induction de cals à partir d'explants nodaux de *Holostemma ada-kodien* et a suggéré que l'induction de cals et la régénération de pousses multiples à partir d'explants nodaux peuvent être dues à la présence de certains composants internes des bourgeons axillaires préexistants qui sont essentiels pour l'induction de la caulogénèse. Toutefois, le nombre de pousses régénérées est relativement faible ne dépassant pas 0,57 pousse par explant callogène.

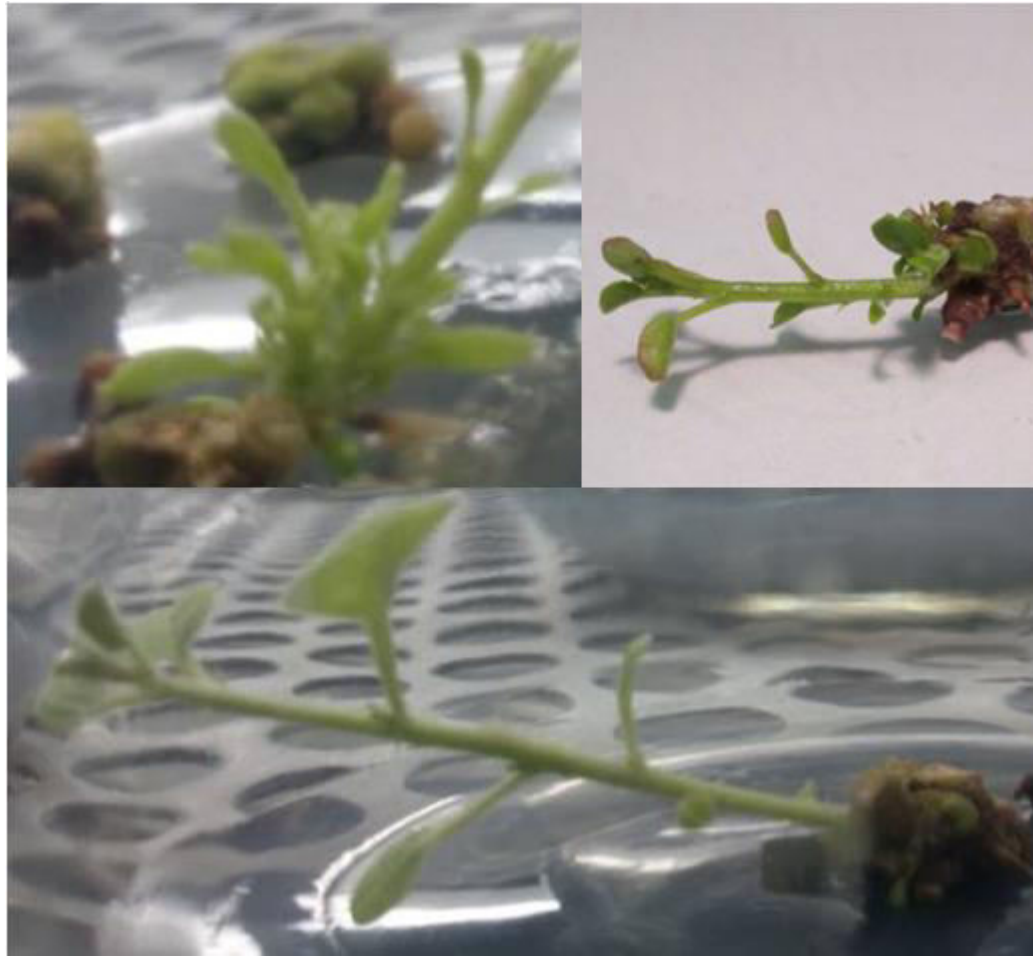


Figure 3.12 : Pousses adventives régénérées sur cals formé à partir des fragments nodaux de *C. spinosa* L. sur milieu MS contenant 1mg/l BAP + 0,1 mg/l AIA.

CHAOUCH et ABDUL HUSSAIN [117] avaient transféré des cals d'*Atriplex halimus* obtenus après 2 mois de culture sur un milieu frais. Un mois après le transfert, les cals ont peu proliféré, un deuxième transfert s'en est suivi, dans les mêmes conditions de culture que le premier. Les proliférations cellulaires sur les cals restaient faibles avec absence totale de néoformation. Les auteurs ont alors procédé à la fragmentation des cals primaires, avec transfert sur les mêmes milieux frais. Un mois après la fragmentation, les tissus manifestaient une activité mitotique importante, surtout au niveau des sections. De nouvelles proliférations cellulaires chlorophylliennes, apparaissaient sur la surface supérieure des cals. Deux semaines plus tard de nombreux petits bourgeons ont été néoformés sur les cals cultivés sur milieu contenant 1 mg/l de BAP et 0,01 mg/l d'AIB.

### 3.2. Multiplication des pousses de *C. spinosa* L.

Les pousses formées directement à partir des bourgeons axillaires des nœuds ont été transférées sur milieux de multiplication, en l'occurrence, le milieu WPM + 100 mg/l de myoinositol + 100mg/l acide ascorbique + 500 mg/l charbon actif + 30 g/l saccharose qui s'est montré favorable à l'élongation et à la rigueur des pousses de *Capparis spinosa* L. et dont le taux de callogenèse et de vitrification n'étaient pas importants.

Trois milieux ont été testés outre le milieu témoin. Plusieurs critères ont été étudiés à savoir : le nombre de pousses régénérées par explant, la longueur des pousses régénérées par explant ainsi que le nombre de feuilles. Les résultats obtenus sont présentés dans le Tableau 3.1.

Tableau 3.1 : Effet des hormones de croissance supplémenté au milieu WPM sur la multiplication in vitro de *Capparis spinosa* L.

Milieux	Nombre de pousses/explant Moyenne ± ESM	Longueur de pousses (mm) Moyenne ± ESM	Nombres de feuilles/ pousses/ explant Moyenne ± ESM
Témoin	0,50 ± 0,42 a	1,50 ± 1,73 a	1,00 ± 0,74 a
M1	2,66 ± 0,42 b	3,92 ± 0,70 b	3,15 ± 0,50 ab
M2	1,33 ± 0,42 ab	4,57 ± 0,96 ab	4,57 ± 0,69 b
M3	1,50 ± 0,42 ab	6,00 ± 0,84 b	4,00 ± 0,60 b

Les moyennes suivies par la même lettre ne sont pas significativement différentes selon le test de Mann-Whitney au risque  $\alpha = 0,0125$ . M1 : WPM + 1mg/l BAP, M2 : WPM + 1mg/l BAP + 0,1 mg/l AIA, M3 : WPM +1mg/l BAP + 0,05mg/l AIA + 0,1mg/l GA3.

#### 3.2.1. Effet des combinaisons hormonales sur le nombre de pousses régénérées par explant

L'analyse de la variance ANOVA Kruskal-Wallis a révélé une différence hautement significative ( $H(3, N=24) = 12,10980$  ;  $p = 0,0070$ ) entre les différents milieux testés (Appendice E.8). En effet, les différentes combinaisons hormonales additionnées au milieu WPM + 100 mg/l de myoinositol + 100mg/l acide ascorbique

+ 500 mg/l charbon actif + 30 g/l saccarose, semblent avoir un effet significatif sur le nombre de pousse régénérées par explant (Figure 3.13).

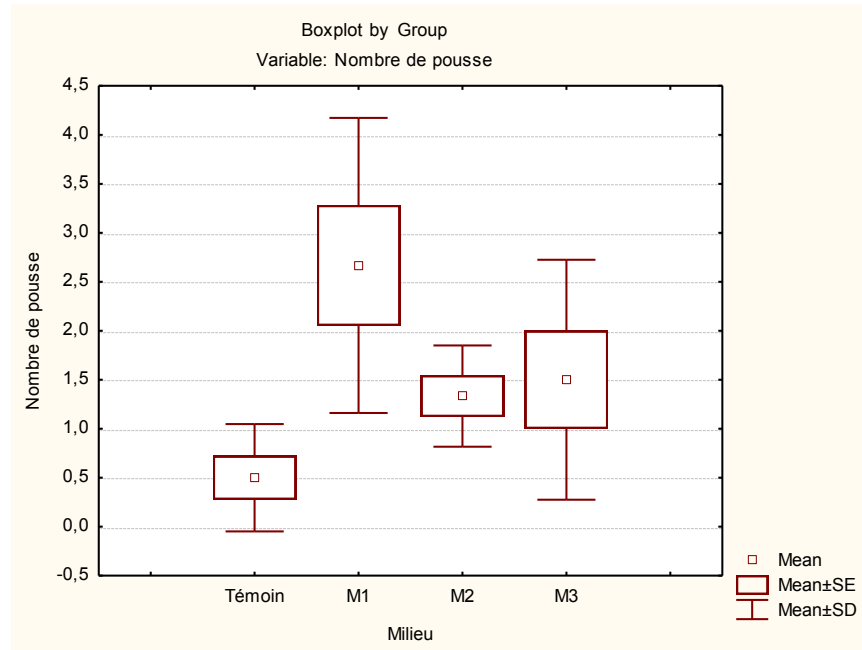


Figure 3.13 : Effet des combinaisons hormonales sur la multiplication des pousses de *Capparis spinosa* L.

Le milieu M1 constitué par les sels de WPM et additionné de 1mg/l BAP semble le plus favorable à la régénération de nouvelles pousses par explant avec une moyenne de 2,66 pousses par explant en comparaison avec le milieu témoin avec une moyenne de 0,50 ( $p = 0,004$ ).

Le milieu M2 et le milieu M3 améliorent légèrement le nombre de pousses régénérées par explant avec une moyenne de 1,33 et 1,50 respectivement. Cependant, il n'existe pas une différence significative entre ces deux milieux et le milieu témoin ( $p > 0,0125$ ). L'ajout de l'AIA à une concentration de 0,1 mg/l et à une concentration de 0,05 mg/l combinée à 0,1mg/l GA3 au milieu WPM contenant 1mg/l BAP ne semble pas avoir un effet important sur l'augmentation de nombre de pousse régénérée par explant. On note, toutefois, l'absence de différence entre le milieu M1 et les milieux M2 et M3 ( $p > 0,0125$ ). Aucune formation de cals n'a été observée et cela sur l'ensemble des milieux testés.

Nos résultats sont compatibles avec ceux obtenus par GHORBEL et *al.* [32] qui ont rapporté que l'utilisation du 1 mg/L BAP pour la multiplication de *Capparis spinosa* L. permettait d'obtenir un taux de propagation considérable et que les vitro pousses régénérées étaient extrêmement vigoureuses.

En effet, de nombreuses études ont montré que la BAP a un effet significatif sur la multiplication des pousses. A titre d'exemple, MUSALLAM et *al.* [8] ont obtenu le meilleur taux de multiplication de *Capparis spinosa* L. sur milieu WPM additionné de 1,2 mg/l BAP avec 4,7 pousses par explant. Ainsi, AL-MAHMOOD et *al.* [7] ont atteint une moyenne de 45,3 pousses par explant sur milieu MS additionné de 0,8 mg/L BAP contre 4,6 pousses par explant sur le milieu témoin exempt d'hormone de croissance.

De même, Rodriguez et *al.* [10] ont rapporté que la BAP s'est avéré être un moyen efficace pour la prolifération des pousses. En fait, toutes les concentrations testées ont stimulé des taux de multiplication similaires de pousses chez *Capparis spinosa* L. Une observation similaire a été notée par DAFFALLA et *al.* [150] qui ont signalé que la BAP semblait être une phytohormone importante pour l'organogenèse, la prolifération et le développement des pousses de *Boscia senegalensis* (Capparidaceae) et qu'elle n'a pas été associée à l'induction de cals. En outre, les résultats d'ABBAS et QAISER [151] ont montré que les différentes concentrations de BAP dans un milieu MS ont eu un effet significatif sur le nombre de pousses régénérées par explant chez *Cadaba heterotricha* (Capparaceae).

Quant à CHALAK et ALBITAR [112] qui ont multiplié les pousses provenant des nœuds de *Capparis spinosa* L. subsp. *rupestris* Sibth. & Sm. sur milieu MS contenant 1 mg/l BAP, ont rapporté que le taux de multiplication augmente au fur et à mesure avec les subcultures jusqu'à atteindre 20 pousses par explant après la 5<sup>ème</sup> subculture.

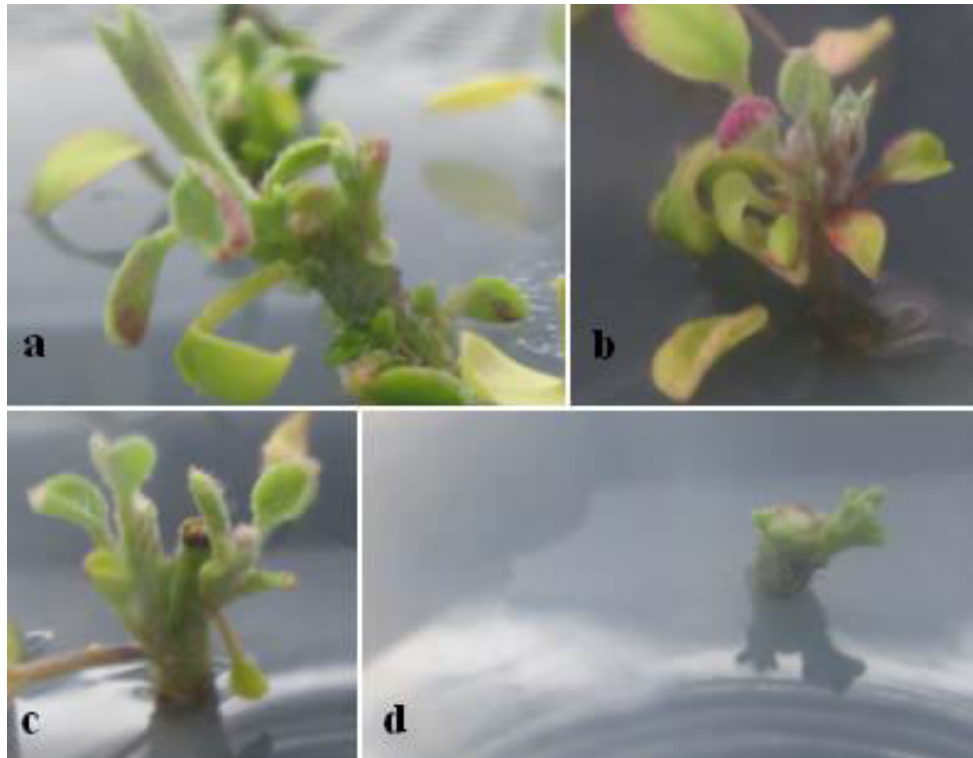


Figure 3.14 : Multiplication des pousses de *Capparis spinosa* L. sur milieu WPM\*.

a) Pousses multiples obtenues sur milieu WPM + 1 mg/l BAP, b) Pousses multiples obtenues sur milieu WPM + 1 mg/l BAP + 0,1 mg/l AIA, c) Pousses multiples obtenues sur milieu WPM + 1 mg/l BAP + 0,05 AIA + 0,1 GA3, d) Pousse obtenue sur milieu WPM exempt d'hormones de croissance.  
\* après 4 semaines de culture.

### 3.2.2. Effet des combinaisons hormonales sur la longueur des pousses régénérées

L'analyse de la variance ANOVA Kruskal-Wallis a révélé une différence très significative ( $H(3, N=35) = 10,36448$   $p = 0,0157$ ) entre les différents milieux testés (Appendice E.9). En effet, les différentes combinaisons hormonales additionnés au milieu WPM + 100 mg/l de myoinositol + 100mg/l acide ascorbique + 500 mg/l charbon actif + 30 g/l saccharose, semblent avoir un effet significatif sur la longueur des pousse régénérées par explant (Figure 3.15).

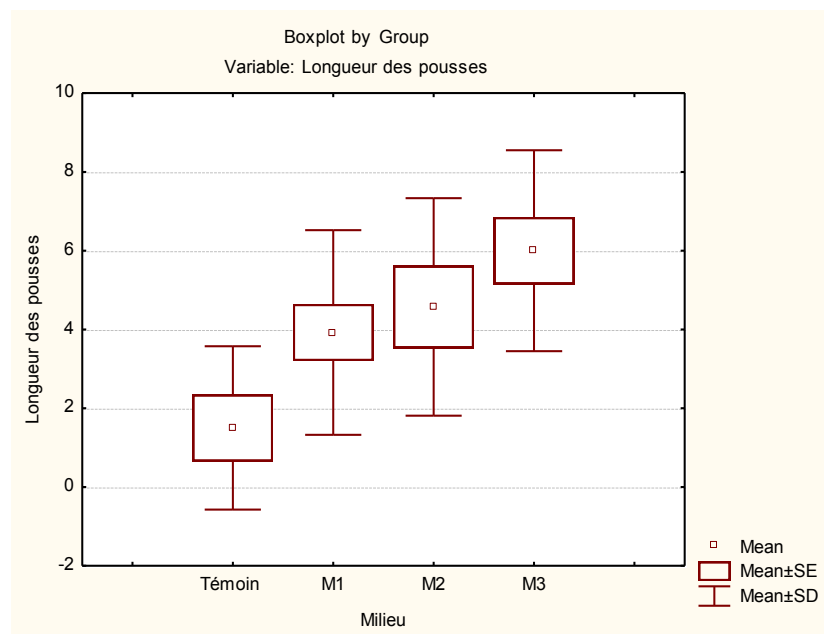


Figure 3.15 : Effet des combinaisons hormonales sur la longueur des pousses régénérées

Le milieu M3 constitué par les sels de WPM et additionné de 1mg/l BAP + 0,05mg/l AIA + 0,1mg/l GA3 semble favoriser le plus la longueur des nouvelles pousses régénérées par explant avec une moyenne de 6 mm en comparaison avec le milieu témoin avec une moyenne de 1,50 ( $p = 0,004$ ).

Le milieu M1 et le milieu M2 améliorent légèrement la longueur des pousses régénérées par explant avec une moyenne de 3,92 mm et 4,57 mm respectivement. Cependant, il n'existe pas une différence significative entre ces deux milieux et le milieu témoin ( $p > 0,0125$ ). L'ajout de la BAP à une concentration élevée de 1mg/L seule ou combinée à l'AIA à une concentration de 0,1 mg/l au milieu WPM ne semble pas avoir un effet important sur l'augmentation de la longueur des pousses régénérées par explant. On note, toutefois, l'absence de différence entre le milieu M1 et les milieux M2 et M3 ( $p > 0,0125$ ). La GA3 ajoutée au milieu à une concentration de 0,1 mg/L en combinaison avec la BAP et l'AIA stimule considérablement l'élongation des pousses régénérées.

En effet, les travaux de MUSALLAM et *al.* [8] montrent que l'augmentation de la concentration de BAP (de 0,4 jusqu'à 2,0 mg/l) au milieu WPM augmente le nombre de pousses régénérées mais, en contre partie, elle diminue la longueur de celles-ci.



Les travaux de ZAID [152] et ceux de CHALAK et ALBITAR [112] ont montré eux aussi une diminution de la longueur des pousses régénérées de *Capparis spinosa* L. en augmentant les concentrations des cytokinines.

Ainsi, Al-MAHMOOD et *al.* [7] ont rapporté que les explants de *Capparis spinosa* L. ont répondu positivement à la combinaison cytokinine/ auxine, avec une longueur de 35,6 mm enregistrée avec 0,4 mg /l de BAP combinée à 0,2 mg/l ANA. En revanche, la longueur des pousses a diminué avec l'augmentation de la concentration de la BAP à 2,0 mg/l.



Figure 3.16 : Pousse obtenu sur milieu WPM + 1mg/l BAP + 0,05mg/l AIA + 0,1mg/l GA3 après 4 semaines de culture.

La barre noire représente 5mm.

### 3.2.3. Effet des combinaisons hormonales sur le nombre des feuilles régénérées par pousse

L'analyse de la variance ANOVA Kruskal-Wallis a révélé une différence hautement significative ( $H(3, N= 35) = 11,36534$   $p = ,0099$ ) entre les différents milieux testés (Appendice E.10). En effet, les différentes combinaisons hormonales additionnés au milieu WPM + 100 mg/l de myoinositol + 100mg/l acide ascorbique + 500 mg/l charbon actif + 30 g/l saccharose, semblent avoir un effet significatif sur le nombre de feuilles des pousses régénérées par explant (Figure 3.17).

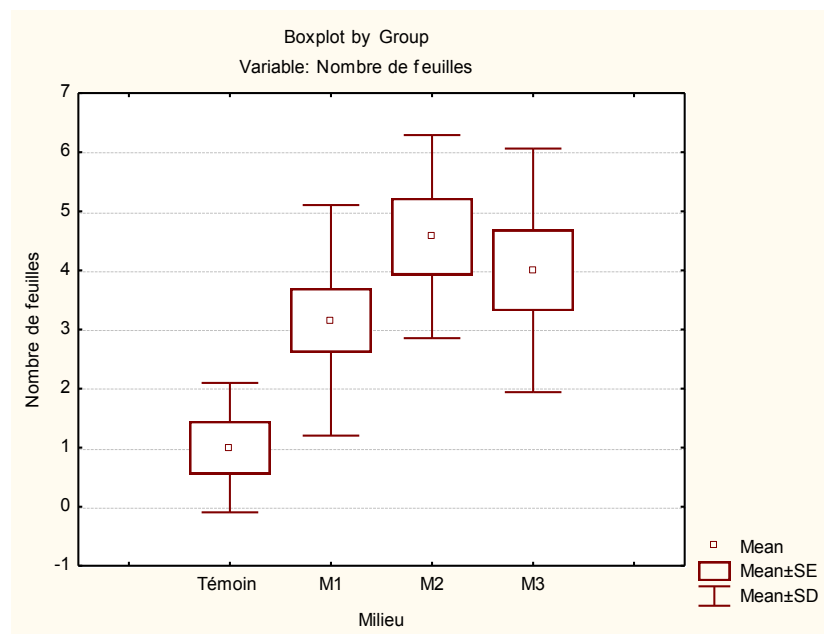


Figure 3.17 : Effet des combinaisons hormonales sur le nombre de feuilles par pousse régénérée par explant.

Le milieu M2, constitué par les sels de WPM et additionné de 1 mg/l BAP + 0,1 mg/l AIA, semble favoriser la formation de feuilles par pousses régénérées avec une moyenne de 4,75 feuilles par pousse par rapport au milieu témoin dont la moyenne ne dépasse pas une feuille par pousse ( $p = 0,002$ ). De même, le milieu M3 constitué par les sels de WPM et additionné de 1 mg/l BAP + 0,05 mg/l AIA + 0,1 mg/l GA3 semble favoriser la formation de feuilles avec une moyenne de 4 feuilles par pousse régénérée par rapport au milieu témoin ( $p = 0,004$ ).

Par ailleurs, on a constaté que le milieu M1 améliore légèrement le nombre de feuilles par pousse régénérée par explant avec une moyenne de 3,15. Cependant, il n'existe pas une différence significative entre ce milieu et le milieu témoin ( $p > 0,0125$ ) ni le milieu M2 ( $p > 0,0125$ ) non plus le milieu M3 ( $p > 0,0125$ ). On note donc que la BAP à une concentration de 1mg/l reste favorable pour la genèse des feuilles et que l'ajout d'une auxine combinée ou non à une gibbérelline stimule d'avantage cette organogenèse chez *Capparis spinosa* L.

ABU-KHALAF [153] a obtenu une moyenne de 3,1 feuilles par pousses par explant sur milieu MS contenant 1 mg/l BAP. L'auteur note cependant que l'utilisation de la zéatine semble plus intéressante pour la formation des feuilles chez le câprier épineux.

L'analyse des résultats totaux obtenus lors de l'étape de multiplication de *Capparis spinosa* L. nous permet de conclure que le milieu WPM additionné d'une cytokinine à une concentration élevée, une auxine à concentration faible ainsi qu'une gibbérelline à une concentration relativement faible, en l'occurrence, 1 mg/l BAP + 0,05 mg/l AIA + 0,1 mg/l GA3 favorise la prolifération des pousses qui sont d'une longueur acceptable et d'une vigueur importante ainsi qu'une phyllotaxie intéressante. Ces résultats sont compatibles avec ceux obtenus avec RODRIGUEZ et al. [10] qui ont montré que la multiplication de *Capparis spinosa* L. réussit bien sur milieu MS modifié additionné de 0,9 mg/l BAP, 0,05 mg/l AIA et 0,1 mg/l GA3.

En effet, les cytokinines jouent un rôle important dans la levée de la dominance apicale et pour briser la dormance des bourgeons et par la suite l'augmentation des ramifications latérales, la BAP reste la cytokinine la plus employée [154]. Cependant, la présence d'auxine est essentielle pour renforcer le rôle des cytokinines en améliorant le taux de caulogénèse et la qualité des pousses régénérées, en fait, la caulogénèse est sous contrôle du rapport auxine/cytokinine [155]. Les taux élevés des cytokinines avec des concentrations relativement faibles des auxines stimulent la formation de pousses chez un nombre important d'espèces végétales [105]. De même, un effet synergique de la gibbérelline avec les auxines et les cytokinines a été signalé sur la caulogénèse chez le chou-fleur [156]. En outre, les gibbérellines favorisent l'élongation des entre-nœuds de la tige, c'est l'un de leurs effets physiologiques le plus fréquent [104].

### 3.3. La Rhizogénèse des vitroplants de *Capparis spinosa* L.

Après quatre semaines de mise en culture aucune induction de racines n'a été observée sur tous les milieux testés.

Ceci peut-être expliqué par la vigueur des pousses obtenues lors des précédentes étapes de la culture. En effet, il s'est avéré que la vigueur représente un inconvénient majeur pour la rhizogénèse du câprier. Le diamètre de la tige étant inversement proportionnel au taux d'enracinement et directement proportionnel au taux de vitrification [32].

CARRA et al. [93] ont rapporté que l'induction des racines chez les vitroplants de *Capparis spinosa* L. se fait 15 à 20 jours après l'initiation de la culture. Par

ailleurs, CHALAK et ALBITAR [112] ont observé l'apparition des racines après 35 à 45 jours de l'initiation de la culture.

On note, cependant, l'apparition de quelques racines sur les pousses trempées dans l'ANA à 100mg/l pendant une heure à l'obscurité et cultivées ensuite sur milieux MS exempt d'hormones de croissance, et ce, après 3 mois de culture. Par ailleurs, les pousses cultivées sur les milieux d'enracinement sont suffisamment longues et atteignent un maximum de 31 mm sur milieu MS après prétraitement à l'AIB et cela après 4 semaines de culture.

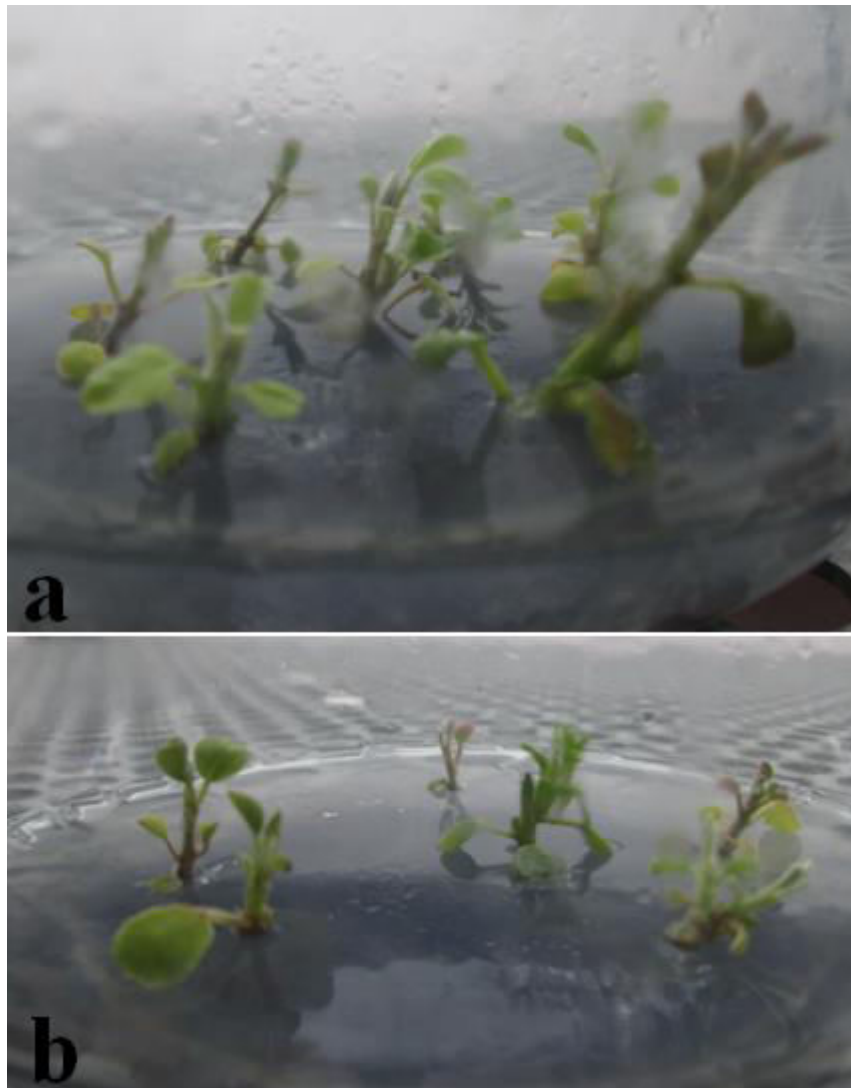


Figure 3.18 : Pousses de *C. spinosa* L. cultivées sur milieu d'enracinement.

a) Pousses cultivées pendant 4 semaines sur milieu MS exempt d'hormones après prétraitement à l'AIB à 100mg/l, b) Pousses cultivées pendant 4 semaines sur milieu MS contenant 1,5mg/l AIB.

### 3.4. Etude histologique de *Capparis spinosa* L.

Cette étude nous a permis de mettre en évidence d'une part une forme d'adaptation anatomique chez le câprier épineux et d'autre part expliquer le phénomène de vitrification courant lors de sa propagation *in vitro* d'une autre part.

Nous nous sommes également focalisés sur l'ontogenèse des cals à partir des explants nodaux.

#### 3.4.1 Anatomie des Feuilles

Nous avons observé plusieurs coupes transversales des feuilles de *Capparis spinosa* L. de différentes catégories à savoir :

- Feuilles récoltées *in situ* âgées de 7 à 8 mois
- Feuilles régénérées *in vitro* âgées de 4 mois
- Feuilles hyperhydriques classées en trois catégories : Jeunes feuilles fragiles transparentes de couleur vert pâle à jaune facilement détachables de leurs tiges, feuilles épaisses vertes et feuilles présentant des malformations avancées à épiderme irréguliers.

##### 3.4.1.1 Anatomie des feuilles *in situ*

Les résultats montrent que la feuille de *Capparis spinosa* L. poussant à l'état spontané est isobilatérale composé d'un parenchyme palissadique sur les deux faces abaxiale et adaxiale et d'un parenchyme lacuneux présent entre les deux. Les épidermes, supérieur et inférieur, sont unisériés et présentent tous les deux des stomates. Les cellules épidermiques sont grandes et rectangulaires sur les deux faces. Celles des parenchymes palissadiques sont cylindriques allongées et serrées les unes contre les autres. En revanche, les cellules de parenchymes lacuneux sont plus circulaires et espacées entre elles. La feuille est composée de 8 à 9 assises cellulaires mésophylliennes (Figures 3.19 et 3.20).



Figure 3.19 : Coupe transversale dans une feuille de *Capparis spinosa* L. récolté à Hamman Melouane au mois d'octobre. (Epaisseur  $2\mu$ , coloration Rouge Congo-Vert de méthyle, microscope photonique x 100).

**NC** : nervure centrale ; **Col** : collenchyme ; **tr** : trachéide ; **Prc** : parenchyme ; **E** : épiderme.



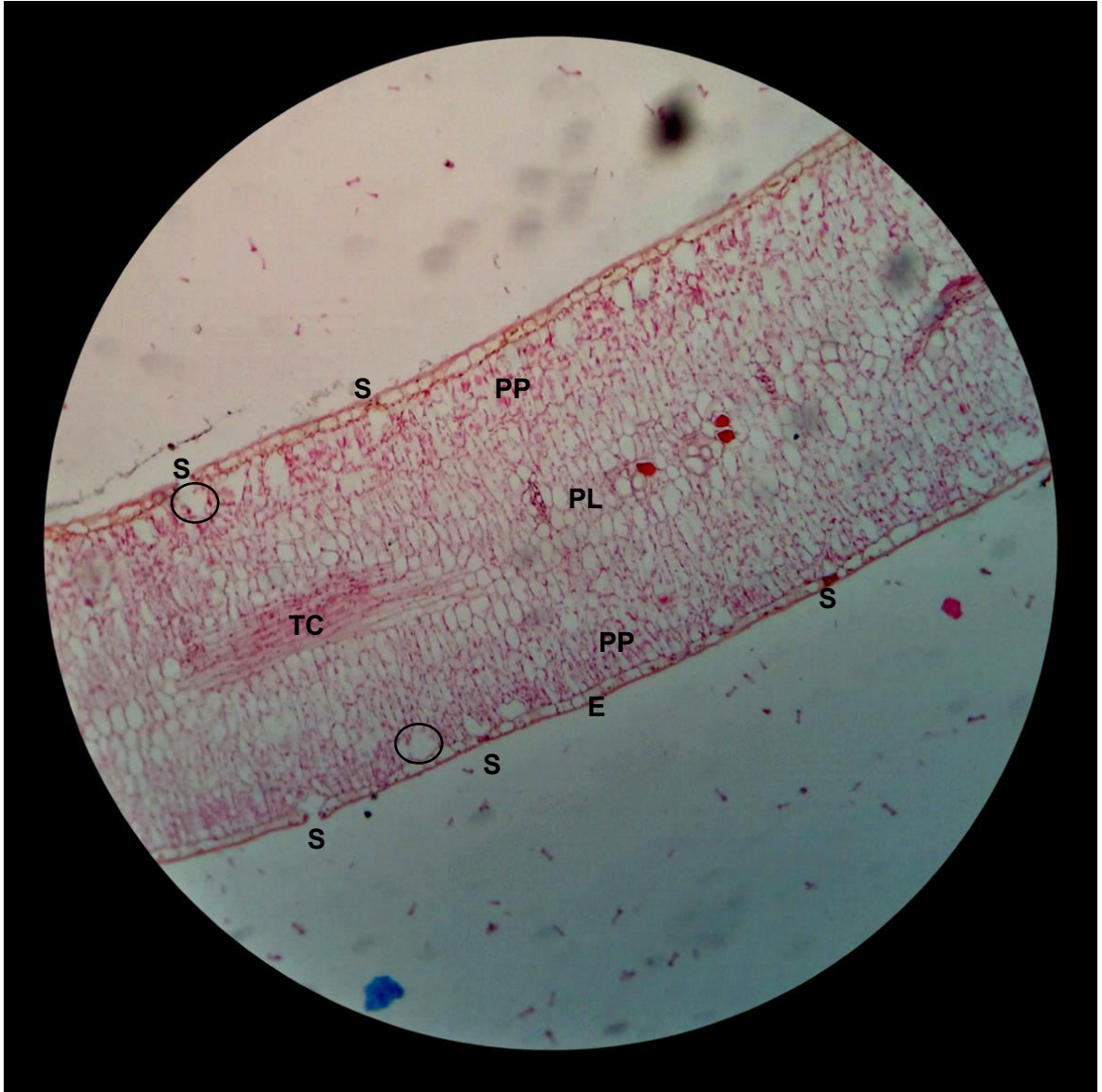


Figure 3.20 : Coupe transversale du limbe de la feuille de *Capparis spinosa* L. récolté à Hamman Melouane au mois d'octobre. (Epaisseur 2 $\mu$ , coloration Hématoxyline-Eosine, microscope photonique x 100).

**TC** : tissu conducteur ; **PP** : parenchyme palissadique ; **PL** : parenchyme lacuneux ; **E** : épiderme ; **S** : stomate ; **O** : Chambre sous stomatique.

Les vaisseaux conducteurs sont lignifiés avec xylème de diamètre important (Figure 3.21). Cependant, la feuille est faiblement vascularisée sans extensions périvasculaires (Figure 3.22). On note la présence des tissus de soutien tels que le sclérenchyme et le collenchyme qui entourent les nervures.

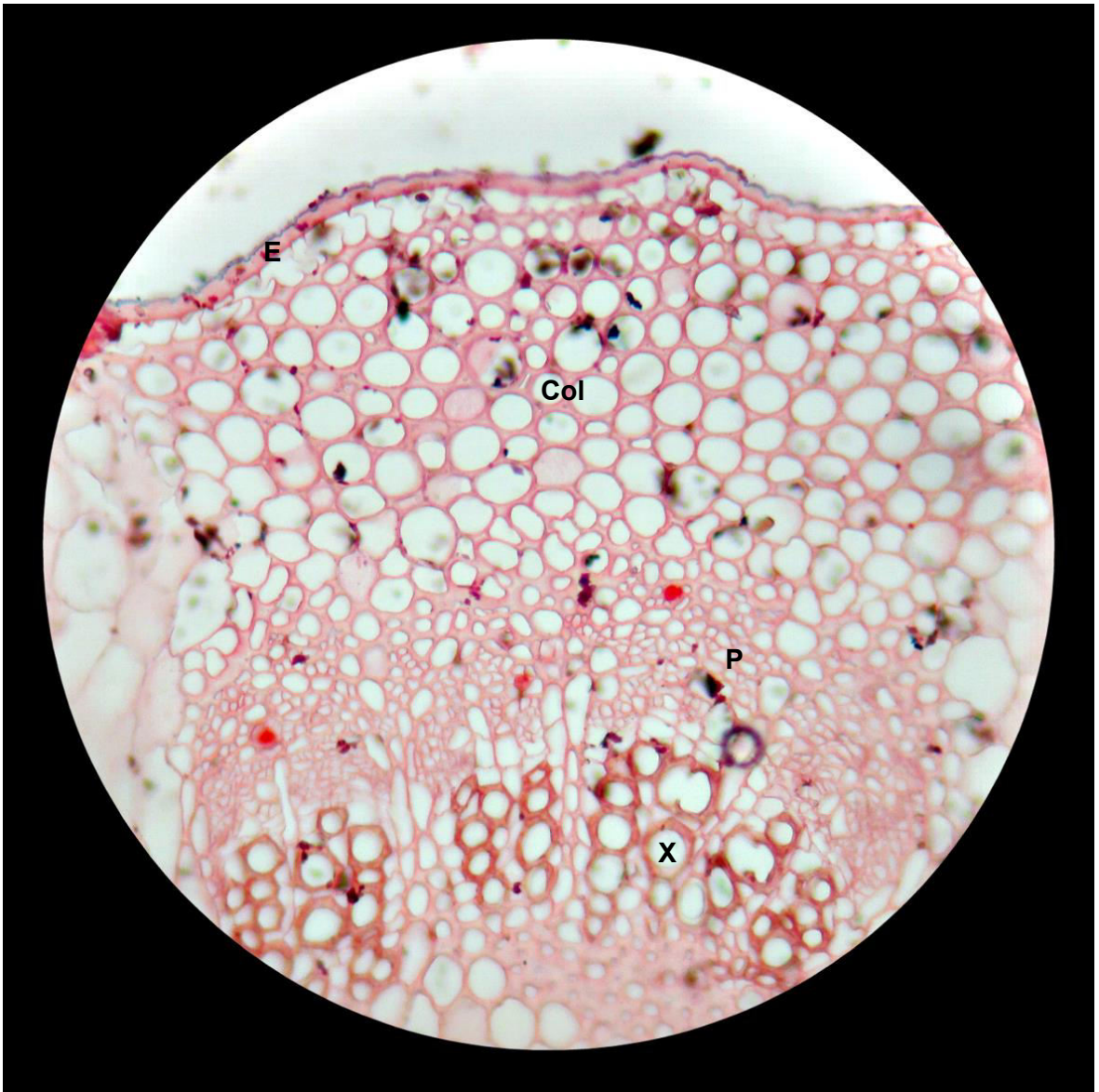


Figure 3.21 : Coupe transversale dans une nervure centrale de *Capparis spinosa* L. récolté à Hamman Melouane au mois d'octobre. (Epaisseur  $2\mu$ , coloration Rouge Congo-Vert de méthyle, microscope photonique x 400).

**E**: épiderme ; **Col**: collenchyme ; **P**: phloème ; **X**: xylème.



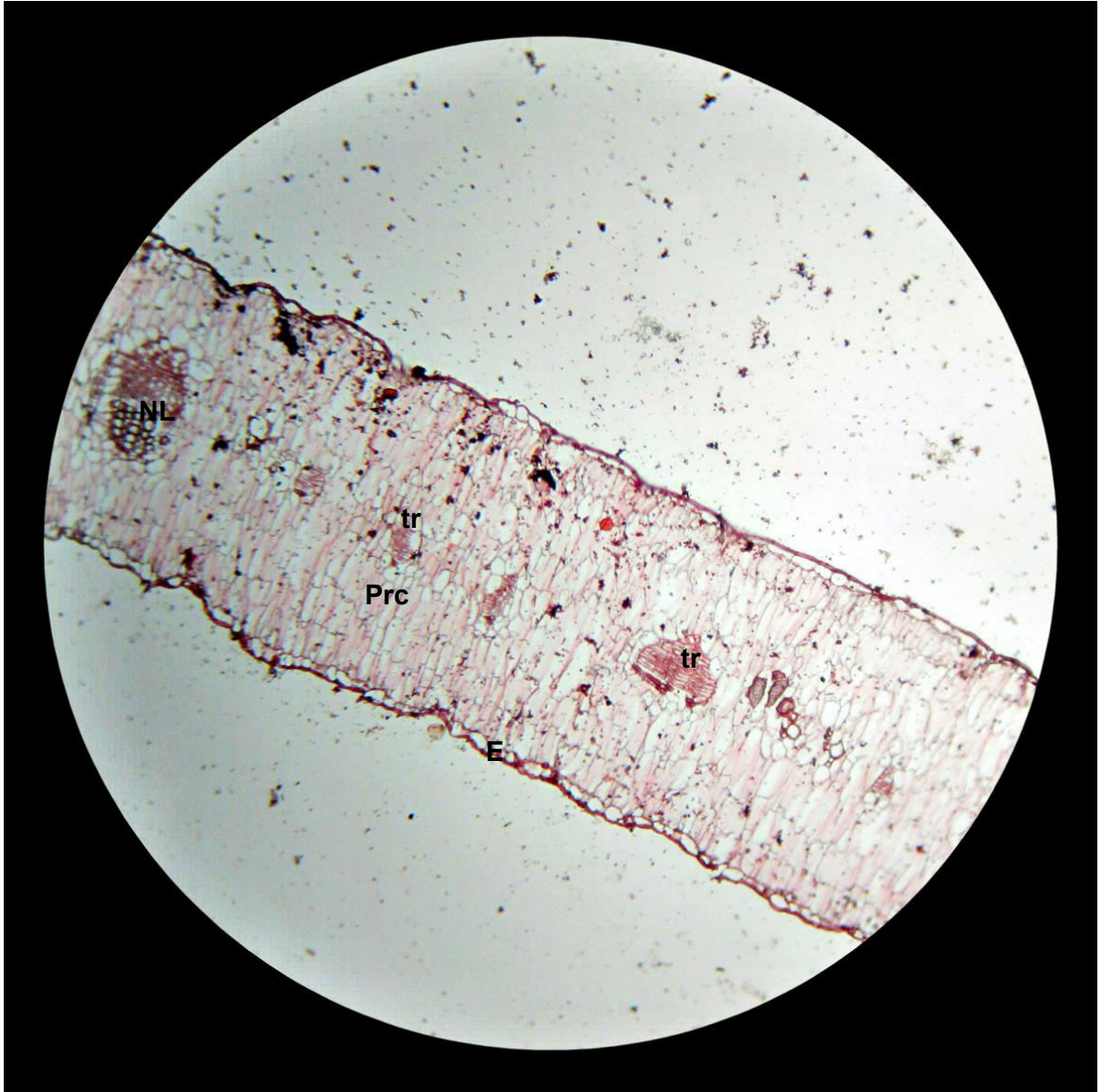


Figure 3.22 : Coupe transversale dans une feuille de *Capparis spinosa* L. récolté à Hammam Melouane au mois d'octobre présentant tissus conducteurs sans extensions périvasculaires. (Epaisseur  $2\mu$ , coloration Rouge Congo-Vert de méthyle, microscope photonique x 100).

**NL** : nervure latérale ; **tr** : trachéide ; **Prc** : parenchyme ; **E** : épiderme.

Les chloroplastes sont présents sur les deux types de parenchymes mésophylliens, cependant, ils sont moins nombreux sur le parenchyme lacuneux. Ils sont positionnés contre la paroi cellulaire en contact avec les méats et les espaces aérifères (Planche II, Figure 3.23).

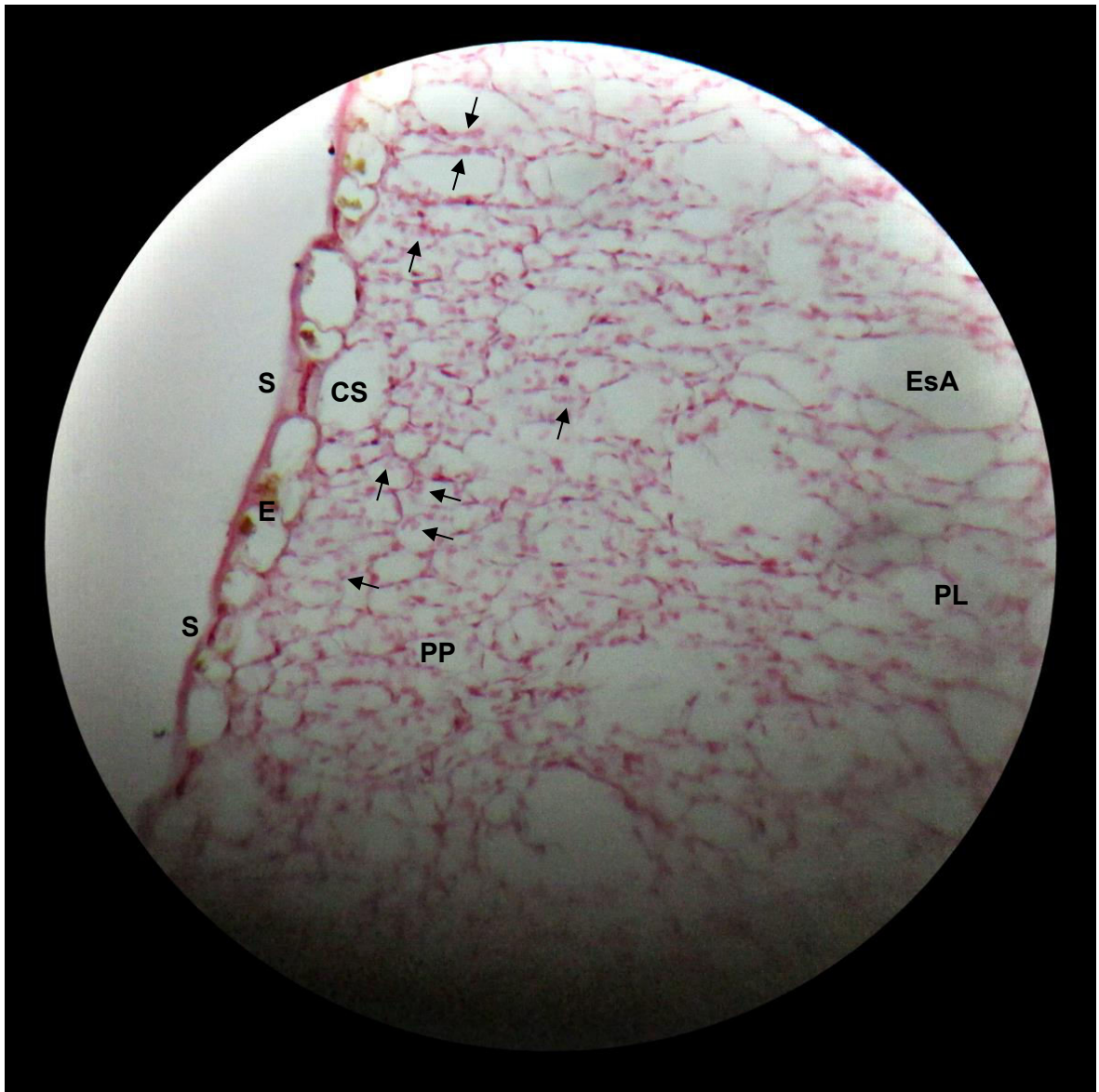


Figure 3.23 : Coupe transversale d'une partie du mésophylle d'une feuille de *Capparis spinosa* L. récolté à Hammam Melouane au mois d'octobre. (Épaisseur 2 $\mu$ , coloration Hématoxyline-Eosine, microscope photonique x 400).

**S**: stomate ; **CS**: chambre stomatique ; **E**: épiderme ; **PP**: parenchyme palissadique ; **EsA**: espace aérifère ; **PL**: parenchyme lacuneux ;  $\rightarrow$  chloroplastes disposés contre les parois cellulaires.

### 3.4.1.2 Anatomie des feuilles in vitro

Les feuilles régénérées in vitro présentent un parenchyme palissadique constitué de cellules allongées sur la face adaxiale et un parenchyme lacuneux à cellules circulaires sur la face abaxiale avec 4 à 5 assises mésophylliennes. Les épidermes, supérieur et inférieur, sont unisériés à petites cellules rectangulaires et renferment des stomates (Figure 3.24).

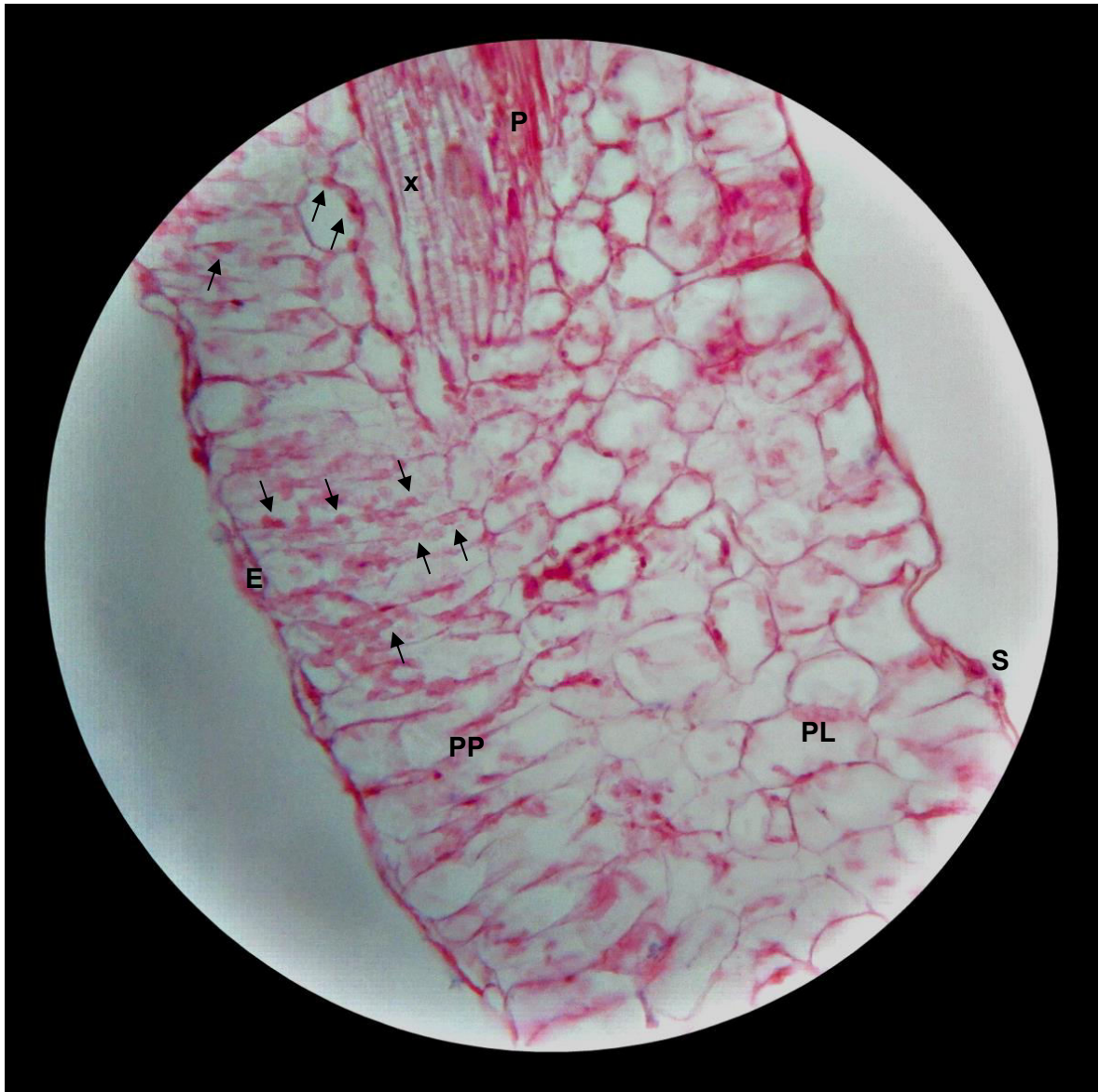


Figure 3.24 : Coupe tangentielle du mésophylle d'une feuille de *Capparis spinosa* L. régénérée in vitro. (Épaisseur 2 $\mu$ , coloration Hématoxyline-Eosine, microscope photonique x 400).

**S:** stomate ; **E:** épiderme ; **PP:** parenchyme palissadique ; **PL:** parenchyme lacuneux ; **X:** xylème ; **P:** phloème ;  $\rightarrow$  chloroplastes disposés contre les parois cellulaires.



Les chloroplastes sont présents sur les deux types de parenchymes mésophylliens cependant, ils sont moins nombreux sur le parenchyme lacuneux. Ils sont positionnés contre la paroi cellulaire en contact avec les méats et les espaces aérifères. On note aussi l'absence d'extensions périvasculaires (Figure 3.24).

En effet, la feuille est l'organe le plus sensible au stress environnemental, elle est capable de s'adapter tant sur le plan structural que fonctionnel quand elle est sujette aux longues périodes de stress [157]. *Capparis spinosa* L. est l'un des rares arbustes qui croît et fleurit durant l'été. Cette particularité lui est conférée par des adaptations anatomiques diverses.

Des recherches antérieures ont révélé que les plantes xérophytes ont relativement de petites feuilles épaisses avec mésophylle multicouche et épidermes à parois cellulaires externes plus épaisses [158]. Nos résultats montrent que 8 à 9 couches de cellules palissadiques étaient présentes dans la feuille mature de *C. spinosa* L. poussant à l'état sauvage, contre 4 à 5 couches dans la feuille des plantes régénérées in vitro. En effet, les cellules palissadiques bien développées peuvent améliorer la photosynthèse de *Capparis spinosa* spontané dans des conditions de sécheresse [159]. Les tissus sclérenchymatiques de *C. spinosa* poussant à l'état sauvage le protègent contre les dommages irréparables qui peuvent survenir pendant les périodes des sécheresses accentuées [160] [161]. Les feuilles des plants régénérées in vitro, dans des conditions favorables sont moins sujettes au stress et donc développent moins leurs structures. GAN et al. [157] ont rapporté que les feuilles de *C. spinosa* sauvage était composé de 7 à 8 couches de cellules palissadiques contre 2 à 3 pour leur semblables régénérées in vitro. En outre, les travaux réalisés par RHIZOPOULOU et PSARAS [158] ont montré que plus les feuilles de *C. spinosa* sont âgées, plus elles développent de nouvelles couches mésophylliennes. De ce fait, on note que les pousses régénérées in vitro sont de caractères juvéniles.

Notre étude a également révélé que les feuilles de *C. spinosa* sauvage sont homobariques, ne présentant pas des extensions périvasculaires. Elle présente des stomates distribués uniformément sur les deux faces. En fait, les stomates sont le principal canal de transfert d'eau et de gaz, ils sont étroitement liés à la transpiration

et à la photosynthèse. Cette distribution particulière des stomates entre les deux surfaces foliaires, est une sorte d'adaptation probablement afin d'éliminer toute obstruction à la diffusion de CO<sub>2</sub> dans le mésophylle [157].

#### 3.4.1.3 Anatomie des feuilles vitrifiées

Sur l'ensemble des feuilles hyperhydriques de *C. spinosa* nous avons observé des épidermes, supérieur et inférieur, unisériés à petites cellules rectangulaires. Le mésophylle présente des cellules circulaires volumineuses ne laissant pas de méats entre elle avec parenchyme palissadique réduit et parenchyme lacuneux important. Les nervures sont réduites et peu lignifiées (Figures 3.25 et 3.26).

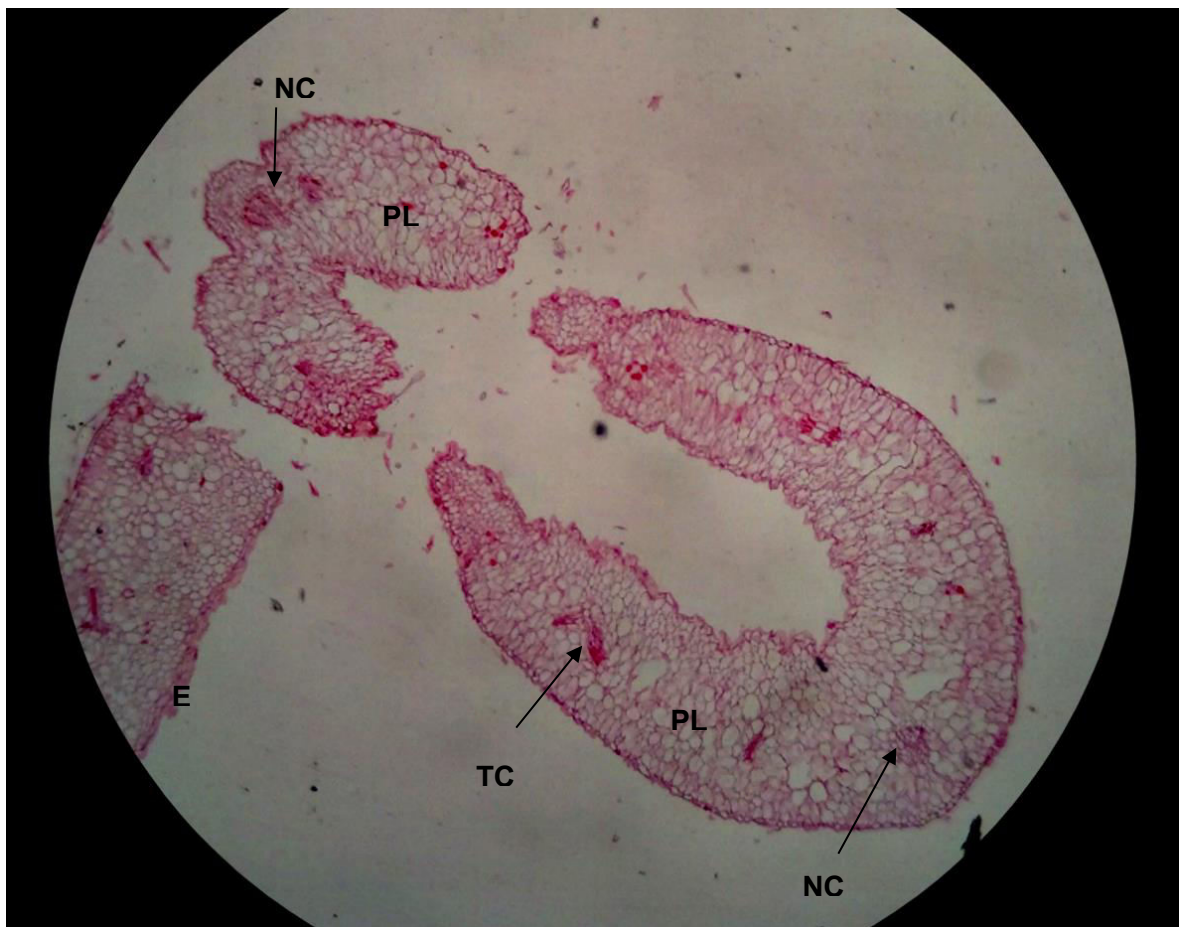


Figure 3.25 : Coupes transversales dans des feuilles vitrifiées (fragiles et facilement détachables de leurs tiges) de *Capparis spinosa* L. (Épaisseur 2 $\mu$ , coloration Hématoxyline-Eosine, microscope photonique x 40).

**E**: épiderme ; **PL**: parenchyme lacuneux ; **NC**: nervure centrale ; **TC**: tissu conducteur.



Figure 3.26 : Coupe transversale dans des feuilles vitrifiées (d'aspect épai) de *Capparis spinosa* L. (Epaisseur 2 $\mu$ , coloration Hématoxyline-Eosine, microscope photonique x 40).

**E**: épiderme ; **PL**: parenchyme lacuneux ; **PP**: parenchyme palissadique ; **NC**: nervure centrale ; **NL**: nervure latérale.

Les jeunes feuilles fragiles et transparentes présentent un épiderme irrégulier. Cette irrégularité est accentuée sur la face adaxiale. (Figure 3.27) tandis que les feuilles épaisses et vertes présentent des nervures peu développées et moins lignifiées avec réduction des tissus de soutien (Figures 3.28 et 3.39).

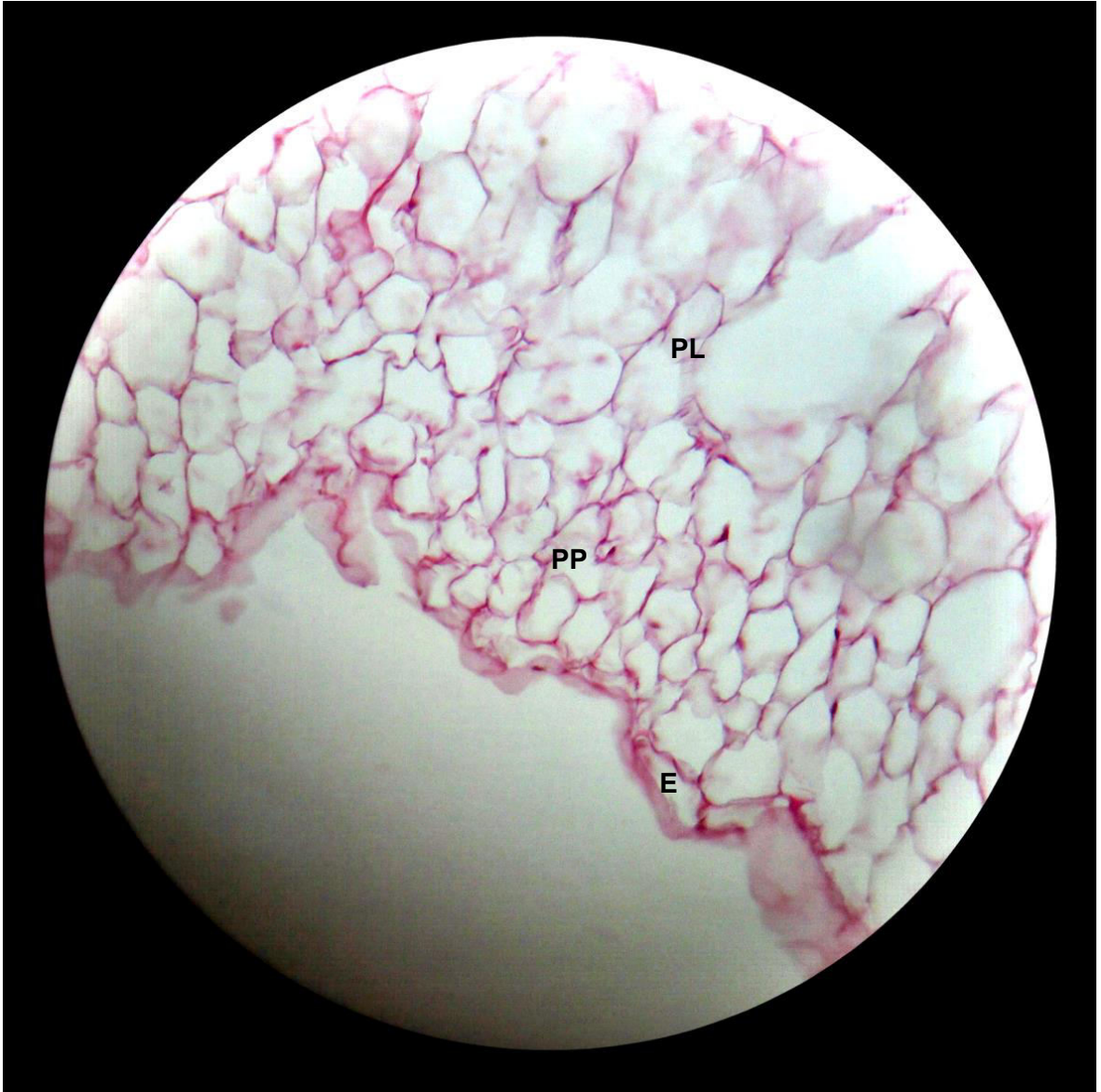


Figure 3.27 : Coupe transversale du mésophylle d'une feuille vitrifiée (fragiles et facilement détachables de leurs tiges) de *Capparis spinosa* L. (Épaisseur 2 $\mu$ , coloration Hématoxyline-Eosine, microscope photonique x 100).

**E**: épiderme ; **PL**: parenchyme lacuneux ; **PP**: parenchyme palissadique.



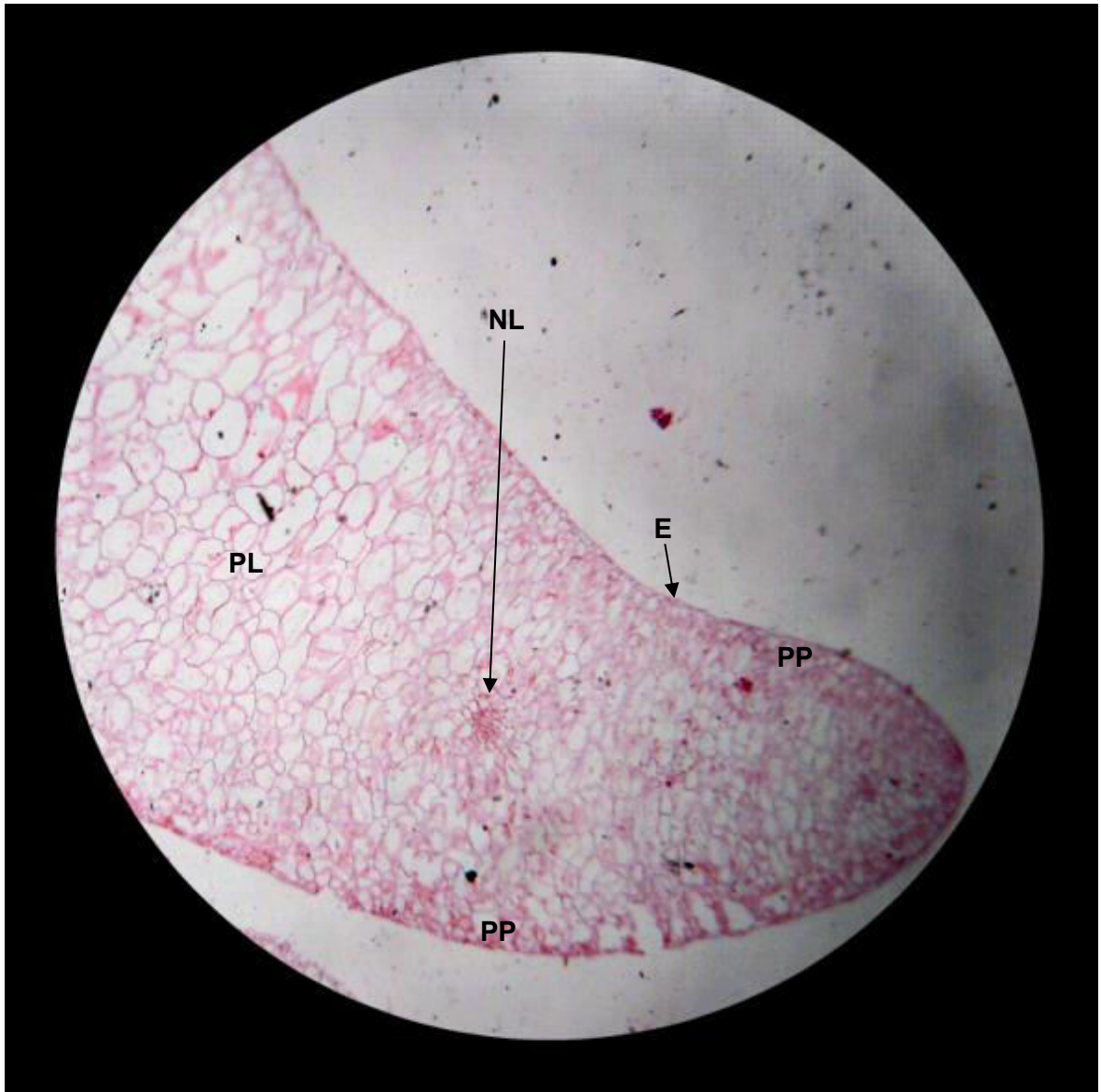


Figure 3.28 : Coupe transversale du mésophylle d'une feuille vitrifiée (d'aspect épais) de *Capparis spinosa* L. (Epaisseur  $2\mu$ , coloration Hématoxyline-Eosine, microscope photonique x 40).

**E**: épiderme ; **PL**: parenchyme lacuneux ; **PP**: parenchyme palissadique.



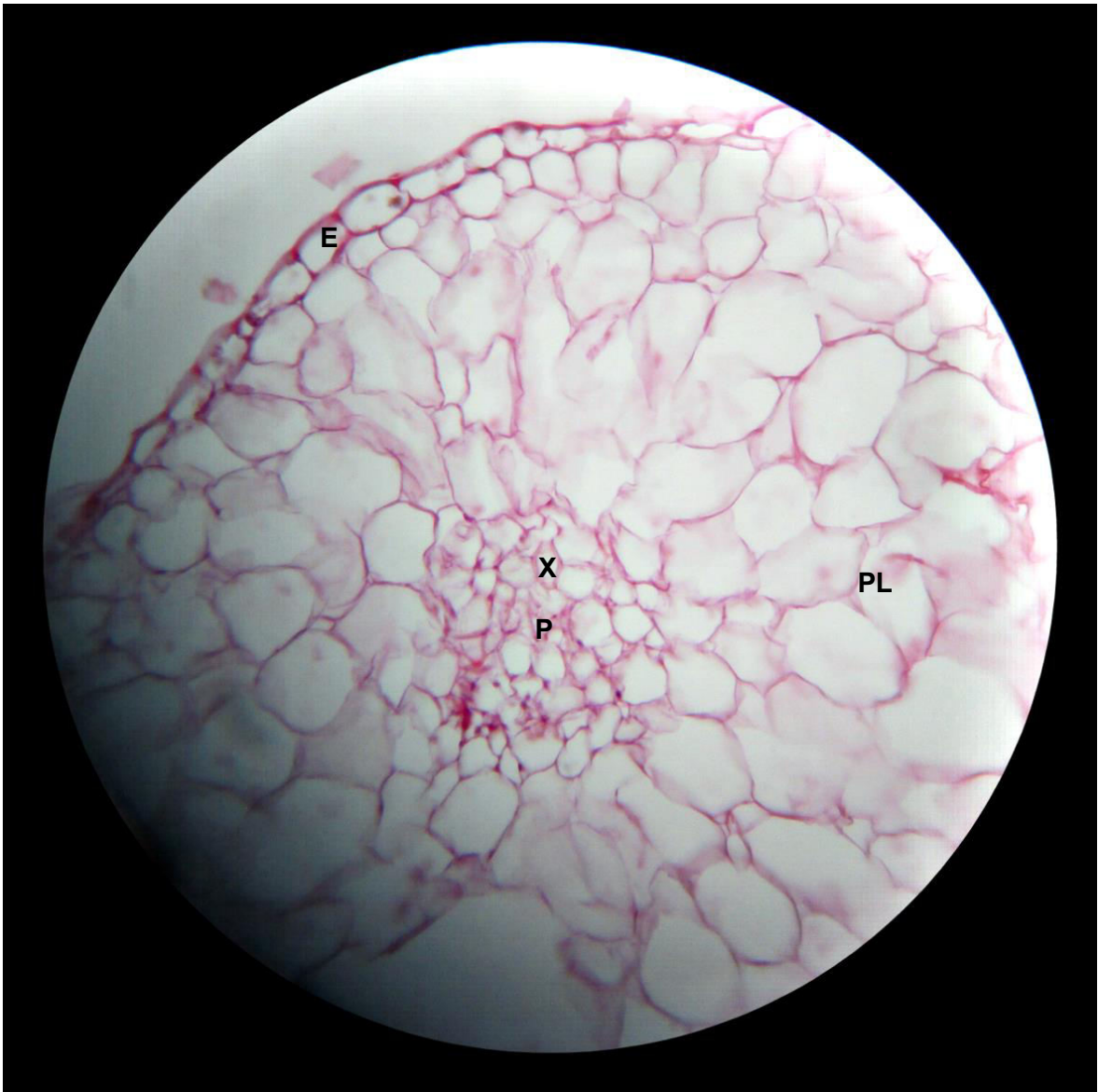


Figure 3. 29 : Nervure centrale en coupe transversale d'une feuille vitrifiée (d'aspect épais) de *Capparis spinosa* L. (Épaisseur 2 $\mu$ , coloration Hématoxyline-Eosine, microscope photonique x 100).

**E**: épiderme ; **PL**: parenchyme lacuneux ; **X**: xylème ; **P**: phloème.

Les feuilles présentant des malformations prononcées sont d'une structure anatomique désorganisée avec parenchyme lacuneux important constitué de cellules de différentes tailles et formes laissant des espaces entre elles. Le parenchyme palissadique est peu distingué et les vaisseaux conducteurs sont très réduits.

En effet, la structure anatomique des feuilles des pousses vitrifiées diffère sensiblement des plantes sauvages et de celles régénérées in vitro ayant un aspect

normal. Ces pousses ont montré les caractéristiques anatomiques générales d'une feuille. Cependant, il y avait une réduction du nombre des couches de cellules du parenchyme palissadique, elles ressemblent plus à ceux du parenchyme lacuneux avec une augmentation du volume cellulaire.

Le système vasculaire des feuilles hyperhydriques était moins développé que dans les feuilles d'aspect normal. En plus de ça, les faisceaux de xylème et fibres du phloème étaient moins lignifiés. Cette réduction de parenchyme palissadique dans les feuilles hyperhydriques a été décrit pour les pousses vitrifiées de *Cynara scolymus* [162], *Dianthus cariophyllus* [163], *Castanea sativa* [164] et *Helianthus annuus* L. [164] En outre, une augmentation générale du volume cellulaire a souvent été observé pour les pousses hyperhydriques chez plusieurs espèces [164] [166] [167] [165] L'anatomie anormale se manifeste principalement dans les feuilles et dans une moindre mesure dans les tiges et les racines [168].

#### 3.4.2 Anatomie des tiges

Seules les tiges collectées *in situ* et celles régénérées *in vitro* âgées de 4 mois ont fait l'objet de l'étude. Les pousses vitrifiées étant pourvues de tiges très réduites non pas pu être étudiées.

L'observation des différentes coupes des pousses de *C. spinosa* poussant à l'état spontanée et régénérés *in vitro* met en évidence des différences structurales. En effet, la couche corticale des plantules régénérées *in vitro*, constituée par des cellules plus au moins volumineuses, est plus développée par rapport à celles des plantes collectées *in situ* dont le rapport de la couche corticale au cylindre central est très faible, les cellules épidermiques étroitement agencées et les cellules corticales très petites. On note la présence de nombreux stomates sur l'ensemble des pousses étudiées (Figures 3.30 et 3.31).

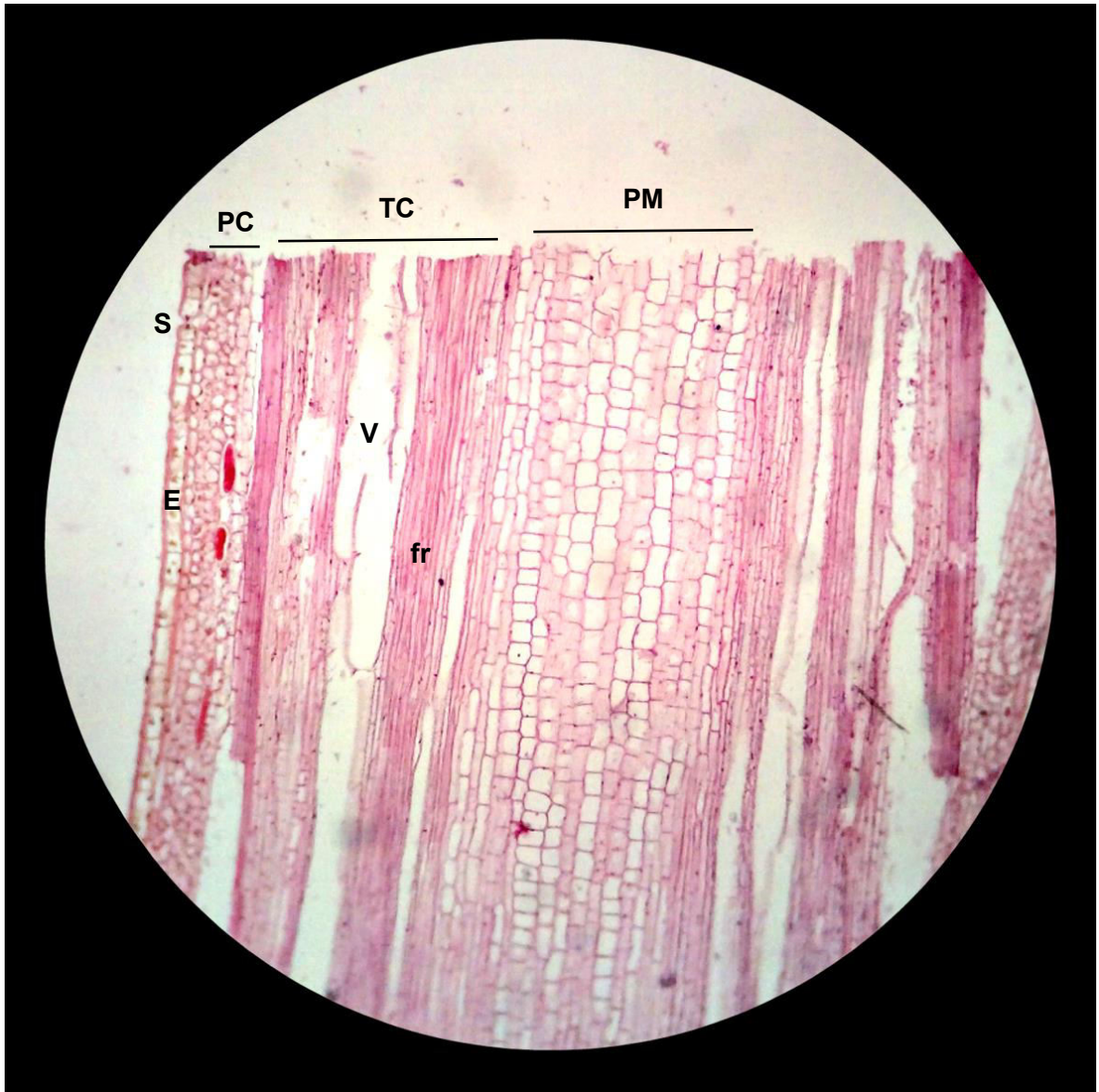


Figure 3.30 : Coupe longitudinale dans une tige de *Capparis spinosa* L. récolté à Hammam Melouane au mois d'octobre. (Épaisseur  $2\mu$ , coloration Hématoxyline-Eosine, microscope photonique x 100).

**S**: Stomate ; **E** : épiderme ; **V**: vaisseau ; **fr**: fibre ; **PC** : parenchyme corticale ; **TC**: tissu conducteur ; **PM**: parenchyme médullaire.



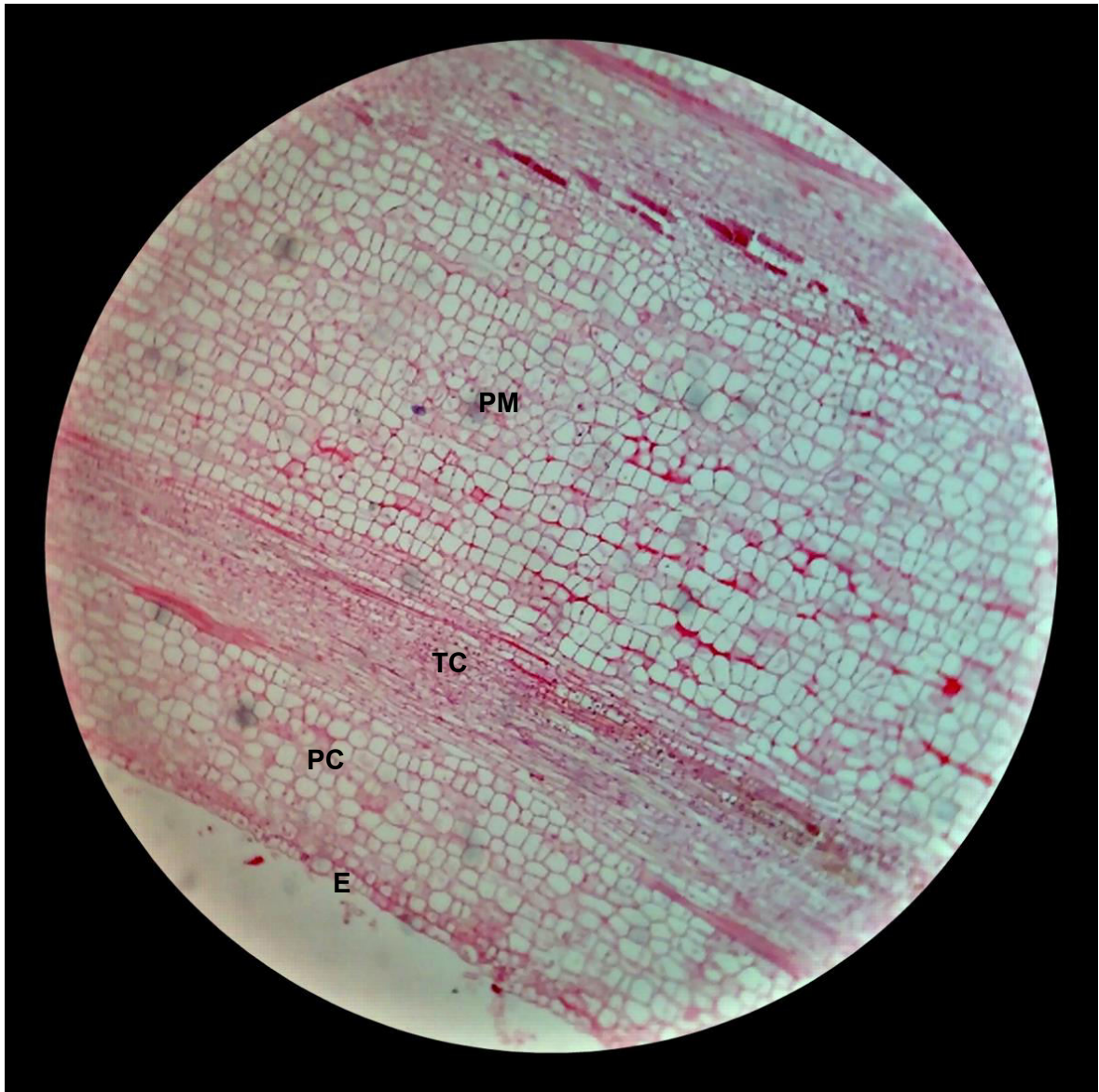


Figure 3.31 : Coupe longitudinale dans une tige de *Capparis spinosa* L. régénérée in vitro. (Épaisseur 2 $\mu$ , coloration Rouge Congo-Vert de méthyle, microscope photonique x 100).

**E**: épiderme ; **PC**: parenchyme cortical ; **TC**: tissu conducteur ; **PM**: parenchyme médullaire.

Les fibres du phloème et les vaisseaux du xylème sont superposés et séparés par le cambium fasciculaire et inter fasciculaire avec présence de rayons plurisériés observés sur toutes les pousses étudiées (Figures 3.32, 3.33 et 3.34). En revanche, les tissus conducteurs des pousses spontanées sont bien développés par rapport à ceux des plantules issues in vitro avec présence de sclérotés dispersées comme tissu de soutien. En fait, les vaisseaux conducteurs développés permettent aux

plantes xérophytes d'augmenter le transport de l'eau durant les conditions de sécheresse [157].

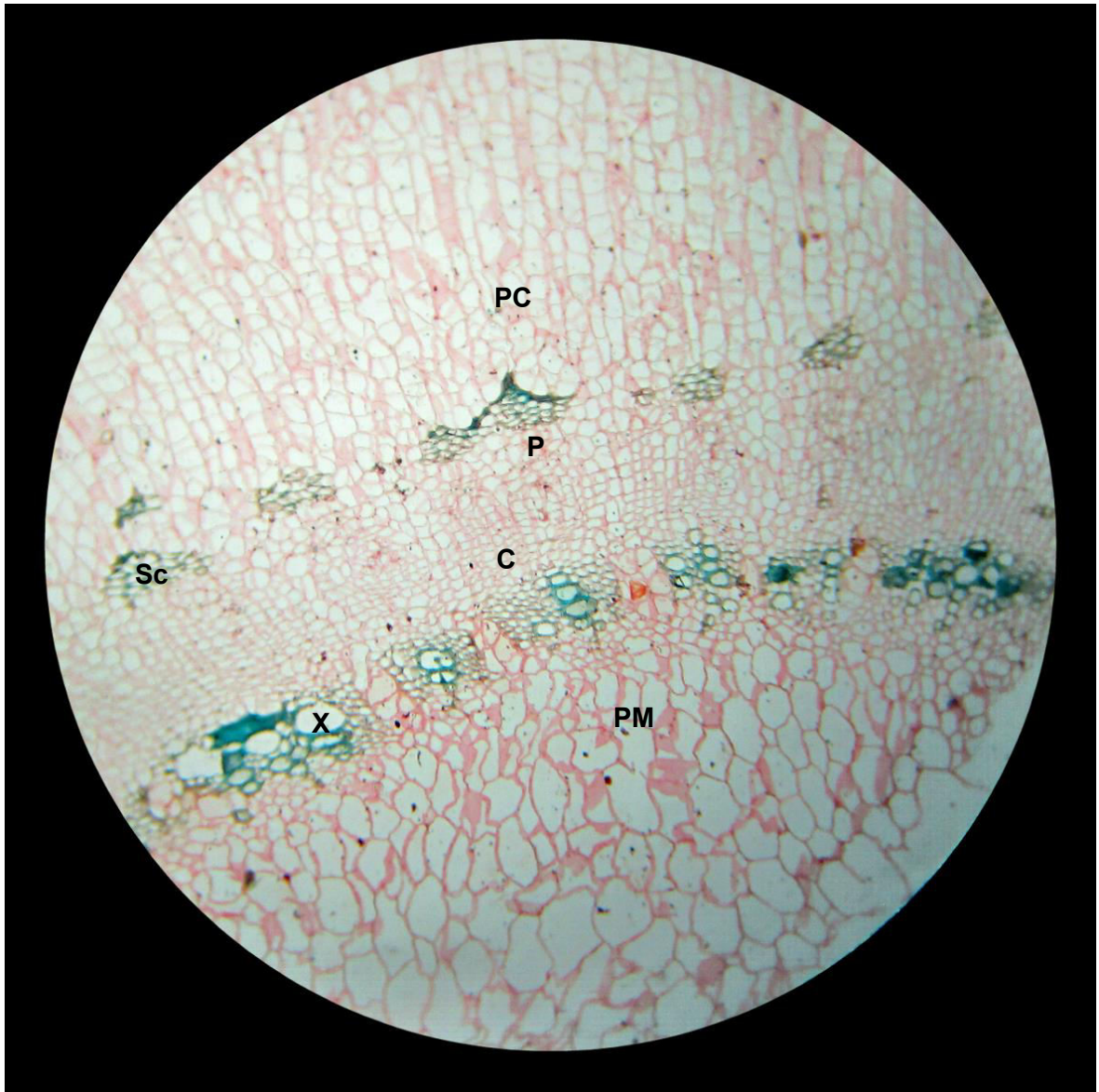


Figure 3.32 : Coupe transversale dans une tige de *Capparis spinosa* L. récolté à Hammam Melouane au mois d'octobre. (Epaisseur 2 $\mu$ , coloration Rouge Congo-Vert de méthyle, microscope photonique x 100).

**PC**: parenchyme cortical ; **Sc**: sclérenchyme ; **P**: phloème ; **C**: cambium ; **X**: xylème ; **PM**: parenchyme médullaire.





Figure 3.33 : Coupe longitudinale dans une tige de *Capparis spinosa* L. récolté à Hammam Melouane au mois d'octobre. (Épaisseur  $2\mu$ , coloration Rouge Congo-Vert de méthyle, microscope photonique x 400).

**E**: épiderme ; **PC**: parenchyme cortical ; **MX**: métaxylème ; **PM**: parenchyme médullaire ;  $\rightarrow$  : parois lignifiées ;  $\circ$  : ponctuations.

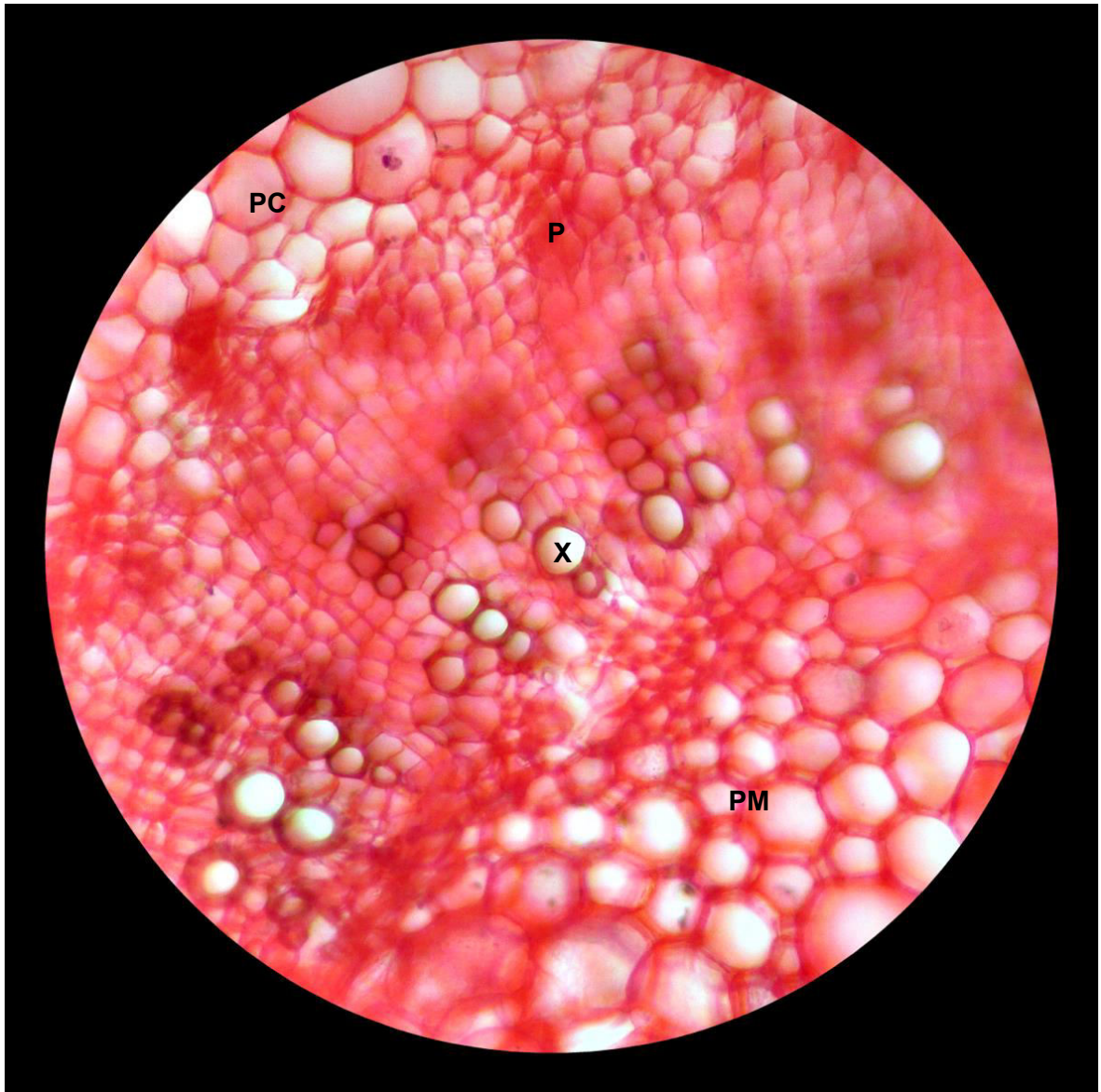


Figure 3.34 : Coupe transversale dans une tige de *Capparis spinosa* L. régénérée in vitro. (à main levée, coloration Rouge Congo-Vert de méthyle, microscope photonique x 400).

**PC:** parenchyme cortical ; **P:** phloème ; **X:** xylème ; **PM:** parenchyme médullaire.

L'étude histologique montre que le bois de *Capparis spinosa* L. est hétéroxylé constitué de vaisseaux, fibres, rayons et parenchyme (Figure 3.35).

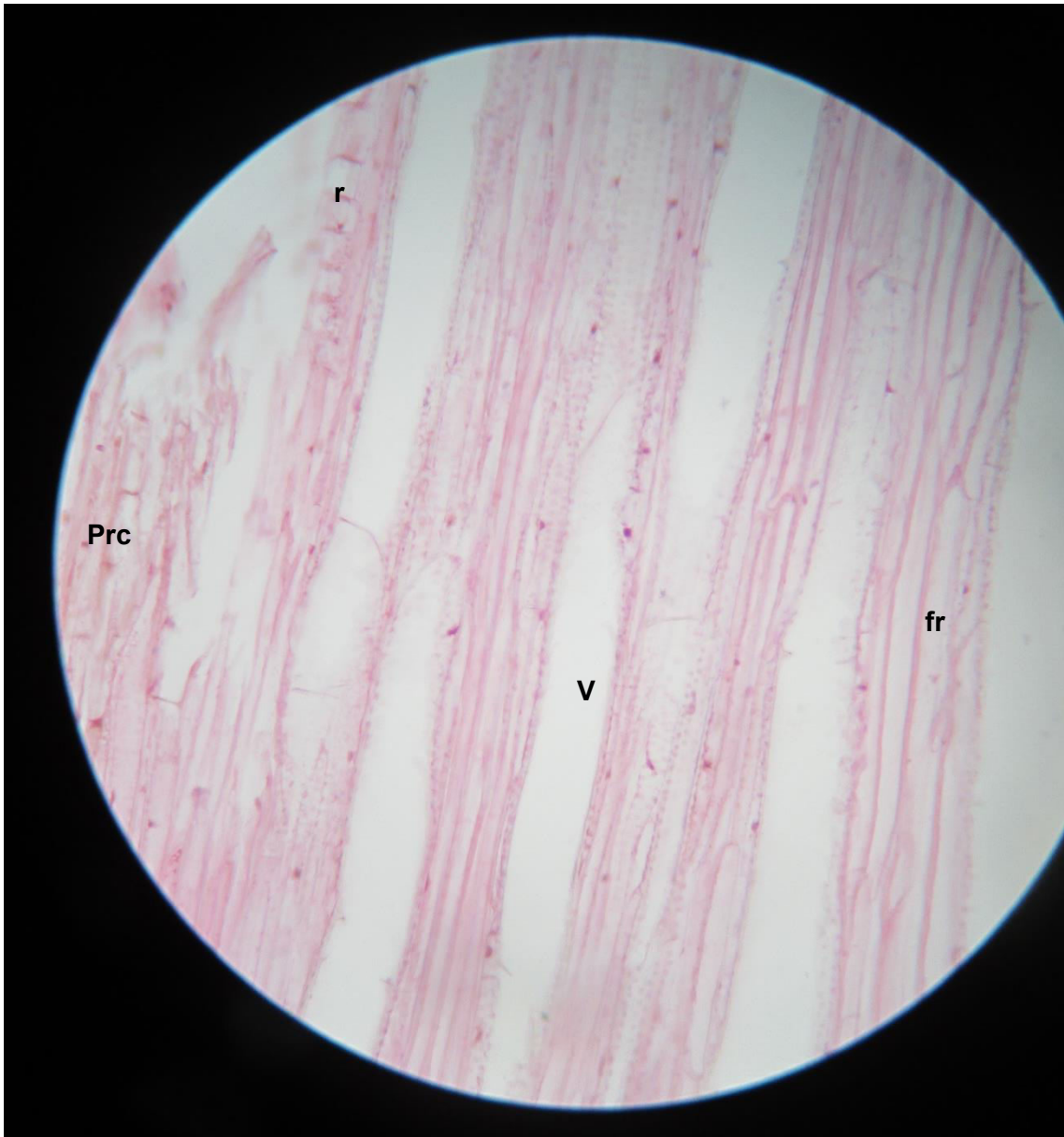


Figure 3.35 : Coupe tangentielle du bois hétéroxylé de *Capparis spinosa* L. récolté à Hammam Melouane au mois d'octobre. (Epaisseur 2 $\mu$ , coloration Hématoxyline-Eosine, microscope photonique x 400).

**Prc**: parenchyme ; **r**: rayon ; **V**: vaisseau ; **fr**: fibre.



### 3.4.3 Anatomie des apex caulinaires

Des coupes longitudinales des apex caulinaires des pousses régénérées in vitro normales et vitrifiées ont été observées sous microscope optique. Les résultats des observations montrent des différences structurales importantes dans les deux types de pousses normales et vitrifiées.

Les apex des pousses normales présentent une structure d'un apex caulinaire des plantes à feuilles alternes avec méristème présentant une zone axiale, un anneau initial à l'origine des primordiums foliaires, un méristème médullaire à l'origine des sous-bassement des entre-nœuds, un procambium donnant naissance à des vaisseaux vasculaires dans les feuilles anciennement régénérées ainsi que des méristèmes axillaires à l'origine des bourgeons latéraux. Nous avons noté des méristèmes latéraux actifs en même temps que le méristème apical souvent dû à la suppression de la dominance apicale suite à la présence de cytokines dans le milieu de culture (Figure 3.36).

Par ailleurs, les apex des tiges vitrifiées présentent des déformations multiples au niveau structural. En effet, une réduction de la zone axiale et du méristème médullaire a été observée. En outre, le méristème apical présentait un aplatissement remarquable par rapport aux pousses normales régénérées in vitro d'une part les soubassements foliaires qui sont réduits ou absents, et les entre-nœuds malformés et d'une autre part, le procambium présente une discontinuité dans la moelle qui se caractérise par des cellules anarchiques (Figure 3.37).

L'hyperhydricité est un désordre morphologique et physiologique qui affecte des plantes régénérées in vitro. Ce défaut est associé à une hydratation excessive des cellules et une morphologie anormale qui donne aux jeunes pousses une apparence vitrifiée. Ce phénomène non souhaitable est un problème fréquent dans les systèmes de culture in vitro et a été décrit d'après les symptômes visibles à l'œil nu mais il n'y a pas d'information sur l'anatomie des pousses affectées [165].

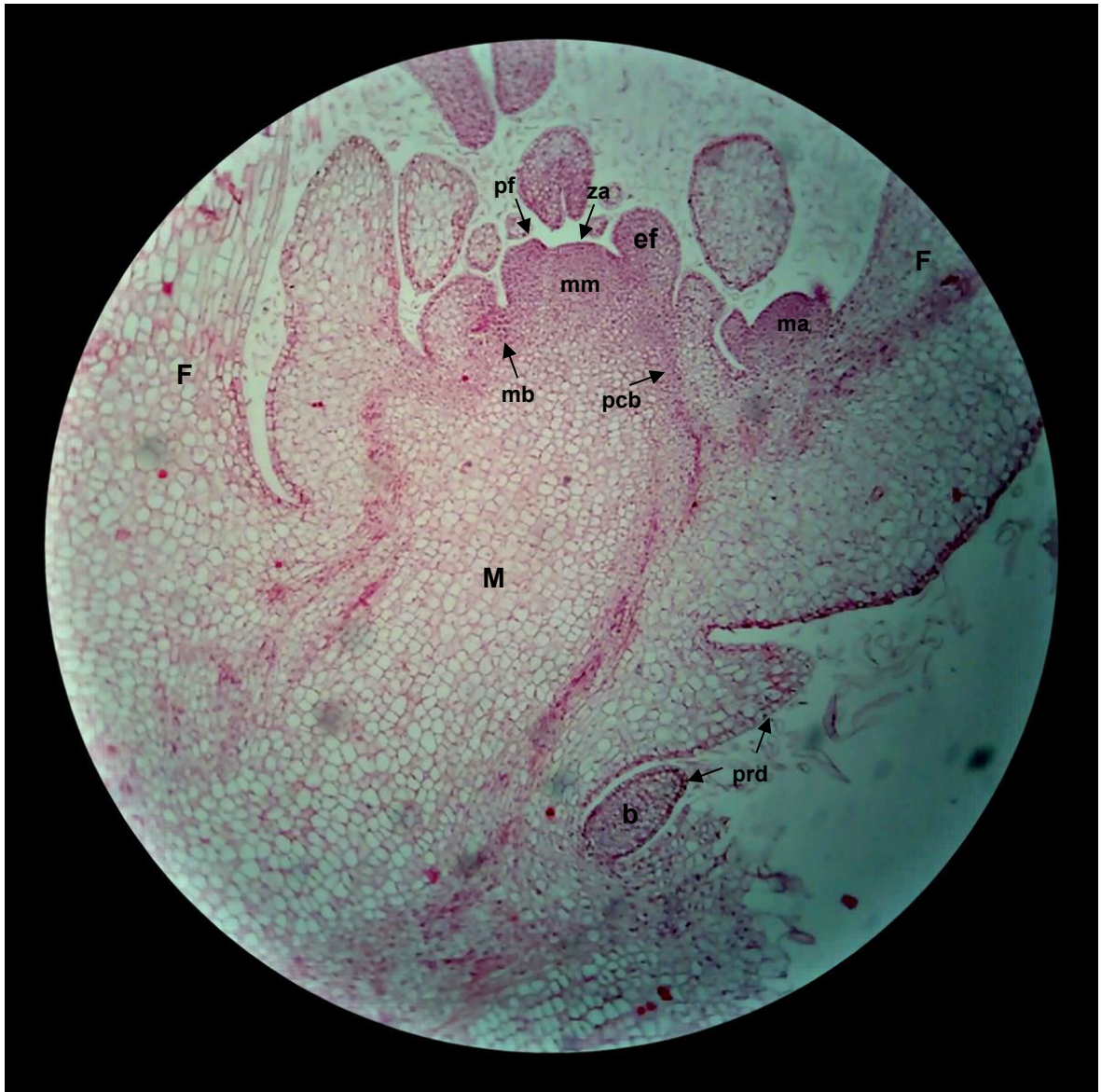


Figure 3.36 : Coupe longitudinale dans un apex caulinaire de *Capparis spinosa* L. régénérée in vitro. (Épaisseur 2 $\mu$ , coloration Hématoxyline-Eosine, microscope photonique x 100).

**F**: feuille; **b**: bourgeon ; **prd**: protoderme ; **M**: moelle ; **mb**: méristème à l'origine d'un bourgeon axillaire ; **pcb**: procambium ; **pf**: prémordium foliaire ; **mm**: méristème médullaire ; **za**: zone axiale ; **ef**: ébauche foliaire ; **ma**: méristème axillaire.

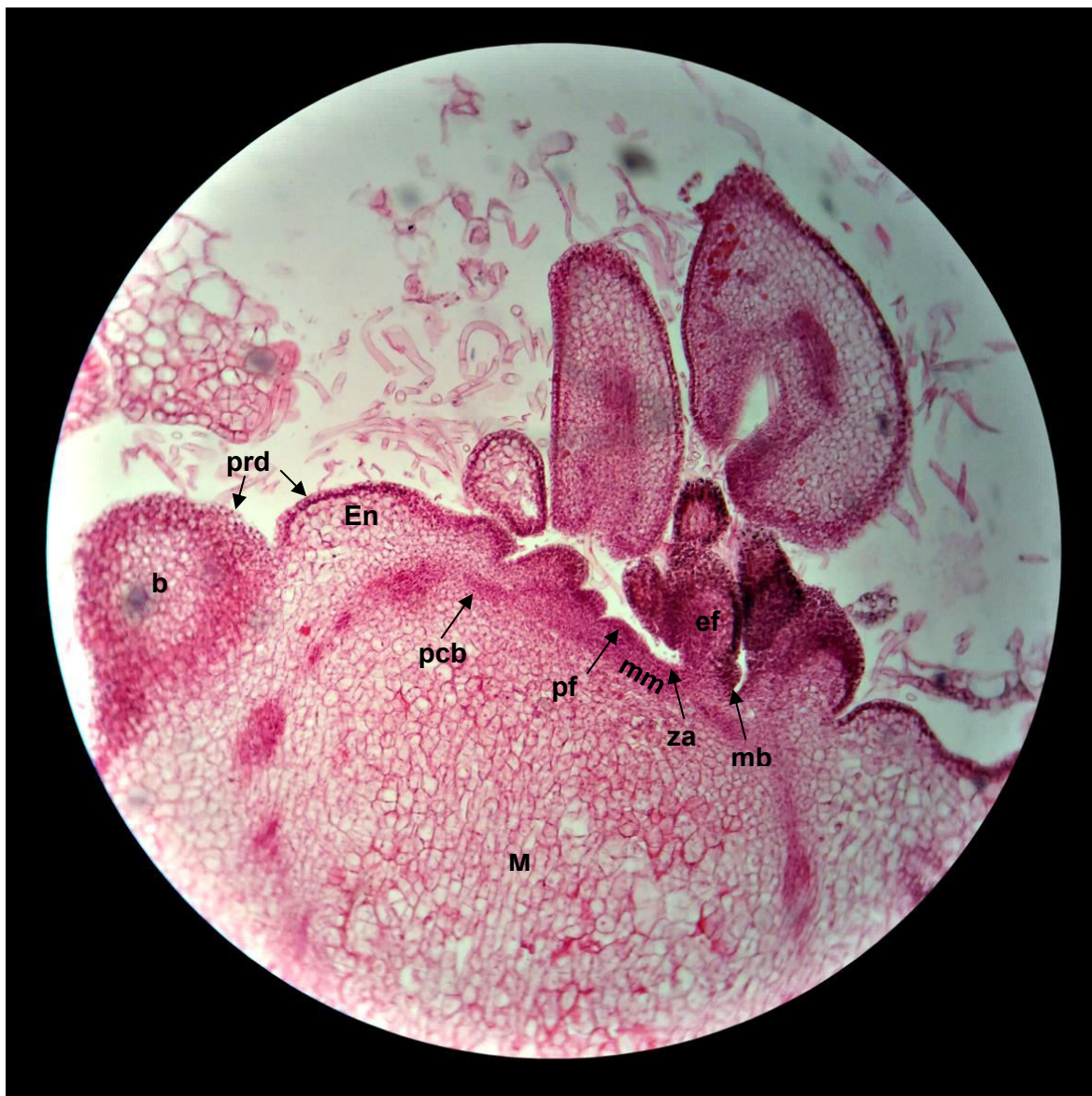


Figure 3.37 : Coupe longitudinale dans un apex caulinaire de *Capparis spinosa* L. régénérée in vitro et présentant une hyperhydricité. (Épaisseur 2 $\mu$ , coloration Hématoxyline-Eosine, microscope photonique x 100).

**b**: bourgeon ; **prd**: protoderme ; **En**: entrenchéud ; **M**: moelle ; **mb**: méristème à l'origine d'un bourgeon axillaire ; **pcb**: procambium ; **pf**: prémordium foliaire ; **mm**: méristème médullaire ; **za**: zone axiale ; **ef**: ébauche foliaire.

#### 3.4.4 Ontogenèse d'un cal

Des segments nodaux de *Capparis spinosa* L. ont été mis en culture sur milieu MS additionné de 1 mg/l BAP + 0.1 mg/l AIA. Après quatre mois de culture, outre le débourrement des bourgeons axillaires préexistants, des cals ont été mise en place autour des explants, suivi, après transfert, par une organogenèse d'une tige feuillée.

L'observation des coupes histologiques des explants calogènes après 4 mois de culture montrent que le cal primaire formé tout autour de l'explant est d'origine cambiale. En effet, des cellules méristématiques d'origine interfasciculaire à division péricline sont réactivées et donnent naissance à un parenchyme néoformé vers l'extérieur. Les cellules parenchymateuses néoformées ont de grand diamètre et présentent des divisions périclines et anticlines (Figures 3.38 et 3.39). Ces divisions exercent une pression sur le parenchyme cortical et l'épiderme qui s'écrasent et se déchirent en conséquence (Figure 3.40). Par ailleurs les faisceaux conducteurs subissent une déformation suite aux pressions exercées par la néoformation.

On note la formation de petits nodules à petites cellules serrées entre elle d'origine épidermique (Figure 3.40).

En effet, sous l'action des phytohormones, certaines cellules appelées cellules cibles se réactivent et subissent une dédifférenciation [104]. Les auxines ayant une action sur la multiplication nucléaire tandis que les cytokinines permettent le cloisonnement cellulaire [169], la prolifération cellulaire ne peut se déclencher qu'en présence dans le milieu de culture des auxines et des cytokinines [170].

L'initiation de la callogenèse peut être d'origine interne ou externe. L'origine interne de la callogenèse se traduit souvent par la réactivité des cellules cambiales inter ou intrafasciculaires ; ceci a été observé sur plusieurs espèces végétales telles que *Phoenix dactylifera* [171] [172], *Artiplex Halimus* L. et *Artiplex canescens* [173]. Certains travaux ont montré que l'origine externe de la callogenèse est souvent liée aux cellules épidermiques ou sous-épidermiques qui se réactivent et se prolifèrent [174] [175].



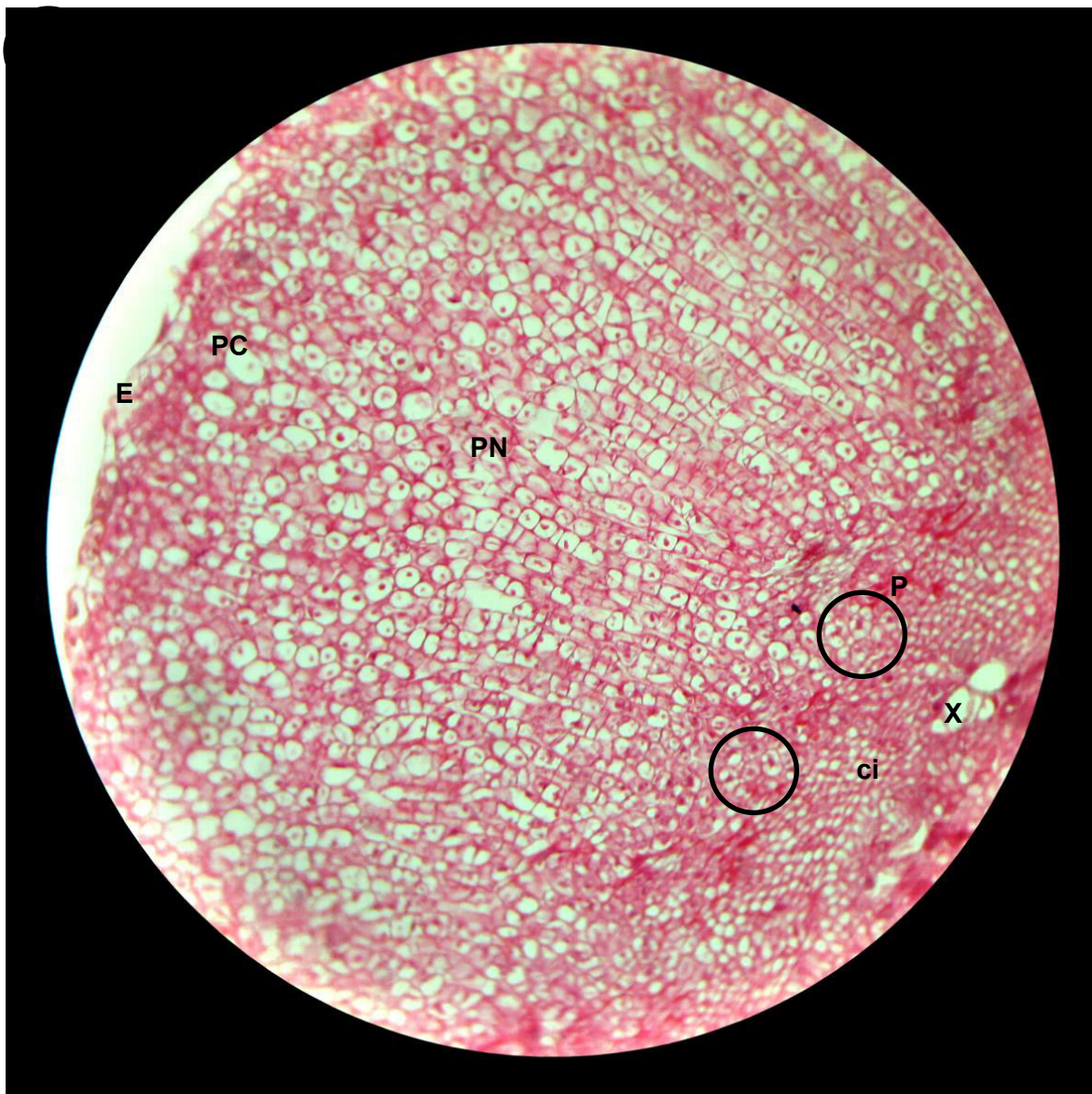


Figure 3.38 : Coupe transversale dans un explant de tige de *Capparis spinosa* L. cultivé sur milieu MS+ 1mg/l BAP + 0,1 mg/l AIA. (Épaisseur 2 $\mu$ , coloration Hématoxyline-Eosine, microscope photonique x 100).

**E**: épiderme ; **PC**: parenchyme cortical ; **PN**: parenchyme néoformé ; **P**: phloème ; **X**: xylème ; **ci**: cambium interfasciculaire ; cercles délimitant des cellules a divisions anticline et péricline.

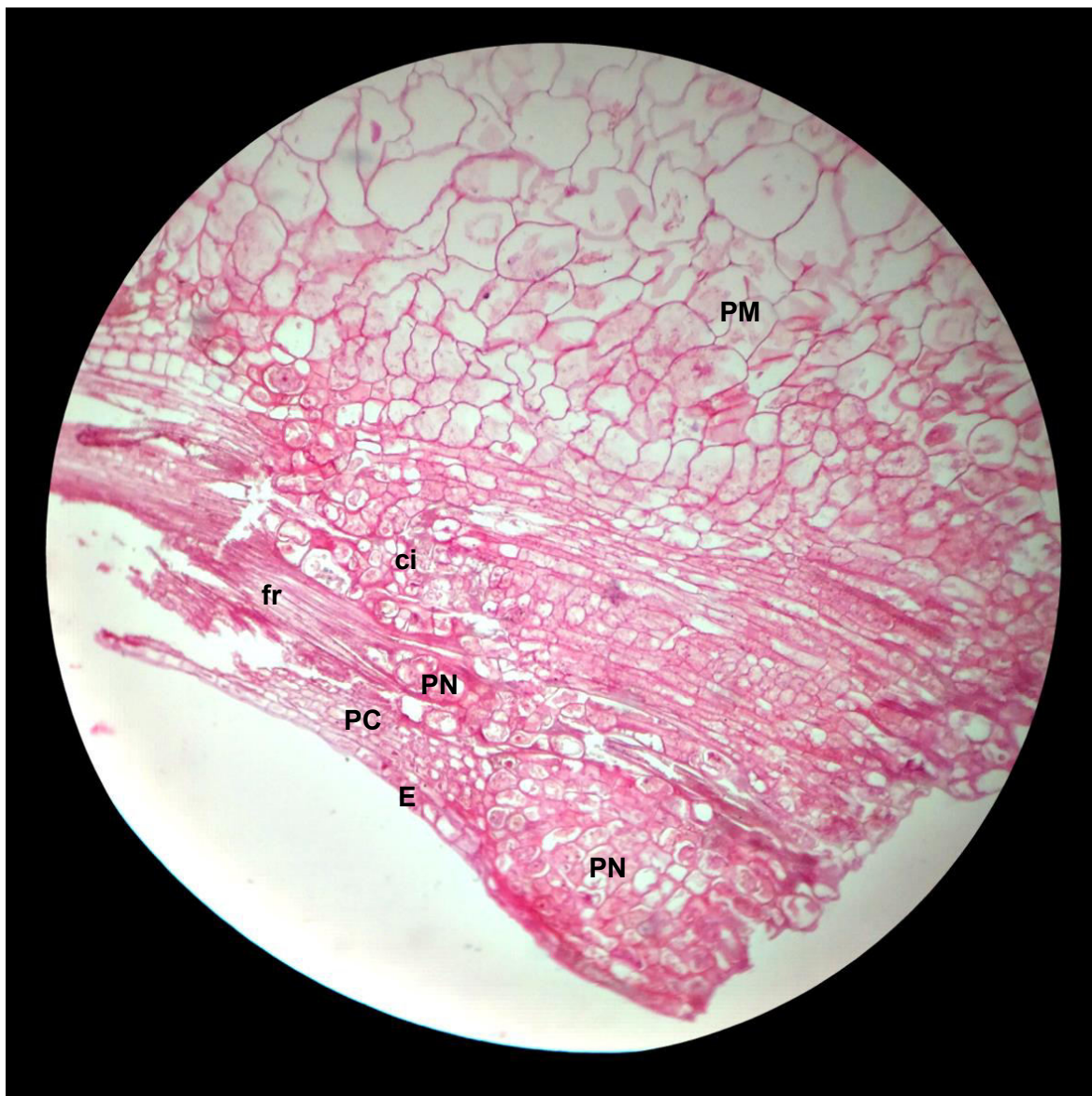


Figure 3.39 : Coupe transversale dans un explant de tige de *Capparis spinosa* L. cultivé sur milieu MS+ 1mg/l BAP + 0,1 mg/l AIA montrant la déformation des tissus conducteurs par les tissus néoformés. (Épaisseur 2 $\mu$ , coloration Hématoxyline-Eosine, microscope photonique x 100).

**E**: épiderme ; **PC**: parenchyme cortical ; **PN**: parenchyme néoformé ; **ci**: cambium interfasciculaire ; **fr**: fibres ; **PM**: parenchyme médullaire.



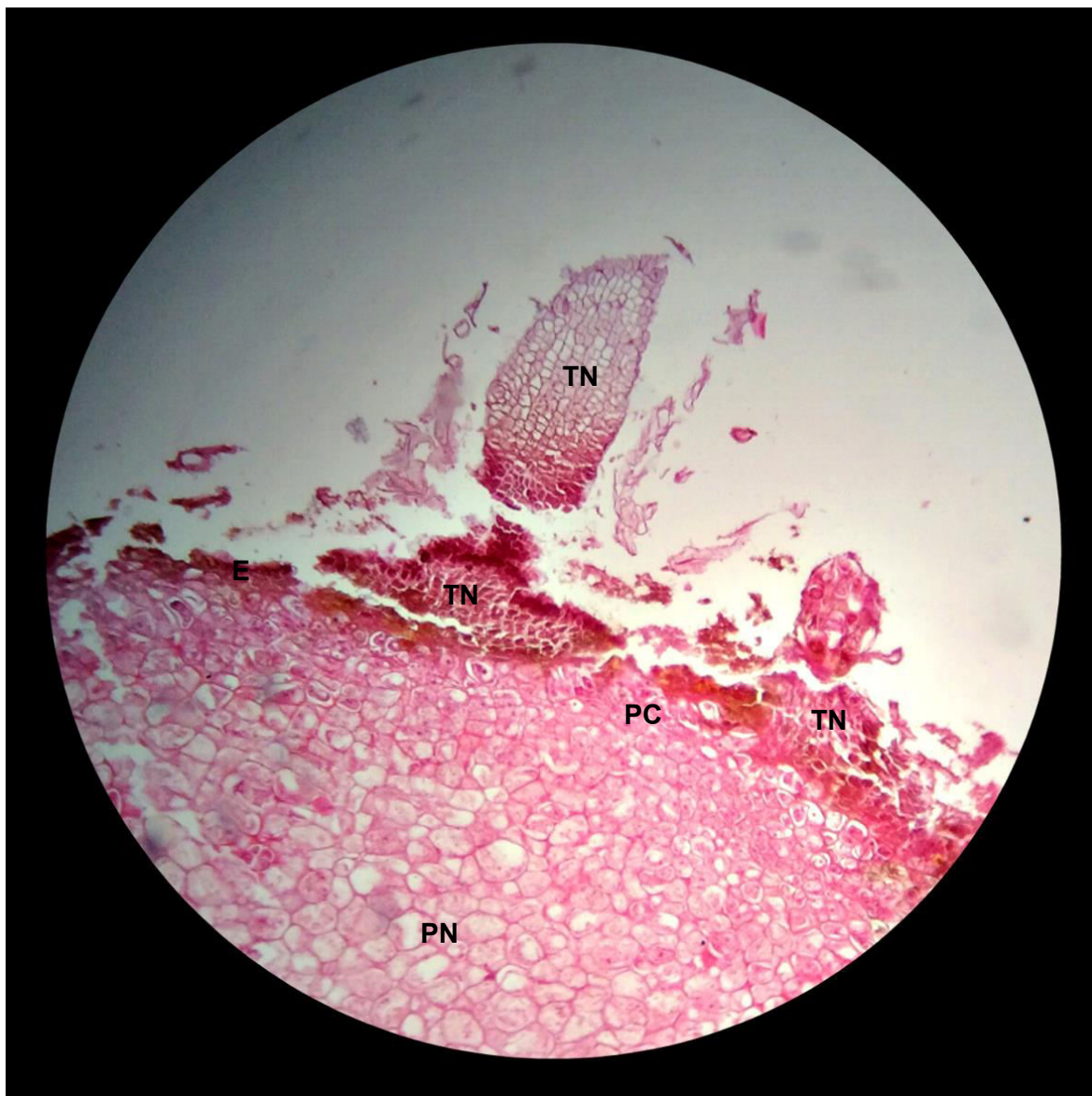


Figure 3.40 : Coupe transversale dans un explant de tige de *Capparis spinosa* L. cultivé sur milieu MS+ 1mg/l BAP + 0,1 mg/l AIA. (Épaisseur 2 $\mu$ , coloration Hématoxyline-Eosine, microscope photonique x 100).

**E**: épiderme déchiré ; **PC**: parenchyme cortical ; **PN**: parenchyme néoformé ; **TN**: tissu nodulaire (cals blancs nodulaires).

Par ailleurs, les résultats histologiques ont révélé trois structures distinctes. En fait, les cals marron, verts et violacées de texture dure présentait une structure histologique plus ou moins compacte. Les cellules de petites tailles sont organisées en files et cette organisation devient de plus en plus anarchique avec le temps (Figure 3.38). Les cals blancs friables s'organisent en tissus lâches à petites cellules et à espaces intercellulaires importants (Figure 3.41). Les cals à texture compacte

sont constitués quand à eux par de grandes cellules de différentes formes avec de grosses vacuoles (Figure 3.41). Les petits nodules de couleur blanche et d'origine épidermique s'organisent en petites cellules à espaces intercellulaires réduits (Figure 3.39).

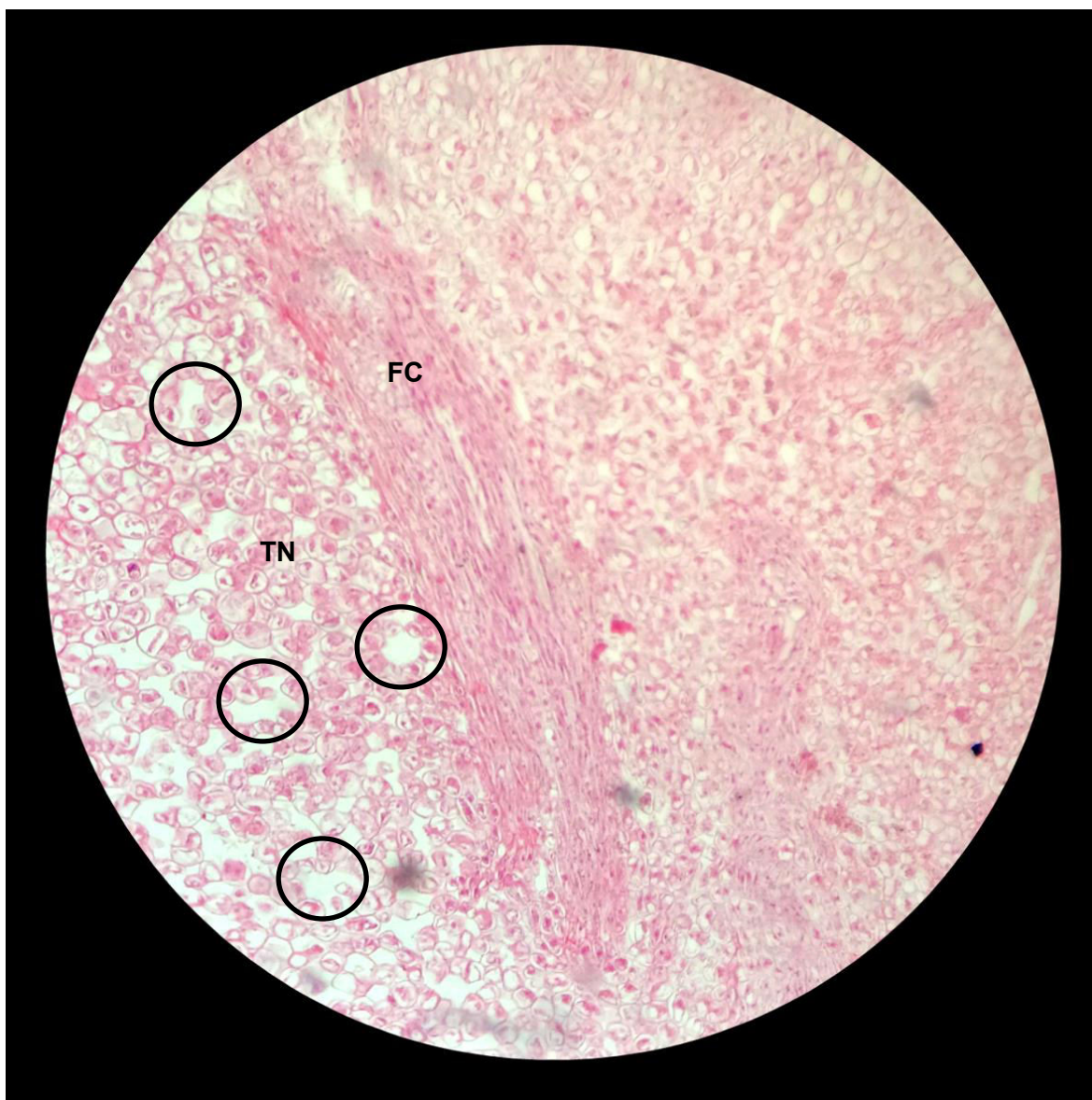


Figure 3. 41 : Parenchyme néoformé d'un cal à texture friable issu d'explant de tige de *Capparis spinosa* L. sur milieu MS+ 1mg/l BAP + 0,1 mg/l AIA. (Epaisseur 2 $\mu$ , coloration Hématoxyline-Eosine, microscope photonique x 100).

**FC:** faisceau conducteur ; **TN:** tissu néoformé ; cercles délimitant les espaces intercellulaires important à l'origine de l'aspect relâché des cals.



Outre les cals primaires, on note la formation des cals secondaires principalement nodulaires de couleur verte et/ou violacée. L'étude histologique a révélé que les tissus nodulaires dérivant des cals primaires sont constitués de cellules de tailles moyennes serrées entre elles et présentant des divisions périclines et anticlines (Figure 3.42). Certains nodules se caractérisent par des cellules à noyau volumineux et cytoplasme dense rappelant un caractère méristimatique.

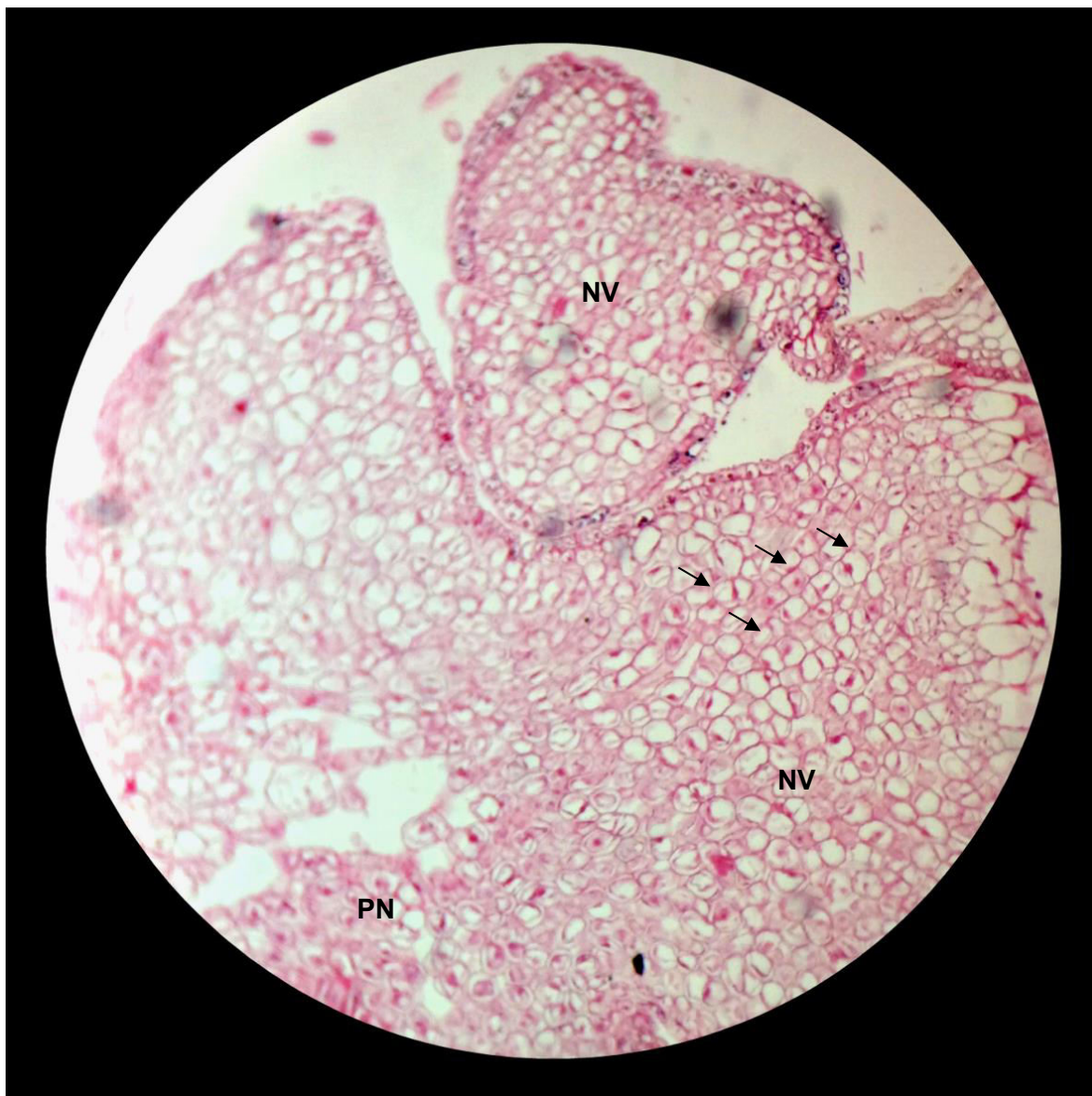


Figure 3.42 : Coupe transversale de Nodules verts néoformés sur cals à partir du néoparenchyme. (Epaisseur  $2\mu$ , coloration Hématoxyline-Eosine, microscope photonique x 100).

**PN**: parenchyme néoformé ; **NV**: nodule vert ; → cellules à division anticline et péricline.

Selon Shang et al. [175], des coupes histologiques réalisées sur des explants calogènes d'hypocotylaire du coton ont révélé que tous les cals embryogènes avaient une morphologie similaire caractérisée par un manque d'espace cellulaire. Les cellules sont à caractère méristimatique avec noyau volumineux et cytoplasme dense.

### 3.5. Essai d'optimisation de la production in vitro des polyphénols

Un essai a été conduit afin de vérifier la capacité des cals de *Capparis spinosa* L. à synthétiser des polyphénols.

#### 3.5.1. Induction de la callogenèse à partir des explants foliaires

Afin de déterminer le milieu et la concentration favorables à l'induction de la callogenèse chez *Capparis spinosa* L. les milieux MS et B5 additionnés de 0, 0,5 et 1 mg/l 2,4-D ont été testés.

Tous les milieux testés ont permis l'induction de la callogenèse chez le câprier épineux même ceux exempts de 2,4-D. Cependant, les taux de callogenèse sur les milieux témoins dépourvus d'hormones ne dépassaient pas les 40 % tandis qu'ils atteignaient les 100% sur milieu MS et B5 pourvus de 2,4-D à des concentrations de 0,5 mg/l et 1 mg/l après cinq semaines de culture.

##### 3.5.1.1. Effet de 2,4-D sur l'induction de la callogenèse

###### 3.5.1.1.1. Effet de 2,4-D sur l'induction de la callogenèse sur milieu MS

Les explants foliaires mis en culture sur milieu MS contenant différentes concentration de 2,4-D présentent des poids et des diamètres différents (Tableau 3.2).

Tableau 3.2 : Poids et diamètre des cals induits sur milieu MS contenant différentes concentrations de 2,4-D

Milieu MS + 2,4 D mg/l	Poids (g)	Diamètre (mm)
	Moyenne ± SEM	Moyenne ± SEM
0	0,01 ± 0,00 a	2,00 ± 0,81 a
0,5	0,04 ± 0,00 b	6,10 ± 0,70 b
1	0,10 ± 0,01 c	9,20 ± 0,67 c

Les valeurs suivies par les même lettres ne sont pas significativement différentes selon le test U de Mann-Whitney au risque  $\alpha = 0,01$ .

L'analyse de la variance ANOVA de Kruskal-Wallis montre une différence très hautement significative entre le poids des cals induits selon les concentrations de 2,4-D sur milieu MS ( $H(2, N=30) = 21,04224$   $p = 0,0000$ ) (Appendice E.11).

Le test U de Mann-Whitney montre une différence hautement significative entre le poids des cals obtenus sur le milieu MS exempt de 2,4-D (0,01g) et celui des cals induits sur milieu contenant une concentration de 0,5 mg/l (0,04g) ( $p = 0,005$ ) (Appendice E.11).

On note aussi une différence très hautement significative entre le poids des cals obtenus sur le milieu MS exempt de 2,4-D (0,01g) et celui des cals induits sur milieu contenant une concentration de 1 mg/l (0,1g) ( $p = 0,0000$ ). En outre, il existe une différence hautement significative entre le poids des cals induit sur milieu MS contenant 0,5 mg/l 2,4-D (0,04g) et de ceux induits sur milieu contenant 1mg/l 2,4-D (0,1g) ( $p = 0,008$ ) (Appendice E.11).

Ces observations permettent de constater l'effet stimulateur qu'exerce le 2,4-D sur l'augmentation du poids des cals. Ainsi, le poids des cals est proportionnel à la concentration de 2,4 D dans le milieu de culture. (Figure 3.43).

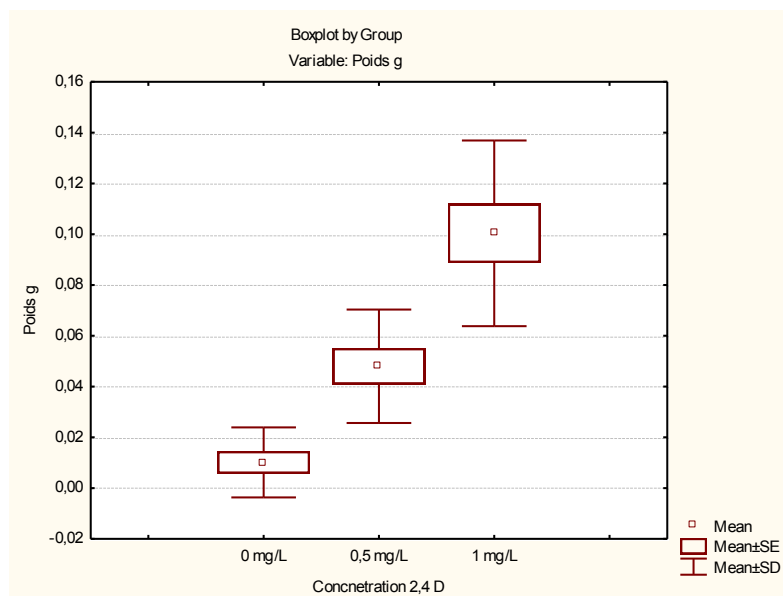


Figure 3.43 : Effet de 2,4-D sur le poids des cals induits sur milieu MS

Par ailleurs, l'analyse de la variance ANOVA de Kruskal-Wallis montre une différence hautement significative entre le diamètre des cals induits selon les concentrations de 2,4-D au milieu MS ( $H(2, N=30)=21,04224$   $p=,005$ ) (Appendice E.11).

Le test U de Mann-Whitney montre une différence très hautement significative entre le diamètre des cals obtenus sur le milieu MS exempt de 2,4-D (2 mm) et celui des cals induits sur milieu contenant une concentration de 0,5 mg/l (6,1 mm) ( $p=0,005$ ) (Appendice E.11).

On note aussi une différence très hautement significative entre diamètre des cals obtenus sur le milieu MS exempt de 2,4-D et celui des cals induits sur milieu contenant une concentration de 1 mg/l (9,1 mm) ( $p=0,0000$ ). En outre, il existe une différence hautement significative entre le diamètre des cals induit sur milieu MS contenant 0,5 mg/l 2,4 D (6,1 mm) et de ceux induit sur milieu contenant 1mg/l 2,4-D (9,1 mm) ( $p=0,006$ ) (Appendice E.11).

Ces observations permettent de constater l'effet stimulateur qu'exerce le 2,4-D sur l'augmentation du diamètre des cals. Le diamètre des cals est proportionnel à la concentration de 2,4 D dans le milieu de culture (Figures 3.44).

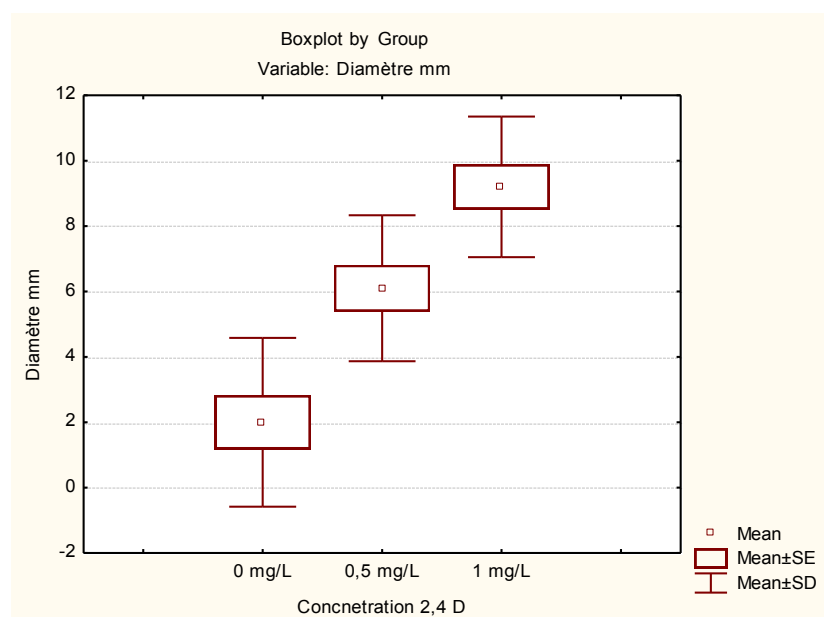


Figure 3.44 : Effet de 2,4-D sur le diamètre des cals induits sur milieu MS

#### 3.5.1.1.2. Effet de 2,4-D sur l'induction de la callogenèse sur milieu B5

Les explants foliaires mis en culture sur milieu B5 contenant différentes concentrations de 2,4-D présentent des poids et des diamètres différents (Tableau 3.3).

Tableau 3.3 : Poids et diamètre des cals induits sur milieu B5 contenant différentes concentrations de 2,4-D

Milieu B5 + 2,4 D mg/l	Poids (g)	Diamètre (mm)
	Moyenne ± SEM	Moyenne ± SEM
0	0,005 ± 0,00 a	1,50 ± 0,76 a
0,5	0,04 ± 0,00 b	6,10 ± 0,35 b
1	0,08 ± 0,01 b	8,70 ± 0,86 b

Les valeurs suivies par les même lettres ne sont pas significativement différentes selon le test U de Mann-Whitney au risque  $\alpha = 0,01$ .

L'analyse de la variance ANOVA de Kruskal-Wallis montre une différence hautement significative entre le poids des cals induits selon les concentrations de 2,4-D au milieu B5 ( $H(2, N=30) = 18,66087$   $p = ,0001$ ) (Appendice E.12).

Le test U de Mann-Whitney montre une différence hautement significative entre le poids des cals obtenus sur le milieu B5 exempt de 2,4-D (0,005g) et celui des cals induits sur milieu contenant une concentration de 0,5 mg/L (0,04g) ( $p = 0,0004$ ) (Appendice E.12).

On note aussi une différence très hautement significative entre le poids des cals obtenus sur le milieu B5 exempt de 2,4-D (0,01g) et celui des cals induits sur milieu contenant une concentration de 1 mg/l (0,08g) ( $p = 0,0000$ ). Cependant, il n'existe pas de différence significative entre le poids des cals induit sur milieu B5 contenant 0,5 mg/l 2,4-D (0,04g) et de ceux induit sur milieu contenant 1mg/l 2,4-D (0,08g) ( $p = 0,03$ ) (Appendice E.12).

Ces observations permettent de constater l'effet stimulateur qu'exerce le 2,4-D sur l'augmentation du poids des cals induit sur milieu B5. Toutefois, l'augmentation de la concentration de 2,4-D ne stimule pas l'augmentation du poids des cals (Figures 3.45).

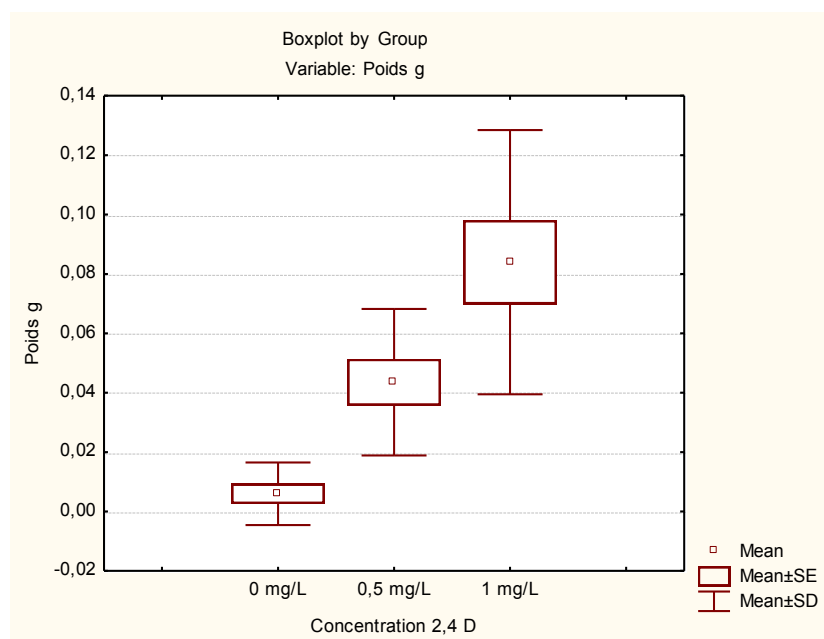


Figure 3.45 : Effet de 2,4 D sur le poids des cals induits, sur milieu B5

Par ailleurs, l'analyse de la variance ANOVA de Kruskal-Wallis montre une différence hautement significative entre le diamètre des cals induits selon les concentrations de 2,4-D au milieu B5 ( $H(2, N = 30) = 18,28169$   $p = ,0001$ ) (Appendice E.12).

Le test U de Mann-Whitney montre une différence très hautement significative entre le diamètre des cals obtenus sur le milieu B5 exempt de 2,4-D (1,5 mm) et celui des cals induits sur milieu contenant une concentration de 0,5 mg/L (6,1 mm) ( $p = 0,0003$ ) (Appendice E.12).

On note aussi une différence très hautement significative entre diamètre des cals obtenus sur le milieu B5 exempt de 2,4-D et celui des cals induits sur milieu contenant une concentration de 1 mg/l (8,7 mm) ( $p = 0,0001$ ). Cependant, il n'existe aucune différence significative entre le diamètre des cals induit sur milieu B5 contenant 0,5 mg/l 2,4-D (6,1 mm) et de ceux induit sur milieu contenant 1mg/l 2,4-D (8,7 mm) ( $p = 0,03$ ) (Appendice E.12).

Ces observations permettent de constater l'effet stimulateur qu'exerce le 2,4-D sur l'augmentation du diamètre des cals induit sur milieu B5. Toutefois l'augmentation de la concentration de 2,4-D n'améliore pas le poids et le diamètre de ces derniers (Figures 3.46).

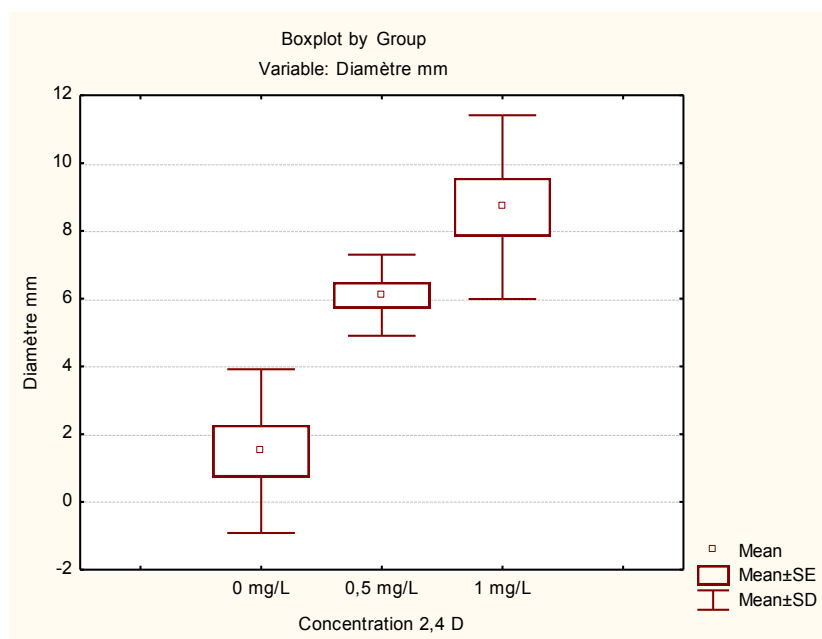


Figure 3.46 : Effet de 2,4-D sur le diamètre des cals induits sur milieu B5

L'auxine généralement utilisé pour l'induction des cals est le 2,4-D, mais l'ANA et l'AIA sont également utilisées [177]. Le 2,4-D est essentiel pour l'induction de cals dans de nombreuses plantes à différents niveaux. Par exemple, le néflier qui est une plante médicinale dicotylédone n'a besoin que de 0,2 mg/l de 2,4-D tandis que

la culture de cellules de ginseng a besoin de plus fortes concentrations atteignant le 12 mg/l [178].

ABU-KHALAF [153] a réussi à induire des cals chez *Capparis spinosa* L. à partir d'explants foliaires sur milieu MS contenant 0,1 mg/l ou 0,5 mg/l 2,4-D. L'auteur rapporte que le 0,5 mg/l est la concentration favorable pour la callogenèse chez le câprier épineux.

Par ailleurs, WANG et al. [178] ont montré que le milieu MS additionné de 0,5 mg/l de 2,4-D et 1,0 mg/l BAP était le milieu optimal pour l'induction de cals chez *Capparis spinosa* L. En outre, AL-SAFADI et al. [9] ont rapporté que le meilleur moyen pour l'induction des cals à partir des feuilles de *C. spinosa* L. était le milieu MS contenant 1,0 mg/l BAP et 0,1 mg/l ainsi que le milieu MS additionné de 2 mg/l de 2,4-D + 1,0 mg/l de ANA + 0,1 mg /l GA3.

#### 3.5.1.2. Effet des milieux MS et B5 sur l'induction de la callogenèse

Le test U de Mann-Whitney ne montre aucune différence significative entre le poids et le diamètre des cals induits sur milieu MS additionné de 1 mg/l 2,4-D et ceux des cals induits sur le milieu B5 additionné de 1 mg/l 2,4-D ( $p > 0,05$ ).

Nos résultats contredisent ceux obtenus par ABU-KHALAF [153] qui a rapporté que le milieu MS additionné de 0,5 mg/l 2,4-D permet d'obtenir des cals d'un poids frais supérieur à  $105.03 \pm 6.54$  mg en comparaison avec le milieu B5 additionné de 0,5 mg/L 2,4-D avec une moyenne de  $69.58 \pm 3.12$  mg. De même, ANBURAJ et al. [179] ont rapporté que des explants de feuilles de *Cleome viscosa* (Capparidaceae) cultivés sur Milieu MS a donné des cals avec un poids frais intéressant par rapport au le milieu B5. La moyenne de poids frais des cals était de  $84,1 \pm 0,55$  mg lorsque MS a été utilisé comparativement à  $37,4 \pm 0,55$  mg avec le milieu B5.

Cependant dans notre étude, la friabilité des cals et leurs couleurs observées ne sont pas semblables sur les deux milieux. En effet, les cals induis sur milieu MS étaient compacts et de couleur marron, en revanche, ceux induits sur milieu B5 étaient durs et de couleur verdâtre (Figure 3.47).





Figure 3.47 : Cals de *Capparis spinosa* L. obtenus après 5 semaines de mise en culture.

a) Cal compact de couleur marron obtenu sur milieu MS additionné de 0,5 mg/l 2,4-D, b) Cal dur de couleur verte obtenu sur milieu B5 additionné de 0,5 mg/l 2,4-D

Nous avons retenu le milieu MS pour la multiplication des cals en se basant sur la couleur des cals marron qui est souvent associée à la présence des polyphénols.

### 3.5.2. Multiplication des cals de *Capparis spinosa* L.

Après élimination des cals contaminés et nécrosés, des cals marron et compacts induit, de 5mm de diamètre ont été cultivés sur milieu MS additionné de 1 mg/l 2,4-D et 1,5 mg/l BAP. Un milieu MS exempt d'hormones de croissance a servi de témoin. Les résultats obtenus après huit semaines de culture sont présentés dans le Tableau 3.4

Tableau 3.4 : Poids et diamètre des cals cultivés sur milieu MS contenant 1 mg/l 2,4-D + 1,5 mg/l BAP.

Milieu	Poids (g)	Diamètre (mm)
	Moyenne ± SEM	Moyenne ± SEM
Témoin	0,02 ± 0,00	5,30 ± 0,15
MS + HC	0,17 ± 0,01	11,50 ± 1,17

HC : Hormones de croissance 1 mg/L 2,4-D + 1,5 mg/L BAP

L'analyse des résultats par le test U de Mann-Whitney montre une différence très hautement significative entre le poids des cals cultivés sur un milieu sans hormones 0,02g et le poids des cals cultivés sur milieu additionné d'hormone de croissance (0,17g) ( $p = 0,0000$ ) (Appendice E.13).

L'ajout de 1 mg/l 2,4-D et de 1,5 mg/l BAP au milieu de culture MS favorise la croissance des cals en augmentant considérablement leur poids (Figure 3.48).

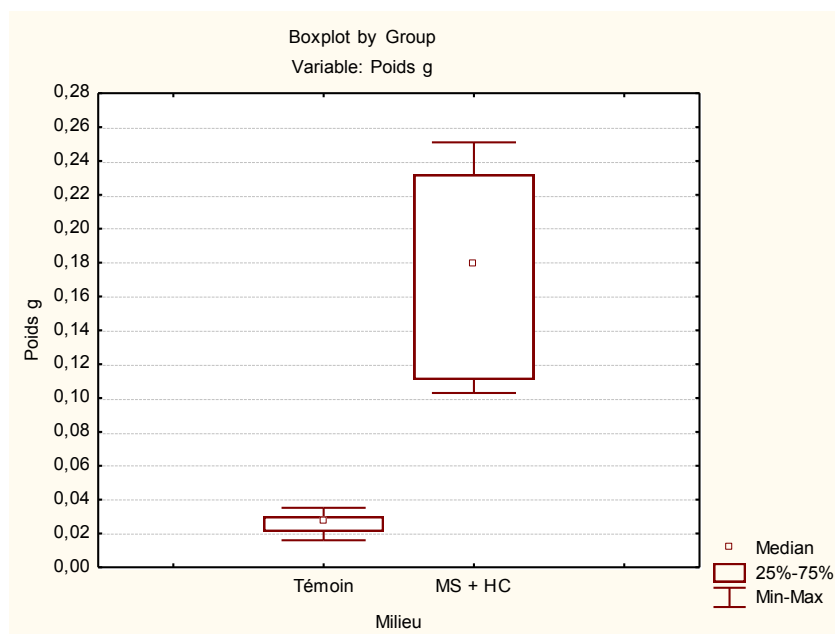


Figure 3.48 : Effet des hormones de croissance sur le poids des cals.

De même, le test U de Mann-Whitney montre une différence hautement très significative entre le diamètre des cals cultivés sur un milieu sans hormones 5,3 mm et le diamètre des cals cultivés sur milieu additionné d'hormone de croissance 11,5 mm ( $p = 0,0000$ ) (Appendice E.13).

L'ajout de 1 mg/l 2,4-D et de 1,5 mg/l BAP au milieu de culture MS favorise la croissance des cals en augmentant considérablement leurs diamètres (Figure 3.49).

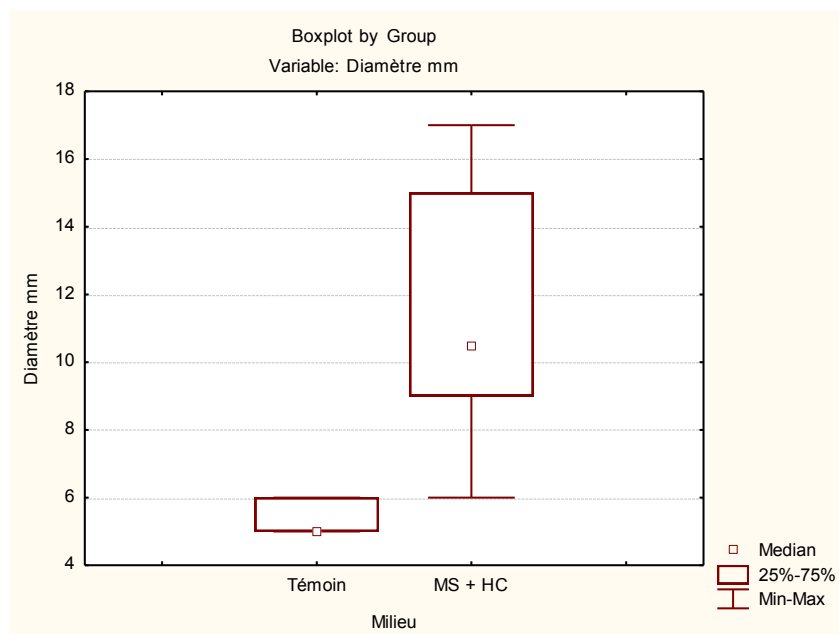


Figure 3.49 : Effet des hormones de croissance sur le diamètre des cals.

En effet, nos résultats se rapprochent de ceux obtenus par ABU-KHALAF [153] qui a rapporté que le milieu MS additionné de 1,0 mg/l 2,4-D et 1,5 mg/l BAP était le milieu approprié pour la croissance des cals de *Capparis spinosa* L. avec une moyenne de poids frais de 272,27 mg. Ainsi, WANG et al. [178] qui ont utilisé le même milieu de culture pour la croissance des cals de *Capparis spinosa* L. ont obtenus des résultats similaires.

Par ailleurs, on note que les cals obtenus sur milieu MS additionné de 1,0 mg/l 2,4-D et 1,5 mg/l BAP étaient compacts et d'une couleur marron à marron foncé (Figure 3.50).



Figure 3.50 : Cal sur milieu MS 1,0 mg/l 2,4-D et 1,5 mg/l BAP après 8 semaines de culture.

### 3.5.3. Effet du choc thermique des explants foliaires sur la callogenèse

Les explants issus des feuilles de *Capparis spinosa* L. traité au froid à 4° C pendant 4 mois n'ont pas répondu à la callogenèse après 7 semaines de culture. Les réponses étaient nulles sur le milieu témoin exempt d'hormone de croissance et le milieu contenant 1,0 mg/l 2,4-D et 1,5 mg/l BAP. Cependant, les explants ne montrent aucune nécrose ou chlorose et sont restés intacts. Cela pourrait être expliqué par un retardement à la réponse à la callogenèse par le froid et non pas son inhibition.

### 3.5.4. Dosage des polyphénols

#### 3.5.4.1. Extraits méthanoliques

Les résultats obtenus après macération de la poudre sèche des feuilles et des cals sont présentés dans le Tableau 3.5.

Tableau 3.5 : Extraits méthanoliques de *Capparis spinosa* L.

	Rendement Extrait MeOH	Couleur	Texture
Feuilles	27,64 %	Vert foncé	pulvérulent
Cals	19,65 %	Marron	Collant et pâteux

L'extrait méthanolique (MeOH) issu des feuilles de *Capparis spinosa* L. récolté in situ, présente une couleur verte très foncé, un aspect pulvérulent avec un rendement de 27,64 %, alors que l'extrait des cals a plutôt un aspect collant de couleur marron, associé à un rendement de l'ordre de 19,65 %.

Selon MEDDOUR et *al.* [67], les extraits des bourgeons à fleurs, fleurs et fruits immatures de *C. spinosa* L., poussant naturellement à Tigharghar wilaya de Batna et d'Ain Zaâtout wilaya de Biskra (Est d'Algérie) et récolté en mai et juin, sont d'aspect liquide et d'une couleur marron clair dont le rendement s'élève à 21,58 %.

D'un autre côté, le rendement de l'extrait méthanolique de la partie aérienne de *Capparis spinosa* L. poussant spontanément à Sétif est de  $6.65 \pm 1.34$  % pendant le mois de mai [54]. Un rendement relativement faible par rapport à celui obtenu lors de nos expériences. En effet, la localisation géographique, la durée de

stockage, le degré de maturité, la génétique, le climat, ainsi que la période de récolte semblent avoir un impact direct sur le rendement [180].

#### 3.5.4.2. Dosage des polyphénols totaux

Les résultats du dosage des polyphénols totaux des extraits secs des feuilles et des cals de *Capparis spinosa* L. sont présentés dans le tableau 3.6.

Tableau 3.6 : Taux des polyphénols totaux des extraits secs de *C. spinosa* L.

Extrait sec	Polyphénols totaux mg eq. AG/g ES
Feuilles	112,2 ± 1,81
Cals	55,3 ± 0,61

Les résultats enregistrés lors de notre expérience montrent que l'extrait méthanolique des feuilles de *C. spinosa* L. poussant à l'état spontané dans la région de Hammam Melouane est riche en polyphénols totaux avec un taux de 112,2 ± 1,81 mg EAG/ g ES.

Plusieurs auteurs ont rapporté la richesse du câprier en polyphénols, ainsi selon les travaux dirigés par Ben Mansour [181] la teneur d'extrait hydroéthanolique du câprier tunisien s'élève à 427.27 ± 3.21 mg EAG/g ES. Par ailleurs, GERMANO et al. [182] ont reporté que l'extrait méthanolique des boutons floraux de *C. spinosa* L. récoltés en plein printemps en Italie contient 100.51 mg E. rutine/ g ES. Le taux des polyphénols totaux de l'extrait aqueux des parties aériennes de *C. spinosa* L. récolté à l'est algérienne atteint les 87.48 ± 2.04 mg EAG/ g d'ES [54].

Néanmoins, Certains travaux mettent en évidence des taux relativement faibles. En fait, selon MEDDOUR et al. [67], L'extrait méthanolique sec des fleurs séchées de *Capparis spinosa* de l'Est algérien contient 29,01 ± 0,84 mg EAG/g ES. BOUMEFREG et al. [54] ont obtenu un taux de 14.86 ± 0.62 mg EAG/g ES méthanolique des parties aériennes provenant de l'est de l'Algérie pendant les mois de mai et juin.

En Italie, TESORIERE et al. [183] ont mené des expériences sur des câpres préalablement traités par de l'eau de mer dont le taux des polyphénols totaux avoisine les 48.75±5.0 mg EAG/ 100 g de câpres.

Le taux des polyphénols totaux des échantillons de *C. spinosa* vendu au marché pendant le début de l'été en Turquie ne dépassait pas  $37.01 \pm 0.03$  mg EAG/100 g de matière sèche [184].

Les travaux dirigés par BHOYAR [73] montrent que le taux des polyphénols de *C. spinosa* L. du désert du Trans-Himalaya, caractérisé par un climat aride et froid, varie d'une région à une autre. Ce taux oscillait entre 21.42 (dans la région de Tirchey) et 27.62 mg EGA/g de matière sèche (dans la région de Skuru).

En effet, le contenu en métabolites secondaires entre autre les composés phénoliques, varie qualitativement et quantitativement d'une plante à une autre, cela peut être attribué à plusieurs facteurs :

- Facteurs climatiques et environnementaux : la zone géographique, sécheresse, sol, agressions et maladies...etc. [73] [185].
- Le patrimoine génétique, la période de la récolte et le stade de développement de la plante [186].
- La méthode d'extraction et la méthode de quantification peuvent également influencer l'estimation de la teneur des phénols totaux [187].

Il a été prouvé que les teneurs des phénols totaux et des flavonoides sont élevées lorsque le milieu de vie de la plante n'est pas adéquat, dans ce cas la plante favorise la synthèse des métabolites secondaires afin de s'adapter et survivre [188].

Dans cette étude, un essai d'optimisation in vitro de taux des polyphénols via la culture des tissus foliaires de *Capparis spinosa* L. a été conduit. Le rendement des cals, cultivés sur milieu MS contenant principalement du 2,4 D, obtenu par extraction par solvant (méthanol) est assez prometteur et égal à  $55,3 \pm 0,61$  mg EGA/g ES. Toutefois, ce rendement reste faible par rapport à celui d'extrait sec des feuilles. Il serait intéressant d'exploiter ces techniques de culture tissulaires afin d'optimiser d'avantage le rendement en métabolites secondaire.



## CONCLUSION

Le présent travail consiste à la réalisation d'un protocole permettant la propagation *in vitro* de *Capparis spinosa* L. d'une part et à l'induction de la callogenèse afin d'essayer d'améliorer le rendement en polyphénols d'une autre part.

Les fragments nodaux constituent un bon matériel végétal pour l'introduction de cette espèce *in vitro* de part leur résistance au traitement de désinfection et de leur réponse caulogène directe ou indirecte. Cependant, un traitement par un fongicide est nécessaire pour la réussite d'une culture axénique.

Le milieu WPM additionné de 1mg/L BAP + 0,1 mg/l AIA favorise la caulogénèse chez *Capparis spinosa* L. qui s'avère sensible aux concentrations élevées des sels minéraux et permet d'obtenir des pousses vigoureuses et suffisamment longues après 4 mois de culture. Tandis que le milieu MS additionné de 1mg/l BAP + 0,1 mg/l AIA et souvent associé à la vitrification mais favorise la callogenèse et la néoformation des pousses.

La combinaison hormonale 1mg/l BAP + 0,05 mg/l AIA + 0,1 mg/l GA3 additionnée au milieu WPM semble la plus favorable à la multiplication de *Capparis spinosa* L.

La rhizogénèse de *Capparis spinosa* L. s'est avérée très difficile et lente, en fait, aucune formation de racine n'a été observée après 6 semaines de culture.

Les coupes histologiques des parties aériennes de *Capparis spinosa* L. issu de l'*in situ* révèlent plusieurs adaptations anatomiques caractéristiques des plantes xérophytes. Ces adaptations sont principalement visibles sur la feuille qui est isobilatérale, mais aussi au niveau des tissus de soutien très répandus ainsi que les vaisseaux conducteurs à diamètre important. En revanche, les pousses régénérées *in vitro* dans des conditions optimales présentent un caractère juvénile avec des feuilles à symétrie bilatérale et mésopyhyllé à couches peu nombreuses, des vaisseaux à diamètre faibles et tissus de soutien peu présents. Par ailleurs, les pousses hyperhydriques présentent plusieurs perturbations anatomiques telles que la réduction du parenchyme palissadique et des nervures ainsi qu'une augmentation

du parenchyme lacuneux et une désorganisation de l'épiderme au niveau des feuilles. En outre, l'apex caulinaire se caractérise par des déformations structurales.

La callogenèse à partir des nœuds cultivés sur milieu MS additionné de 1mg/l BAP + 0,1 mg/l AIA trouve une origine interne à savoir les cellules cambiales interfasciculaires donnant naissance à plusieurs types de cals dont des nodules à cellules méristimatiques. D'autre cals se forme à partir de l'épiderme et ont donc une origine externe.

La callogenèse à partir des explants foliaires est facilement induite en présence de 2,4-D à des concentrations de 0,5 mg/l et 1 mg/l qui possède un effet stimulateur important sur celle-ci en améliorant considérablement le poids et le diamètre des cals induits. Les deux milieux MS et B5 favorisent de façon similaire l'induction des cals à partir de la quatrième semaine de culture. Cependant, les cals induits sur ces deux milieux ont des couleurs et consistances différentes. Le milieu MS favorise le développement de cals compacts et marron susceptibles de contenir des polyphénols. En revanche, le milieu B5 favorise le développement des cals durs et verts.

Le prétraitement des feuilles de *Capparis spinosa* L. à l'origine des explants par le froid à 4°C pendant 4 mois ne permet pas l'induction de la callogenèse après sept semaines de la mise en culture.

Le rendement des feuilles de *Capparis spinosa* L. poussant à l'état spontané et celui des cals induits in vitro en extrait méthanolique semble intéressant avec 27,64 % et 19,65 % respectivement. Le dosage des polyphénols de ces extraits par spectrophotométrie à UV-visible en utilisant le Folin-Ciocalteu révèle la richesse du câprier en polyphénols.

Les résultats obtenus pendant cette étude interpellent à étudier de façon plus détaillée le comportement des nœuds de *Capparis spinosa* L. mis en culture et ce afin de réduire la période de la mise en culture qui s'avère très longue. De ce fait, il serait intéressant de tester l'effet d'autres hormones végétales sur la caulogénèse du câprier telles que la kénitine, zéatine et d'autres cytokines et auxines en variant les modes de traitements des explants.

Il est également important de poursuivre ces recherches afin de réussir l'étape cruciale de l'enracinement en passant par l'étiollement des pousses et l'épuisement des cultures.

*Capparis spinosa* L. semble posséder un bon pouvoir callogène, ceci peut être exploité pour l'embryogenèse somatique et la création variétale d'une part, et pour la culture cellulaire en suspension ou sur milieu solide tout en y introduisant des facteurs de stress pour l'optimisation de la production des métabolites secondaires d'une autre part.

## APPENDICE A

## LISTE DES ABREVIATIONS

Symbole	Signification
2,4 D	Acide 2,4-Dichlorophénoxyacétique
AIA	Acide indol 3-acétique
AIB	Acide $\beta$ -indole butyrique
ANA	$\alpha$ -Acide naphthalène acétique
B5	Milieu de Gamborg B5
BAP	6-Benzylaminopurine
<i>C. spinosa</i>	<i>Capparis spinosa</i>
°C	Degrés Celsius
EAG	Equivalent acide gallique
ES	Extrait sec
g	Gramme
g/l	Gramme/litre
HCl	Acide chlorhydrique
IPGRI	International Plant Genetic Research Institute
KOH	Hydroxyde de potassium
ml	Millilitre
mm	Millimètre
MeOH	Méthanol
MS	Murashige et Skoog
NaCl	Chlorure de sodium
NaOH	Hydroxyde de sodium
pH	Potentiel d'Hydrogène
SEM	Standard error of mean
SMS	Soot Multiplication Signal
WPM	Woody Plant Medium

**APPENDICE B**  
**COMPOSITION DES MILIEUX DE CULTURE**

Milieu MS

Macro éléments (x10)

Ingrédients	Quantité Par litre MS (g/l)	Quantité Par litre de solution mère (g/l)
NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	1.65	16.50
KNO <sub>3</sub>	1.9	19.00
CaCl <sub>2</sub> •2H <sub>2</sub> O	0.44	4.40
MgSO <sub>4</sub> •7H <sub>2</sub> O	0.37	3.70
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0.17	1.70

Micro éléments (x100)

Ingrédients	Quantité Par litre MS (g/l)	Quantité Par litre de solution mère (g/l)
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	0.0062	0.62
MnSO <sub>4</sub> •4H <sub>2</sub> O	0.0223	2.230
ZnSO <sub>4</sub> •H <sub>2</sub> O	0.0086	0.860
KI	0.000083	0.0083
NaMO <sub>4</sub> •2 H <sub>2</sub> O	0.00025	0.025
CuSO <sub>4</sub> •5H <sub>2</sub> O	0.000025	0.0025
CoCl <sub>2</sub> •6H <sub>2</sub> O	0.000025	0.0025

Chélate de fer (100X)

Ingrédients	Quantité Par litre MS (g/L)	Quantité Par litre de solution mère (g/L)
FeSO <sub>4</sub> •7H <sub>2</sub> O	0.0278	0.278
Na <sub>2</sub> EDTA•2H <sub>2</sub> O	0.0373	0.373

Vitamines (1000X)

Ingrédients	Quantité Par litre MS (g/l)	Quantité Par litre de solution mère (g/l)
Nicotinic acid	0.0005	0.05
Pyridoxine•HCl	0.0005	0.05
Thiamine•HCl	0.0001	0.01
Myo-inositol	0.01	1

## Milieu B5

Composant de la solution minérale	Nom de la solution minérale des mili	
	MS	B5
<b>Macro-éléments (mg·l<sup>-1</sup>)</b>		
NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	1 650	-
KNO <sub>3</sub>	1 900	2 500
CaCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O	440	150
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	370	134
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	170	-
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	-	134
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ·H <sub>2</sub> O	-	150
Ca (NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> ·4H <sub>2</sub> O	-	-
<b>Micro-éléments (mg·l<sup>-1</sup>)</b>		
KI	0,83	0,75
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	6,20	3
MnSO <sub>4</sub> ·H <sub>2</sub> O	22,30	10
ZnSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	8,60	2
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> ·2H <sub>2</sub> O	0,25	0,25
CuSO <sub>4</sub> ·5H <sub>2</sub> O	0,025	0,025
CoCl <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O	0,025	0,025
Na <sub>2</sub> EDTA	37,25	37,25
FeSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	27,85	27,85
NaFeEDTA	-	-

MS, B5, ML-6, P : correspondent respectivement aux solutions minérales des milieux de (1968), de Kumar et al. (1998) et de Phillips et al. (1979) — represent respectively the m Skoog (1962), Gamborg et al. (1968), Kumar et al. (1988) and Phillips et al. (1979) med

## Vitamines B5

Ingrédients	Quantité Par litre MS (g/l)	Quantité Par litre de solution mère (g/l)
Nicotinic acid	0.001	0.05
Pyridoxine•HCl	0.001	0.05
Thiamine•HCl	-	-
Myo-inositol	0.01	1

## Milieu WPM

Stock	Constituents	g/liter <sup>b</sup>	ml/liter <sup>c</sup>	mg/liter <sup>d</sup>
A	NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	20.0	20	400
	Ca(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> · 4H <sub>2</sub> O	27.8		556
B	K <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	49.5	20	990
C	CaCl <sub>2</sub> · 2H <sub>2</sub> O	19.2	5	96
D	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	34.0	5	170
	H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	1.24		6.2
	Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> · 2H <sub>2</sub> O	0.05		0.25
E	MgSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	74.0	5	370
	MnSO <sub>4</sub> · H <sub>2</sub> O	3.38		16.9
	ZnSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	1.72		8.6
	CuSO <sub>4</sub> · 5H <sub>2</sub> O	0.005		0.025
F <sup>e</sup>	FeSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	5.57	5	27.8
	Na <sub>2</sub> EDTA	7.45		37.3
G <sup>f</sup>	Thiamine · HCL	0.2	5	1.0
	Nicotinic acid	0.1		0.5
	Pyridoxine · HCL	0.1		0.5
	Glycine	0.4		2.0
H	Myo-inositol	20.0	5	100
<b>Other constituents</b>				<b>g/liter</b>
Sucrose				20
Calcium gluconate (Sigma #G-4625) <sup>g</sup>				1.3
Agar (Sigma A-1296)				3.0
Gelrite (Scott Labs 4900-1891)				1.1

Note. All stocks (but G) are made in bulk and autoclaved to insure sterility. The pH of the medium is usually adjusted to the desired level (commonly 5.6) using KOH after adding the gelling agents.

<sup>a</sup>Lloyd, G. B., & McCown, B. H. (1980). *International Plant Propagation Society*, 30, 421–427.

<sup>b</sup>Stock concentration.

<sup>c</sup>Volume of stock to add to medium.

<sup>d</sup>Final concentration in medium.

<sup>e</sup>This stock is prepared by dissolving each component separately in half the final volume of distilled water (heat required) and then combining the two solutions to make a yellow stock.

<sup>f</sup>This stock is filter sterilized and kept frozen in 10- to 20-ml aliquots.

<sup>g</sup>Zeldin, E. L., & McCown, B. H. (1986). *Abstracts of the VIth IAPTC Congress*, p. 57.



## APPENDICE C

### CONFECTION DES COUPES HISTOLOGIQUES

Les techniques histologiques comprennent 4 étapes essentielles : la fixation, la déshydratation, l'inclusion, puis la confection des préparations. Le protocole utilisé est celui proposé par SPENCER LOPES [125] modifié.

#### C.1. La Fixation

Les différents échantillons ont été fixés dans du formol à 10% afin de les maintenir dans un état le plus proche possible de leurs structures et de permettre leur observation au microscope.

Les échantillons sont conservés jusqu'à leur utilisation.

#### C.2. La déshydratation

Après passage à l'eau courante, les échantillons sont déshydratés dans cinq bains d'alcool éthylique à concentration croissante (25%, 50%, 75%, 95% et 100%). Cette étape a pour but d'éliminer totalement l'eau et mettre fin à l'action du liquide fixateur (Formol). En effet, La paraffine n'est pas hydrosoluble, il faut donc que le fragment végétal soit au préalable, parfaitement déshydraté (Tableau 1).

Tableau 1 : Bain de déshydratation des échantillons à l'éthanol.

Bain	Durée
Ethanol à 25 %	30 minutes
Ethanol à 50 %.	30 minutes
Ethanol à 75 %	30 minutes
Ethanol à 95 %	45 minutes
Ethanol à 100 % (= Ethanol absolu)	2 fois 45 minutes
Ethanol à 100 %	14 heures

### C.3. L'inclusion

Le principe de l'inclusion consiste à traiter les pièces à inclure dans un ordre déterminé par différents solvants de manière à faire pénétrer la paraffine dans les tissus pour maintenir les éléments constitutifs en place.

#### C.3.1. L'éclaircissement

La paraffine n'est pas miscible à l'alcool, il faut donc remplacer progressivement l'alcool contenu dans les tissus par un solvant de celle-ci : le xylène. Pour cela, différents mélanges alcool-xylène ont été préparés en diminuant progressivement les proportions d'alcool et en augmentant simultanément celles de xylène (Tableau 2).

Tableau 2 : Bains d'éclaircissement des échantillons au xylène.

1 <sup>ères</sup> série de bains		Durée	2 <sup>ème</sup> série de bains	Durée
Ethanol pur	Xylène		Xylène	
3/4	1/4	30 minutes	Pur	45 minutes
1/2	1/2	30 minutes	Pur	30 minutes
1/4	3/4	30 minutes	Pur	30 minutes

#### C.3.2. Imprégnation à la paraffine

La température de fusion de la paraffine se situant à 56-58°C, les mélanges xylène-paraffine se feront à l'étuve à 60 ± 1°C. Ainsi, les fragments végétaux sont disposés dans de petits béchers de 10 ml contenant du toluène pure tout en y ajoutant progressivement des pastilles de paraffine. Les pièces sont ensuite transférées dans des béchers contenant de la paraffine pure (Tableau 3).

Tableau 3 : Bains d'imprégnation des échantillons à la paraffine

1 <sup>ères</sup> série de bains		Durée	2 <sup>ème</sup> série de bains	Durée
Xylène	Paraffine		Paraffine	
3/4	1/4	30 minutes	Pure	45 minutes
1/2	1/2	30 minutes	Pure	45 minutes
1/4	3/4	30 minutes	Pure	14 heures

### C.3.3. La mise en bloc

Une fois les pièces imprégnées de paraffine, il faut les inclure dans un bloc de paraffine afin de permettre la coupe au microtome. Pour cela, la pièce du dernier bain de paraffine pure est placée dans un moule spécial en acier contenant la paraffine fondue pur.

La pièce est orientée selon le plan de coupe qu'on veut obtenir ; cette étape est réalisée sur un appareil d'enrobage. Les blocs obtenus permettent une conservation illimitée des échantillons à la température ambiante.

### C.3.4. Confection des coupes

Après refroidissement et solidification de la paraffine, les blocs d'inclusion sont sectionnés au microtome à paraffine (type LEICA) en coupes de 2 micromètres d'épaisseur. Les rubans ainsi obtenus sont mis à flotter sur de l'eau gélatineuse sur une lame d'histologie. Celle-ci est alors placée dans l'étuve à une température légèrement inférieure au point de fusion de la paraffine pendant 20 minutes ; les coupes sont ainsi étalées et collées à la lame.

L'élimination de la paraffine est obtenue par un solvant spécifique : le xylène qui est à son tour chassé par l'alcool éthylique qui est remplacé ensuite par de l'eau distillée (Tableau 4).

Le séchage s'effectue dans l'étuve à 60°C pendant au moins 24 heures afin d'augmenter l'adhérence des coupes.

Tableau 4 : Bains de déparaffinage des coupes.

Bain	Durée
Xylène	10 minutes
Xylène	10 minutes
Xylène	10 minutes
Xylène	10 minutes
Ethanol à 100 %.	10 minutes
Ethanol à 100 %	10 minutes
Ethanol à 100 %	10 minutes
Ethanol à 95 %	10 minutes
Ethanol à 75 %	10 minutes
Eau distillée	10 minutes
Eau distillée	10 minutes
Eau distillée	10 minutes

## **APPENDICE D**

### **COLORATION DES COUPES HISTOLOGIQUES**

#### D.1. Coloration Vert de méthyle-Rouge Congo

Cette coloration a pour but de mettre en évidence la structure anatomique, c'est-à-dire l'agencement des différents tissus. En effet, Le Rouge Congo est retenu par les épaissements pectocellulosiques, tandis que le vert de méthyle est retenu par la lignine et ses dérivés. La coloration se déroule comme suit :

- Bain de 15 minutes dans un mélange volume à volume d'eau et d'eau de Javel pure (lyse des contenus cellulaires).
- Deux bains de 5 minutes chacun dans l'eau distillée (pour éliminer l'excédent d'eau de Javel).
- Bain de 3 à 5 mn dans de l'eau acétique à 1 % environ (mordançage).
- Deux bains de 5 minutes chacun dans l'eau distillée.
- Bain de vert de méthyle de 10 minutes
- Deux bains de 10 minutes chacun dans l'eau distillée (pour éliminer excédent de colorant).
- Bain de rouge de Congo de 10 minutes.
- Deux bains de 10 minutes chacun dans l'eau distillée.

#### D.2. Coloration topographique à l'hématoxyline et à l'éosine

Après fixation alcoolique, cette coloration met en évidence de façon très nette les cellules méristématiques. En effet, l'éosine est un colorant acide, qui a une affinité sélective pour le cytoplasme cellulaire ; elle se fixe de préférence aux molécules basiques telles que les groupements positifs des protéines cytoplasmiques. En revanche, l'hématoxyline (l'hématéine) ( $\text{NH}^+$ ) colorant basique, va se fixer sur les acides phosphoriques des noyaux. Le résultat de leur action étant noyaux colorés en bleu et cytoplasme en nuances de rose, l'observation au microscope va permettre de repérer les cellules méristématiques à rapport nucléocytoplasmique élevé.

La coloration se déroule comme suit :

- Un bain d'Hématoxyline de Harris de 4 minutes
- Lavage à l'eau sous faible débit pendant 5 minutes
- Un à 5 bains d'Acide-alcool (HCL 1% dans éthanol 95%, a pour but la décoloration)
- Lavage à l'eau sous faible débit pendant 8 minutes
- Lavage à l'ammoniaque pendant 2 minutes
- Lavage à l'eau sous faible débit pendant 5 minutes
- Bain d'Éosine de 2 minutes
- 5 à 10 bains Éthanol 70%
- 10 bains Éthanol 85-95%
- Un bain d'Éthanol 100% de 2 minutes
- Nettoyage dans du xylène pendant 2 minutes de fois de suite.

## APPENDICE E

### ETUDE STATISTIQUE

#### 1. Le test khi carré de Pearson (Traitement x Etat de l'explant)

Summary Table: Expected Frequencies				
Marked cells have counts > 30				
Pearson Chi-square: 34,1832, df=2, p=,000000				
Traitement de désinfection	Etat de l'explant Intacte	Etat de l'explant Contaminé	Etat de l'explant Nécrosé	Row Totals
Traitement A	26,50318	36,73248	9,76433	73,0000
Traitement B	30,49682	42,26752	11,23567	84,0000
All Grps	57,00000	79,00000	21,00000	157,0000

#### 2. Table des résidus (Traitement x Etat de l'explant)

Summary Table: Observed minus Expected Frequencies				
Marked cells have counts > 30				
Pearson Chi-square: 34,1832, df=2, p=,000000				
Traitement de désinfection	Etat de l'explant Intacte	Etat de l'explant Contaminé	Etat de l'explant Nécrosé	Row Totals
Traitement A	-13,5032	18,2675	-4,76433	-0,000000
Traitement B	13,5032	-18,2675	4,76433	-0,000000
All Grps	0,0000	-0,0000	0,00000	-0,000000

#### 3. Test exact de Fisher (Milieu x Débourrement des bourgeons)

Statistic	Statistics: Milieu(2) x Débournement(		
	Chi-square	df	p
Pearson Chi-square	,4865952	df=1	p=,48545
M-L Chi-square	,4841284	df=1	p=,48656
Yates Chi-square	,1507510	df=1	p=,69782
Fisher exact, one-tailed			p=,34750
two-tailed			p=,54622
McNemar Chi-square (A/D)	,0500000	df=1	p=,82306
(B/C)	3,703704	df=1	p=,05429

#### 4. Nombre de pousses régénérées par explant mise en culture

Variable	Descriptive Statistics					
	Valid N	Mean	Minimum	Maximum	Std.Dev.	Standard Error
Nombre de pousses	17	1,235294	1,000000	2,000000	0,437237	0,106046



### 5. Test U de Mann-Whitney (Effet des milieux sur le Longueur de pousses régénérées par explant)

Mann-Whitney U Test By variable Milieu Marked tests are significant at $p < ,05000$										
variable	Rank Sum WPM	Rank Sum MS	U	Z	p-level	Z adjusted	p-level	Valid N WPM	Valid N MS	2*1 sided exact p
longueur de pousses (mm)	160,0000	71,00000	16,00000	2,746297	0,006028	2,766126	0,005673	11	10	0,004786

### 6. Effet des milieux sur le nombre de feuilles régénérées par pousse

Mann-Whitney U Test By variable Milieu Marked tests are significant at $p < ,05000$										
variable	Rank Sum WPM	Rank Sum MS	U	Z	p-level	Z adjusted	p-level	Valid N WPM	Valid N MS	2*1 sided exact p
nombre de feuilles	130,0000	101,0000	46,00000	0,633761	0,526237	0,642155	0,520773	11	10	0,557264

### 7. Effet des milieux sur la callogenèse des explants nodaux

2 x 2 Table			
	Column 1	Column 2	Row Totals
Frequencies, row 1	11	8	19
Percent of total	23,404%	17,021%	40,426%
Frequencies, row 2	26	2	28
Percent of total	55,319%	4,255%	59,574%
Column totals	37	10	47
Percent of total	78,723%	21,277%	
Chi-square (df=1)	8,26	p= ,0041	
V-square (df=1)	8,08	p= ,0045	
Yates corrected Chi-square	6,31	p= ,0120	
Phi-square	,17576		
Fisher exact p, one-tailed		p= ,0060	
two-tailed		p= ,0086	
McNemar Chi-square (A/D)	4,92	p= ,0265	
Chi-square (B/C)	8,50	p= ,0036	

### 8. Multiplication : Effet des combinaisons hormonales sur le nombre de pousses régénérées par explant

Kruskal-Wallis ANOVA by Ranks; Nombre de pousse (Spreadsheet1) Independent (grouping) variable: Milieu Kruskal-Wallis test: $H(3, N=24) = 12,10980$ $p = ,0070$						
Depend.: Nombre de pousse	Code	Valid N	Sum of Ranks			
Témoin	0	6	36,0000			
M1	1	6	113,5000			
M2	2	6	72,5000			
M3	3	6	78,0000			

		Mann-Whitney U Test (multiplication.sta) By variable Milieu Marked tests are significant at p <,01250								
variable	Rank Sum Témoïn	Rank Sum M1	U	Z	p-level	Z adjusted	p-level	Valid N Témoïn	Valid N M1	2*1 sided exact p
<b>Nombre de pousse</b>	22,50000	55,50000	1,500000	-2,64211	0,008239	-2,72940	0,006345	6	6	0,004329

		Mann-Whitney U Test (multiplication.sta) By variable Milieu Marked tests are significant at p <,01250								
variable	Rank Sum Témoïn	Rank Sum M2	U	Z	p-level	Z adjusted	p-level	Valid N Témoïn	Valid N M2	2*1 sided exact p
<b>Nombre de pousse</b>	27,00000	51,00000	6,000000	-1,92154	0,054665	-2,16641	0,030281	6	6	0,064935

		Mann-Whitney U Test (multiplication.sta) By variable Milieu Marked tests are significant at p <,01250								
variable	Rank Sum Témoïn	Rank Sum M3	U	Z	p-level	Z adjusted	p-level	Valid N Témoïn	Valid N M3	2*1 sided exact p
<b>Nombre de pousse</b>	28,50000	49,50000	7,500000	-1,68135	0,092697	-2,02073	0,043309	6	6	0,093074

		Mann-Whitney U Test (multiplication.sta) By variable Milieu Marked tests are significant at p <,01250								
variable	Rank Sum M2	Rank Sum M1	U	Z	p-level	Z adjusted	p-level	Valid N M2	Valid N M1	2*1 sided exact p
<b>Nombre de pousse</b>	28,00000	50,00000	7,000000	-1,76141	0,078170	-1,89922	0,057536	6	6	0,093074

		Mann-Whitney U Test (multiplication.sta) By variable Milieu Marked tests are significant at p <,01250								
variable	Rank Sum M2	Rank Sum M3	U	Z	p-level	Z adjusted	p-level	Valid N M2	Valid N M3	2*1 sided exact p
<b>Nombre de pousse</b>	41,00000	37,00000	16,00000	0,320256	0,748774	0,421637	0,673290	6	6	0,818182

		Mann-Whitney U Test (multiplication.sta) By variable Milieu Marked tests are significant at p <,01250								
variable	Rank Sum M1	Rank Sum M3	U	Z	p-level	Z adjusted	p-level	Valid N M1	Valid N M3	2*1 sided exact p
<b>Nombre de pousse</b>	50,00000	28,00000	7,000000	1,761410	0,078170	1,899222	0,057536	6	6	0,093074

## 9. Multiplication Effet des combinaisons hormonales sur la longueur des pousses régénérées

		Kruskal-Wallis ANOVA by Ranks; Longueur des pousses Independent (grouping) variable: Milieu Kruskal-Wallis test: H ( 3, N= 35) =10,36448 p =,0157								
Depend.:	Code	Valid N	Sum of Ranks							
Longeur des pousses										
<b>Témoïn</b>	0	6	49,0000							
M1	1	13	218,0000							
M2	2	9	225,5000							
M3	3	7	137,5000							

		Mann-Whitney U Test (Multiplication paramètre.sta) By variable Milieu Marked tests are significant at p <,01250								
variable	Rank Sum Témoïn	Rank Sum M1	U	Z	p-level	Z adjusted	p-level	Valid N Témoïn	Valid N M1	2*1 sided exact p
<b>Longeur des pousses</b>	37,50000	152,5000	16,50000	-1,97338	0,048453	-1,99449	0,046100	6	13	0,046218

		Mann-Whitney U Test (Multiplication paramètre. sta) By variable Milieu Marked tests are significant at p <,01250									
variable	Rank Sum Témoïn	Rank Sum M2	U	Z	p-level	Z adjusted	p-level	Valid N Témoïn	Valid N M2	2*1 sided exact p	
<b>Longeur des pousSES</b>	28,00000	63,00000	7,000000	-2,00000	0,045501	-2,04546	0,040810	6	7	0,051282	

		Mann-Whitney U Test (Multiplication paramètre. sta) By variable Milieu Marked tests are significant at p <,01250									
variable	Rank Sum Témoïn	Rank Sum M3	U	Z	p-level	Z adjusted	p-level	Valid N Témoïn	Valid N M3	2*1 sided exact p	
<b>Longeur des pousSES</b>	25,50000	94,50000	4,500000	-2,65165	0,008010	-2,67565	0,007459	6	9	0,004795	

		Mann-Whitney U Test (Multiplication paramètre. sta) By variable Milieu Marked tests are significant at p <,01250									
variable	Rank Sum M1	Rank Sum M2	U	Z	p-level	Z adjusted	p-level	Valid N M1	Valid N M2	2*1 sided exact p	
<b>Longeur des pousSES</b>	127,50000	82,50000	36,50000	-0,713186	0,475731	-0,730126	0,465314	13	7	0,485423	

		Mann-Whitney U Test (Multiplication paramètre. sta) By variable Milieu Marked tests are significant at p <,01250									
variable	Rank Sum M2	Rank Sum M3	U	Z	p-level	Z adjusted	p-level	Valid N M2	Valid N M3	2*1 sided exact p	
<b>Longeur des pousSES</b>	48,00000	88,00000	20,00000	-1,21729	0,223495	-1,23280	0,217653	7	9	0,252273	

		Mann-Whitney U Test (Multiplication paramètre. sta) By variable Milieu Marked tests are significant at p <,01250									
variable	Rank Sum M1	Rank Sum M3	U	Z	p-level	Z adjusted	p-level	Valid N M1	Valid N M3	2*1 sided exact p	
<b>Longeur des pousSES</b>	120,00000	133,00000	29,00000	-1,96995	0,048845	-1,98742	0,046876	13	9	0,051353	

## 10. Multiplication : Effet des combinaisons hormonales sur le nombre des feuilles régénérées par pousSES

		Kruskal-Wallis ANOVA by Ranks; Nombre de feuilles (Spreadsheet55) Independent (grouping) variable: Milieu Kruskal-Wallis test: H ( 3, N= 35) =11,36534 p =,0099									
Depend.:	Code	Valid N	Sum of Ranks								
Nombre de feuilles	<b>Témoïn</b>	0	6	39,0000							
	M1	1	13	230,5000							
	M2	2	9	190,0000							
	M3	3	7	170,5000							

		Mann-Whitney U Test (Multiplication paramètre. sta) By variable Milieu Marked tests are significant at p <,01250									
variable	Rank Sum Témoïn	Rank Sum M1	U	Z	p-level	Z adjusted	p-level	Valid N Témoïn	Valid N M1	2*1 sided exact p	
<b>Nombre de feuilles</b>	33,00000	157,0000	12,00000	-2,36806	0,017882	-2,41512	0,015730	6	13	0,016733	

		Mann-Whitney U Test (Multiplication paramètre. sta) By variable Milieu Marked tests are significant at p <,01250									
variable	Rank Sum Témoïn	Rank Sum M2	U	Z	p-level	Z adjusted	p-level	Valid N Témoïn	Valid N M2	2*1 sided exact p	
<b>Nombre de feuilles</b>	22,50000	68,50000	1,500000	-2,78571	0,005341	-2,84495	0,004442	6	7	0,002331	

		Mann-Whitney U Test (Multiplication paramètre.sta) By variable Milieu Marked tests are significant at p <,01250								
variable	Rank Sum Témoïn	Rank Sum M3	U	Z	p-level	Z adjusted	p-level	Valid N Témoïn	Valid N M3	2*1 sided exact p
<b>Nombre de feuilles</b>	25,50000	94,50000	4,500000	-2,65165	0,008010	-2,69284	0,007085	6	9	0,004795

		Mann-Whitney U Test (Multiplication paramètre.sta) By variable Milieu Marked tests are significant at p <,01250								
variable	Rank Sum M2	Rank Sum M1	U	Z	p-level	Z adjusted	p-level	Valid N M2	Valid N M1	2*1 sided exact p
<b>Nombre de feuilles</b>	92,50000	117,5000	26,50000	1,505615	0,132167	1,532347	0,125438	7	13	0,134804

		Mann-Whitney U Test (Multiplication paramètre.sta) By variable Milieu Marked tests are significant at p <,01250								
variable	Rank Sum M2	Rank Sum M3	U	Z	p-level	Z adjusted	p-level	Valid N M2	Valid N M3	2*1 sided exact p
<b>Nombre de feuilles</b>	65,50000	70,50000	25,50000	0,635107	0,525359	0,643198	0,520096	7	9	0,536014

		Mann-Whitney U Test (Multiplication paramètre.sta) By variable Milieu Marked tests are significant at p <,01250								
variable	Rank Sum M1	Rank Sum M3	U	Z	p-level	Z adjusted	p-level	Valid N M1	Valid N M3	2*1 sided exact p
<b>Nombre de feuilles</b>	138,0000	115,0000	47,00000	-0,767948	0,442519	-0,785207	0,432333	13	9	0,470729

## Induction de la callogenèse à partir des explants foliaires

### 11. Effet de 2,4-D sur l'induction de la callogenèse sur milieu MS

		Kruskal-Wallis ANOVA by Ranks; Diamètre mm (Spreadsheet19) Independent (grouping) variable: Concnetration 2,4 D Kruskal-Wallis test: H ( 2, N= 30) =19,27830 p =,0001								
Depend.: Diamètre mm	Code	Valid N	Sum of Ranks							
<b>0 mg/L</b>	1	10	69,0000							
0,5 mg/L	2	10	156,5000							
1 mg/L	3	10	239,5000							

		Mann-Whitney U Test (Spreadsheet19) By variable Concnetration 2,4 D Marked tests are significant at p <,05000								
variable	Rank Sum 0 mg/L	Rank Sum 1 mg/L	U	Z	p-level	Z adjusted	p-level	Valid N 0 mg/L	Valid N 1 mg/L	2*1 sided exact p
<b>Diamètre mm</b>	55,00000	155,0000	0,00	-3,77964	0,000157	-3,85426	0,000116	10	10	0,000011

		Mann-Whitney U Test (Spreadsheet19) By variable Concnetration 2,4 D Marked tests are significant at p <,05000								
variable	Rank Sum 0 mg/L	Rank Sum 1 mg/L	U	Z	p-level	Z adjusted	p-level	Valid N 0 mg/L	Valid N 1 mg/L	2*1 sided exact p
<b>Diamètre mm</b>	55,00000	155,0000	0,00	-3,77964	0,000157	-3,85426	0,000116	10	10	0,000011

		Mann-Whitney U Test (Spreadsheet19) By variable Concnetration 2,4 D Marked tests are significant at p <,05000								
variable	Rank Sum 0,5 mg/L	Rank Sum 1 mg/L	U	Z	p-level	Z adjusted	p-level	Valid N 0,5 mg/L	Valid N 1 mg/L	2*1 sided exact p
<b>Diamètre mm</b>	70,50000	139,5000	15,50000	-2,60795	0,009109	-2,64194	0,008244	10	10	0,006841

Mann-Whitney U Test (Spreadsheet32) By variable Concnetration 2,4 D Marked tests are significant at p <,01000										
variable	Rank Sum 0 mg/L	Rank Sum 0,5 mg/L	U	Z	p-level	Z adjusted	p-level	Valid N 0 mg/L	Valid N 0,5 mg/L	2*1sided exact p
Poids g	62,00000	148,0000	7,000000	-3,25049	0,001152	-3,32117	0,000897	10	10	0,000487

Kruskal-Wallis ANOVA by Ranks; Poids g (Spreadsheet32) Independent (grouping) variable: Concnetration 2,4 D Kruskal-Wallis test: H ( 2, N= 30) =18,66087 p =,0001			
Depend.: Poids g	Code	Valid N	Sum of Ranks
0 mg/L	1	10	64,0000
0,5 mg/L	2	10	170,0000
1 mg/L	3	10	231,0000

## 12. Effet de 2,4-D sur l'induction de la callogenèse sur milieu B5

Kruskal-Wallis ANOVA by Ranks; Diamètre mm (BS.sta) Independent (grouping) variable: Concentration 2,4 D Kruskal-Wallis test: H ( 2, N= 30) =18,28169 p =,0001			
Depend.: Diamètre mm	Code	Valid N	Sum of Ranks
0 mg/L	1	10	65,5000
0,5 mg/L	2	10	173,0000
1 mg/L	3	10	226,5000

Mann-Whitney U Test (BS.sta) By variable Concentration 2,4 D Marked tests are significant at p <,01000										
variable	Rank Sum 0 mg/L	Rank Sum 0,5 mg/L	U	Z	p-level	Z adjusted	p-level	Valid N 0 mg/L	Valid N 0,5 mg/L	2*1sided exact p
Diamètre mm	61,00000	149,0000	6,000000	-3,32609	0,000881	-3,48280	0,000496	10	10	0,000325

Mann-Whitney U Test (BS.sta) By variable Concentration 2,4 D Marked tests are significant at p <,01000										
variable	Rank Sum 0 mg/L	Rank Sum 1 mg/L	U	Z	p-level	Z adjusted	p-level	Valid N 0 mg/L	Valid N 1 mg/L	2*1sided exact p
Diamètre mm	59,50000	150,5000	4,500000	-3,43948	0,000583	-3,56787	0,000360	10	10	0,000130

Mann-Whitney U Test (BS.sta) By variable Concentration 2,4 D Marked tests are significant at p <,01000										
variable	Rank Sum 0,5 mg/L	Rank Sum 1 mg/L	U	Z	p-level	Z adjusted	p-level	Valid N 0,5 mg/L	Valid N 1 mg/L	2*1sided exact p
Diamètre mm	79,00000	131,0000	24,00000	-1,96542	0,049367	-2,01448	0,043960	10	10	0,052426

Kruskal-Wallis ANOVA by Ranks; Poids g (BS.sta) Independent (grouping) variable: Concentration 2,4 D Kruskal-Wallis test: H ( 2, N= 30) =18,66087 p =,0001			
Depend.: Poids g	Code	Valid N	Sum of Ranks
0 mg/L	1	10	64,0000
0,5 mg/L	2	10	170,0000
1 mg/L	3	10	231,0000

Mann-Whitney U Test (BS.sta) By variable Concentration 2,4 D Marked tests are significant at p <,05000										
variable	Rank Sum 0 mg/L	Rank Sum 0,5 mg/L	U	Z	p-level	Z adjusted	p-level	Valid N 0 mg/L	Valid N 0,5 mg/L	2*1sided exact p
Poids g	62,00000	148,0000	7,000000	-3,25049	0,001152	-3,32117	0,000897	10	10	0,000487

Mann-Whitney U Test (BS.sta) By variable Concentration 2,4 D Marked tests are significant at p <,01000										
variable	Rank Sum 0 mg/L	Rank Sum 1 mg/L	U	Z	p-level	Z adjusted	p-level	Valid N 0 mg/L	Valid N 1 mg/L	2*1sided exact p
Poids g	57,00000	153,0000	2,000000	-3,62846	0,000285	-3,70735	0,000209	10	10	0,000043

Mann-Whitney U Test (BS.sta) By variable Concentration 2,4 D Marked tests are significant at p <,01000										
variable	Rank Sum 0,5 mg/L	Rank Sum 1 mg/L	U	Z	p-level	Z adjusted	p-level	Valid N 0,5 mg/L	Valid N 1 mg/L	2*1sided exact p
Poids g	77,00000	133,0000	22,00000	-2,11660	0,034294	-2,11660	0,034294	10	10	0,035463

### 13. Effet des hormones de croissance sur la multiplication des cals de *Capparis spinosa* L.

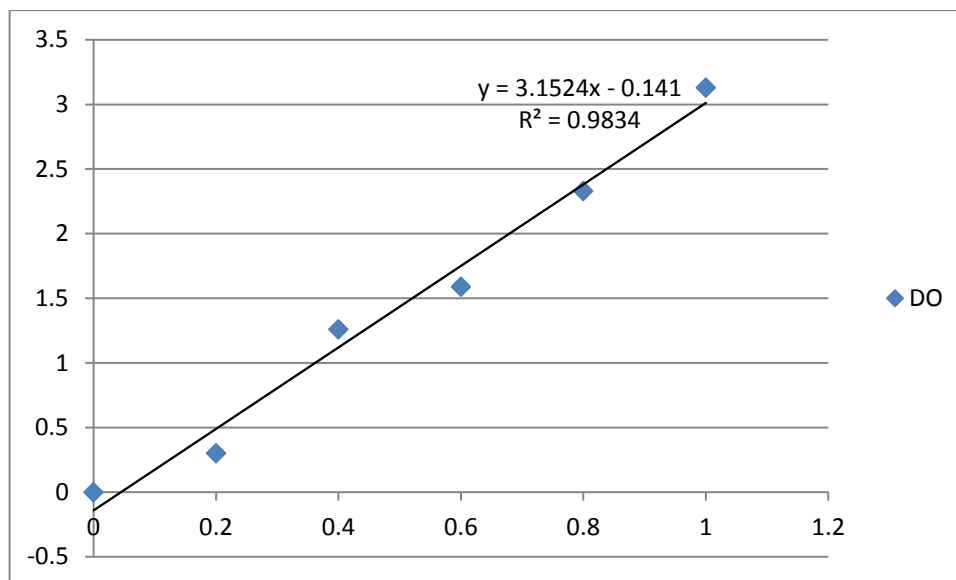
Mann-Whitney U Test (cal mult.sta) By variable Milieu Marked tests are significant at p <,05000										
variable	Rank Sum Témoïn	Rank Sum MS + HC	U	Z	p-level	Z adjusted	p-level	Valid N Témoïn	Valid N MS + HC	2*1sided exact p
Diamètre mm	56,50000	153,5000	1,500000	-3,66626	0,000246	-3,76821	0,000164	10	10	0,000022

Mann-Whitney U Test (cal mult.sta) By variable Milieu Marked tests are significant at p <,05000										
Rank Sum Témoïn	Rank Sum MS + HC	U	Z	p-level	Z adjusted	p-level	Valid N Témoïn	Valid N MS + HC	2*1sided exact p	
55,00000	155,0000	0,00	-3,77964	0,000157	-3,78249	0,000155	10	10	0,000011	

### 14- Taux des polyphénols totaux des extraits secs de *C. spinosa* L.

Variable	Descriptive Statistics (Polyphénols totaux.sta)				
	Valid N	Mean	Minimum	Maximum	Std.Dev.
PTF mg Eq AG/g ES	3	120,2067	118,3700	121,9900	1,810589
PTC mg Eq AG/g ES	3	55,3000	54,6900	55,9100	0,610000

**APPENDICE F**  
**COURBE D'ETALONNAGE DE L'ACIDE GALLIQUE**





## REFERENCES

1. Boullard B., "Plantes médicinales du monde *Réalités & Croyances*", Editions ESTEM, Paris, (2001) 636 p.
2. Kaçar D., "Screening of Some Plant Species for their Total Antioxidant and Antimicrobial Activities", Master thesis The Graduate School of Engineering and Sciences of İzmir Institute of Technology, Turkey, (2008), 106 p.
3. Bérubé-Gagnon J., "Isolation et identification de composés antibiotiques des écorces de *Picea mariana*.", Mémoire de maîtrise de l'université du Québec, Canada, (2006), 76 p.
4. Mehdioui R., et Kahouadji A., "Etude ethnobotanique auprès de la population riveraine de la forêt d'Amsittène: cas de la Commune d'Imi n'Tlit (Province d'Essaouira) ", Bulletin de l'Institut Scientifique, Rabat, section Sciences de la Vie, n°29, (2007), 11-20.
5. Julsing M. K., Wim J. Q. and Kayser O., "The Engineering of Medicinal Plants: Prospects and Limitations of Medicinal Plant Biotechnology", (2007) In: ABU KHALAF G., "*Capparis spinosa* L. "Caper": In Vitro Cultures and Bioassay", Master of Science thesis, Palestine Polytechnic University, (2011), 81p.
6. Bensghir-Boukhari L. A. et Seridi R., "Le câprier, une espèce arbustive pour le développement rural durable en Algérie", Méditerranée, n° 109, (2007), 101-105.
7. Al-mahmood H. J., Shatnawi M. A., Shibli R., Makhadmeh I. M., Abubaker S. M. and Shadiadeh A. N., "Clonal propagation and medium-term conservation of *Capparis spinosa*: A medicinal plant", Journal of Medicinal Plants Research, V. 6 n° 22, (2012), 826-836. DOI: 10.5897/JMPR11.547.
8. Musallam I., Duwayri M. and Shibli, R. A., "Micropropagation of Caper (*Capparis spinosa* L.) from Wild Plants" Functional Plant Science and Biotechnology, V. 5 ,(Special Issue 1), (2011), 17-21.

9. Al-Safadi B. and Elias R., "Improvement of caper (*Capparis spinosa* L.) propagation using in vitro culture and gamma irradiation", *Sci. Hortic.*, n° 127, (2011), 290–297.
10. Rodriguez R., Rey M., Cuozzo L. and Ancora G., "In vitro propagation of caper (*Capparis spinosa* L.) ", *In Vitro Cell Dev. Biol.*, n° 26, (1990), 531–536.
11. Hall J. C., Sytsma K. J. and Iltis H. H., "Phylogeny of Capparaceae and Brassicaceae based on chloroplast sequence", (2002). In: Inocencioc., Rivera D., Oboń M. C., Alcaraz F. and Barrenã JA., "A systematic revision of *Capparis* section *Capparis* (Capparaceae) ", *ANN. MISSOURI BOT. GARD.*, n° 93, (2006), 122–149.
12. Fici S. and Gianguzzi L., "Diversity and conservation of wild and cultivated *Capparis* in Sicily", *Bocconea*, n° 7, (1997), 437-443.
13. Zohary M., "The species of *Capparis* in the Mediterranean and near Eastern Countries", (1960). In: Fici S. and Gianguzzi L., "Diversity and conservation of wild and cultivated *Capparis* in Sicily", *Bocconea*, n° 7, (1997), 437-443.
14. JACOBS M., "The genus *Capparis* (Capparaceae) from the Indus to the Pacifico", (1964). In: Fici S. and Gianguzzi L., "Diversity and conservation of wild and cultivated *Capparis* in Sicily", *Bocconea*, n° 7, (1997), 437-443.
15. Renfrew J.M., "Palaeoethnobotany: The Prehistoric Food Plants of the Near East and Europe", Methuen & Co. Ltd., London, (1973), 153 p.
16. CCE (Communautés Européennes – Commission), "Le Câprier *Capparis spp* L.", Editions Guiseppe Barbera, Luxembourg: OPOCE. Agriculture, n° CD-NA-13617-FR-C. IV, (1991), 62 p.
17. Otto Wilhelm Thomé, "Flora von Deutschland Österreich und der Schweiz" [https://en.wikipedia.org/wiki/Caper#/media/File:Illustration\\_Capparis\\_spinosa0.jpg](https://en.wikipedia.org/wiki/Caper#/media/File:Illustration_Capparis_spinosa0.jpg) consulté le: 09/10/2014.
18. Inocencioc., Rivera D., Oboń M. C., Alcaraz F. and Barrenã JA., "A systematic revision of *Capparis* section *Capparis* (Capparaceae) ", *ANN. MISSOURI BOT. GARD.*, n° 93, (2006), 122–149.

19. Fici S., "A taxonomic revision of the *Capparis spinosa* group (Capparaceae) from the Mediterranean to Central Asia", *Phytotaxa*, V. 174, n° 1, (2014), 1–24 ISSN 1179-3163 (online edition).
20. Lamnauer D. and Batanouny K., "A guide to medicinal plants in North Africa", IUCN North Africa Biodiversity programme (NABP), (2005), 63-65.
21. Watson L. and Dallwitz M. J., "The families of flowering plants", (1992). In: Behnaz M., Asli E., Anoosh D. et Anoosh E., *Caper the Mystique of the recent century*. Intl J Agri Crop Sci. V. 4, n° 10, (2012), 604-608.
22. Bensghir-boukhari L. A., "Techniques de multiplication du câprier", (1994), INRF, Sétif.
23. Raven J., "Plants and plant lore in Ancient Greece", (1990). In Behnaz M., Asli E., Anoosh D. and Anoosh E., *Caper the Mystique of the recent century*. Intl J Agri Crop Sci. V. 4, n° 10, (2012), 604-608.
24. Soyler D. and Khawar K. M., "Seed Germination of Caper (*Capparis ovata* var. *Herbacea*) Using  $\alpha$  Naphthalene Acetic Acid and Gibberellic Acid", INTERNATIONAL JOURNAL OF AGRICULTURE & BIOLOGY, V. 9, n° 1, (2007), 35-37.
25. Hessam Arefi I., Khani Nejad S. and Kafi M., "Roles of duration and concentration of priming agents on dormancy breaking and germination of caper (*Capparis spinosa* L.) for the protection of arid degraded areas", *Pak. J. Bot.*, n° 44, Special Issue, (2012), 225-230.
26. Sakcali M. S., Bahadir H. and Ozturk M., "Eco-physiology of *Capparis spinosa* L.: a plant suitable for combating desertification" *Pak. J. Bot.*, V. 40, n° 4, (2008), 1481-1486.
27. Hansen J. M. "The Palaeoethnobotany of Franchthi Cave", (1991). In: Jiang HE., Li X., Ferguson D.K., Wang YF., Liu CJ. and Li CS., "The discovery of *Capparis spinosa* L. (Capparidaceae) in the Yanghai Tombs (2800 years b.p.), NW China, and its medicinal implications", *Journal of Ethnopharmacology*, n° 113, (2007), 409–420.

28. Jiang H. E., Li X., Ferguson D.K., Wang Y. F., Liu C. J. and Li C. S., "The discovery of *Capparis spinosa* L. (Capparidaceae) in the Yanghai Tombs (2800 years b.p.), NW China, and its medicinal implications", *Journal of Ethnopharmacology*, n° 113, (2007), 409–420.
29. Van Zeist W. and Bakker-Heeres J.A.H., "Archaeobotanical studies in the Levant 1. Neolithic sites in the Damascus Basin: Aswad, Ghoraife, Ramad. *Palaeohistoria*", (1982). In: Jiang H. E., Li X., Ferguson D.K., Wang Y. F., Liu C. J. and Li C. S., "The discovery of *Capparis spinosa* L. (Capparidaceae) in the Yanghai Tombs (2800 years b.p.), NW China, and its medicinal implications", *Journal of Ethnopharmacology*, n° 113, (2007), 409–420.
30. IPGRI, "Enhancing the Contribution of Neglected and Underutilized Species to Food Security and to the Incomes of the Rural Poor", (2001), Disponible en ligne: <http://www.ipgri.cgiar.org>.
31. BENSGHIR L. et BENSGHIR K., "Spécificité écologique du câprier et applications diverses en phytothérapie. 1<sup>ère</sup> exposition en ethnobotanique et 2<sup>ème</sup> atelier d'initiation à la phytothérapie au Jardin d'Essaie du Hamma", ENS El-Ibrahimi, CNDRB, Alger, (2014).
32. Ghorbel A., Ben Salem-Fnayou A., Khouildi S., Skouri H. et Chibanl F., "Le câprier : Caractérisation et multiplication", In: *Des modèles biologiques à l'amélioration des plantes*. Serge Hamon, Paris, (2001), 157-172.
33. Couplan F., "Retrouvez les légumes oubliés. 50 légumes, condiments et fruits. Culture, historique, propriétés, recettes", Editions La maison rustique, Flammarion, Paris, (1986),
34. Zargari A., "Medicinal plants" V. 1, Tehran: Tehran University, (1986). In: Romeo V., Ziino M., Giuffrida D., Condurso C. and Verzera A., "Flavour profile of capers (*Capparis spinosa* L.) from the Eolian Archipelago by HS-SPME/GC-MS", *Food Chemistry*, V. 101, (2007), 1272–1278.
35. Ozcan M., "Mineral composition of different parts of *Capparis ovate* Desf. Growing Wild in Turkey", (2005). In: Behnaz M., Asli E., Anoosh D. and Anoosh

E., Caper the Mystique of the recent century. Intl J Agri Crop Sci. V. 4, n° 10, (2012), 604-608.

36. Romeo V., Ziino M., Giuffrida D., Condurso C. and Verzera A., "Flavour profile of capers (*Capparis spinosa* L.) from the Eolian Archipelago by HS-SPME/GC-MS", Food Chemistry, V. 101, (2007), 1272-1278.

37. Mishra S. N., Tomar P. C. and Lakra N., "Medicinal and food value of Capparis-a harsh terrain plant. Indian Journal of traditional knowledge", V. 6, n° 1, (2007), 230-238.

38. Fragiska M., "Wild and Cultivated Vegetables. Herbs and Spices in Greek Antiquity Environ Archaeol", (2005). In: Behnaz M., Asli E., Anoosh D. et Anoosh E., "Caper the Mystique of the recent century", Intl J Agri Crop Sci. V. 4, n° 10, (2012), 604-608.

39. Behnaz M., Asli E., Anoosh D. and Anoosh E., "Caper the Mystique of the recent century", Intl J Agri Crop Sci. V. 4, n° 10, (2012), 604-608.

40. Manikandaselvi S. and Brindha P., "Chemical standardization studies on *capparis spinosa* L. ", International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences, V. 6, Suppl. 1, (2014), 47-54. ISSN-0975-1491.

41. Azaizeh H., Fulder S., Khalil K. and Said O., "Ethnomedicinal knowledge of local Arab practitioners in the Middle East Region", Fitoterapia, V. 74, (2003), 98-108.

42. Tlili N., Elfalleh W., Saadaoui E., Khaldi A., Triki S. and Nasri N., "The caper (*Capparis* L.): Ethnopharmacology, phytochemical and pharmacological properties", Fitoterapia V. 82, (2011), 93-101.

43. Al-Antaki D., "Tadhkirat ulali-albab wa-jami al-ujab". In: Tlili N., Elfalleh W., Saadaoui E., Khaldi A., Triki S. and Nasri N., "The caper (*Capparis* L.): Ethnopharmacology, phytochemical and pharmacological properties", Fitoterapia V. 82, (2011), 93-101.

44. Ibn Sina, "Kitab al-Qanun Tibb" In Tlili N., Elfalleh W., Saadaoui E., Khaldi A., Triki S. and Nasri N., "The caper (*Capparis* L.): Ethnopharmacology, phytochemical and pharmacological properties", Fitoterapia V. 82, (2011), 93-101.

45. Rivera D., Inocencio C., Obon C. and Alcaraz F., "Review of food and medicinal uses of *Capparis* L. subgenus *Capparis* (Capparidaceae)", *Econ Bot.*, V. 57, (2003), 515–34.
46. Ducros MAH., "Essai sur le droguier populaire arabe de l'inspectorat de pharmacies du Caire". In: Tlili N., Elfalleh W., Saadaoui E., Khaldi A., Triki S. and Nasri N., "The caper (*Capparis* L.): Ethnopharmacology, phytochemical and pharmacological properties", *Fitoterapia* V. 82, (2011), 93–101.
47. Sher, H. and Alyemeni M. N., "Ethnobotanical and Pharmaceutical Evaluation of *Capparis spinosa* L, Validity of Local Folk and Unani System of Medicine", *Journal of Medicinal Plants Research*, V. 4, n ° 17, (2010), 1751-1756.
48. Bellakhdar J., "La pharmacopée Marocaine Traditionnelle. Collection Médecine arabe et savoirs populaires", Ibis Press, Paris, V. 1, (1997), 764 p.
49. Eddouks M., Lemhadri A. and Michel J. B., "Caraway and Caper: Potential Anti-hyperglycaemic Plants in Diabetic Rats", *Journal of Ethnopharmacology*, V. 94, (2004), 143–148.
- 50- Leporatti M. L. and Ghedira K., "Comparative Analysis of Medicinal Plants Used in Traditional Medicine in Italy and Tunisia. *Journal of Ethnobiology and Ethnomedicine*", V. 5, n° 31, (2009), 1-8.
51. Afzal S., Afzal N., Awan M. R., Khan T. S., Gilani A., Khanum R. and Tariq S., "Ethno-Botanical Studies from Northern Pakistan", *Journal Ayub Medical College*, V. 21, n° 1, (2009), 52-57.
52. Fu X. P., Aisa H. A., Abdurahim M. and Yili A., (2007). In: Feng X., Lu J., Xin H., Zhang L., Wang Y., Tang K., "Anti-arthritic active fraction of *Capparis spinosa* L. fruits and its chemical constituents", *Yakugaku Zasshi*, V. 131,n° 3, (2011), 423-429.
53. Aslantürk Ö. S. and Tulay A. Ç., "Genotoxic and Antimutagenic Effects of *Capparis spinosa* L. on the *Allium cepa* L. Root Tip Meristem Cells", *CARYOLOGIA*, V. 62, n° 2, (2009), 114-123.

54. Boumerfeg S., Ameni D., Adjadj M., Djarmouni M., Khennouf S., Arrar L. and Baghiani A., "Antihymolytic and Antioxidant Effects of Medicinal Plant *Capparis spinosa* L", Journal of Life Sciences, n° 6, (2012) , 637-64.
55. Gadgoli C. and Mishra SH., "Antihepatotoxic activity of p-methoxy benzoic acid from *Capparis spinosa* L. ", J. Ethnopharmacology, V. 66, n° 2, (1999), 187-92.
56. Yu JI., Mo K., Xiang W., and Xiang W., "Study on inhibitory effect by total alkaloids in *Capparis spinosa* on SGC-7901 in vitro", J. of Shenyang Pharm Univ., V. 25, n° 21, (2008), 74-75.
57. Lam SK. and Ng TB., "A protein with antiproliferative, antifungal and HIV-1 reverse transcriptase inhibitory activities from caper (*Capparis spinosa*) seeds", Phytomedicine, V.16, Issue 5, (2009), 444–450.
58. Feng X., Lu J., Xin H., Zhang L. and Wang Y. and Tang K., "Anti-arthritic active fraction of *Capparis spinosa* L. fruits and its chemical constituents", Yakugaku Zasshi, V. 131,n° 3, (2011), 423-429.
59. Al-asady A. A. B., Khalil K. H. and Barwari S. S. M., "Cytotoxic and Cytogenetics Effects of Aqueous, Methanolic and Secondary Metabolites Extracts of *Capparis spinosa* on Tumor Cell Lines in vitro", JJBS, V. 5, n° 1, (2012), 15 – 30. ISSN 1995-6673.
60. Abraham I., Palani A., Ramaswamy B., Shunmugiah K. and Arumugam V., "Antiquorum Sensing and Antibiofilm Potential of *Capparis spinosa*", Archives of medical research, V. 42, Issue 8, (2011), 658–668.
61. Lemhadri A., Eddouks M., Sulpice T. and Burcelin R., "Anti hyperglycaemic and Anti-obesity Effects of *Capparis spinosa* and *Chamaemelum nobile* Aqueous Extracts in HFD Mice", American Journal of Pharmacology and Toxicology, V. 2, n° 3, (2007), 106-110.
62. Zeggwagh N. A., Michel J. B. and Eddouks M., "Cardiovascular Effect of *Capparis spinosa* Aqueous Extract. Part VI: In vitro Vasorelaxant Effect", American Journal of Pharmacology and Toxicology, V. 2, n° 3, (2007), 135-139.



63. Benzidane N., Charef N., Krache I., Baghiani A. and Arrar L., "In Vitro Bronchorelaxant Effects of *Capparis Spinosa* Aqueous Extracts on Rat Trachea", *Journal of Applied Pharmaceutical Science*, V. 3, n° 9, (2013), 85-88. DOI: 10.7324/JAPS.2013.3916
64. Zhou H., Jian R., Kang J., Huang X., Li Y., Zhuang C., Yang F., Zhang L., Fan X., Wu T., and Wu X., "Anti-inflammatory Effects of Caper (*Capparis spinosa* L.) Fruit Aqueous Extract and the Isolation of Main Phytochemicals", *J. Agric. Food Chem.*, V. 58, n° 24, (2010), 12717–12721.
65. Liu HG., Yang T., Cheng XM., and Wang CH., "Comparative evaluation of anti-inflammatory and analgesic activities of various medicinal parts of *Capparis spinosa*: a consideration of ecological environment and resource conservation", *Indian Journal of Pharmaceutical Science & Research*, V. 4, Issue 1, (2014), 53-59.
66. Arslan R., Bektas N. and Ozturk Y., "Antinociceptive activity of methanol extract of fruits of *Capparis ovata* in mice", *Journal of Ethnopharmacology*, V. 131, Issue 1, (2010), 28–32.
67. Meddour A., Yahia M., Benkiki N. et Ayachi A. "Etude de l'activité antioxydante et antibactérienne des extraits d'un ensemble des parties de la fleur du *Capparis spinosa* L", *Lebanese Science Journal*, V. 14, n° 1, (2013), 49-60.
68. Ibrahim Orooba M. S., "Evaluation of anti-bacterial activity of *Capparis spinosa* (Al-Kabara) and *Aloe vera* extracts against Isolates Bacterial Skin Wound Infections in -vitro and in-vivo", *Kufa Journal For Veterinary Medical Sciences*, V. 3, n° 2, (2012), 23-35.
69. Bonina F., Puglia C., Ventura D., Aquino R., Tortora S., Sacchi A., Saija A., Tomaino A., Pellegrino M. L. and de CAPRARIIS P., "In vitro antioxidant and in vivo photoprotective effects of a lyophilized extract of *Capparis spinosa* L. buds", *J. Cosmet. Sci.*, V. 53, (2002), 321-335.
70. Bouriche H., Karnouf N., Belhadj H., Dahamna S., Harzallah D. and Senator A., "Free Radical, Metal-chelating and Antibacterial Activities of Methonolic Extract of *Capparis Spinosa* buds", *Advances in Environmental Biology*, V. 5, n° 2, (2011), 281-287.

71. Trombetta D., Occhiuto F., Perri D., Puglia C., Santagati NA., De Pasquale A., Saija A. and Bonina F., "Antiallergic and antihistaminic effect of two extracts of *Capparis spinosa* L. flowering buds", *Phytother Res*, V. 19, n° 1, (2005), pp.29-33.
72. Arena A., Bisignano G., Pavone B., Tomaino A., Bonina F. P., Saija A., Cristani M., D'Arrigo M. and Trombetta D., "Antiviral and immunomodulatory effect of a lyophilized extract of *Capparis spinosa* L. buds", *Phytotherapy Research*, V. 22, Issue 3, (2008), 313–317.
73. Bhojar M. S., Mishra G. P., Naik P. K. and Srivastava R. B., "Estimation of antioxidant activity and total phenolics among natural populations of Caper (*Capparis spinosa*) leaves collected from cold arid desert of trans-Himalayas", *AJCS*, V. 5, n° 7, (2011), 912-919.
74. Mustafa A., "In Vitro Evaluation of *Capparis spinosa* against *Lumbricus terrestris* (Annelida)", *PUJ*, V. 5, n° 2, (2011), 199-202.
- 75- Baghiani A., Ameni D., Boumerfeg S., Adjadj M., Djarmouni M., Charef N., Khennouf S. and Arrar L., "Studies of Antioxidants and Xanthine Oxidase Inhibitory Potentials of Root and Aerial Parts of Medicinal Plant *Capparis Spinosa* L. ", *American Journal of Medicine and Medical Sciences*, V. 2, n° 1, (2012), 25-32.
76. Cao Y.L., Li X. and Zheng M., "Effect of *Capparis spinosa* on fibroblast proliferation and type I collagen production in progressive systemic sclerosis", *China Journal of Chinese Material Medical*, V. 33, n° 5, (2008), 560-563.
77. Kulisic-Bilusica T., Schmöller I., Schnäbele K., Siracusa L. and Ruberto G., "The anticarcinogenic potential of essential oil and aqueous infusion from caper (*Capparis spinosa* L.) ", *Food Chemistry*, V. 132, Issue 1, (2012), 261–267.
78. Boga C., Forlani L., Calienni R., Hindley T., Hochkoepler A., Tozzi S. and Zanna N., "On the antibacterial activity of roots of *Capparis spinosa* L.", *Natural Product Research: Formerly Natural Product Letters*, V. 25, Issue 4, (2011), 417-421.
79. Aghela N., Rashidib I. and Mombeinia A., "Hepatoprotective Activity of *Capparis spinosa* Root Bark against CCl<sub>4</sub> Induced Hepatic Damage in Mice", *Iranian Journal of Pharmaceutical Research*, V. 6, n° 4, (2007), 285-290.

80. Lam SK., Han Q.F. and Ng TB., "Isolation and characterization of a lectin with potentially exploitable activities from caper (*Capparis spinosa*) seeds", Bioscience Reports, V. 29, (200), 293–299. ISSN 1573-4935.
81. Attila A. and Ozcan M., "Some compositional characteristics of *Capparis* (*Capparis spp.*) seed oil", Grass Y.A. Ceite, V. 50, (1999), 42-52.
82. Matthäus B. and Özcan M., "Glucosinolates and Fatty Acid, Sterol, and Tocopherol Composition of Seed Oils from *Capparis spinosa* Var. *spinosa* and *Capparis ovata* Desf. Var. *canescens* (Coss.) Heywood" J. Agric. Food Chem., V. 53, n° 18, (2005), 7136–7141.
83. Yang T.C.H., Wang G.X., Chout W.U., Cheng X.M. and Wang Z.T., "New alkaloids from *Capparis spinosa*: Structure and X-ray crystallographic analysis", Food Chem., V. 123, (2010), 705-710.
84. Çalis I., Kuruüzüm A. and Rüedi P., "1H-Indole-3 acetonitrile glycosides from *C. spinosa* fruits", Phytochem., V. 50, (1999), 1205-1208.
85. Çalis I., Kuruuzum A., Lorenzetto PA. and Ruedi P., " (6S)-Hydroxy-3-oxo-ionol glucosides from *C. spinosa* fruits", Phytochem., V. 59, n° 4, (2002), 451-457.
86. Satyanarayana T., Anjana A., Mathews A. and Vijetha P., "Phytochemical and pharmacological review of some Indian *Capparis* species", (2008). In: Al-asady A. A. B., Khalil K. H. and Barwari S. S. M., 2012 "Cytotoxic and Cytogenetics Effects of Aqueous, Methanolic and Secondary Metabolites Extracts of *Capparis spinosa* on Tumor Cell Lines in vitro", JJBS, V. 5, n° 1, (2012), 15 – 30. ISSN 1995-6673.
87. AL-SOQEER A., "Antioxidant activity and biological evaluation of hot-water extract of *Artemisia monosperma* and *Capparis spinosa* against lead contamination", Research J. of Botany, V. 6, (2011), 11-20.
88. Rodrigo M., Lazaro M.J., Alvarruiz A. and Giner V., "Composition of Capers (*Capparis spinosa*): Influence of Cultivar, Size and Harvest Date", Journal of Food Science, V. 57, Issue 5, (1992), 1152–1154.

89. Musallam I., Duwayri M., Shibli R. and Alali F., "Investigation of Rutin Content in Different Plant Parts of Wild Caper (*Capparis spinosa* L.), Populations from Jordan", *Research Journal of Medicinal Plant*, V. 6, Issue 7, (2012), 27-36.
90. Sharaf M., El-Ansari M.A. and Saleh N.A.M., "Quercetin triglycoside from *Capparis spinosa*", *Fitoterapia*, V. 71, Issue 1, (2000), 46–49.
91. Al-Said MS., Abdelsattar EA., Khalifa SI. and El-Feraly FS., "Isolation and identification of an anti-inflammatory principle from *Capparis spinosa*", *Pharmazie*, V. 43, n° 9, (1998), 640-641.
92. Yu Y., Gao H., Tang Z., Song X. and Wu L., "Several Phenolic Acids from the Fruit of *Capparis spinosa*", *Asian Journal of Traditional Medicines*, V. 1, (2006), 3-4.
93. Carra A., Maurizio S., Abbate L., Siragusa M., Sottile F. and Carimi F., "In vitro plant regeneration of caper (*Capparis spinosa* L.) from floral explants and genetic stability of regenerants", *Plant Cell Tiss Organ Cult*, V. 109, (2012), 373–381. DOI 10.1007/s11240-011-0102-9.
94. Sozzi G. O. and Chiesa A., "Improvement of caper (*Capparis spinosa* L.) seed germination by breaking seed coat-induced dormancy", *Scientia Horticulturae*, V. 62, (1995), 255-261.
95. Pascual B., San Bautista A., Pascual Seva N., Garcia Molina R., López-Galarza S. and Maroto J. V., "Effects of soaking period and gibberellic acid addition on caper seed germination. *Seed Science and Technology*", V. 37, n° 1, (2009b), 33-41.
96. Bewley, J.D., Bradford, K., Hilhorst, H. and Nonogaki, H., "Seeds. Physiology of Development, Germination and Dormancy", Ed.: Springer, London, United Kingdom, (2013), 392 p.
97. Sozzi G. O. and Vicente A. R., "Capers and caperberries. Handbook of Herbs and Spices". Ed. CRC Press, V. 3, Chap. 19, (2006), 230 – 256.
98. Mohammad S. M., Kashani H. H. and Azarbad Z., "*Capparis spinosa* L. Propagation and Medicinal uses", *Life Science Journal*, V. 9, n° 4, (2012), 684-686.

99. Güteryüz M., Özkan G. and Ercisli S., "Caper (*Capparis spp.*) Growing Techniques and Economical Importance", 1st International Symposium on Sustainable Development, June 9-10 2009, Sarajevo.
- 100- Olmez, Z., Gokturk A. and Gulcu S., "Effects of Cold Stratification on Germination Rate and Percentage of Caper (*Capparis ovata* Desf.) Seeds", Journal of Environmental Biology, V. 27, n° 4, (2006), 667-670.
101. Dominguez Pizarro N., "Estudio para la mejora de la propagación sexual de la alcaparra (*Capparis spinosa* L.) ", Universidad politécnica de valencia. Tesina de máster, 54 p.
102. Suleiman M.K., Bhat N.R., Abdal M.S., Jacob S., Thomas R.R., Al-Dossery S. and V Bellen R., "Germination studies of *Capparis spinosa* L., Propagation of Ornamental Plants", V. 9, n° 1, (2009), 35-38.
103. Jain S.M. and Minocha S. C., "Molecular biology of Woody Plants. Kluwer Academic Publishers", V. 1, (2000), 315-339.
104. MARGARA J., "Bases de la multiplication végétative : les méristèmes et l'organogenèse", INRA, Paris, (1982), 262 p.
105. Pierik R. L. M., "In Vitro Culture of Higher Plants", (1987). In: ABU KHALAF G., "*Capparis spinosa* L. "Caper": In Vitro Cultures and Bioassay", Master of Science thesis, Palestine Polytechnic University, (2011), 81 p.
106. Zrýd J-P., "Cultures de cellules, tissus et organes végétaux", (1988). In : Vallata P., "Intérêt pharmaceutique du genre *Taxus* et des Taxanes ; culture in vitro et dosage", Thèse de doctorat, UNIVERSITÉ HENRI POINCARÉ - NANCY 1, France, (2009), p. 62.
107. Vallata P., "Intérêt pharmaceutique du genre *Taxus* et des Taxanes ; culture in vitro et dosage", Thèse de doctorat, UNIVERSITÉ HENRI POINCARÉ - NANCY 1, France, (2009), 106 p.
108. Ancora G. and Cuzzo L., "In vitro propagation of caper (*Capparis spinosa* L.)", (1984). In: Carra A., Maurizio S., Abbate L., Siragusa M., Sottile F. and Carimi F., "In vitro plant regeneration of caper (*Capparis spinosa* L.) from floral explants and

genetic stability of regenerants", *Plant Cell Tiss Organ Cult*, V. 109, (2012), 373–381. DOI 10.1007/s11240-011-0102-9.

109. Salem A. B., Zemni H. and Ghorbel A., "Propagation of caper (*Capparis spinosa* L.) by herbaceous cuttings and in vitro culture", *Agric Med*, V. 31, (2001), 42–48.

110. Chalak L., Elbitar A., Cordahi N., Hage C. and Chehade A., "In vitro propagation of *Capparis spinosa* L.", *Acta Horticulturae*, V. 616, (2003), 335–338.

111. Caglar C., Caglar S., Ergin O. and Yarim M., "The influence of growth regulators on shoot proliferation and rooting of in vitro propagated caper", *J Environ Biol*, V. 26, (2005), 479–485.

112. Chalak L. and Elbitar A., "Micropropagation of *Capparis spinosa* L. subsp. *Rupestris* Sibth. & Sm. by nodal cuttings", *Indian J Biotech*, V. 5, (2006), 555–558.

113. Carra A., Del Signore M. B., Sottile F., Ricci A. and Carimi F., "Potential use of new diphenylurea derivatives in micropropagation of *Capparis spinosa* L." *Plant Growth Regulation*, V. 66, Issue 3, (2011), 229–237. doi: 10.1007/s10725-011-9645-3.

114. Tomassoli L., Di Lernia G., Tiberini A., Chiota G., Catenaro E. and Barba M., "In vitro thermotherapy and shoot-tip culture to eliminate Caper latent virus in *Capparis spinosa*", *Phytopathol. Mediterr.*, V. 47, (2008), 115–121.

115. Chawla H.S., "Introduction to Plant Biotechnology", 2nd ed. USA: Science publishers, (2007).

116. Dia A., Duponnois R., "Le projet majeur africain de la grande muraille verte : Concepts et mise en œuvre", IRD, Sénégal, (2012), Pp. 437.

117. Chaouche F-Z. et Abdul Hussain M. S., 2008 "Callogenèse de l'*Atriplex halimus* a partir de différents explants, en vue d'une régénération", *Agricultura – StiinŃă si practică*, n° 1-2, (2008), p65-66.

118. Jain S.M., Brar D.S. and Ahloowalia B.S., "Somaclonal Variation and Induced Mutations in Crop Improvement", Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, (1998).

119. Karp A., "Somaclonal variation as a tool for crop improvement", *Euphytica*, V. 85, (1995), 295-302.
120. Briskin, D. P., "Biotechnological Methods for Selection of High-Yielding Cell Lines and Production of Secondary Metabolites in Medicinal Plants", (2007). In: ABU KHALAF G., "*Capparis spinosa* L. "Caper": In Vitro Cultures and Bioassay", Master of Science thesis, Palestine Polytechnic University, (2011), page 8.
121. Bansal P. B. ED., "Potentials of Plant Biotechnology. New Delhi: Gene-Tech Books", (2006). In ABU KHALAF G., "*Capparis spinosa* L. "Caper": In Vitro Cultures and Bioassay", Master of Science thesis, Palestine Polytechnic University, (2011), p. 9.
122. Murashige T. and Skoog F., "A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures", *Physiol. Plant*, V. 15, (1962), 473-479.
123. Gamborg OL., Miller RA. and Ojima K., "Nutrient requirements of suspension culture of soybean root cells", *Ex. Cell. Res.*, V. 50, (1968), 15-158.
124. Lloyd G. and Mccown H., 1981 "Commercially-feasible micropropagation of Mountain Laurel, *Kalmia latifolia*, by shoot tip culture", *Proc. Int. Plant Prop. Soc.*, V. 30, (1981), 421-427.
125. Spencer Lopes M. M., "Plasticité morphogénétique des ébauches racinaires adventives préformées sur la tige de *Sesbania rostrata* Brem. (Leguminosae) ", Thèse de doctorat 3<sup>ème</sup> cycle, Université CHEIKH ANTA DIOP, Dakar, (1987), 146 p.
126. Bentabet N., Boucherit-Otmani Z. and Boucherit K., 2014 "Composition chimique et activité antioxydante d'extraits organiques des racines de *Fredolia aretioides* de la région de Béchar en Algérie", *Phytothérapie*, Springer-Verlag, France, (2014), p. 1-8.
127. Boizot N. et Charpentier J., "Méthode rapide d'évaluation du contenu en composés phénoliques des oranges d'un arbre forestier. Méthodes et outils pour l'observation et l'évaluation des milieux forestiers, prairiaux et aquatiques", INRA, (2006), 79–82.



128. Vermerius W. and Nicholson R., "Phenolic compound biochemistry", Springer, Dordrecht, (2006), 257p. ISBN:101-4020-5163-8.
129. Debergh P.C. and Maene L.J., "A schemes for commercial propagation of ornamental plants by tissue culture", *Scientia Hortic.*, V. 14, n° 4, (1981), 335-345.
130. Souayah N., Khouja M.L., Rejeb M.N. and Bouzid S., "Micropropagation d'un arbuste sylvo-pastoral, *Atriplex halimus* L. (Chénopodiacées). In : Ferchichi A. (comp.), Ferchichi A. (collab.) Réhabilitation des pâturages et des parcours en milieux méditerranéens", *Cahiers Options Méditerranéennes*, Zaragoza : CIHEAM, n° 62, (2004), 131 -135.
131. Dun E. A., Ferguson B. J. and Beveridge C. A., "Apical Dominance and Shoot Branching. Divergent Opinions or Divergent Mechanisms?", *Plant Physiology*, V. 142, (2006), 812–819, [www.plantphysiol.org](http://www.plantphysiol.org)
132. King RA. And Van Staden J., "Differential responses of buds along the shoot of *Pisum sativum* to isopentyladenine and zeatin application", *Plant Physiol Biochem*, V. 26, (1988), 253–259.
133. Morris DA., "Transport of exogenous auxin in two-branched dwarf pea seedlings (*Pisum sativum* L.)", *Planta*, V. 136, (1977), 91–96.
134. Beveridge C.A., Weller J.L., Singer S.R. and Hofer J.M.I., "Axillary meristem development: Budding relationships between networks controlling flowering, branching, and photoperiod responsiveness", *Plant Physiol.*, V. 131, (2003), 927–934.
135. Tian XX., Jiang CQ., Chen XY. QU S. and Yang WS., "Studies on the Tissue Culture of Axillary Bud and Rapid Propagation in the *Capparis spinosa*". Beijing, V. 22, n° 4, (2009), 521-525.
136. Minocha R. and Jain S. M., "Tissue Culture of Woody Plants and Its Relevance to Molecular Biology", *Molecular Biology of Woody Plants Forestry Sciences*, V. 64, (2000), 315-339.
137. George E.F., "Plant propagation tissue culture. Part I. The technology". (1993). In: Pattar P. V., Jayaraj M., "Rapid callogenesis and plant regeneration from nodal

explants of *Sida cordifolia* L.- an important medicinal plant”, Journal of Phytology, V. 4, n° 3, (2012), 40-44 ISSN: 2075-6240. <http://journal-phytology.com/>

138. George, E.F., Hall M.A. and DE Klerk. G.J., “Plant propagation by tissue culture”, 3rd Ed., The background. Springer Verlag, Dordrecht, The Netherlands, V. 1, (2008), 501p.

139. Standardi A. and Mechelini M., “Control of vitrification in proliferating shoots of M26”, Acta Horticulturae, V. 227, (1988), 425-427.

140. Ziv M., Schwartz A. and Devorah F., “Malfunctioning stomata in vitrous leaves of cornation (*Dianthus coryophyllus*) plant propagated in vitro: Implications for hardening”, Plant science, V. 52, (1987), 127-134.

141. Safrazbekyan S. A., Kataeva N. V. and Milyaeva E. L., “Morphophysiological characteristics of caper (*Capparis spinosa* L.) shoots during clonal micropropagation”, Soviet Plant Physiology, V. 37, n° 1, (1990), 130-136.

142. Pattar P. V. and Jayaraj M., “Rapid callogenesis and plant regeneration from nodal explants of *Sida cordifolia* L.- an important medicinal plant”, Journal of Phytology, V. 4, n° 3, (2012), 40-44. ISSN: 2075-6240. <http://journal-phytology.com/>

143. Sivanesen I. and Byoung R., “Direct Shoot regeneration from nodal explants of *Sida cordifolia* L”, In vitro Cell.Dev.Biol-Plant, V. 43, (2007), 436-441.

144. Rout GR. and Das P., “In vitro organogenesis in ginger (*Zingiber officinale* Rosc.)”, J. Herbs Spices Med. Plants, V. 4, (1997), 41-51.

145. Yadav R. K., Perales M., Gruel J., Ohno C., Heisler M., Girke T., Jönsson H. and Reddy G. V., “Plant stem cell maintenance involves direct transcriptional repression of differentiation program”. Mol Syst Biol., V. 9, (2013), 654 p.

146. Schuster C., Gaillochot C., Medzihradsky A., Busch W., Daum G., Krebs M., Kehle A. and Lohmann JU., DEV, “A regulatory framework for shoot stem cell control integrating metabolic, transcriptional, and phytohormone signals”. Cell, V. 28, n° 4, (2014), 438-49.

147. Lineberger R. D., “Tissue culture of woody plants”, The Buckeye Nurseryman. Columbus, OH, (1980). Consulté en ligne : <http://aggie->

horticulture.tamu.edu/earthkind/landscape/plant-propagation/tissue-culture-of-woody-plants/

148. Skoog, F., and Miller, C.O. "Chemical regulation of growth and organ formation in plant tissue cultures in vitro". Symp. Soc. Exp. Biol., V. 11, (1957), 118–131.

149- Martin K., "Rapid propagation of *Holostemma ada-kodien* Schult., a rare medicinal plant, through axillary bud multiplication and indirect organogenesis", Plant Cell Reports, V. 21, Issue 2, (2002), 112-117.

150. Daffalla H., Abdellatef E., Elhadi EA. and Khalafalla M., "Effect of Growth Regulators on In Vitro Morphogenic Response of *Boscia senegalensis* (Pers.) Lam. Poir. Using Mature Zygotic Embryos Explants" Biotechnology Research International, V. 2011, (2011), Article ID 710758, 8 p.

<http://dx.doi.org/10.4061/2011/710758>

151. Abbas H. and Qaiser M., "In vitro conservation of *Cadaba heterotricha* stocks, an endangered species in Pakistan". Pak. J. Bot., V. 42, n° 3, (2010), 1553-1559.

152. Zaid S. H., "A study on in vitro micropropagation of Caper (*Capparis spinosa* L.) using tissue culture techniques", مجلة جامعة دمشق للعلوم الأساسية, V. 28, n° 1, (2012), 143-154.

153. Abu Khalaf G., "*Capparis spinosa* L. "Caper": In Vitro Cultures and Bioassay", Master of Science thesis, Palestine Polytechnic University, (2011), 81 p.

154. Nordström AN. and Eliasson L., "Uptake and translocation of [14C]-labelled benzylaminopurine in apple shoots grown in vitro in relation to shoot development. Physiologia Plantarum", V. 68, Issue 3, (1986), 431–435. DOI: 10.1111/j.1399-3054.1986.tb03377.x.

155. Christison M.L. and Warnick D.A., "Organogenesis in vitro as a developmental process", Hort. Sci., V. 23, (1988), 115–119.

156. Margara J., "Étude des facteurs de la néoformation de bourgeons en culture in vitro chez le chou-fleur (*Brassica oleracea* L. var. *botrytis*)". Ann. Physiol. Veg., V. 11, (1969a) 95-112.

157. Gan L., Zhang C., Yin Y., Lin Z., Huang Y., Xiang J., Fu C. and Li M., "Anatomical Adaptations of the Xerophilous Medicinal Plant, *Capparis spinosa*, to Drought Conditions". Hort. Environ. Biotechnol., V. 54, n° 2, (2013), 156-161. DOI 10.1007/s13580-013-0162-3
158. Rhizopoulou S., Psaras G. K., "Development and structure of drought-tolerant leaves of shrub Mediterranean *Capparis spinosa* L.", Annals of botany, V. 92, (2003), 377-383.
159. Levizou E., Drilias P., Kyparissis A., "Exceptional photosynthetic performance of *Capparis spinosa* L. under adverse conditions of Mediterranean summer", Photosynthetica, V. 42, (2004), 229-235.
160. Rotondi A., Rossi F., Asunits C. and Cesaraccio C., "Leaf xeromorphic adaptations of some plants of a coastal Mediterranean macchia ecosystem", J. Mediterranean Ecol., V. 3, (2003), 25-35.
161. Stephanou M. and Manetas Y., "The effect of season, exposure, enhanced UV-B radiation, and water stress on leaf epicuticular and internal UV-B absorbing capacity of *Cistus creticus*: A mediterranean field study" J. Expt. Bot., V. 48, (1997), 1977-1985.
162. Debergh P., Harbaoui, R. and Lemeur R., "Mass propagation of glove artichoke (*Cynara scolymus*): evaluation of different hypotheses to overcome vitrification with special reference to water potential", Physiol. Plant., V. 53, (1981), 181-187.
163. ZIV M., MEIR G. and HALEVY A. H., "Factors influencing the production of hardened glaucous carnation plantlets in vitro". Plant Cell Tissue and Organ Cult. V. 2, (1983), 55-60.
164. Vieitez A.M., Balléster A., San-Jose M.C. and Vieitez, E., "Anatomic and chemical studies of vitrified shoots of chestnut regenerated in vitro" Physiol. Plant. V. 65, (1985), 177-184.
165. Fauguel C.M., Vega T.A., Nestares G., Zorzoli, R. and Picardi L.A., "Anatomy of normal and hyperhydric sunflower shoots regenerated in vitro", HELIA, V. 31, n° 48, (2008), 17-26. DOI: 10.2298/HEL0848017F.

166. Pâques M. and Boxus P., "A model to learn "vitrification", the rootstock apple M.26 present results", *Acta Hort*, V. 212, (1987b), 193-210.
167. Apóstolo N. and Llorente B., "Anatomy of normal and hyperhydric leaves and shoots of in vitro grown *Simmondsia chinensis* (link) Schn", *In vitro cell. dev. Biol. Plant*, V. 36, (2000), 243-249.
168. Ziv M., "Vitrification: morphological and physiological disorders of in vitro plants", (1991). In: Debergh, P.C., Zimmerman, R.H. (ed.): "Micropropagation: Technology and Application", Kluwer Academic, Dordrecht, 49-69.
169. Gautheret R.J., "La culture des tissus végétaux. Techniques et réalisation", Ed. Masson et Cie, Paris, (1959), 849 p.
170. Boxus P., Bercetche J., Bollon H., Ducos J. P., Jemmali A., Pâques M., Petiard V. and Pieron S., "Multiplication végétative : micropropagation et embryogenèse somatique in biotechnologie végétales", Ed. CNED, AUPELF-UREF, (1995), 191 p.
171. Sané D., Aberlenc-Bertossi F., Gassama-Dia Y. K., Sanga M., Trouslot M. F., Duval Y. and Borgel A., "Histological analysis of callogenesis and somatic embryogenesis from cell suspensions of date palm (*Phoenix dactylifera* L.)", *Annals of Boyany*, V. 98, n° 2, (2006), 301-308.
172. Gueye B., Herve J., Sané D., Borgel A., Aberlenc-Bertossi F., Verdail J. and L., "Les cellules végétales compétentes à se réactiver constituent des cibles privilégiées du 2,4 D", AUF Rennes, (2008).
173. Ighilhariz Henna Z., "Contribution à la valorisation d' *Artiplex Halimus* L. et *Artiplex canescens* (Purch) Nutt par la culture des tissus", Thèse de doctorat, Université Es-senia, Oran, (2008), 143 p.
174. Santos K., Mariath J., Moço M. and Bodanese-Zanettini M., "Somatic embryogenesis from immature cotyledons of soybean (*Glycine max* L. Merr.): Ontogeny of somatic embryos", *Brazilian Archives of Biology and Technology*, V. 49, n° 1, (2006), 49-55.
175. Haensch K. T., "Influence of 2,4 D and BAP on callus growth and the subsequent regeneration of somatic embryo in long-term culture of *Pelargonium X*

domesticum cv. Madame layal”, *Electronic Journal of Biotechnology*, V. 10, n° 1, (2007), 69-77.

176. Shang H. H., Liu C. L., Zhang C. J., Li F. L., Hong W. D. and Li F. G., “Histological and Ultrastructural Observation Reveals Significant Cellular Differences between *Agrobacterium* Transformed Embryogenic and Non-embryogenic Calli of Cotton”. *Journal of Integrative Plant Biology*, (2009), 1-10 p.

177. Afshari, R. T., Angoshtari, R. and Kalantari, S., “Effects of Light and Different Plant Growth Regulators on Induction of Callus Growth in Rapeseed (*Brassica Napus* L.) Genotypes”, *Plant Omics Journal*, V. 4, n° 2, (2011), 60-67.

178. Wang Y., Gan L., Liu W., Yu L. and Li M., “Research on the Callus Induction and the Cell Growth and Metabolism Characteristics of *Capparis spinosa* L.”, *Progress in Modern Biomedicine*, V. 9, n° 8, (2009), 1453- 458.

179. Anburaj, J., Ravinder Singh, C., Kuberan, T., Sundaravadivelan, C. and Kumar, P., “Effects of Plant Growth Regulators on Callus Induction from Leaf Explants of *Cleome viscosa*”, *Research Journal of Pharmaceutical, Biological and Chemical Sciences (RJPBCS)*, V. 2, n° 2, (2011), 576-583.

180. Touaibia M. and Chaouch F., “Pouvoir antioxydant des extraits de *Myrtus communis* L. obtenus in situ et in vitro”, *Nature & Technologie*, n° 10, (2014), 3-8.

181. Ben Mansour R., Ben Haj Jilani I., Bouaziz M., Gargouri B., Elloumi N., Attia H., Ghrabi-Gammar Z. and Lassoued S., 2014 “Phenolic contents and antioxidant activity of ethanolic extract of *Capparis spinosa*”, *Cytotechnology*, DOI 10.1007/s10616-014-9764-6.

182. Germano• M. P., De Pasquale R., D’angelo V., Catania S., Silvari V. and COSTA C., “Evaluation of Extracts and Isolated Fraction from *Capparis spinosa* L. Buds as an Antioxidant Source”, *J. Agric. Food Chem*, V. 50, (2002), 1168-1171.

183. Tesoriere L., Butera D., Gentile C. and Livrea M. A., “Bioactive Components of Caper (*Capparis spinosa* L.) from Sicily and Antioxidant Effects in a Red Meat Simulated Gastric Digestion”, *J. Agric. Food Chem*, V. 55, (2007), 8465–8471.

184. Aliyazicioglu R., Eyupoglu O. E., Sahin H., Yildiz O. and Baltas N., "Phenolic components, antioxidant activity, and mineral analysis of *Capparis spinosa* L." *African Journal of Biotechnology*, V. 12, n° 47, (2013), 6643-6649. DOI: 10.5897/AJB2013.13241.
185. Ebrahimi N.S., Hadian J., Mirjalili M.H., Sonboli A. and Yousefzadi M., "Essential oil composition and antimicrobial activity of *Thymus caramanicus* at different phenological stages", *Food chemistry*, V. 110, (2008), 927-931.
186. Miliauskas. G., Venskutonis P.R., and Van Beek T.A. "Screening of radical scavenging activity of some medicinal and aromatic plant extract", *Food chemistry*., V. 85, (2004), 231-237.
187. Lee K.W., Kim Y.J., Lee H.J., and Lee C.Y., "Cocoa has more phenolic phytochemicals and a higher antioxidant capacity than teas and red wine", *Food chemistry*, V. 51, (2003), 7292-7295.
188. Tim T. P. C., and Lamb A. J., "Antimicrobial activity of flavonoids", *International journal of antimicrobial agents*, V. 26, (2005), 343-356.