

UNIVERSITE DE SAAD DAHLAB DE BLIDA

Faculté des Sciences Agro Vétérinaire et Biologiques
Département de Biologie

MEMOIRE DE MAGISTER

Spécialité : Biotechnologies Végétales

**ESSAI DE CULTURE IN VITRO DE GRAINES DE
Cassia obovata ET ETUDE DE L'EFFET DE STRESS SALIN
ET THERMIQUE SUR LA BIOSYNTHESE DE MOLECULES
ACTIVES**

Par

MOUSSA Sabrina

Devant le jury composé de

Dr HAMAIDI M.S	MCA USDB	Président
Dr CHAOUIA C	MCB USDB	Examinatrice
Dr CHAOUCH F.Z	MCA USDB	Examinatrice
Mme SAIDI F	Professeur USDB	Promotrice
Mr ROUIBI A	MAA USDB	Co promoteur

Blida : Octobre 2011

RESUME

Le présent travail a porté sur l'étude des viroplants issus de la culture in vitro des graines d'une espèce de séné algérien (*Cassia obovata*), cette étude porte sur la biosynthèse des molécules actives dans les différents explants ainsi que l'essai de callogenèse à partir de ces explants, enfin nous avons essayé de faire une étude de l'effet des stress salin et thermique sur le développement de ces cals ainsi que sur la biosynthèse des sennosides dans ces cals.

Une étude statistique nous a été indispensable pour l'interprétation des résultats obtenus.

Le dosage des sennosides dans les viroplants cultivé sur milieu MS a montré que la teneur de ces molécules est variable selon l'origine de l'explant. L'étude statistique révèle que la quantité du sennoside B synthétisé change dans les trois explants durant trois mois de culture.

L'étude de l'effet de la combinaison hormonale sur la callogénèse révèle que l'addition de 1 mg de 2,4 D +1 mg de kinétine dans le milieu de culture donne la meilleure callogenèse ainsi qu'une bonne croissance des cals obtenus.

La teneur en sennosides semble la plus élevée dans les cals issus des explants foliaires, elle est cependant moyenne à faible dans les cals racinaires et caulinaires.

L'effet du stress salin sur la biomasse des cals a montré une diminution très importante de la biomasse sèche dans le milieu contenant 1,5 % de NaCl.

Concernant la biosynthèse des molécules actives dans ces conditions notre étude a montré que qu'elle est meilleure pour une concentration de 0,5% de NaCl dans le milieu de culture, cependant elle diminue à partir d'une concentration de 1% de NaCl.

Enfin le dosage des molécules actives dans les viroplants et les cals soumis au stress thermique montre que le sennoside B est majoritaire et que sa teneur varie selon le type d'organe.

La biosynthèse des sennosides est meilleure dans les feuilles comparativement aux racines et aux tiges pour les viroplants, concernant les cals elle est plus faible dans les cals caulinaires.

Mots clefs : *Cassia obovata*, culture in vitro, callogénèse, sennosides, stress salin, stress thermique

ABSTRACT

This work focused on the study of viroplants from in vitro culture of seeds of an Algerian Senna specie(*Cassia obovata*).

this study examines the biosynthesis of active molecules in different explants and the testing of a callus from these explants, we finally tried to make a study the effect of salt stress and heat on development of callus and on the biosynthesis sennosides in these callus.

A statistical study has been essential to interpretation of results.

The determination of sennosides in vitro plants grown on MS medium showed that the content of these molecules is variable and depending on the origin of the explant.

The statistical study reveals that the amount of sennosides B synthesized in exchange for three explants during three months of culture.

The study of the effect of the combination hormone on callogenesis reveals that the addition of 1 mg of 2,4-D + 1 mg kinetin in the culture medium gives the best callus and a good callus growth obtained.

Sennosides content appears highest in callus from leaf explants, it is nevertheless average low in root and shoot callus.

The effect of salt stress on callus biomass showed a substantial reduction in dry biomass medium containing 1.5% NaCl.

On the biosynthesis of active molecules in these conditions our study has shown that it is better for a concentration of 0.5% NaCl in the medium culture, however it has decreased from a concentration of 1% NaCl.

Finally the determination of the active molecules in plantlets and calli subjected to heat stress shows that the majority sennoside B and its content varies by type of organ.

The biosynthesis of sennosides is better in leaves compared to roots and stems to the plantlets, callus on it is lower in stem callus.

Keywords: *Cassia obovata*, in vitro culture, callogenesis, sennosides, salt stress, heat stress

Dédicaces

Je dédie ce mémoire,

À mes chers parents que dieu vous protège,

À mon cher mari pour son soutien au quotidien,

À mon petit ange Racim,

À ma sœur Ouafa, son mari Naquib et à mon adorable neveu Yaniss,

À ma petite sœur Amira,

À mon oncle Noreddine pour sa disponibilité et son aide précieuse,

À mon amie Farida,

À tous mes collègues de travail,

À tous ceux qui ont contribué à la réalisation de ce travail.

Sabrina.

REMERCIEMENTS

Je tiens exprimer ma profonde reconnaissance à ma promotrice Mme SAIDI F , pour tout ce qu'elle a fait a fin que ce mémoire soit réalisé et je la remercie vivement d'avoir bien voulu le diriger , ainsi qu'à mon Co promoteur Mr ROUIBI A pour sa disponibilité et son aide.

J'exprime mes sincères remerciements à Mr HAMAIDI qui nous a fait l'honneur de présider le jury.

A Mme CHAOUCH et Mme CHAOUIA d'avoir accepter d'examiner ce travail.

Mes remerciements les plus sincères sont pour Mr BRAHIM ERRAHMANI pour son aide précieuse sans laquelle ce travail n'aurait pas pu être achevé, je le remercie également pour ces encouragements, son extrême bonté et sa disponibilité.

Je tiens également a remercier Mr CHELHA directeur de l'ENARP de Bab Ezzouar pour avoir bien voulu m'accueillir au sein de son entreprise .ainsi qu'a tout le personnel pour leurs collaboration et conseils.

J'exprime mon infinie gratitude à l'ensemble des enseignants qui ont contribué à notre formation.

Enfin pour les ingénieurs des laboratoires de recherche de biologie végétale du département de biologie.

LISTE DES ILLUSTRATIONS . GRAPHIQUES ET TABLEAUX

Figure 1.1	plante de <i>Cassia obovata</i>	22
Figure 1.2	gousse de <i>Cassia Obovata</i>	22
Figure 1.3	Feuilles de <i>Cassia obovata</i>	23
Figure 1.4	fleurs de <i>Cassia obovata</i>	23
Figure 1.5	structure chimique des sennosides A et B	29
Figure 1.6	Représentation de la molécule D'AIA	40
Figure 1.7	Représentation de deux autres auxines	40
Figure 1.8	Quelques exemples de cytokinines	42
Figure 1.9	Formule de quelques gibbérellines.	44
Figure 3.1	Photo de vitroplants	60
Figure 3.2	photo de vitroplants	60
Figure 3.3	concentration du sennoside B durant les trois mois	61
Figure 3.4	Concentration du sennoside B dans le vitroplant	62
Figure 3.5	Cals issus de tiges	64
Figure 3.6	Cals issus de racines	64
Figure 3.7	Cals issus de feuilles	64
Figure 3.8	Biomasse (poids frais en g) des cals en fonction de la combinaison hormonale	66
Figure 3.9	Biomasse (poids sec en g) des cals en fonction de la combinaison hormonale	67
Figure 3.10	Effet de la combinaison hormonale sur la biosynthèse des sennosides	70
Figure 3.11	Effet de la combinaison hormonale sur la biosynthèse des sennosides	70

Figure 3.12	Poids moyen des sennosides en fonction de la combinaison hormonale et du type de cals.	73
Figure 3.13	Moyenne de poids des sennosides en fonction de la combinaison hormonale	73
Figure 3.14	Cals soumis au stress salin pendant 01 mois	76
Figure 3.15	Cals soumis au stress salin pendant 02 mois	76
Figure 3.16	Cals soumis au stress salin pendant 03 mois	76
Figure 3.17	Effet du stress salin (en % de NaCl) sur le poids frais des cals (feuille, tiges ou racines)	78
Figure 3.18	Effet du stress salin (en % de NaCl) sur le poids sec des cals (feuilles, tiges ou racines)	80
Figure 3.19	Poids sec des feuilles	83
Figure 3.20	Poids frais des feuilles	83
Figure 3.21	Pourcentage de poids sec/poids frais le 1^{er} mois en fonction du stress salin	84
Figure 3.22	Biosynthèse du sennoside B en fonction du stress salin et du type de cal	87
Figure 3.23	Biomasse du sennoside B en fonction du stress salin	90
Figure 3.24	Cals soumis à un stress thermique pendant 01 mois	91
Figure 3.25	Cals soumis à un stress thermique pendant 02 mois	91
Figure 3.26	Teneur en sennosides B dans les différents parties des vitroplants avec et sans stress	93
Figure 3.27	Teneur en sennoside B dans les différents types de cals avec et sans stress thermique	96

Tableau 1.1	Interprétation de l'évolution des sciences et techniques en matière	
	20	
	de recherche de médicaments ou substances actives d'origine naturelle	
Tableau 3.1	Pourcentage de la callogenèse	63
Tableau 3.2	Les poids moyen des cals	65
Tableau 3.3	Résultats du test d'ANOVA	65
Tableau 3.4	Poids frais des racines	68
Tableau 3.5	Poids sec des racines	68
Tableau 3.6	Poids moyen des sennosides	71
Tableau 3.7	Test de Student-Newman-Keuls	85
Tableau 3.8	Test de Student-Newman-Keuls	86
Tableau 3.9	Test de Student-Newman-Keuls	86
Tableau 3.10	Poids moyen du sennoside B avec stress	94
Tableau 3.11	Poids moyen du sennoside B sans stress	94
Tableau 3.12	Test SNK et TURKEY	97
Tableau 3.13	Test SNK et TURKEY	98
Tableau 3.14	T-TEST	98
Tableau 3.15	Poids moyen avec stress	99
Tableau 3.16	Poids moyen sans stress	99

TABLE DES MATIERES

Introduction	12
ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE	
1.1. La phytothérapie	14
1.2. Les plantes médicinales.....	14
1.2.1. Historique	14
1.2.2. Importance de l'utilisation des plantes médicinales.....	15
1.2.3. Avantages des remèdes naturels	15
1.2.4. L'utilisation des plantes médicinales.....	16
1.2.4.1. Tisane.....	16
1.2.4.2. Infusion et décoction.....	16
1.2.4.3. Les huiles essentielles.....	17
1.2.5. Précautions dans l'utilisation des plantes médicinales.....	17
1.2.6. Prévention des interactions.....	17
1.3. Les plantes médicinales et la biotechnologie.....	18
1.2. Etude botanique du séné.....	21
1.2.1. Description et systématique de la plante	21
1.2.1.1. Description botanique de l'espèce étudiée.....	21
1.2. Systématique du séné	24
1.2.2. Répartition géographique du séné	25
1.2.2.1. Dans le monde	25
1.2.2.2. En Algérie.....	25
1.2.3. Propriétés générales du séné	26
1.2.3.1. Propriétés pharmacologiques	26
1.2.3.2. Mécanisme d'action.....	26
1.2.3.3. Formes d'utilisations	27
1.2.3.4. Tolérance	28
1.2.3.5. Effets indésirables.....	28
1.2.3.6. Contre- indications	28
1.2.4. Composition chimique du séné.....	28
1.2.4.1. Les sennosides.....	29
1.3. Culture in vitro	31
1.3.1. Considérations générales sur la culture in vitro.....	31
1.3.1.1. Définition de la culture in vitro.....	31
1.3.1.2. Techniques de culture in vitro.....	32
1.3.2.2. Intérêts et applications de la culture in vitro.....	33
1.3.2.3. Avantages de la culture in vitro.....	34
1.3.2.4. Limites de la culture in vitro.....	34
1.3.3. Facteurs influençant la culture in vitro.....	34
1.3.3.1. Conditions extrinsèques	35
1.3.3.1.2. Environnement.....	35
1.3.3.1.3. Température	35
1.3.3.1.4. Lumière	

1.3.3.1.5. Potentiel hydrique	36
1.3.3.1.6. Echanges gazeux	36
1.3.3.1.7. Milieu de culture	36
1.3.3.1.7.1. Composition minérale du milieu	38
1.3.3.1.7.1.1. Oligoéléments	38
1.3.3.1.7.1.2. Macroélément	39
1.3.3.1.7.1.3. Les régulateurs de croissance	39
1.3.3.1.7.1.3.1. La notion d'hormone chez les végétaux.....	39
1.3.3.1.7.1.3.2. Les auxines.....	40
1.3.3.1.7.1.3.3. Les cytokinines.....	41
1.3.3.1.7.1.3.4. Les gibberrillines.....	42
1.3.3.1.7.4. Source de carbone	46
1.3.3.2. Conditions intrinsèques	46
1.3.3.2.1. Type d'explant	46
1.3.3.2.2. Age physiologique de l'explant	46
1.3.3.2.3. Epoque de prélèvement	47
1.3.3.2.4. Génotype.....	47
1.4. Le stress salin	47
1.4.1 Définition du stress	48
1.4.2 Application du stress	48
1.4.3 Le stress salin	49
1.4.3.1 Les végétaux face au stress salin	49
1.4.3.1.1 Assurer son apport d'eau sans s'intoxiquer.....	49
1.4.3.2 Perturbations physiologiques	51
1.4.4. Le stress thermique	51
1.4.4.1 Les végétaux face au stress thermique.....	51
1.4.4.1.1 Hautes températures.....	51
1.4.4.1.2 Basses températures	52
 MATÉRIEL ET METHODES.....	 53
2.1. Matériel	53
2.1.1 Matériel et réactifs	53
2.1.2 Matériel végétal	53
2.2.1.1 Scarification chimique	54
2.2.1.2 Désinfection	54
2.2. Méthodes.....	54
2.2.1. Culture in vitro des graines de séné.....	54
2.2.2 Essais d'embryogenèse somatique	54
2.2.2.1. Matériel végétal	55
2.2.2.2. Milieu de culture	55
2.2.2.3. Repiquage des explants	55
2.2.3 L'effet du stress salin sur la biosynthèse des molécules actives	56
2.2.3.1. Milieu de culture	56
2.2.3.2. Repiquage des cals	56
2.2.4 .Effet de stress thermique sur la biosynthèse des molécules actives (vitroplants et cals)	57
2.2.5 Biosynthèse des sennosides	57
2.2.5.1. Spectrophotométrie	57
2.2.5.2. Méthode de dosage des sennosides.....	57
2.2.6. Etude statistique des résultats	58

RESULTATS ET DISCUSSION.....	59
3.1. Dosage des sennosides dans les différents organes vitroplants cultivés pendant trois mois.....	59
3.2 Etude de l'effet de la combinaison hormonale	63
3.2.1 Effet de la combinaison hormonale sur l'induction de la callogénèse.....	63
3.2.2.Effet de la combinaison hormonale sur la biomasse des cals	65
3.2.2.1.Cals issus des explants foliaires	67
3.2.2.2.Cals issus des explants caulinaire.....	67
3.2.2.3.Cals issus des explants racinaires	68
3.2.3.L'effet de la combinaison hormonale sur la biosynthèse des sennosides dans les cals issus des explants racinaires, caulinaires et foliaire.....	69
3.3 Etude de l'effet du stress salin sur la biomasse des cals	75
3.3.1.1 sur le poids frais.....	77
3.3.1.2 sur le poids sec.....	79
3.3.2Effet du stress salin sur la biosynthèse des sennosides dans les cals issus des différents explants et cultivés in vitro pendant 3 mois.....	85
3.3.2.1.Cals issus des explants Foliaires	85
3.3.2.2. Cals issus des explants caulinaires.....	86
3.3.2.3. Cals issus des explants racinaires	86
3.4. Etude de L'effet du stress thermique sur la biosynthèse des sennosides.....	91
3.4.1.1L'effet du stress thermique sur la biosynthèse des sennosides dans les différentes parties des vitroplants pendant trois mois	92
3.4.1.2.L'effet du stress thermique sur la biosynthèse des sennosides chez les cals issus des différents explants et cultivées in vitro pendant 3 mois.....	95
CONCLUSION.....	100

INTRODUCTION

L'utilisation des plantes médicinales dans le traitement des maladies est la plus ancienne des thérapeutiques qui soit .En effet, depuis la nuit des temps les hommes confrontés à la maladie, ont cherché à y porter remède avec les moyens dont ils disposaient dans leur environnement : les végétaux. Au fil des millénaires, ils ont accumulé une somme considérable de connaissances empiriques sur leurs bénéfiques vertus [1].

Depuis quelques décennies, de plus en plus de personne prennent conscience des vertus de ces plantes. La médecine traditionnelle s'est répandue partout dans le monde en gagnant en popularité non seulement les pays en développement, mais aussi ceux où la bio-médecine occupe une grande place dans le système de santé [2].

Partout dans le monde, on fait appel à la médecine traditionnelle, mais ce sont surtout les pays en développement qui y ont recours [3].

Aujourd'hui, un grand nombre de personnes se tournent vers les médecins homéopathes ou physiologistes en cas de maladies [4].

De ce fait, le monde scientifique est entrain de redécouvrir et de valider le savoir traditionnel des plantes [5].

Ainsi, le corps médical a pris conscience de l'intérêt thérapeutique des plantes pour soigner efficacement un grand nombre d'affections ,de ce fait, face aux molécules de synthèse, c'est le grand retour de la pharmacopée naturelle [6] .

L'Algérie, par son aire géographique et la diversité climatique couvre d'importantes ressources végétales réparties sur les cotes, les plaines, les montagnes, la steppe et le sahara , La population attache encore de l'importance à ces plantes et leur utilisation dans le domaine pharmaceutique [7].

Considéré depuis toujours comme un puissant laxatif, le séné est probablement la plante la mieux connue, il rentre dans la composition de nombreux médicaments et de nombreuses préparations magistrales associées à diverses autres plantes [8].

Ainsi, a travers ce modeste travail, nous nous sommes intéressé à une espèce de séné : *Cassia obovata* très répandue dans le sud algérien.

Nous nous somme assignées les objectifs suivants :

- ✓ Essai de culture in vitro d'une espèce de séné algérien : *Cassia obovata*,
- ✓ Essai de callogénèse à partir d'explants cultivés in vitro,
- ✓ Effet des stress salin et thermique sur la biosynthèse des molécules actives (sennosides).

CHAPITRE 1

ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE

1.1. La phytothérapie

La phytothérapie, est l'utilisation de médicaments d'origine végétale pour soigner un certain nombre de maux dont nous pouvons être victime. [09]. Elle est née en 1769 en Amérique du nord [10] .

Aujourd'hui, l'efficacité prouvée et les bienfaits incontestables de la phytothérapie pour notre santé lui ont permis d'entrer dans notre vie de tous les jours [11].

1.2. Les plantes médicinales

1.2.1. Historique :

A travers les siècles, l'Homme se livra au redoutable apprentissage des propriétés médicinales des végétaux, pareille entreprise lui coûta parfois la vie [12].

Depuis toujours les plantes ont constitué la source majeure de médicaments, grâce à la richesse de ce qu'on appelle : le métabolisme secondaire.

Parmi les milliers de molécules produites par ce métabolisme, l'homme sélectionne celles qui lui permettent de se défendre contre les agressions d'organismes vivants pathogènes (champignons, bactéries et virus) [13] .

Le séné a été utilisé depuis les temps les plus reculés. On le retrouve dans le kanoun d'Avicenne. A cette époque les médecins herboristes l'utilisait en infusions, décoctions et fumigations.

En Europe, dans le formulaire de thérapeutique de DUJARDIN – BEAUMETZ de 1894, on ne trouve pas moins de 25 préparations possibles contenant du séné, celles-ci vont des potions purgatives aux lavements en passant par la bière purgative anglaise de Cadet, le café purgatif, infusion, potions, poudre et sirops [14].

Aujourd'hui, de nombreuses spécialités pharmaceutiques laxatives contiennent du séné, seul ou couplé à d'autres molécules naturelles ou synthétiques (Arkogellules séné, Laxilo gel, Senokot, olivalax) [15].

1.2.2. Importance de l'utilisation des plantes médicinales :

Il est acquis que les plantes médicinales sont en mesure de soigner des maladies simples comme le rhume, elles peuvent aussi prévenir de plus importantes comme l'ulcère, la migraine, l'infarctus en plus de certaines allergies ou affections. Si l'on y ajoute leurs vertus réparatrices, tonifiantes, sédatives, revitalisantes ou immunologiques, on mesure mieux l'aide précieuse qu'elles sont susceptibles de nous apporter au quotidien [16].

Cependant, la compréhension des modes d'action des plantes douces à la base de la phytothérapie est infiniment plus complexe et plus difficile [17].

1.2.3. Avantages des remèdes naturels

L'ensemble des espèces végétales possèdent des vertus thérapeutiques. Les remèdes naturels phytothérapeutiques peuvent s'avérer dans de nombreux cas plus économiques, plus efficaces et plus sûrs que bien des médicaments (moins d'effets secondaires). Ils apportent des éléments nutritifs et sont plus facilement assimilés par l'organisme [10].

En général, l'organisme humain s'adapte bien mieux à une médecine naturelle comme phytothérapie, car l'Homme et la plante vivent côte à côte depuis toujours.

Pour les chercheurs, les préparations à base de plantes entières sont des traitements naturels plus doux et plus efficaces que les substances chimiques isolées de la plante [10].

1.2.4. L'utilisation des plantes médicinales

La décoction fait perdre les propriétés thérapeutiques du séné. Ainsi, c'est sous forme d'infusion qu'il convient de l'administrer soit en potion soit en lavement [18].

1.2.4.1. Tisane

La plante fraîche contient pour le même poids moins de principes actifs (80 % d'eau) en comparaison avec la plante séchée. Néanmoins, le goût y est plus prononcé [10].

1.2.4.2. Infusion et décoction

Les infusions sont plus adaptées pour les feuilles ou les fleurs, car elles libèrent plus facilement leurs principes.

La décoction est plus adaptée pour les fragments racines et les branches [10].

1.2.4.3. Les huiles essentielles :

Les huiles essentielles des plantes sont des principes volatiles ou essences végétales, qu'on extrait en utilisant plusieurs procédés (distillation, expression, dissolution dans un corps gras).

Elles s'utilisent :

- par voie orale (prise directe)
- par voie aérienne (diffusion atmosphérique)
- par voie cutanée (massage, frictions ou balnéothérapie)

Les huiles essentielles sont fragiles, volatiles et se conservent à l'abri de l'air et la lumière [20].

1.2.5. Précautions dans l'utilisation des plantes médicinales :

L'utilisation des plantes médicinales doit se faire avec précaution. Comme tout médicament, Il est préférable de suivre les conseils d'un spécialiste [10].

L'usage des plantes s'avère avoir occasionnellement une hépatotoxicité. Celle-ci est particulièrement difficile à mettre en évidence du fait de l'automédication très fréquente et de la réputation d'innocuité.

Les risques, rares mais possibles, d'hépatotoxicité, doivent donc conduire à une certaine prudence quant à l'usage des plantes médicinales et à une évaluation sérieuse du rapport bénéfice/risque [20].

1.2.6. Prévention des interactions

Lorsque plantes et médicaments ont la même action thérapeutique, ils vont interagir entre eux. Cette interaction est d'autant plus dangereuse lorsque ces substances sont diurétiques, antidiabétiques et anticoagulants. Ces interactions engendreraient des risques cardio-vasculaires, diurétiques, anticoagulantes et anti-diabétiques [21] .

1.3. Les plantes médicinales et la biotechnologie :

De nos jours l'utilisation des plantes en médecine a évolué : les médicaments sont aujourd'hui le fruit d'une recherche longue et coûteuse qui passe de la cueillette au laboratoire à la détermination du principe actif ,son isolation ensuite la synthèse. [22].

Le passage de la plante au médicament ne s'est pas produit par hasard. En effet, car depuis quelques années, les outils du chercheur se sont perfectionnés. Ainsi, toutes les méthodes quelles soient chimiques, biologiques, pharmacologiques et biotechnologiques sont mise en œuvre pour la domestication des substances naturelles [23].

On a donc appris, depuis le XXe siècle, à isoler ces principes actifs et à les transformer. Une nouvelle étape a été franchie depuis que l'on sait modifier un végétal par le génie génétique, afin qu'il produise le principe actif désiré à grande échelle et en toute sécurité sanitaire (tableau 1.1). La création de médicaments nécessite néanmoins la mise en œuvre de procédés complexes, longs et coûteux [22].

La méthode biotechnologique semble assez satisfaisante ces dernières années pour atteindre cet objectif. En effet, elle pourrait intégrer des données disparates de chimie et de pharmacologie, mais aussi de génétique et d'agronomie afin de :

- ✓ Multiplier des plantes sur lesquelles s'exerce une pression d'exploitation.
- ✓ Produire in vitro ou in vivo des espèces et des substances exploitées.
- ✓ Préserver les réservoirs génétiques naturels potentiellement utiles dans l'avenir à la suite de futures enquêtes ethnopharmacologiques [23].

Les méthodes biotechnologiques commencent également à être utilisées pour obtenir des molécules actives. Beaucoup de recherches systématiques sont réalisées sur toutes les plantes disponibles pour découvrir de nouveaux modèles pour de futurs médicaments. Mais la découverte de nouveaux principes actifs, relève aussi du hasard associé au sens d'observation des scientifiques [24].

Tableau 1.1 : Interprétation de l'évolution des sciences et techniques en matière de recherche de médicaments ou substances actives d'origine naturelle [23].

	Sciences et techniques de mises en oeuvres	Produits de valorisation
Substances naturelles pures	Chimie d'isolement, analyse structurale et pharmacologie	Produit pur identifié dont les produits purs actifs
Substances naturelles pures et extraites	Pharmacologie systématique, chimie d'isolement, analyse structurale.	Activité pharmacologique d'extraits et de produits purs d'origine naturelle.
Système vivant producteur de substances naturelles	Biotechnologie (pharmacologie, chimie, analyse et génétique).	Production de la substance naturelle ou de clones de composition chimique connue et constante

1.2. Etude botanique du séné

1.2.1. Description et systématique de la plante

Le séné est un petit arbrisseau de 50 cm de haut en moyenne, mais qui peut atteindre jusqu'à 10 m selon les espèces [25].

Ses tiges ligneuses à la base se ramifient vers leurs extrémités [26],[27]

Les feuilles composées pennées portent des folioles de couleur verte jaunâtre. Elles sont étroites, lancéolées et coriaces. Elles ont une longueur de 5 à 6 cm sur 2cm de large. Elles sont disposées de chaque côté d'une tige principale cannelée.

Les fleurs, de couleur jaune, veinée de brun, sont groupées en grappes dressées à l'extrémité des tiges.

Les fruits sont des gousses membraneuses de couleur brun clair, plates et parcheminée. Les gousses ont une longueur de 3 à 5 cm et contiennent des graines [1]

1.2.1.1. Description botanique de l'espèce étudiée

Cassia obovata ou *C italica*

Nom Tamahaq : Agargar

Nom français : Séné

Description

C'est un arbrisseau dont les tiges sont souvent couchées (figure 1.2), de 1 à 2 mètres de hauteur.



Figure 1.1 : plant de *Cassia obovata* [28]

Les tiges portent des feuilles composées de folioles obovales (deux fois plus longues que large). La base des folioles et des feuilles est orangée (figure 1.3). Les feuilles portent deux stipules à leur base.[28]



Figure 1.2 : feuilles de *Cassia obovata* [28]

Les fleurs en courtes grappes sont de couleur jaune vif à jaune pâle (figure 1.4). Elles sont utilisées pour ces propriétés laxatives et purgatives, mais également en cataplasme pour les soins des cheveux. Elles étaient utilisées dans le temps comme moyen d'avortement [28].



Figure 1.3 : fleurs de *Cassia obovata* [28]

Les gousses très aplaties et arquées (figure 1.5) deviennent brun noir à maturité. Elles sont munies d'une crête dentelée centrale [28].



Figure 1.4: gousse de *Cassia obovata* [28]

Les graines sont très sucrées avant maturité, elles sont souvent croquées par les bergers.

1.2.. Systématique du séné :

Cassia est un genre de la famille des *Caesalpiniciacées*, classe des dicotylédones

1.2.3.2. Classification phylogénétique

Règne :	végétal
Embranchement:	Spermaphytes
Sous- embranchement :	Angiospermes
Classe :	Dicotylédones
Superfamille :	Légumineuses
Famille :	<i>Césalpiniciacées</i>
Genre :	<i>Cassia</i> (Nom commun : Séné) [29]

Classiquement, le genre *Cassia* comprend 2145 espèces, dont les plus connues sont : [30]

Cassia angustifolia Vahl (séné de Timnevelly)

Cassia acutifolia Delile (séné d'Alexandrie = séné de Khartoum)

Cassia fistula

Cassia obovata (*Cassia italica*)

1.2.2. Répartition géographique du séné :

1.2.2.1. Dans le monde :

L'espèce *Cassia acutifolia*, se trouve sur le bord du Nil, au nord et au sud de Khartoum, le long de la rivière Atbara au Soudan et le sud de l'Inde. Ce dernier est aussi un gros exportateur de l'espèce *C angustifolia* [14].

Le séné est aussi cultivé au Pakistan, en Iran et en Arabie Saoudite. Il croît naturellement dans le nord est de l'Afrique [31].

1.2.2.2. En Algérie :

Le séné pousse naturellement dans le Sahara méridional : Hoggar, Illizi, Tassili et Tamanrasset. Les espèces les plus connues dans ces régions sont : *C acutifolia*, *C obovata* [32].

1.2.3. Propriétés générales du séné :

1.2.3.1. Propriétés pharmacologiques :

Le séné ainsi que les nombreuses préparations qui en renferment sont employés comme phytolaxatif [19].

On dit que le séné est laxatif, lorsqu'il est utilisé aux doses thérapeutiques. Il devient purgatif à des doses plus élevées [33].

Il agit après 10 à 12 heures après la prise [15].

Pharmacologiquement, le séné empêche la réabsorption de l'eau et des électrolytes au niveau du gros intestin, provoquant des selles molles. Il s'utilise dans les traitements symptomatiques de la constipation, lorsque les mesures diététiques (alimentation riche en fibres et boissons abondantes) demeurent inefficaces [34].

Actuellement, le séné est utilisé :

- ✓ En général : pour favoriser ponctuellement le transit intestinal.
- ✓ En particulier : dans la sphère digestive pour traiter la constipation fonctionnelle spasmodique occasionnelle [1].

1.2.3.2. Mécanisme d'action :

Il a été démontré que les dérivés du séné (sennosides) qui sont chimiquement des glycosides anthroquinoniques, peuvent être considérés comme des pros drogues au niveau de l'intestin grêle. Ils ne deviennent actifs que dans le colon droit, après avoir subi une hydrolyse par les bactéries coliques présentes [14].

Les sennosides ne sont ni résorbés ni hydrolysés avant d'atteindre le colon, où sous l'action de la flore intestinale, ils sont hydrolysés et les anthrones libérées, ce sont les formes actives. Le sennoside est une forme de transport jusqu'au colon,

Curieusement les anthrones sont inefficaces, si elles sont absorbées libres ou hydrolysées trop tôt au niveau de l'intestin grêle [19].

Cette probabilité de devenir actif là où il le faut, confère aux sennosides une efficacité importante obtenue avec des doses qui sont, moyenne quelques fois moindre que celle des anthraquinones de synthèse. [14].

Pharmacologiquement, les glucosides u-liés (sennosides) ne sont pas absorbés dans les intestins grêles, ils le seront après hydrolyse par les « réductases » bactérien dans le colon en métabolites actif : rhein-9-anthrone. Le rhein anthrone n'est pas métabolisé par la flore bactérienne, mais il est partiellement absorbé par les cellules épithéliales de l'intestin, il est soumis à la circulation entero-hepatique. En contact avec l'oxygène, le rhein anthrone est oxydé en rhein et sennosides qui se retrouvent dans le sang, principalement sous forme de glucuronides et de sulfates [15].

Il faut signaler que de petites quantités de rhein anthrone passent dans le lait maternel (0,01%) de la quantité total ingérée par la mère.

L'intérêt d'utiliser les sennosides sous forme de comprimés ou de gélules est de n'absorber que la dose utile, ce qui n'est pas toujours facile à calculer avec les infusions [14].

1.2.3.3. Formes d'utilisations

La forme habituelle d'administration du séné en phytothérapie contemporaine est la poudre totale sèche en gélules qui représente le totum végétal des folioles dans toute leur intégrité [1].

Il peut aussi être pris sous forme d'infusion. Il rentre dans la composition de très nombreuses spécialités pharmaceutiques, seule ou combiné à d'autres plantes médicinales ou aromatiques [15].

1.2.3.4. Tolérance :

Bien que les sennosides paraissent bien mieux tolérés que d'autres laxatifs anthraquinoniques, il ne faut pas faire du séné le remède idéal. Il reste un laxatif stimulant, qui agit sur la muqueuse intestinale, qui peu entraîner des effets secondaires malencontreux [14].

1.2.3.5. Effets indésirables

Comme de nombreuses plantes laxatives, le séné ne doit jamais être utilisé de façon prolongée. La prise du séné ne doit pas excéder dix jours. Néanmoins, il peut être utilisé sur des périodes courtes mais souvent répétées[1].

Toute prise prolongée peut entraîner « la maladie des laxatifs » (colopathie fonctionnelle sévère, irritation colique, rectocolites, anomalies électrolytiques avec hypokaliémie [15].

1.2.3.6. Contre- indications :

Le séné est contre-indiqué pour les femmes enceintes, au cours de l'allaitement et pour les enfants dont l'âge est inférieur à 12 ans[15].

1.2.4. Composition chimique du séné :

Les principaux constituants purgatifs du séné sont des Hétérosides dianthroniques : sennosides A, B, C, D avec de faibles quantités d'hétérosides anthraquinoniques [14].

En outre, le séné renferme dans sa composition mais en faibles quantités :

- Mucilages
- Flavonoïdes (dérivés du kaempférol)
- Hétérosides naphthaléniques
- Huiles essentielles [36]

1.2.4.1. Les sennosides

Structure chimique des sennosides :

Les sennosides A et B (figure 1.5) majoritaires sont des di-O- glucoside en C-8 et C-8' d'une genine hemodianthronique symétrique, la diherine anthrone [25].

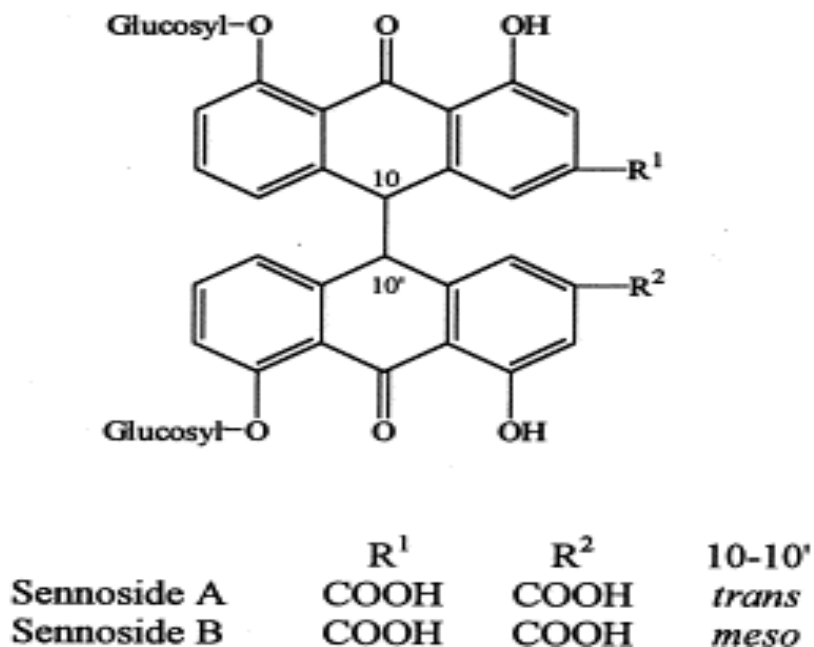


Figure 1.5: Structure chimique des sennosides A et B [37]

Les sennosides A peuvent lentement s'isomériser en sennosides B en présence de NaHCO₃ à 80°C. Les sennosides B peuvent être cristallisés en grande quantité dans l'eau chaude [38].

La drogue sèche renferme aussi des traces d'antraquinones libres (<0,1%) et une faible quantité d'hétérosides (monoglucosides et diglucosides d'aloé-emodol et rehine) et des hétérosides d'antrones monomères (glucosides de rehine-anthrone et d'aloé- emdol-anthrone) [25].

Les sennosides C et D sont des composées à structures chimiques analogues mais sont présents en faibles quantités [38].

La rheine-8-glucose est un glucoside de naphtalène, il caractérise les espèces *C acutifolia* et *C angustifolia*

Localisation

Les dérivés anthroniques n'existent pas dans la plante fraîche, elle contient majoritairement les O- glucosides en C8 de la rehine anthrone et de l'aloé- emodol anthrone. C'est au cours du séchage, vers 40°C que les glucosides d'anthrone sont éliminés par le processus enzymatique.

Si le séchage est effectué à plus haute température, la liaison hétérosidique est rompue et l'anthrone est immédiatement oxydées en antraquinones [25].

Les graines contiennent moins de sennosides par rapport aux feuilles, mais il a été constaté que les cotylédons de 3 jours peuvent contenir des teneurs équivalentes a celles des feuilles [25].

Dans les racines âgées on trouve souvent des dérivés de type anthroquinoniques [31].

1.3. Culture in vitro

1.3.1. Considérations générales sur la culture in vitro :

1.3.1.1. Définition de la culture in vitro

La culture in vitro est basée sur la mise en culture d'explant en milieu artificiel contrôlé, à l'abri de toutes contaminations (en annexe) .

Elle est actuellement utilisée pour multiplier des plantes ou variétés rares. Celles ci poussent lentement, ne donnent pas ou peu de graines, pour répondre,entre autres, aux réponses commerciales[39].

Les premiers résultats intéressants de culture de tissus végétaux furent obtenus par GAUTHERET (1959) NOBRCOURT et WHITE en 1934. Elles se font hors sol en conditions stériles et très contrôlés, dans des flacons ou tubes fermés, sur des milieux synthétiques solides ou liquides. Ces derniers contiennent des sels minéraux, une source énergétique et des adjuvants [40].

Quelle que soit la technique utilisée, les cultures in vitro requièrent des conditions très précises de milieux et d'environnement. Les conditions peuvent changer au cours de la culture, ce qui rend la maîtrise de la technique plus délicate [41].

Selon [41] (AUGE, 1984), [42] (GOACOLOU et PERDRIZET, 1988), toute cellule végétale vivante, quelle que soit sa spécialisation, est capable de reproduire la plante entière dont elle st issue. C'est grâce a cette totipotentialité que la culture in vitro d'organe ou de tissus provoque la reprise des mitoses. Ainsi elle favorise la dédifférenciation cellulaire, et permet l'extension a un nombre d'espèces de l'expression de potentialités normalement réprimées [43].

1.3.1.2. Techniques de culture in vitro

Différentes techniques de culture des cellules végétales ont été développées en laboratoire :

- Culture de tissus provoque la multiplication inorganisée des cellules à partir de cellule totalement indépendante.

Deux mécanismes essentiels de régénération ont ainsi pu être mis en évidence, selon les espèces :

- ✓ Formation de méristèmes.
- ✓ Différentiation d'embryons somatiques (issus de cellules non sexuelles).

- Micro bouturage qui par simple enracinement sur milieu de culture, augmente la rapidité et la fiabilité du processus de croissance.

- Culture des méristèmes, petit organe fragile de moins de 1mm. Il sont présents au sein du bourgeon apical assure la croissance et la mise en place des différents organes de la plante.

- culture de protoplastes : leur multiplication permet l'obtention d'un très grand nombre de plantes. cette technique peut être utilisée pour la production de plantes nouvelles par fusion de cellules d'origines différentes [44].

1.3.2.2. Intérêts et applications de la culture in vitro

La culture in vitro est un moyen d'investigation qui peut être extrêmement précis, au service de la recherche biologique et physiologie végétale. Elle est aussi au service de la reproduction végétale depuis l'horticulture jusqu'aux plantes médicinales [45].

Ainsi, les applications de la culture in vitro sont nombreuses et variées [44], [39].

- Guérison de plantes par culture de méristèmes.
- Multiplication végétative.
- Production de plantes génétiquement nouvelles.
- Obtention d'haploïdes.
- Culture et fusion de protoplastes.
- Production de métabolites secondaires.
- Culture d'individus transgéniques.

1.3.2.3. Avantages de la culture in vitro

- Ces techniques rendent possible la multiplication d'espèces dont les semences sont rares et pour lesquelles les techniques de bouturage ou de greffage sont difficiles.
- La technologie in vitro permet d'obtenir des taux de multiplication largement supérieurs aux techniques traditionnelles.
- La qualité des plantes reproduites in vitro est généralement supérieure à celle des plantes obtenues par des techniques traditionnelles. On ne reproduit généralement que des individus présentant des caractéristiques intéressantes (rendement fruitier supérieur, résistant à des parasites). Les plantes issues de la culture in vitro peuvent être assainies (débarrassés des viroses et bactérioses).

- La culture in vitro est généralement source d'économie. La technique de culture in vitro requiert, une surface de culture minimale. A titre d'exemple, chaque m² de culture peut produire plus de 10.000 plantules par an.
- La production peut être échelonnée toute l'année, par stockage à des températures froides des plantules en développement [46].

1.3.2.4. Limites de la culture in vitro

Les principales limites de la culture in vitro sont : [47], [48].

- Le coût : les méthodes de culture in vitro demandent un coût plus élevé que les méthodes traditionnelles.
- Le risque de mutations : le taux de viabilité est à peine plus élevé que celui rencontré dans les méthodes traditionnelles lors du passage par le stade cal.
- Les difficultés de réussite telles que:
 - difficulté de propager certains lignaux,
 - difficulté de trouver un milieu adapté,
 - certaines substances toxiques sécrétées par la plantule qui s'accumulent dans le milieu [49].

1.3.3. Facteurs influençant la culture in vitro

L'orientation des néoformations vers une organogenèse bien déterminée à partir d'un fragment (explant) ou d'un cal dépend de l'interaction complexe des conditions intrinsèques et extrinsèques.

1.3.3.1. Conditions extrinsèques :

La nature de l'environnement (lumière, hygrométrie, et le photopériodisme) et la nature du milieu de culture utilisé ainsi que l'équilibre hormonale jouent un rôle primordial sur le type d'organogenèse à réaliser.

1.3.3.1.2. Environnement :

Pour une bonne réussite d'organogenèse, tel que l'embryogenèse, les conditions environnementales doivent être contrôlées périodiquement. Parmi ces facteurs nous citons :

1.3.3.1.3. Température :

En culture in vitro, [50]note que les températures classiquement utilisées varient entre 22°C et 26°C.

En outre, une température élevée +30°C peut favoriser l'initiation des primordium racinaire alors qu'une température de +25°C favoriserait plutôt leur développement [51].

D'après PIATTI [52], quelques expériences ont été conduites en utilisant des températures qui sont écartés sensiblement pour les phases de germination et d'embryogenèse proprement dites qui se déroulent habituellement à température ambiante.

En effet, ZHANG et al [53] ont montré l'effet bénéfique des basses températures sur le rendement androgénétique de *Datura innoxia*. Le même traitement fût appliqué à plusieurs espèces, et il s'avère qu'il augmente généralement le pourcentage d'anthère embryogene.

1.3.3.1.4. Lumière :

La réussite d'un des différents types d'organogénèses ainsi que l'embryogénèse somatique est influencée par l'intensité d'éclairement et le photopériodisme appliqués.

MORET [54] confirme, qu'après le repiquage dans les tubes à essai et les boîtes de Pétri, ceux-ci sont placés dans une chambre de culture où la photopériode et la température sont contrôlées, le développement des souches est optimal.

Selon TEOULE [50], la photopériode appliquée est généralement longue (16 heures d'éclairement et de 8 heures d'obscurité) et l'intensité lumineuse comprise entre 2000 et 6000 lux.

Par ailleurs, l'induction de l'embryogénèse somatique indirecte est liée à l'obscurité chez la patate douce (*Ipomoea batatas L.*) [55], et le palmier dattier (*Phoenix dactylifera L.*) [56].

1.3.3.1.5. Potentiel hydrique :

Le pH du milieu de culture est aussi un facteur critique. La pratique habituelle fait que l'on ajuste le pH à 5,5 – 5,8 pendant la préparation du milieu [57].

D'après BOCCON-GIBOD [57], plus le pH est bas, plus la gélose tend à devenir liquide.

1.3.3.1.6. Echanges gazeux :

Le choix du volume interne et la forme des récipients, lors de l'élaboration d'une culture cellulaire, sont très importants.

BATESON et GROUT [58] confirment, en régénérant une culture de *Daucus carota* à partir de cals, qu'il existe une corrélation positive entre la diminution du volume du gaz présent et élévation du taux de croissance cellulaire.

D'après ZRYD [51], la taille du flacon (tube, bocal) influe sur le développement des cultures in vitro.

1.3.3.1.7. Milieu de culture :

Les milieux de culture choisis doivent être les plus parfaitement adaptés aux besoins nutritifs de la plante étudiée, afin de laisser s'exprimer pleinement son potentiel génétique [59].

Le milieu nutritif (ou base nutritive) doit fournir tous les éléments chimiques nécessaires au développement de la plante : carbone, azote, oligoéléments, vitamines, régulateurs de croissance [60].

La modification du milieu de culture porte souvent sur la forme de la source d'azote ; nitrate, ammonium, acide aminés, sur la nature et la concentration de la source de carbone et en dernier sur la concentration en régulateurs de croissance [61].

Ce milieu étant également favorable au développement des micro-organismes qui est plus rapide que celui de la plante, il convient donc de cultiver en conditions aseptiques totales [60].

1.3.3.1.7.1. Composition minérale du milieu :

La composition du milieu de mise en culture joue un rôle très important dans l'organogenèse.

L'effet d'un milieu de culture résulte de l'ensemble des interactions des différents éléments qui le composent. Certains d'entre eux stimulent les processus du développement *in vitro*, d'autres par contre ont peu d'influence sur le débourrement [62].

Les plantes puisent les éléments de bases essentiels aux réactions biochimiques à partir du milieu extérieur

Les principaux critères pour juger si un élément est essentiel :

1- sa présence est nécessaire pour permettre à la plante d'achever son développement.

2- Il fait partie d'une molécule ou d'un de ces constituants

3- l'apparition de symptômes ou de carences en absence de l'élément concerné [63].

On peut repartir les éléments essentiels en oligoéléments et macroéléments :

1.3.3.1.7.1.1. Oligoéléments

Ils sont nécessaires en très petites quantités sous formes de traces (Concentration ≤ 100 mg/ kg de matière sèche : molybdène, nickel, cuivre, zinc, manganèse, bore, fer, chlore) [43].

1.3.3.1.7.1.2. Macroélément :

Exigés une quantité plus importante que les oligoéléments (≥ 100 mg/kg de matière sèche : soufre, phosphore, magnésium, calcium, potassium, azote, oxygène, carbone, hydrogène) [63].

CHAUSSAT et BIGOT [64] indiquent que parmi les ions, le K^+ est le plus important, la croissance maximale des cals est assurée pour une concentration de 1Mm, alors que celle de l'embryon nécessite 20Mm.

D'après MAZLIAK [65], la carence en ions K^+ entraîne des déficiences dans la synthèse protéique.

TALAMALI [66], indique que le NH_4^+ ne peut remplacer le K^+ mais il renforce son effet.

1.3.3.1.7.1.3. Les régulateurs de croissance :

1.3.3.1.7.1.3.1. La notion d'hormone chez les végétaux

Une hormone végétale ou phytohormone est une molécule endogène, oligodynamique et vectrice d'une information. Cette dernière est apportée à une cellule cible sélectivement sensible à son action, et dont elle influence le fonctionnement (ce qui la distingue des autres substances oligodynamiques agissant sur le métabolisme fondamental, telles que les vitamines) [67].

L'effet des hormones dépend à la fois de leur concentration, de leur site d'action, du stade de développement de la plante ainsi que de leur concentration relative (une hormone pouvant inhiber le rôle d'une autre) [68].

1.3.3.1.7.1.3.2. AUXINE :

Nature chimique de l'auxine :

Au sens strict, l'auxine l'acide indole-acétique (AIA) (figure 1.6). Le terme d'auxines a ensuite été élargi à un ensemble de substances qui possèdent des propriétés physiologiques voisines et une conformation chimique apparentée (figure 1.7).

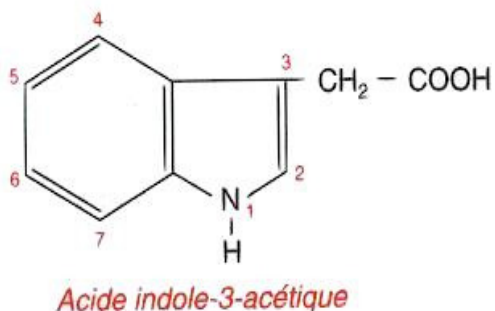


Figure1.6 Représentation de la molécule D'AIA : [67]

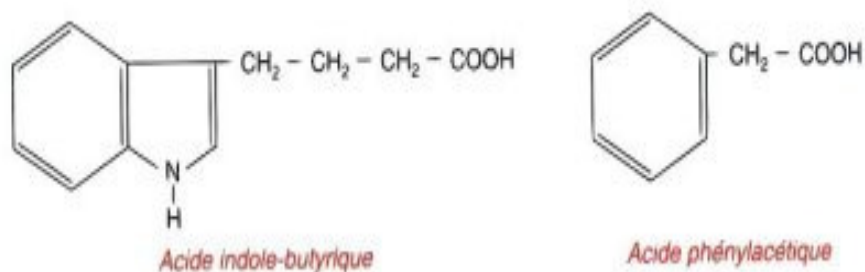


Figure 1.7: Représentation de deux autres auxines [67]

- Lieu de synthèse et transport de l'auxine

La synthèse de l'auxine s'effectue dans les apex des tiges, dans les méristèmes et jeunes feuilles des bourgeons terminaux. Une fois synthétisée elle doit être distribuée dans tous les tissus, y compris les racines, où elle s'accumule [63].

- Rôles de l'auxine dans la morphogenèse végétative

L'auxine est la principale hormone qui agissent sur l'augmentation de la taille des cellules. Cet effet, qui dépend des concentrations intracellulaires de l'auxine et de la nature des organes, s'exerce sur des cellules jeunes en cours d'élongation, au moment où la paroi est extensible.

L'auxine agit en fait sur l'élongation cellulaire à deux niveaux :

- a)- d'une part au niveau de la paroi, dont elle provoque le relâchement
- b)- d'autre part sur les synthèses protéiques, en modifiant l'expression génique

L'auxine stimule les mitoses, mais cette action ne s'exerce pas indistinctement sur tous les méristèmes : l'auxine n'agit pas (ou peu) sur la prolifération au niveau des méristèmes primaires. En revanche, elle a une action très marquée sur la prolifération des cambiums[67].

1.3.3.1.7.1.3.2. CYTOKININE :

- Nature chimique des cytokinines

Environ 200 cytokinines ont été identifiées et isolées. Leur formule est à base d'adénine substituée : au lieu du H du groupement amine en position 6 on retrouve un autre groupement. De plus, beaucoup de cytokinines sont sous forme conjuguée : dans ce cas, il s'agit le plus souvent de glycosides [67].

La figure 1.8 représente quelques cytokinines utilisées en culture in vitro.

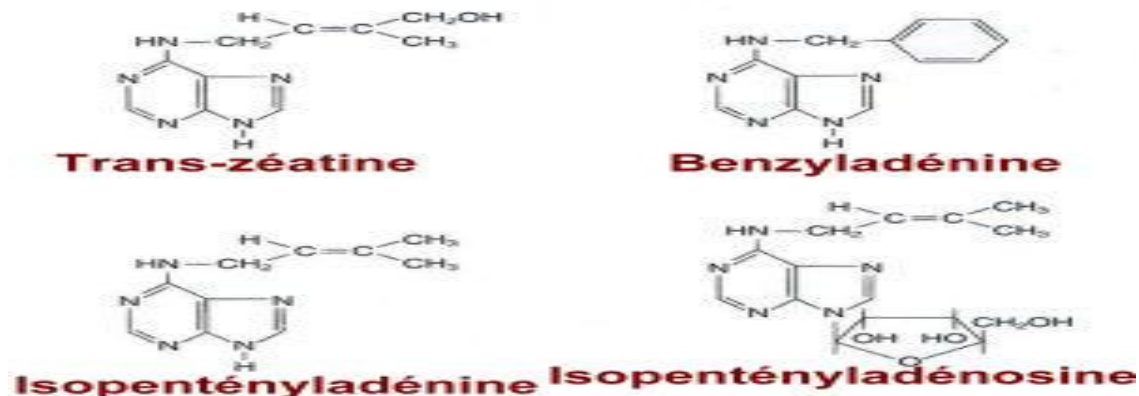


Figure 1.8 : Quelques exemples de cytokinines [67].

- Lieu de synthèse des cytokinines :

Les cytokinines sont présentes dans presque tous les tissus. Elles sont particulièrement abondantes dans les graines et dans les fruits. Elles sont, pour l'essentiel, synthétisées sur place, ce qui fait qu'elles se trouvent généralement en quantité suffisante sur leur lieu d'utilisation. Cependant, pour les tissus à prolifération intense, un complément peut être nécessaire. Il semble que les tissus proches de l'apex racinaire soient impliqués dans la production de ces cytokinines surnuméraires qui vont alors migrer vers les tissus demandeurs via la sève brute [69].

- Rôles des cytokinines dans la morphogenèse végétative

-Les cytokinines stimulent la division cellulaire, sous réserve qu'elles soient en présence d'auxine. L'effet précis des cytokinines porte sur la duplication des chromosomes et sur le reclonement cellulaire.

-Les cytokinines peuvent agir sur l'auxèse (augmentation de la taille des cellules) au niveau de cellules où l'auxine n'agit pas (exemple des cellules foliaires adultes). Au niveau des cellules de tige ou de racines, les cytokinines ont en général un effet inhibiteur sur l'élongation longitudinale mais favorisent l'extension radiale [67].

- Rôle des auxines et des cytokinines dans l'organogénèse

Le rapport auxines / cytokinines détermine le devenir des tissus en culture,

$R = \text{concentration en auxine} / \text{concentration en cytokinines}$

Si : $R = 1$: Callogénèse.

$R < 1$: Organogénèse.

$R > 1$: Rhizogénèse. [51].

3.3.1.7.1.3.3. LES GIBBERELINES :

- Nature chimique des gibbérellines

Le terme gibbérelline désigne l'acide gibbérellique noté GA3 (figure 1.9) et bien d'autres substances (on connaît plus de 110 gibbérellines différentes) désignées sous le sigle GA, sans qu'il y ait forcément une parenté chimique entre ces molécules. Ce sont cependant des diterpènes, possédant toutes un noyau énantiomère du gibbérelane [63].

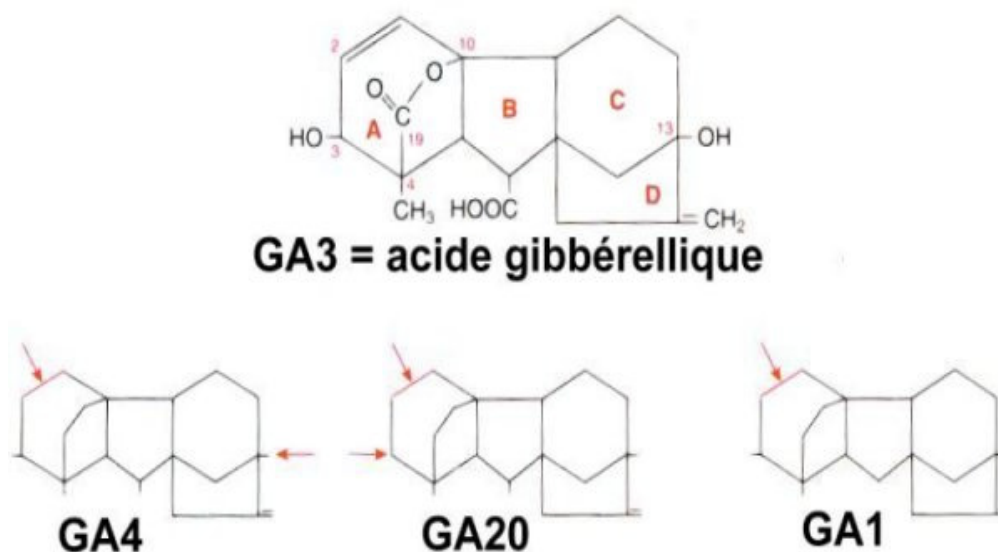


Figure 1.9: Formule de quelques gibbérellines [63]

- Lieu de synthèse

La synthèse des gibbérellines s'effectue dans des régions très diverses de la plante, pourvu qu'il s'agisse de tissus aux divisions actives. Cette synthèse est particulièrement intense dans les parties terminales des jeunes pousses (à l'exception des méristèmes), les pétioles, les jeunes feuilles. Elle ne semble pas avoir lieu dans les tissus de la racine [67].

Implication des gibbérellines dans la morphogenèse végétative

-Les gibbérellines agissent sur l'élongation cellulaire, mais cette action sur l'auxèse se limite aux cellules des entre-nœuds, elles mêmes souvent produites par l'activité de méristèmes intercalaires [64].

-De plus, les gibbérellines stimulent la prolifération des cellules au niveau des méristèmes intercalaires. Cette action sur la mérése intéresse notamment les tissus corticaux et épidermiques, qui sont insensibles à l'auxine [68].

-Ainsi, à l'échelle macroscopique, les gibbérellines sont, par excellence, des hormones provoquant l'élongation des entre-nœuds [64].

1.3-3-1-7-1-4-Source de carbone :

En général, le saccharose constitue la meilleure source de carbone, il est apporté généralement à la concentration de 20g/l (cette concentration peut varier de 5 à 40 g/l ou plus) [43].

1.3-3-2-Conditions intrinsèques :

1.3-3-2-1-Type d'explant :

Les tissus de racines, tiges, pétioles, feuilles et bourgeon axillaire ont été surtout utilisés chez les espèces favorables (feuilles, tiges, racines, bourgeon axillaires de *Ipomoea batatas* L. (patate douce) [55], des bourgeons apicaux et axillaires du *Phoenix dactylifera* L.(palmier dattier), [56].

Chez la pomme de terre, les meilleurs résultats obtenus, concernant le nombre de bourgeons sur cal, sont obtenus pour des explants de 5 à 7mm de long [71].

D'après LEBRUN [72] les boutons floraux présentent une bonne aptitude à l'embryogenèse somatique chez la vigne.

1.3-3-2-2- Age physiologique de l'explant :

DAIKH [73] montre que l'âge du matériel, ainsi que l'origine de l'explant, sa nature et sa position sur la plante mère peuvent avoir une nette influence sur l'aptitude à la callogénèse.

En effet, AUGE et al [49] constatent que lorsque les tissus deviennent trop âgés, les réactions de dédifférenciation deviennent incomplètes et très rares.

D'HALLUIN et al [74] montrent qu'il existe une relation étroite et toujours respectée entre l'âge physiologique des tubercules, les phénomènes de callogénèse et l'organogenèse des différents plants issus de ces tubercules. Parmi les tiges néoformées sur cals un polymorphisme est observé.

1.3-3-2-3-Epoque de prélèvement :

L'explant ne peut être prélevé en toutes saisons ; cela est dû à des modifications des équilibres internes des régulateurs de croissance lors des différentes saisons. En conséquence, il est souhaitable de travailler sur un matériel pour lequel la dormance a été levée.

Actuellement, les plantes sont traitées par le froid, ou par des éclaircissements spécifiques ou encore par des régulateurs de croissance, afin de provoquer un bouleversement de ces équilibres internes et permettre une organogenèse dirigée [52].

1.3-3-2-4-Génotype :

La capacité de fournir des embryons somatiques est liée à l'espèce. Au sein d'une même espèce, un génotype donne des embryons somatiques, tandis qu'un autre ne peut fournir que des bourgeons. Les résultats des dernières années montrent l'influence de la constitution génétique des plantes mères sur la réussite de la culture in vitro. Ce qui a été constaté par TANG et al [75].

Chez le piment, DUMAS DE VAULX et POCHAARD [76] obtiennent des plantes andogénétiques avec des fréquences variant selon le type des génotypes testés.

LEBRUN [72] montre que chez la vigne (*Vitis sp*) l'existence d'un effet très significatif du génotype au niveau quantitatif pour l'obtention des cals primaires embryogènes et au niveau de la qualité de l'embryogenèse.

1.4. Le stress salin

La culture in vitro offre la possibilité de caractériser, à un niveau cellulaire des marqueurs physiologiques associés à la résistance au sel. Cette technique présente l'avantage d'un meilleur contrôle des conditions de nutrition tout en autorisant la manipulation d'un grand nombre de cellules [77].

1.4.1 Définition du stress

Le stress est défini comme l'action d'un facteur de l'environnement (ou la combinaison de plusieurs d'entre eux) limitant la réalisation des potentialités génétiquement déterminées de croissance, de développement et de reproduction chez les plantes [78].

Le stress communément rencontré sont : l'action des températures extrêmes positives ou négatives, des régimes hydriques, des radiations et des concentrations salines [79].

1.4.2 Application du stress :

En général, le stress peut s'appliquer lors de l'initiation des cals, à partir d'embryons matures ou immatures, ou sur des cals d'un certain âge obtenu en conditions non sélectives. Les cals continuant à proliférer en présence de l'agent sélectif sont considérés comme tolérants au stress.

La pression de sélection s'exerçant sur les cals est généralement de longue durée, parce que toutes les cellules ne sont pas uniformément exposées à l'agent sélectif: les cellules qui ne sont pas en contact direct avec l'agent stressant peuvent échapper à la pression sélective, ce qui peut entraîner la régénération de plantes sensibles ou chimériques. Ce qui explique pourquoi la plupart des travaux de sélection in vitro utilisent la sélection de longue durée.

L'action de l'agent stressant pendant la phase de callogenèse peut avoir lieu à différentes phases de croissance des cals, après leur initiation sur un milieu dépourvu de l'agent stressant, ou à la phase d'initiation des cals

La pression peut également être exercée graduellement, en palier, en augmentant l'intensité de l'agent stressant au cours des repiquages successifs des colonies survivantes. Cette pression sélective graduelle peut cependant favoriser des mécanismes d'adaptation physiologiques [78].

1.4.3 Le stress salin :

On parle de stress salin lorsque le facteur « sel » est en excès par rapport aux besoins de l'espèce

LEVIGNERON et al [80] et SEELIG [81] montrent que le stress salin provoque 3 effets chez les plantes :

- stress hydrique : une forte concentration saline nécessite un ajustement osmotique.
- Stress ionique : accumulation de sel dans les tissus d'où perturbation de l'activité métabolique
- Stress nutritionnel : le sel provoque une altération de la nutrition minérale.

1.4.3.1 Les végétaux face au stress salin :

1.4.3.1.1 Résistance de la plante à la salinité :

L'efficience de l'eau est une composante importante de la résistance à la salinité et à la sécheresse. Elle est définie par la quantité de biomasse produite par gramme d'eau absorbée [77].

La première difficulté d'une plante en milieu salin est donc d'assurer son apport en eau pour cela, il faut que la plante puisse ajuster la pression osmotique de ses tissus par rapport à la pression osmotique du sol.

Les ions sodium et chlore sont stockés dans la vacuole, et permettent ainsi l'établissement d'une pression osmotique interne importante. Cependant, les halophytes sont contraints de stocker ce sel dans leurs vacuoles pour éviter toute intoxication [82].

1.4.3.1.2 Les osmoprotecteurs :

Les halophytes (mais aussi occasionnellement des glycophytes) sont capables de lutter contre ce phénomène en produisant des composés dits osmoprotecteurs (ou solutés compatibles).

Ces composés, par leur concentration, assurent l'ajustement osmotique entre le cytosol et la vacuole.

Différentes molécules peuvent jouer le rôle de « solutés compatibles » chez les végétaux [82].

Pour les acides aminés, la proline, l'alanine, la β -alanine et la taurine sont les plus connus :

1.4.3.1.3 Accumulations de la proline

L'accumulation de proline est l'une des manifestations les plus remarquables du stress salin et hydrique. Aussi a-t-on cherché à mettre en évidence une corrélation positive ou négative entre l'accumulation de proline dans les feuilles et la résistance à la salinité ou à la sécheresse [77].

1.4.3.1.4 Accumulation de sucres

Les teneurs en saccharose et en amidon des racines et des feuilles semblent indicatrices du degré de résistance des espèces à la salinité [77].

L'accumulation de proline ou de glycine bétaine dans le cytosol est accompagnée d'une baisse de la concentration de solutés moins compatibles (comme les sels) et d'une augmentation du volume d'eau du cytosol [82].

1.4.3.2 Perturbations physiologiques :

Un excès de sel dans le protoplasme conduit à des perturbations dans la balance ionique, ainsi que des perturbations des enzymes. ces perturbations entraînent une faible production d'énergie par phosphorylation et la photo respiration, l'assimilation de l'azote perturbé et un dérèglement de nombreuses voies métaboliques [82].

Si la concentration en sel excède le niveau de tolérance de la plante des perturbations fonctionnelles apparaissent au niveau de la photosynthèse [77].

L'acquisition de nutriments minéraux comme le potassium, les nitrates ou le calcium est également redite.

La croissance des végétaux est perturbée par de trop fortes concentrations de sel ; la plante montre alors des signe de stress par la production d'anthocyanes ou la destruction de la chlorophylle [82]

1.4.4. Le stress thermique :

On parle de stress thermique lorsque la température du milieu externe atteint des valeurs extrêmes (positives ou négatives), qui peuvent induire des changements métaboliques chez les plantes qui y sont exposées [83].

1.4.4.1 Les végétaux face au stress thermique :

4.4.1.1 Hautes températures

Parmi les mécanismes biochimiques de tolérance à la chaleur, il faut citer :

- La transpiration,.
- Le métabolisme C4 : Avec l'élévation de la température, la solubilité du CO₂ diminue plus vite que celle de l'O₂.

- Chez les plantes adaptées aux milieux arides chauds (souvent des C4), on peut constater que de nombreuses activités enzymatiques sont plus thermotolérantes que chez des espèces proches mais adaptées à des milieux tempérés
- L'induction de protéines de choc thermique (Heat Shock Proteins),
- La modulation des proportions en acides gras membranaires saturés/insaturés [43].

1.4.4.1.2 Basses températures :

la principale conséquence du froid non gélif concerne la baisse de fluidité membranaire et son impact sur le fonctionnement des activités photosynthétiques et respiratoires. La principale adaptation connue concerne les ratios acides gras saturés/insaturés au niveau des lipides membranaires.

Le mécanisme de tolérance le plus classique repose sur l'évitement de la congélation au niveau intracellulaire [84].

CHAPITRE 2

MATERIEL ET METHODES

2.1. Matériel :

2.1.1 Matériel et réactifs : (annexe)

2.1.2 Matériel végétal :

1. Récolte

Les graines de *Cassia obovata* ont été récoltées dans la région d'Oua-Helledjen dans les Oueds d'Ahgar de la wilaya de Tamanrasset dans le sud algérien, cette espèce est très répandue dans la région et est utilisée par la population locale à des fins médicinales (1)

La récolte a été effectuée au mois d'Octobre 2007,

2. Identification

L'identification de l'espèce a été effectuée par la station INRF de Tamanrasset.

3. Préparation des graines

Les graines sont rincées à l'eau du robinet pour les débarrasser des traces de terre.

2.2. Méthodes :

2.2.1. Culture in vitro des graines de séné :

2.2.1.1. Scarification chimique :

La scarification chimique consiste à faire tremper les graines dans une solution d'acide sulfurique à 95% pendant une heure afin de ramollir leur enveloppe et rendre la germination facile.

Les graines sont ensuite rincées abondamment à l'eau distillée pour éliminer les résidus de l'acide sulfurique [86].

2.2.1.2. Désinfection :

La désinfection étape importante de la culture in vitro, a pour objectif la stérilisation de la graine et diminue les risques de contaminations ultérieures sous une hotte à flux laminaire, le procédé de désinfection a été effectué :

- les graines ont été trempées dans une solution fongicide de benomyle à 0,4% pendant 20min, et mise en agitation dans de l'éthanol 70% pendant 5mn.
- ensuite les graines ont été trempées dans une solution de bichlorure de mercure à 0,04% pendant 25min.
- enfin, les graines subissent une série de trois rinçages à l'eau distillée stérile pendant 15min, 10min, et 5min successivement afin d'éliminer les traces de bichlorure de mercure qui peut empêcher la germination [87].

2.2.1.3. Mise en culture des graines

Pour la culture in vitro des graines de séné, nous avons choisi le milieu de culture Murashige et Skoog (MS)(1962).

le potentiel hydrogène des milieux de culture est ajusté à 5,8 avec du NaOH (1N) ou HCl (1N).

Le milieu MS est coulé dans des tubes à essais et autoclavé à 120°C pendant 20 minutes [88]

Sous hotte à flux laminaire et dans des conditions d'asepsie maximales, les graines désinfectées sontensemencées dans les tubes à raison d'une graine par tube.

Les tubes sont fermés par des bouchons en plastique et mis dans la chambre de culture.

La température de la chambre de culture est maintenue à $25 \pm 2^\circ\text{C}$.

L'éclairage est assuré par des néons d'une intensité de 20000 à 25000 lux

2.2.2. Essais d'embryogenèse somatique :

L'embryogenèse somatique, dépend à la fois de l'état physiologique et génétique de l'explant ainsi que du type de composition du milieu nutritif, et l'équilibre hormonal.

Notre travail consiste à déterminer d'une part l'influence de la composante hormonale sur l'induction de la callogenèse et la croissance des cals, et d'autre part l'effet du stress salin et thermique sur une éventuelle biosynthèse des molécules actives in vitro.

2.2.2.1. Matériel végétal :

Sous hotte à flux laminaire, nous avons découpé les vitro plants obtenus, en fragment de racines, tiges (entre noeuds) et feuilles à l'aide de pinces et de scalpels stériles.

Nous avons pris des fragments de sections de 1cm de longueur et de 5mm de diamètre de chaque organe.

2.2.2.2. Milieu de culture :

Le milieu de culture utilisé est le milieu MS auquel nous avons ajoutés des hormones de croissance qui stimule la callogenèse.

Quatre combinaisons hormonales de deux types d'hormone : les unes de type auxinique : 2,4D, ANA. Les autres de type cytokinine BAP et la kinétine ont été utilisées :

- Combinaison 1 : 1mg/l 2,4D + 1mg/l kinétine
- Combinaison 2 : 1mg/l 2,4D+1mg/l BAP.
- Combinaison 3 : 1mg/l ANA +1mg/l BAP.
- Combinaison 4: 1mg/l ANA +1mg/l kinétine

Le rapport auxines/ cytokinines doit être de l'ordre de l'unité.

Les milieux de culture additionnés des différentes combinaisons d'hormones ont été coulés dans des bocaux à raison de 100ml par bocal et stérilisés à l'autoclave à 120°C pendant 20min.

2.2.2.3. Repiquage des explants :

Chaque type d'explant a été repiqué dans des bocaux (à raison de 10 explants par bocal) contenant chacun le milieu de culture correspondant à une combinaison hormonale. Les bocaux sont fermés avec un film plastique et placé dans la chambre de culture et à l'obscurité.

La température de la chambre de culture a été réglé à $28 \pm 2^{\circ}\text{C}$, température qui favorise l'induction de la callogenèse.[88]

L'objectif de cette étape est de déterminer l'effet de l'équilibre hormonal sur le taux de la callogenèse, l'estimation quantitative des cals (poids frais et poids sec) et le dosage des molécules actives dans les cals in vitro.

2.2.3. L'effet du stress salin sur la biosynthèse des molécules actives :

Afin de déterminer l'effet du stress salin sur la biosynthèse des molécules actives dans les cals, les cals développées sur le milieu MS contenant la combinaison hormonale favorable à la callogenèse ont été utilisées.

Ces derniers ont été pesés à l'aide d'une balance de précision.

Chaque cal repiquée pèse 500 mg.

2.2.3.1. Milieu de culture :

Le milieu de culture utilisé est le milieu MS, auquel nous avons ajouté des concentrations croissantes de Na Cl : 0% 0,5% , 1% et 1,5%.

Le milieu de culture est coulé dans des bocaux, à raison de 100ml par bocal.

Il est ensuite stérilisé à l'autoclave à 120°C pendant 20 min.

2.2.3.2. Repiquage des cals :

Chaque type de cal (issu de racines, tiges ou feuilles) estensemencé dans des bocaux (à raison de 10 cals par bocal) contenant le milieu de culture et les quatre concentrations correspondantes en Na Cl correspondantes. Ces cals ont été placés dans une chambre de culture à l'obscurité et à une température $28 \pm 2^{\circ}\text{C}$.

Durant les trois mois de culture, nous avons estimé la biomasse des cals (poids frais et poids sec), ainsi que la teneur en sennoside exprimée en sennoside B.

2.2.4. Effet de stress thermique sur la biosynthèse des molécules actives (vitroplants et cals) :

Après une semaine de culture, les vitroplants qui doivent subir le stress thermique ont été sélectionnés, et préservés dans leur milieu de culture.

Les cals choisies ont été sélectionnés parmi les mieux développés sur le milieu hormonal adéquat.

Les vitroplants et les cals sont mis au réfrigérateur à une température de +4°C pendant 4 heures un jour sur deux.

Ils sont ensuite remis dans la chambre de culture à 25°C

La synthèse de sennoside B a été estimée durant le 1^{er}, le 2^{ème} et le 3^{ème} mois de culture.

2.2.5 Biosynthèse des sennosides :

2.2.5.1. Spectrophotométrie :

Principe :

L'absorbance (A) d'une solution est le logarithme décimal de l'inverse de la transmittance (T) pour un rayonnement monochromatique. Elle s'exprime par l'équation suivante (11) :

$$A = \log_{10}(1/T) = \log_{10}(I_0/I)$$

$$T = I/I_0$$

I_0 = intensité du rayonnement monochromatique incident.

I = intensité du rayonnement monochromatique transmis.

2.2.5.2. Méthode de dosage des sennosides

La poudre sèche de 0.1 g de vitroplants et des cals sont dissoutes dans 5 ml d'éthanol à 50%. Après agitation et chauffage jusqu'à ébullition, le mélange est refroidi et centrifugé pendant 5 mn à 5000 t/mn. Le surnageant est utilisé pour réaliser les analyses. [89].

Le témoin utilisé est un comprimé Sénokot.®

Le dosage des sennosides est effectué par spectrométrie aux longueurs d'ondes, 356nm, 536nm, 608nm, 668nm et 750nm qui correspondent respectivement aux absorbances des sennosides B, A, D, la Réine-8-glucose et le sennoside C.

Les longueurs d'ondes des sennosides ont été déterminées par Rouibi et al [90].

Sennoside	longueur d'onde (λ)
Sennoside A	536
Sennoside B	356
Sennoside C	750
Sennoside D	607
Rheine 8. Glucose	668

Le résultat de l'absorbance correspond à la quantité de sennoside présente dans l'échantillon (la pharmacopée Européenne 2002).

Pour calculer la concentration en sennoside A, B, C, D et rheine- 8- glucose, nous avons pris comme référence le comprimé de senokot® qui contient 7.3mg de sennoside B pour 152mg de poudre de séné.

L'absorbance du témoin et celles des différents échantillons ont été déterminés dans les longueurs d'ondes correspondant aux différents sennosides. La teneur de ces derniers a été déterminée moyennant la connaissance des différentes longueurs d'ondes et les différentes absorbance en se basant sur la teneur en sennoside B dans le témoin (senokot®)

2.2.6. Etude statistique des résultats :

L'étude statistique a été établie, selon les besoins du calcul ou des graphiques, à l'aide des logiciels PASW Statistics 18.0 (anciennement SPSS) d'IBM Company, Chicago, Illinois, USA ou Statistica 8.0 de Statsoft Inc, Tulsa, USA.

Les données relatives aux échantillons catégoriels ou témoins et ceux soumis à divers types de traitements ont été analysés par ANOVA à un ou deux facteurs (one-way, main effects and factorial ANOVA). Lorsque des différences ont été observées, elles ont été considérées comme significatives lorsque $p < 0,05$.

A chaque fois que cela a été le cas, des tests post hoc de comparaisons multiples tels que le test SNK (Student Newman Keuls) ou celui de Tukey ont permis de mettre en évidence le (ou les) groupes responsables de ces différences. Nous avons utilisé, quand il a fallu cibler des groupes précis, le test d'homogénéité (t-test) de comparaison de deux moyennes.

Les données numériques sont présentées sous la forme « moyenne \pm l'erreur standard sur la moyenne ».

Rappel : Si c est l'écart-type d'un échantillon de données, alors l'erreur standard sur la moyenne (SEM, standard error of mean) est égale à $\sigma_m = \frac{c}{\sqrt{n-1}} = \frac{s}{\sqrt{n}}$

CHAPITRE 3

RESULTATS ET DISCUSSION

3.1. Dosage des sennosides dans les différents organes vitroplants cultivés pendant trois mois

Le dosage des sennosides dans les différents organes des vitroplants cultivé (figures 3.1 et 3.2) sur un milieu de culture MS a montré que leur teneur est variable dans les différents explants.

La teneur des sennosides A,C ,D et rehine-8-glucose est négligeable par rapport au sennoside B, qui représente la fraction la plus importante (annexe 1).

Ce même résultat a été observé par Rouibi et al [90] lors de l'étude phytochimique réalisée sur la même espèce.

Le dosage du sennoside B montre que celui-ci est plus important dans les feuilles comparativement aux tiges et racines.

Nous signalons aussi une baisse de la teneur en sennosides dans les tiges et les racines entre le 1^{er} et 3^{ème} mois de développement. Dans les feuilles le contenu en sennosides subit une augmentation entre le 1^{er} et le 3^{ème} mois.

Les figures 3.3 et 3.4 montrent que la teneur en sennoside B durant le 1^{er} mois est la même dans les différentes parties de vitroplant.

Durant le 2^{ème} et le 3^{ème} mois de culture, nous avons constaté une diminution importante en sennoside B dans la tige et la racine, et une augmentation de ce dernier dans les feuilles.

L'augmentation de la teneur des sennosides dans les feuilles peut s'expliquer par l'augmentation de la biomasse foliaire qui engendre une augmentation de la biosynthèse des métabolites primaires indispensables à la biosynthèse des métabolites secondaires, et aussi à une migration de ces molécules actives à partir des racines vers ces dernières.



Figure 3.1 : vitoplant de 15 jours (à gauche), vitoplant de 1 mois (au milieu).Graine de *Cassia obovata* (à droite)



Figure 3.2 : vitoplant cultivé pendant de 2 mois.

L'étude statistique établie grâce à des tests ANOVA à effets principaux qui consistent à évaluer la variabilité due au paramètre période, puis au paramètre type d'organe a montré que ces différences ne sont pas significatives (annexe 2).

En effet, le dosage du sennoside présente des valeurs comparables dans le temps (du 1^{er} au 3^{ème} mois, $p = 0,8282$) mais aussi pour les trois parties du vitroplant (feuille, tige ou racine, $p = 0,1947$).

L'étude statistique révèle que la quantité du sennoside B synthétisé par les racines du vitroplant est la même, mais sa répartition entre les différents compartiments change entre le 1^{er} et le 3^{ème} mois de culture.

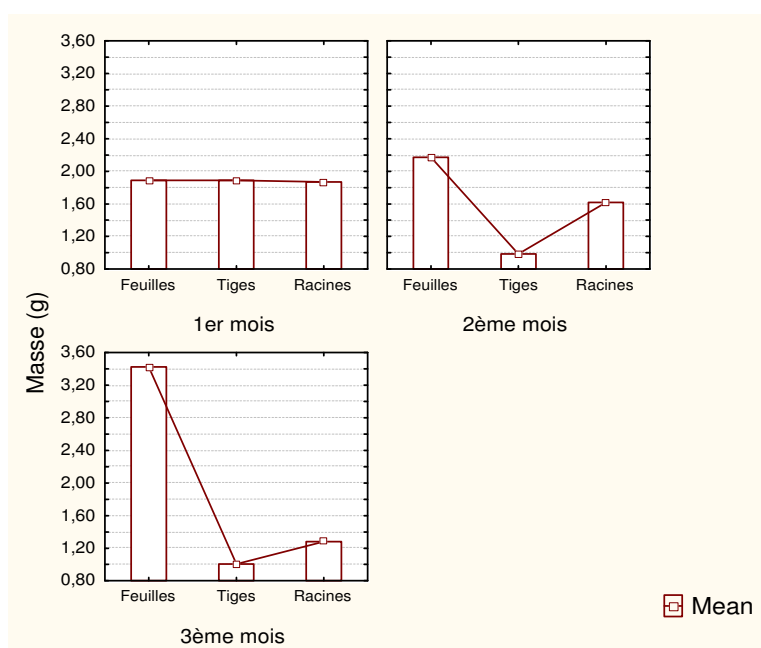


Figure 3.3 : Concentration du sennoside B durant les trois périodes :

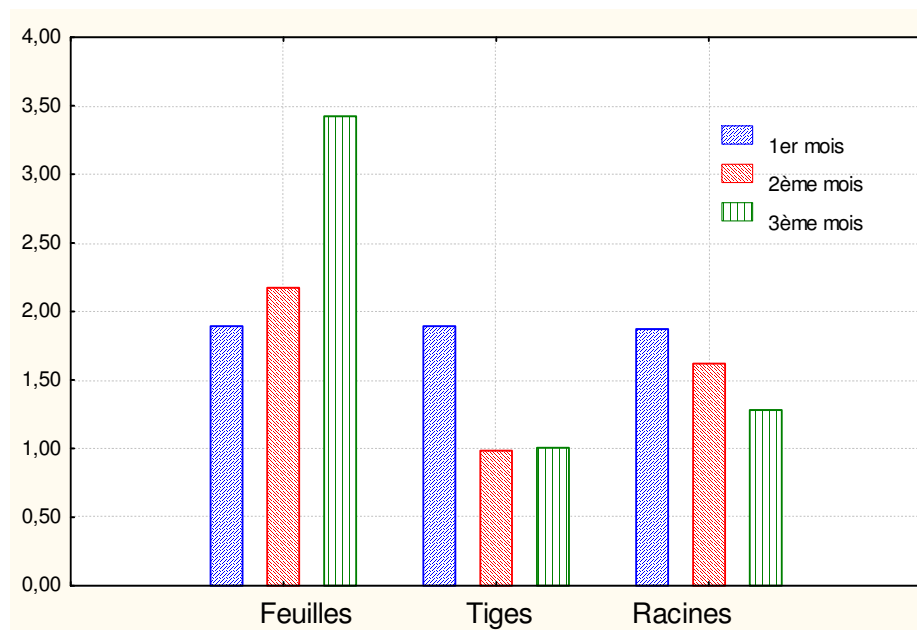


Figure 3.4 : Concentration du senoside B dans le vitplant :

3.2 Etude de l'effet de la combinaison hormonale

3.2.1 Effet de la combinaison hormonale sur l'induction de la callogénèse

Le nombre de cals obtenu sur chaque milieu de culture utilisé est enregistré dans le tableau 3.1

les cals issus des explants caulinaires ,racinaires et foliaires sont représentés dans les figures 3.5, 3.6 et 3.7 respectivement.

- Pour les explants foliaires, nous avons 90 % dans le milieu I, 50% dans les milieux II et III, alors qu'aucune callogénèse n'a été observée dans le milieu IV.

- Pour les explants caulinaires, nous avons 50%, 70%, 80% dans les milieux I, II, III respectivement et aucune callogénèse n'a été constatée dans le milieu IV.

- Pour les explants racinaires, il est très élevé, 100% dans le milieu I et II et 90% dans le milieu III. Dans le milieu IV aucune callogénèse n'a été constatée.

Tableau 3.1 : nombre de cals obtenus par milieu de culture

Milieu	I	II	III	IV
Explant foliaire	9	5	5	0
Explant caulinaire	5	7	8	0
Explant racinaire	10	10	9	0

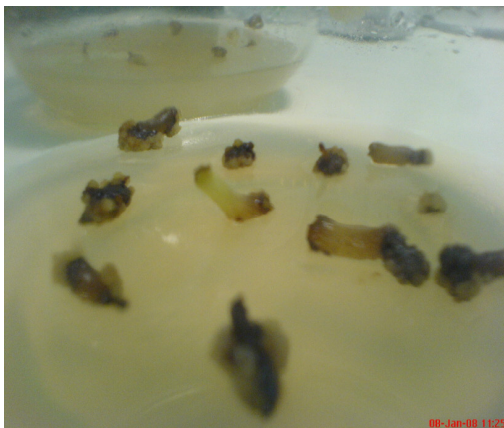


Figure 3.5 : cals issus de tiges



Figure3.6 : cals issus de racines



Figure3.7 : cals issus de feuilles

Nous remarquons que ce taux de la callogenèse est très élevé dans les cals issus des explants racinaires et qu'il varie en fonction de la nature de l'explant, et de ses besoins trophiques, qui dépendent de la composition nutritive offerte par le milieu de culture.

3.2.2. Effet de la combinaison hormonale sur la biomasse des cals (annexe 3) :

Une étude statistique a été réalisée dans le but de déterminer s'il existe un effet de la combinaison hormonale sur les poids frais et sec des cals issus des explants foliaires, caulinaires et racinaires. Nous obtenons le tableau 3.2 représentant les poids moyens. (détails en annexe 4) :

Tableau 3.2 : les poids moyens des cals

Combinaison hormonale	1	2	3
Poids frais des cals issus des :			
Explants foliaires	2,58 ± 0,69	2,15 ± 0,95	1,63 ± 0,54
Explants caulinaires	3,24 ± 1,12	2,48 ± 1,13	2,35 ± 0,79
Explants racinaires	3,02 ± 1,11	2,12 ± 0,98	1,26 ± 0,67
Poids sec des cals issus des :			
Explants foliaires	0,2108 ± 0,0726	0,1937 ± 0,0875	0,1569 ± 0,0740
Explants caulinaires	0,2358 ± 0,1217	0,2458 ± 0,0923	0,2433 ± 0,0867
Explants racinaires	0,2305 ± 0,0346	0,2400 ± 0,0395	0,1080 ± 0,0131

La comparaison se fait, grâce à une ANOVA simple dont les résultats sont dans le tableau 3.3

Tableau 3.3 résultats du test d'ANOVA

Cals issus des :	Poids frais		Poids sec	
Explants foliaires	F = 2,714	p = 0,097	F = 0,677	p = 0,523
Explants caulinaires	F = 1,322	p = 0,293	F = 0,016	p = 0,984
Explants racinaires	F = 8,213	p = 0,0017	F = 50,156	p = 0,0000

Les figures 3.8 et 3.7 représentent la biomasse des différents cals en fonction de la combinaison hormonale

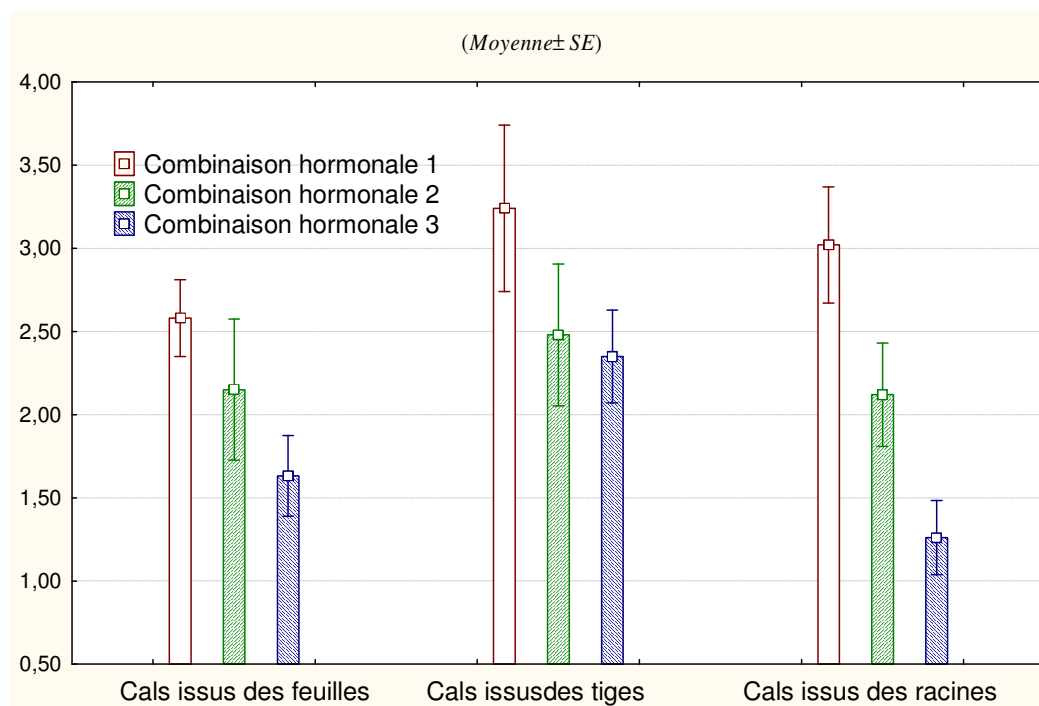


Figure 3.8 : Biomasse (poids frais en g) des cals en fonction de la combinaison hormonale

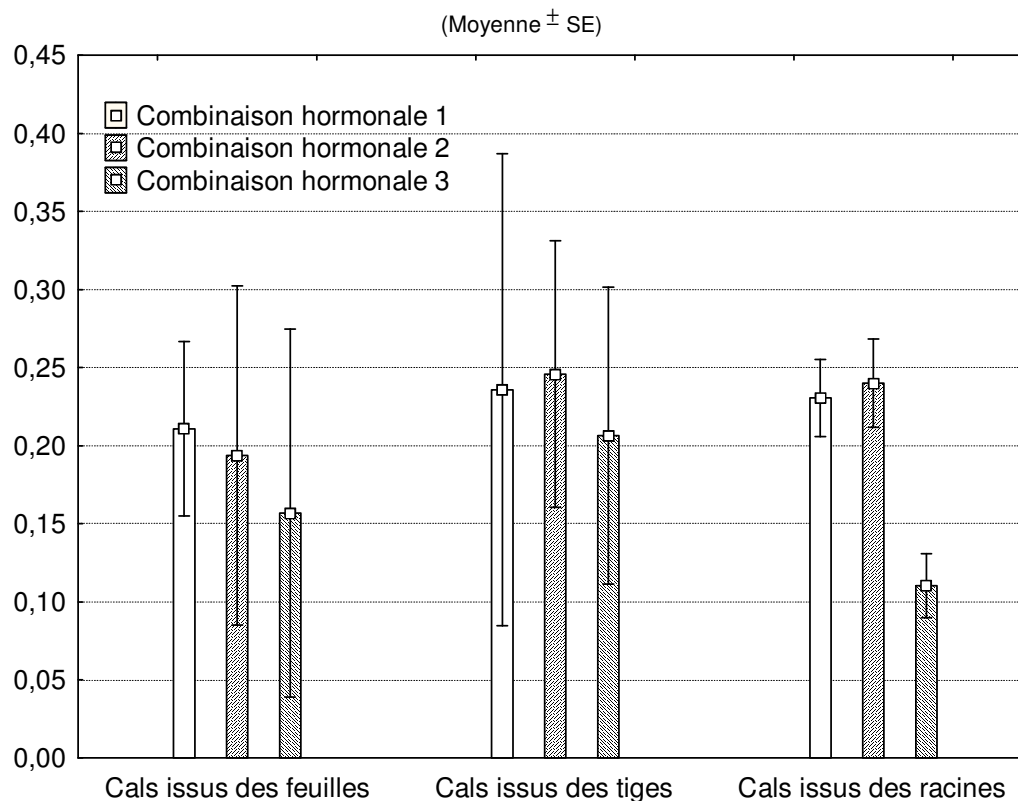


Figure 3.9 : Biomasse (poids secs en g) des cals en fonction de la combinaison hormonale

3.2.2.1. Cals issus des explants foliaires :

Les moyennes obtenues pour les cals sont comparables autant pour le poids frais ($p = 0,097$) que pour le poids sec ($p = 0,523$) (Tableau 3.3)

Il n'y a donc pas d'effet de la combinaison hormonale sur la biomasse des feuilles.

3.2.2.2. Cals issus des explants caulinaires :

Les moyennes obtenues pour les cals sont comparables autant pour le poids frais ($p = 0,293$) que pour le poids sec où ces valeurs sont pratiquement égales ($p = 0,984$ très proche de 1,000) (tableau 3.3)

Il n'y a donc pas d'effet de la combinaison hormonale sur la biomasse des tiges.

3.2.2.3.Cals issus des explants racinaires :

La situation est toute autre pour les cals issus des explants racinaires.

Ici, il existe une différence hautement significative entre les poids frais moyens des racines ($p = 0,0017$). (Tableau 3.3)

Cette différence est encore plus accentuée ($p = 0,0000$) pour les poids secs moyens.

Un test de Student-Newman-Keuls (test SNK ci-après) nous montre que c'est la combinaison hormonale I qui donne le meilleur poids frais moyen des cals issus des explants racinaires (3,02 g) contre 1,26 g et 2,12 g pour les autres combinaisons.

Tableau 3.4 Poids frais des racines

Hormone	N	Subset for alpha = .05	
Comb. Horm. 3	9	1,2600	
Comb. Horm. 2	10	2,1200	
Comb. Horm. 1	10		3,0200
Sig.		0,057	1,000

Tableau 3.5 : poids sec des racines

Hormone	N	Subset for alpha = .05	
Comb. Horm. 3	9	0,1080	
Comb. Horm. 1	10		0,2305
Comb. Horm. 2	10		0,2400
Sig.		1,000	0,517

Nous remarquons de même que le poids sec moyen pour la combinaison hormonale III (0,108 g) est significativement plus faible que pour les deux autres combinaisons hormonales qui donnent des poids comparables (0,23 et 0,24 g).

Globalement, la combinaison hormonale I favorise la callogenèse et une bonne croissance des cals.

L'induction de la callogenèse et la croissance des cals sont favorisées par un équilibre trophique qui assure aux cellules les éléments minéraux indispensables à leur croissance, et un équilibre hormonal qui contrôle leur différenciation. Actuellement, le mécanisme hormonal qui règle la croissance n'est pas bien élucidé. Il est clair que la présence d'auxine joue un rôle important. D'autres hormones, surtout les cytokinines et l'acide abscissique, pourraient bien être impliqués mais la nature de leur interaction est complexe et n'a pas été clairement déterminée.

Plusieurs travaux ont étudié l'effet de la composante hormonale sur la croissance des cals et leur capacité à produire des anthraquinones.

L'incorporation du L-phénylalanine dans le milieu de culture des cals de *Cassia fustila* stimule, à la fois, la croissance des cals et la production des polyphénols.

La croissance maximale des cals et les teneurs les plus élevées en polyphénols (acide gallique, anthocyanidines) ont été obtenues par l'addition de 100 mg.l⁻¹ du L-phénylalanine dans le milieu de culture [91].

Une corrélation négative entre la croissance des cals et la production des métabolites secondaires a été signalée par plusieurs auteurs comme Pareilleux et Vinas [92] sur *Catharanthus roseus*, Hussein et al [93]. Hussein,Reda,El Bahr et Ghanem [94] sur *Datura stramonium L.* Dans cette optique, il est suggéré que le taux de la croissance est lui-même un facteur déterminant pour la biosynthèse des métabolites secondaires, ce qui permet la diversification des précurseurs en métabolites primaires indispensables à la synthèse des métabolites secondaires [95].

3.2.3. L'effet de la combinaison hormonale sur la biosynthèse des sennosides dans les cals issus des explants racinaires, caulinaires et foliaires (annexe 6) :

Les figure 3.10 et 3.11 représentent l'effet de la combinaison hormonale sur la biosynthèse des sennosides.

Le dosage des sennosides dans les 3 types de cals développés sur un milieu de culture contenant 3 combinaisons hormonales démontre que :

- La synthèse des sennosides a eu lieu dans tous les cals quelque soit la nature de l'explant.
- La teneur en sennosides synthétisés dans les cals varie en fonction de type de l'explant et la combinaison hormonale du milieu.
- La combinaison hormonale I semble favorable pour la biosynthèse des sennosides.

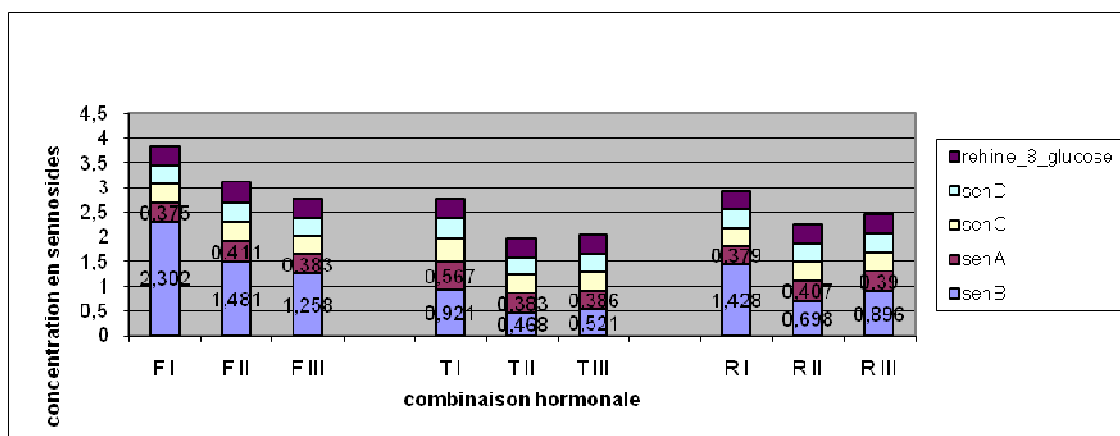


Figure 3.10 effet de la combinaison hormonale sur la biosynthèse des sennosides

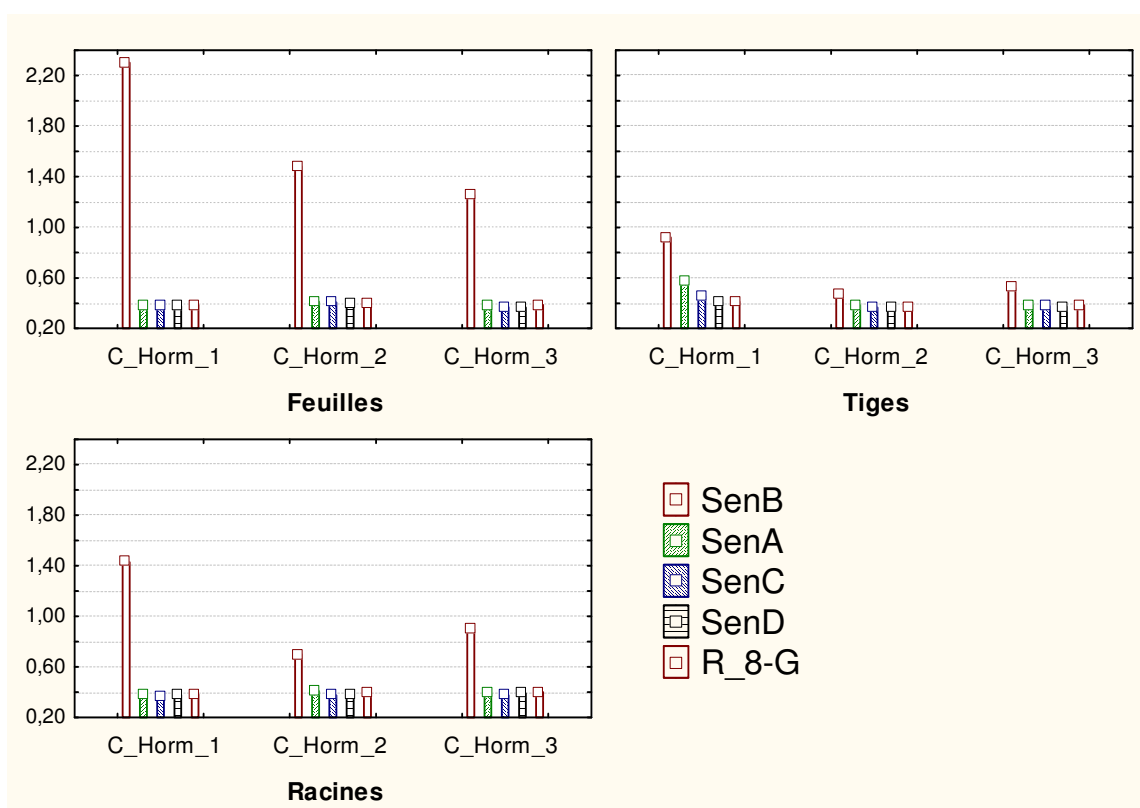


Figure 3.11 : Effet de la combinaison hormonale sur la biosynthèse des sennosides

La teneur en sennosides semble la plus élevée dans les cals issus des explants foliaires, moyenne à faible dans les cals issus de explants racinaires et caulinaires.

Les variations de la teneur en sennosides dans les cals suivent la même allure que celle des vitroplants (variation de la teneur en sennosides B et stabilité pour les autres types de sennosides).

La teneur en sennoside B est majoritaire par rapport aux autres types de sennosides quel que soit le type de cals et la composante hormonale offerte par le milieu nutritif.

Les teneurs en sennoside A, B, C et rehine-8-glucoside restent comparables pour les trois types de cals et les trois combinaisons hormonales utilisées.

La diminution de la teneur en sennosides B des cals durant les 3 mois de culture (figure 3.10) est due selon Nazif N.M et al [88] à l'effet rétro-inhibiteur exercé par les sennosides largués dans le milieu de culture sur leur propre biosynthèse.

L'étude statistique a été réalisée afin de déterminer s'il existe un effet de la combinaison hormonale sur la biosynthèse des sennosides selon le type de cal.

Les valeurs moyennes globales obtenues sont consignées et détaillées pour chaque sennoside (annexe 7).

Nous avons ensuite comparé ces moyennes en fonction des deux paramètres « hormone » puis « type de cal », les calculs (détaillés annexe 8) sont représentés dans le tableau 3.6 (F est le facteur de Fisher-Snedecor et p le degré de signification) :

Tableau 3.6 poids moyen des sennosides

	En fonction de la combinaison hormonale		En fonction du type de cal	
Sennoside A	F = 0,5064	p = 0,6367	F = 0,6393	p = 0,5742
Sennoside C	F = 0,440	p = 0,6718	F = 0,534	p = 0,6229
Sennoside D	F = 0,260	p = 0,7833	F = 0,028	p = 0,9730
Rehine_8_Glucose	F = 0,050	p = 0,9519	F = 0,061	p = 0,9416
Sennoside B	F = 13,322	p = 0,017	F = 25,423	p = 0,0053

- La biosynthèse du sennoside A donne des valeurs comparables pour les 3 types de combinaisons hormonales ($p = 0,6367$) et pour les 3 types de cals (feuilles, tiges et racines $p = 0,5742$).
- Le constat est le même pour le sennoside C ($p = 0,6718$ selon le type d'hormone et $p = 0,6229$ selon le type de cal), le sennoside D ($p = 0,7833$ selon le type d'hormone et $p = 0,9730$ selon le type de cal) et le rehine_8_glucoside ($p = 0,9519$ selon le type d'hormone et $p = 0,9416$ selon le type de cal).

Nous remarquons que seule la biosynthèse du sennoside B montre des différences significatives selon le type de l'hormone retenue ($p = 0,017$) et hautement significatives ($p = 0,0053$) selon le type de cal.

Ceci est visualisé sur les figures 3.12 et 3.13 (calculs en annexe 9), la composante hormonale I est la composante qui favorise davantage une bonne croissance des cals et garantit une biosynthèse accrue des sennosides B (1,55g contre 0,88 et 0,89g) et que cette biosynthèse est significativement meilleure dans les feuilles (1,68 g contre 0,64 et 1,01 g).

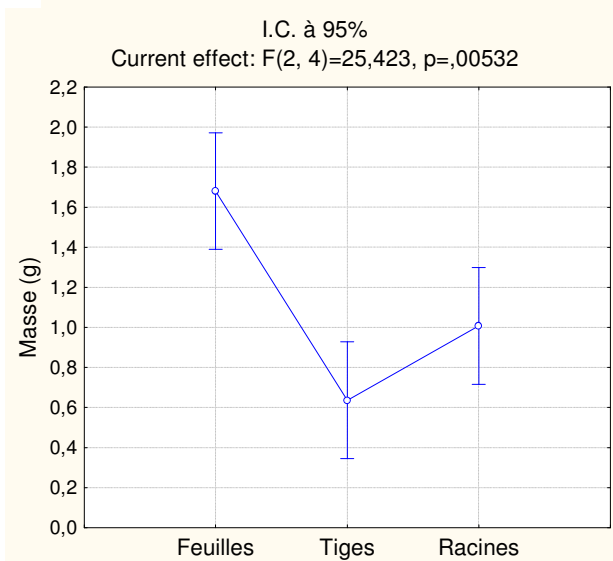
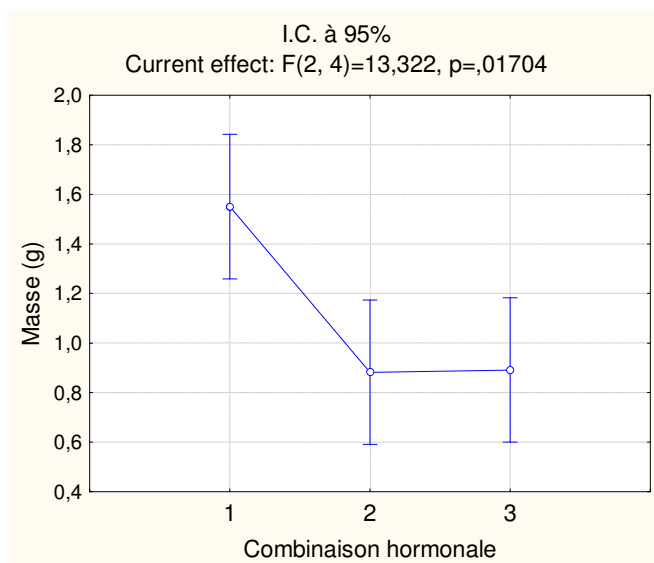


Figure 3.12 : Poids moyens des sennosides en fonction de la combinaison hormonale et du type de cal

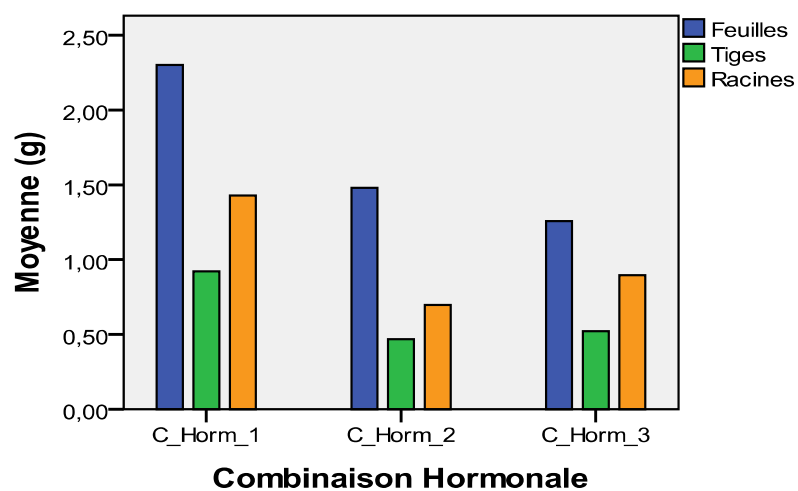


Figure 3.13 : moyennes des poids des sennosides en fonction de la combinaison hormonale

Nos résultats corroborent ceux de [96] qui ont souligné que la concentration des sennosides dans les cultures cellulaires varie selon le type des cellules et la composition chimique du milieu de culture, ainsi que selon la nature des hormones exogènes présentes dans le milieu.

Selon ces mêmes auteurs, le milieu qui donne la meilleure organogénèse et le meilleur développement cellulaire donne automatiquement une meilleure biosynthèse des sennosides. Selon ces mêmes auteurs, plusieurs observations indiquent que le stade de développement des cultures cellulaires est un facteur de régulation important des différentes voies biosynthétiques des métabolites secondaires.

La production des anthraquinones par la culture des cals de *Cassia senna* a été améliorée par l'acétate de magnésium, l'acide schikimique, du 2,4D et la kinétine qui ont été ajoutés au milieu [97]

Ainsi, une augmentation de la production des anthraquinones a été constatée dans la culture cellulaire de *Galium verum* par un polymère adsorbant [98].

La production des dérivés anthraquinoniques, le chrysophanol et l'émodin dans les tissus des cals de *Rheum palmatum* a été stimulée par un traitement par le 2-CEPA (ethephon) [99].

La culture des tissus en division active accumule peu de substances secondaires [100]. Le L-tryptophane inhibe sévèrement la croissance cellulaire, et la production des anthraquinones chez la culture cellulaire de *Cinchona ledgeriana* [101].

Une corrélation négative entre la croissance des tissus *in vitro* et la biosynthèse des métabolites secondaires a été mise en évidence par plusieurs auteurs [102]

Subbaiah et al.[103] ont étudié l'influence du saccharose, du 2,4-D, de la kinétine et de l'acide gibbérélique sur la croissance, et la biosynthèse des métabolites secondaires dans les cals de *Cassia fistula*. Le saccharose, à des concentrations élevées, stimule la croissance et la synthèse des polyphénols, le 2,4-D et la kinétine à des doses supra optimales l'inhibe. L'initiation de la biosynthèse des polyphénols est influencée par le 2,4-D et la kinétine, leur accumulation est étroitement dépendante des concentrations des sucres dans le milieu de culture.

L'étude réalisée par Shah et al.[104] concernant l'effet des hormones sur l'accumulation des polyphénols dans les cals de *Cassia fistula* a montré que l'initiation de la synthèse des polyphénols est dépendante de la concentration en auxine dans le milieu, leur accumulation dépend de la phase de croissance des cals. Les mêmes constatations ont été soulignées in vivo par Mahesh et al.[105].

L'amélioration du milieu de culture par l'addition des précurseurs appropriés stimule la synthèse de certains métabolites secondaires in vitro.

3.3 Etude de l'effet du stress salin sur la biomasse des cals :

L'étude a porté sur différents types de cals issus des feuilles, des tiges et des racines (figures 3.14,3.15,3.16) dont on a mesuré l'évolution de la biomasse dans le temps en fonction de différentes concentrations de NaCl (0% ,0.5%,1%, 1,50%).

Dans les graphiques 3D (figure 3.17 et 3.18), chaque bloc de 3 mesures représente l'évolution dans le temps (du 1^{er} au 3^{ème} mois), (annexe 10)

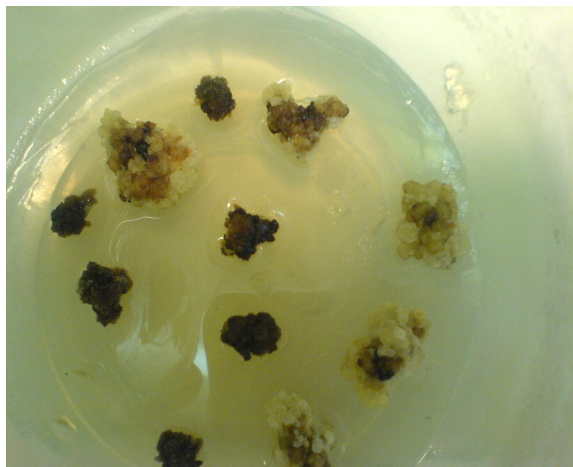


Figure 3.14 : cals soumis au stress salin à 0.5% pendant 01 mois



Figure 3.15 : cals soumis au stress salin à 0.5% pendant 02 mois



Figure 3.16 : cals soumis à un stress salin à 0.5% Pendant 03 mois

3.3.1.1 sur le poids frais

Les résultats obtenus sont illustrés dans la figure 3.17, nous remarquons que les meilleurs rendements en poids frais des cals issus des différents explants s'obtiennent à 0% NaCl (temoin); le poids frais des cals augmente entre 1^{er} et le 3^{ème} mois. Cette augmentation pour les feuilles est plus accentuée pour les tiges et encore plus pour les racines.

Le rendement de la biomasse fraîche des cals à 0,5% NaCl est plus faible pour tous les types de cals (annexe 10)

Les meilleurs rendements en poids frais s'observent dans les cals issus des explants racinaires et un peu moins pour les cals issus des explants caulinaires tout en restant comparables pour les 3 concentrations de NaCl (0% à 1,0%).(annexe10)

Au-delà, et pour un stress de 1,5%, les valeurs chutent même pour les cals issus des explants racinaires.

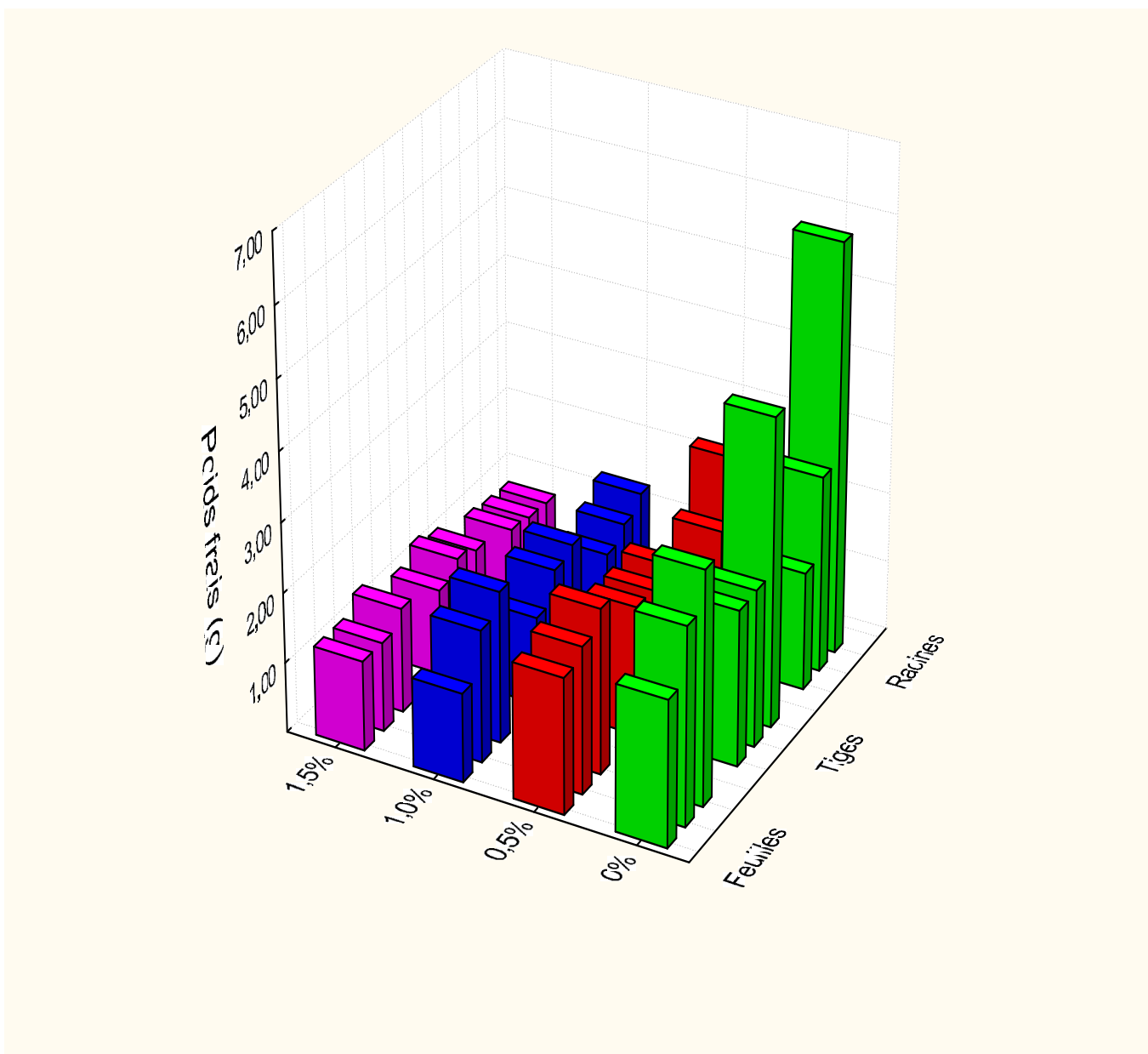


Figure 3.17 effet du Stress salin (en % de NaCl) sur le poids frais des cals (feuilles, tiges ou racines)

3.3.1.2 sur le poids sec

La figure 3.18 montre que la diminution de la biomasse sèche des cals est d'autant plus importante dans les cals issus des explants foliaires, caulinaires que celles issus des explants racinaires.

La diminution de la biomasse des cals est importante dans le milieu contenant les concentrations 1,5% en NaCl.

La biomasse sèche des cals sans stress salin est meilleure par rapport aux autres traitements, où l'on a enregistré une diminution de la biomasse sèche. (annexe 10)

La biomasse des cals issus des explants foliaires est la plus faible, comparativement avec la biomasse des cals issus des explants caulinaires et racinaires et ceux-ci durant les trois mois de croissance.

la concentration 1,5% en NaCl, la biomasse sèche des cals diminue quelle que soit la nature des explants.

La diminution de la biomasse des cals est due à l'effet inhibiteur de la salinité sur la croissance .

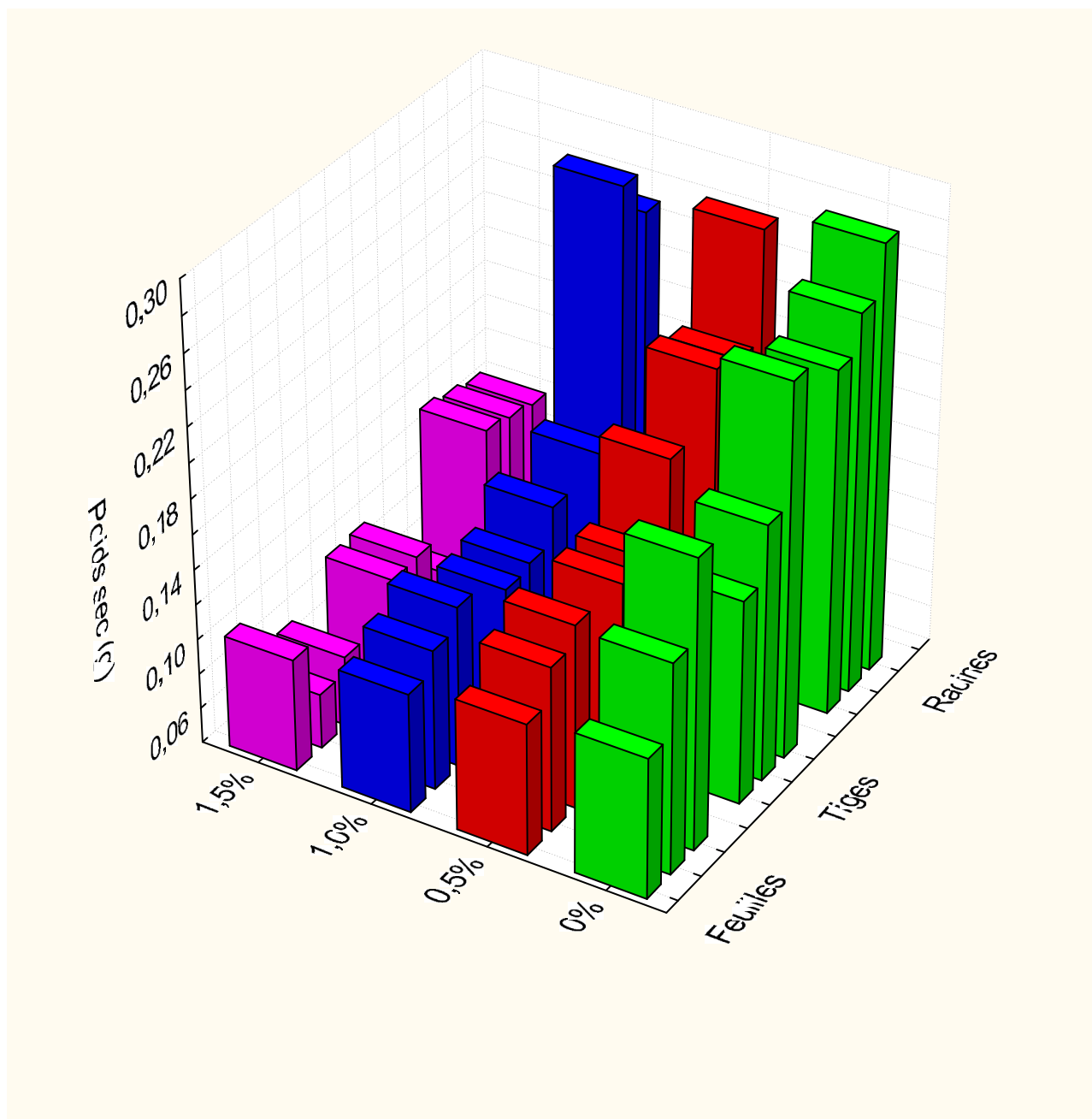


Figure 3.18: Effet du stress salin (en % de NaCl) sur le poids sec des cals (feuilles, tiges ou racines)

Les fortes concentrations en sel dans le milieu sont inextricablement liées au stress hydrique. Des concentrations salines élevées génèrent de bas potentiels hydriques dans le milieu, une forme de sécheresse physiologique, qui rendent de plus en plus difficiles l'acquisition d'eau par les plantes

Des concentrations salines trop fortes dans le milieu provoquent une altération de la nutrition minérale, en particulier, vis-à-vis des transporteurs ioniques cellulaires, le sodium entre en compétition avec le calcium et le potassium, le chlorure avec le nitrate, le phosphate et le sulfate. Il est connu qu'une concentration saline élevée supprime la croissance et réduit beaucoup de phénomènes physiologiques dans la plante.

Les effets toxiques des ions spécifiques, et spécialement Na^+ et Cl^- , engendrent des dommages structurels et métaboliques chez les plantes. Bien que le mécanisme précis de l'endommagement ne soit pas encore bien compris, l'excès pourrait provoquer des problèmes de membranes, des inhibitions enzymatiques ou un dysfonctionnement métabolique général.

Plusieurs travaux ont souligné l'effet dépressif de la salinité sur la croissance des cals de différentes espèces. Parmi ces travaux, citons :

- celui de El-Bahr et Ghanem [106] qui ont constaté une diminution du poids frais et sec de trois types de cals de *Vigna sinensis* en fonction de l'augmentation des doses en NaCl dans le milieu de culture.
- Youssef et al [107] ont rapporté que la présence des sels dans le milieu de culture réduit la croissance des cals de *Nigella sativa* comparativement à la croissance des cals témoins.
- Tyagi et al [108] ont montré que la croissance des cellules cultivées de *Datura innoxia* a été sévèrement inhibée par le Na Cl. La croissance des cellules est arrêtée par la concentration la plus élevée (1%) en NaCl.

Plusieurs autres auteurs ont souligné que les concentrations élevées en sel affectent le potentiel hydrique des cellules, les activités physicochimiques et l'intégrité et les fonctions membranaires [109].

Le stress salin provoque un déséquilibre ionique, et induit chez les plantes une hyper stress osmotique.

Le stress salin engendre un stress oxydatif qui cause des dommages aux protéines, aux membranes et à l'ADN [110],[111],[112].

L'influence de plusieurs doses en NaCl sur le développement des cals de *Cassia acutifolia* in vitro a été étudiée par Nasif et al. [88]. La salinité affecte la biomasse fraîche et sèche des cals. La croissance des cals a été importante en l'absence de sel.

La présence d'une concentration 1,5% en NaCl dans le milieu de culture réduit la croissance de cals issues des explants racinaires et cotylédonaire comparativement au témoin.

A la même concentration, les cals issues des explants racinaires ont enregistré les meilleures valeurs en biomasse sèche comparativement aux autres types de cals qui se développent dans les mêmes niveaux de salinité.

L'effet de la salinité sur la croissance des cals de citrange cultivés sur un milieu de culture contenant des concentrations croissantes en NaCl (jusqu'à 8g.l⁻¹ de NaCl), a montré que la salinité a ralenti la croissance et provoque le brunissement de la plupart des explants (cals sensibles).

Les cals tolérants ont présenté une croissance comparable à celle des témoins. Le dosage de certains ions minéraux a révélé que la teneur en K⁺ des cals tolérants a été voisine de celle des cals témoins, mais plus élevée que celle des cals sensibles.

En revanche, la teneur en ions Na⁺ des cals tolérants et sensibles a été relativement plus élevée que celle des témoins. Le sodium s'accumulerait donc à deux niveaux cellulaires selon le type de cals : envahissement du cytosol (effet toxique) pour les cals sensibles ou compartimentage vacuolaire pour les cals tolérants.

La salinité a provoqué l'accumulation de proline et de sucres solubles dans les cals tolérants mais pas dans les cals sensibles [113].

Nos conclusions concernant l'effet du stress (0% et 0,5%) sont encore plus visibles sur les figures suivantes

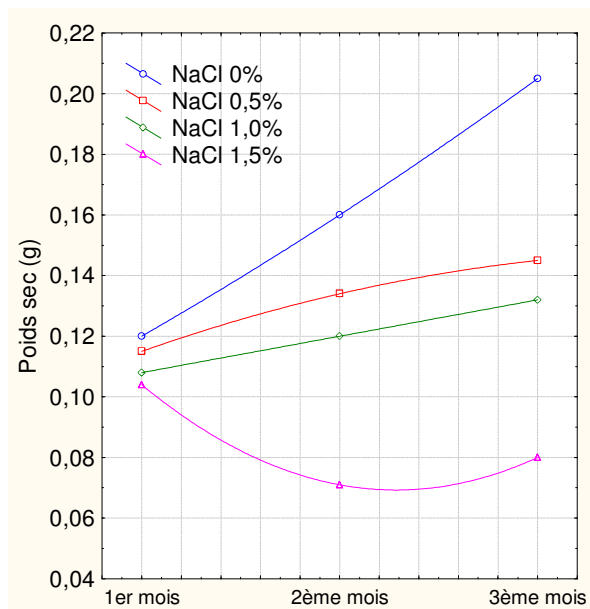


Figure 3.19 : Poids sec des feuilles

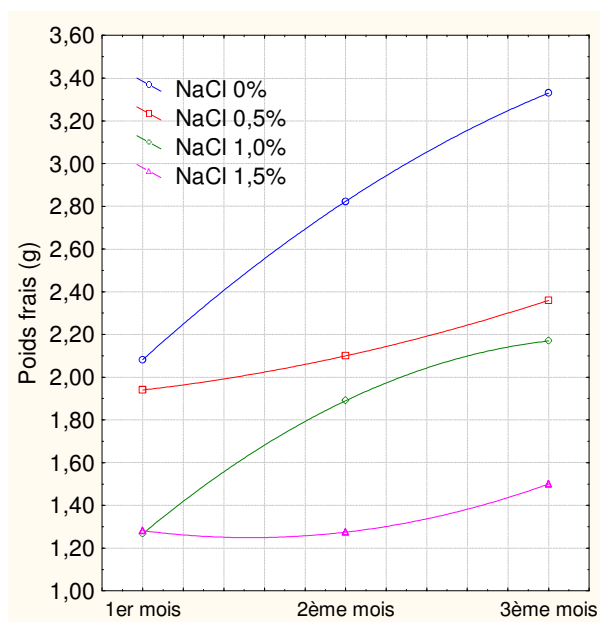


Figure 3.20 : Poids frais des feuilles

Les conclusions concernant les cals issus de racines sont encore plus visibles sur le diagramme 3.21 :

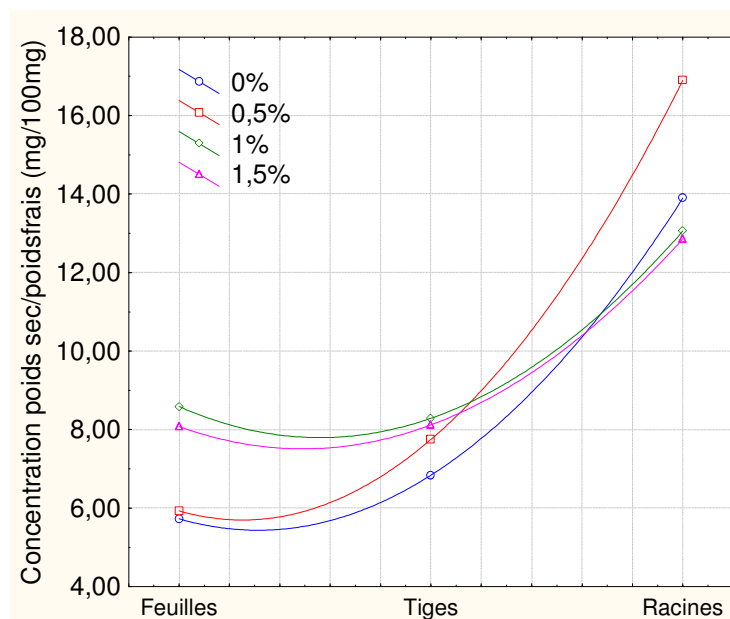


Figure 3.21 : Pourcentage de poids sec/poids frais le 1^{er} mois en fonction du stress salin

3.3.2 Effet du stress salin sur la biosynthèse des sennosides dans les cals issus de différents explants et cultivés in vitro pendant 3 mois (annexe 11) :

La teneur en sennosides dans les cals témoins et les cals développés sur des milieux contenant trois doses en NaCl, varie en fonction du type de cal et de la concentration du milieu en NaCl. (figures 3.22)

3.3.2.1. Cals issus des explants Foliaires :

Les teneurs moyennes de sennoside B dans les cals sont comparées à différentes concentrations salines. Nous pouvons considérer les variances comme comparables (le test de Levene d'homogénéité des variances donne $p = 0,040$, annexe 12-1). Le test ANOVA met en évidence une différence très hautement significative entre les différents stress ($F=17,787$ $p=0,00067$). Les meilleurs rendements en sennoside B s'obtiennent à 0% et 0,5% NaCl puisqu'on obtient des moyennes de 3,22 à 3,25 g contre des moyennes de 1,07 à 1,16 g pour des salinités plus élevées (test SNK tableau 3.7).

Tableau 3.7 : Test de Student-Newman-Keuls

	N	Subset for alpha = 0.05	
1,0% NaCl	3	1,0673	
1,5% NaCl	3	1,1597	
0,5% NaCl	3		3,2223
0% NaCl	3		3,2553
Sig.		0,828	0,938

3.3.2.2. Cals issus des explants caulinaires :

En ce qui concerne ces cals, nous constatons toujours des variances comparables (test de Levene, $p = 0,273$, annexe 12-2). Les teneurs moyennes en sennoside B dans les cals restent relativement comparables quel que soit le stress ($F=2,223$ $p = 0,1630$). Cependant, si l'on se limite au seul début de période, il faut noter la forte valeur obtenue pour la concentration à 0,5% de NaCl. Les quatre moyennes sont comparables au risque 5%. (annexe11)

Tableau 3.8 : Test de Student-Newman-Keuls

	N	Subset for alpha = .05
1,5% NaCl	3	1,2657
0% NaCl	3	1,2923
1,0% NaCl	3	1,4560
0,5% NaCl	3	2,3580
Sig.		,195

3.3.2.3. Cals issus des explants racinaires :

Les variances sont toujours comparables (test de Levene $p = 0,048$ pratiquement égal à 5%, annexe 12-3). Les teneurs moyennes en sennoside B dans les cals à différentes concentrations salines montrent une différence très hautement significative ($F = 36,200$ et $p = 0,00005$). Le meilleur rendement s'obtient à 0,5% NaCl avec une moyenne de 3,012 g contre des moyennes de 1,755 g; 1,697 et enfin 1,141 g pour les autres concentrations (annexe 11)

Tableau 3.9: Test Student-Newman-Keuls

	N	Subset for alpha = .05		
1,5%NaCl	3	1,1407		
1,0% NaCl	3		1,6970	
0% NaCl	3		1,7547	
0,5% NaCl	3			3,0120
Sig.		1,000	0,764	1,000

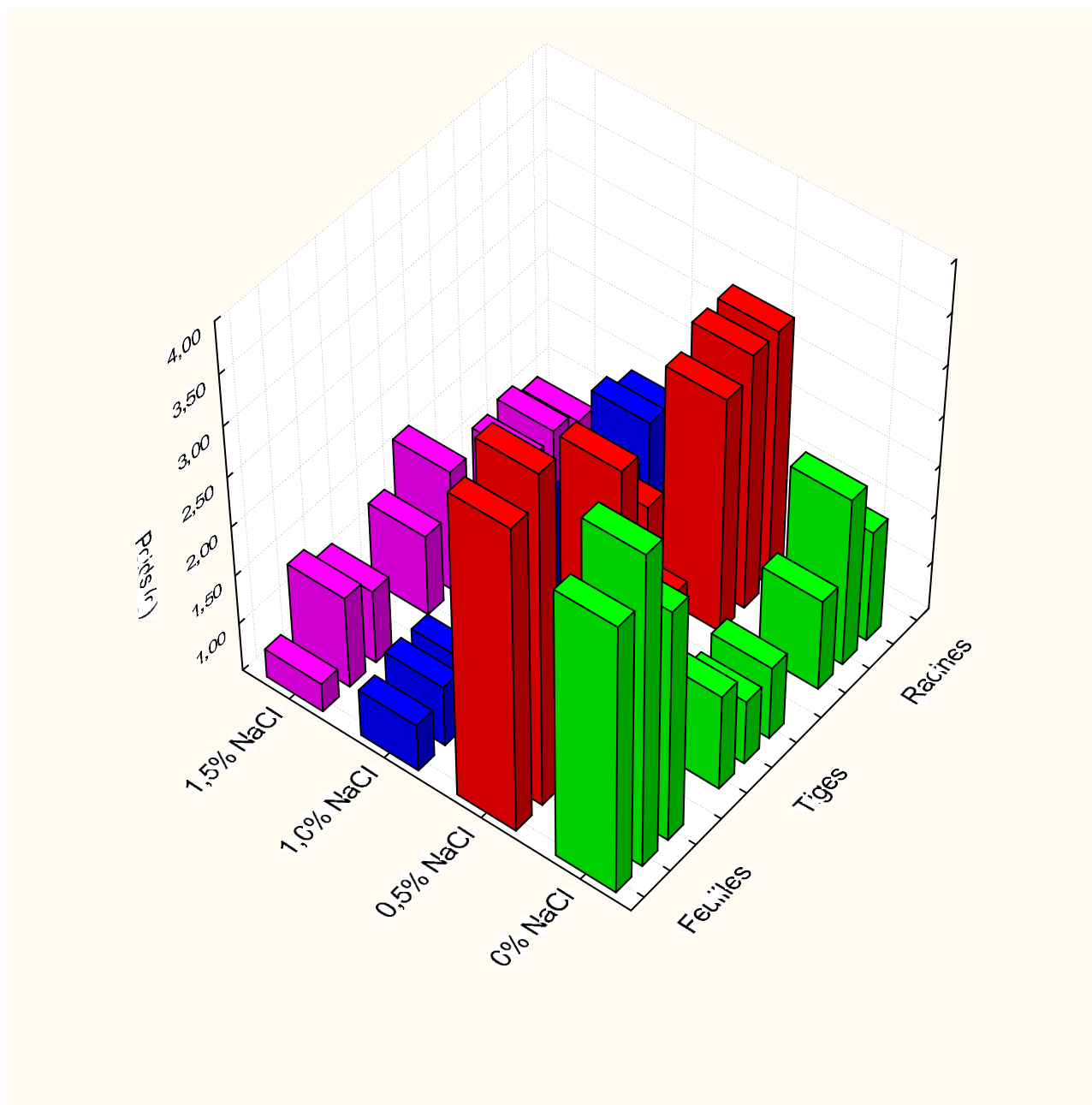


Figure 3.22: Biosynthèse du sennoside B en fonction du stress salin et du type de cal

Finalement et d'un point de vue global, la synthèse des sennosides est la meilleure pour un stress de 0,5% de NaCl (même si elle reste bonne pour un stress de 0% pour les feuilles).

A 0,5% de NaCl, les rendements sont bons pour les trois types de cals même si l'on constate une chute brutale le 3^{ème} mois pour les feuilles et les tiges. Concernant les racines, les rendements restent comparables durant toute la période du 1^{er} au 3^{ème} mois (figure 3.23)

Le chlorure de sodium à la concentration 0,5% a stimulé la synthèse des sennosides dans les cals provenant des différents explants, notamment les cals des explants foliaires et racinaires.

Nos résultats concordent avec ceux obtenus par Rady MN, nazif MN [114] qui ont démontré que la concentration des anthraquinones dans les cellules *Cassia acutifolia* cultivées in vitro en présence de NaCl est nettement supérieure à celle retrouvée dans les cellules cultivées dans un milieu sans sel. La concentration 0,5% en NaCl additionné dans le milieu de culture favorise une biosynthèse importante en sennosides dans les cellules des cals.

Dans le milieu contenant une concentration 1% en NaCl, nous constatons que la teneur en sennoside B diminue dans les cals quelque soit leur type. Cette diminution est importante dans les cals issus des explants foliaires.

Les concentrations en NaCl de 1% stimulent aussi la biosynthèse des sennosides dans les cals issus des explants caulinaires et racinaires. La synthèse des sennoside dans les cals est affectée pour les concentrations de 1,5% en NaCl. Ces concentrations deviennent toxiques pour les cellules et exercent un effet dépressif sur la croissance et affectent le métabolisme cellulaire, entre autres la synthèse des sennosides.

L'effet inhibiteur des concentrations élevées en NaCl est dû à l'interférence qui s'établit entre Na⁺ et Cl⁻ avec les enzymes impliqués dans la biosynthèse des sennosides. Ainsi, les cellules qui se développent dans un environnement salin subissent un stress osmotique résultant de la diminution du potentiel hydrique dans le milieu.

Plusieurs anthraquinones ont été isolées à partir de la culture in vitro des tissus de *Cassia acutifolia* sp [115]

Plusieurs auteurs ont publié des rapports sur l'accumulation des anthraquinones et l'action des éliciteurs sur leur biosynthèses in vitro a partir des cultures cellulaires, ainsi que les facteurs qui influencent leur production tels que les régulateurs de croissance [116],[114], la composition du milieu de culture [117],[97] l'effet de l'illumination[118] et les effets des microorganismes et les éliciteurs fongiques [119],[120].

Nazif et al [88] ont étudié la stimulation de la production des anthraquinones d'une suspension des cultures cellulaires de *Cassia acutifolia* par le stress salin. Leur résultat montre que le NaCl augmente la teneur en anthraquinone et réduit la croissance de la culture. La teneur des anthraquinones et leur glucoside varient dans les cellules et le milieu de culture selon la nature des explants. Le stress salin affecte énormément la production des anthraquinones dans les cellules des explants provenant de l'hypocotyle et les feuilles cotylédonaires. Les explants racinaires sont modérément touchés par la salinité.

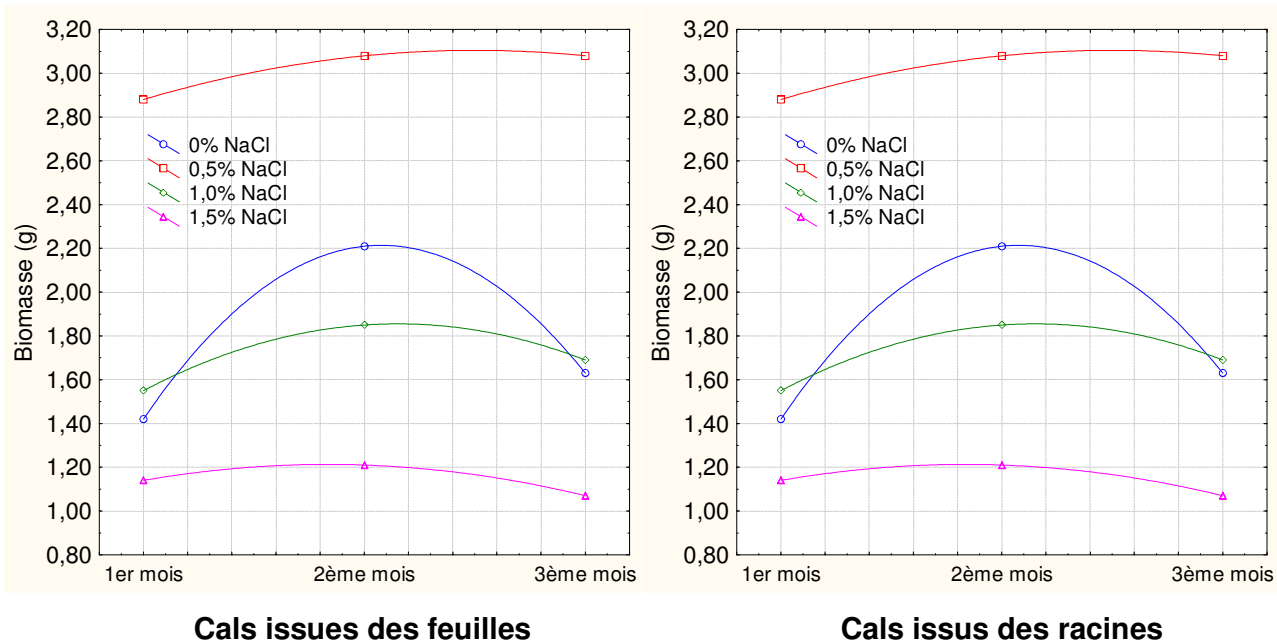


Figure 3.23 Biomasse du senoside B en fonction du stress salin

3.4. Etude de L'effet du stress thermique sur la biosynthèse des sennosides

Les cals (figures 3.24 et 3.25) et les vitroplants sont soumis à un stress thermique par une exposition à une température de 4°C un jour sur deux, le résultat du dosage des sennosides in vitro est représenté en annexe 13.



Figure 3.24 : cals soumis à un stress thermique pendant 01 mois

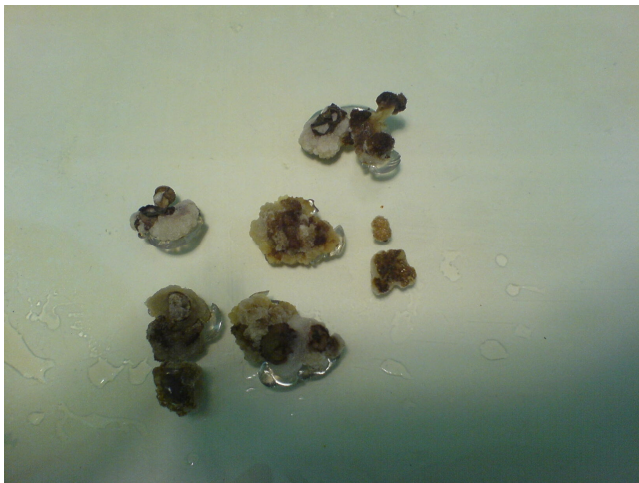


Figure 3.25 : cals soumis à un stress thermique pendant 02 mois

3.4.1.1 L'effet du stress thermique sur la biosynthèse des sennosides dans les différentes parties des vitroplants pendant trois mois :

Les résultats du dosage des sennosides dans les différents organes des vitroplants soumis à un stress thermique montrent que le sennoside B est majoritaire, sa teneur varie en fonction du type de l'organe. Nous constatons aussi une faiblesse et une stabilité dans les teneurs des autres sennosides dans les différents organes dans le temps (Annexe 13)

Cette teneur reste faible dans les tiges et les racines tout en diminuant durant les 3 mois d'expérience.

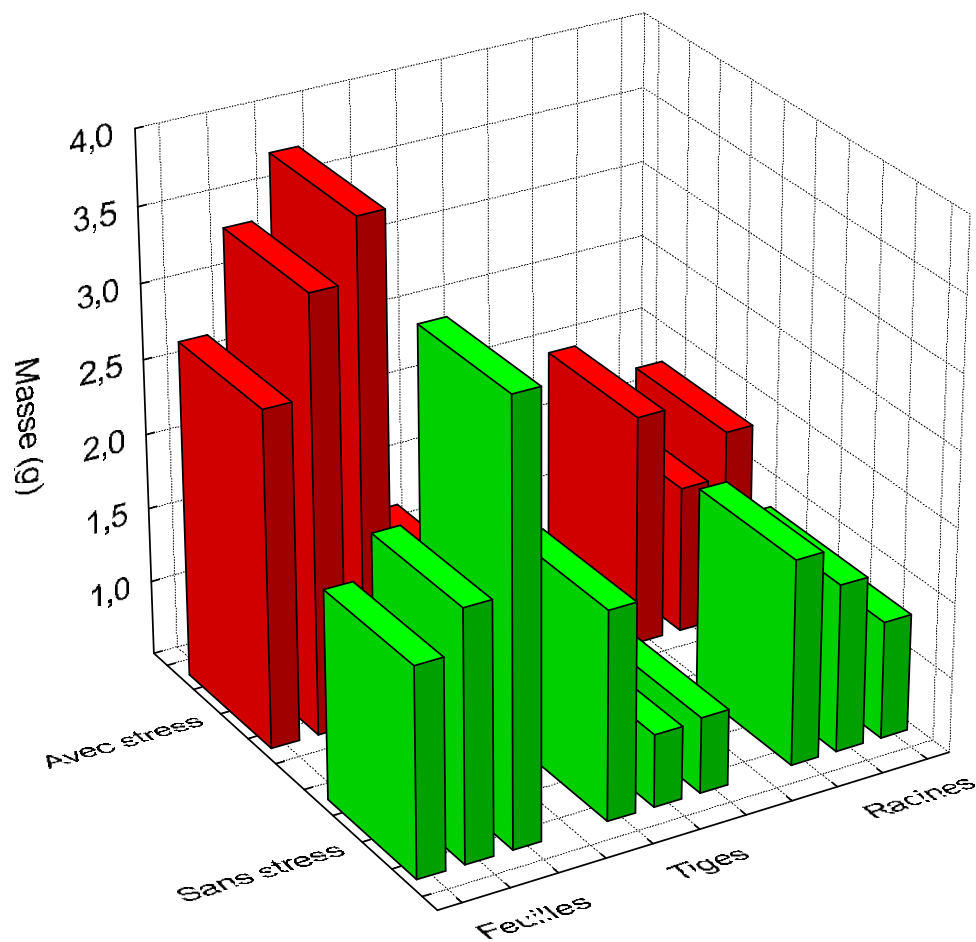


Figure 3.26: Teneur en senoside B dans les différents parties des vitroplants avec et sans stress

La biosynthèse est la meilleure pour les feuilles, tout en semblant être légèrement plus faible sans stress et subissant une augmentation entre le 1^{er} et le 3^{ème} mois (annexe 14).

Si nous comparons cette biosynthèse (avec stress) pour les trois parties de la plante, la différence est hautement significative (annexe 14, $p = 0,0008$) entre les feuilles, tiges et racines. Nous avons obtenu les moyennes suivantes (annexe 14) :

Tableau 3.10 Poids moyen avec stress

Type	Poids moyen	SEM	N
Feuilles	3,3250	0,3132	3
Tiges	1,0900	0,0987	3
Racines	1,7723	0,1629	3

Tableau 3.11 poids moyen sans stress

Type	Poids moyen	SEM	N
Feuilles	2,4950	0,4704	3
Tiges	1,2941	0,2988	3
Racines	1,5905	0,1704	3

Le meilleur poids (3,82 g, annexe 13) s'obtient pour les feuilles avec stress après 60 jours avec une moyenne de $3,325 \pm 0,313$ g. (tableau 3.10)

Vient ensuite le meilleur poids (3,42 g, annexe 13) qui s'obtient pour les feuilles sans stress après 60 jours avec une moyenne de $2,495 \pm 0,470$ g. (tableau 3.11)

Les mêmes types de fluctuations sont observés lorsque l'on compare ces résultats à ceux obtenus pour les vitroplants non soumis au stress thermique. Nous pouvons dire, en définitive, que le stress exercé par le froid n'a pas d'effet marqué sur la biosynthèse des sennosides.

L'étude réalisée par Gonzalez et Borroto [121] sur les effets provoqués par le stress thermique dans les plantules de bananier a montré que les températures extrêmes ont entraîné une augmentation du nombre de plantes présentant un symptôme de stress, mesuré par la proportion de zones nécrosées sur les feuilles et qui était de 38% et 97% à 34 °C et 7 °C respectivement.

Les températures extrêmes ont significativement réduit la hauteur des plantules, et influencé l'émission de feuilles, en diminuant leur nombre de manière significative par rapport au témoin.

En ce qui concerne le poids frais, les températures n'ont pas eu une influence directe.

Actuellement on ne dispose pas d'informations sur les modifications moléculaires biochimiques liées au désordre provoqué par les températures extrêmes. Chez d'autres espèces, l'application exogène de régulateurs de la croissance végétale a pu limiter les dommages [121].

3.4.1.2. L'effet du stress thermique sur la biosynthèse des sennosides chez les cals issus des différents explants et cultivées in vitro pendant 3 mois

La synthèse des sennosides B dans les cals soumis à un stress thermique est importante comparativement aux autres sennosides, dont leurs teneurs restent faibles et constantes pour les différents types de cals en fonction du temps (figure 3.27).

La teneur en sennoside B dans les cals issus des explants foliaires et racinaires dépasse celui des cals issus des explants caulinaires (annexe 16). Les variations de la teneur en sennosides dans les cals correspondent à leur variation dans les vitroplants.

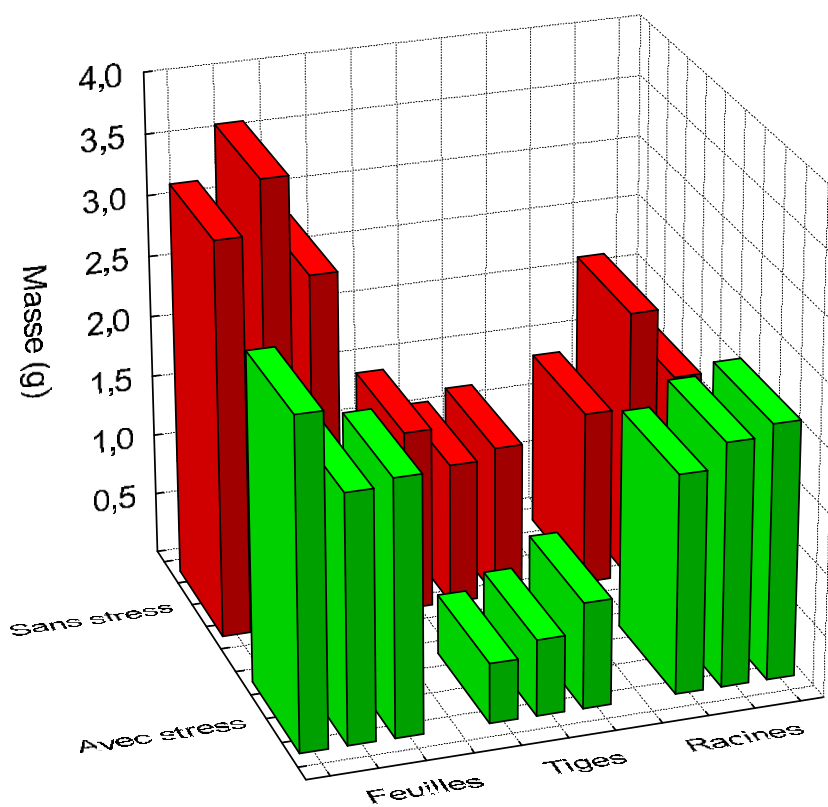


Figure 3.27: Teneur en sennoside B dans les différents types de cals avec et sans stress thermique

Nous comparons tout d'abord par ANOVA les poids moyens du sennoside B pour les trois types de cals (feuilles, tiges et racines), le test de Levene de comparaison des variances étant concluant ($p = 0,408$, annexe 18).

La différence observée est hautement significative entre les feuilles, tiges et racines sans stress ($F = 26,53$ et $p = 0,00105$, annexe 19).

Le test SNK (tableau 3.12) (ou de Tukey) montre que les feuilles ont le meilleur poids moyen (3,255 g).

La biosynthèse est donc de façon très significative la meilleure pour les feuilles.

Tableau 3.12 : test SNK et TURKEY

	Type	N	Subset for alpha = 0.05	
			1	2
Student-Newman-Keuls ^a	Tiges	3	1,292333	
	Racines	3	1,754667	
	Feuilles	3		3,255333
	Sig.		0,152	1,000
Tukey HSD ^a	Tiges	3	1,292333	
	Racines	3	1,754667	
	Feuilles	3		3,255333
	Sig.		0,301	1,000

Le même traitement est fait pour l'échantillon « avec stress », le test de Levene de comparaison des variances étant toujours concluant ($p = 0,152$, annexe 18).

La différence observée est là aussi très hautement significative entre les feuilles, tiges et racines avec stress ($F = 34,126$ et $p = 0,00053$, annexe 19)

Là aussi, le test SNK (ou de Tukey) (tableau 3.13) montre que les feuilles, avec les racines, ont le meilleur poids moyen (2,264 g).

La biosynthèse est donc comparable pour les feuilles et les racines, significativement moindre pour les tiges.

Tableau 3.13 test SNK et TURKEY

	Type	N	Subset for alpha = 0.05	
			1	2
Student-Newman-Keuls ^a	Tiges	3	0,658333	
	Racines	3		1,955333
	Feuilles	3		2,263667
	Sig.		1,000	0,186
Tukey HSD ^a	Tiges	3	,658333	
	Racines	3		1,955333
	Feuilles	3		2,263667
	Sig.		1,000	0,357

Dans les feuilles, la comparaison des poids moyens (t-test) (tableau 3.14) montre une différence significative au risque 5% ($p = 0,0034$). Le stress inhibe donc la biosynthèse du sennoside B (annexe 20)

Tableau 3.14 : T-TEST

Mean Sans stress	Mean Avec stress	t-value	df	p
3,2553	2,2637	3,158	4	0,0034

La biosynthèse pour les feuilles est significativement meilleure sans stress thermique (3,26 g contre 2,26)

Tableau 3.15 Poids moyen avec stress

Type	Moyenne	SEM	N
Feuilles	2,2637	0,2100	3
Tiges	0,6583	0,1098	3
Racines	1,9553	0,0876	3

Tableau 3.16 poids moyen sans stress

Type	Moyenne	SEM	N
Feuilles	3,2553	0,2335	3
Tiges	1,2923	0,0959	3
Racines	1,7547	0,2353	3

La teneur en sennoside B subit une décroissance dans les cals issus des explants foliaires entre le 1^{er} et le 3^{ème} mois de culture, l'inverse est constaté sur les cals issus des explants racinaires.

Certains travaux ont souligné que la biosynthèse des sennosides se fait aussi bien dans les plantule mères et les cals qui en dérivent, ce qui prouve que les cellules des cals sont dotées du même potentiel génétique et de la capacité à synthétiser les métabolites secondaires que ceux de la plante mère [122].

Le potentiel biosynthétique est dû, selon certains auteurs, à la totipotence de la cellule végétale où chaque cellule est capable de produire les métabolites secondaire [123].

Les travaux de Shrivastava et al [86] ont montré que chez *C senna*, quelle que soit l'origine des cellules obtenues par callogenèse, celles-ci ont le même potentiel physiologique en ce qui concerne la synthèse des métabolites secondaires que la plante cultivée in vitro.

Les mêmes résultats ont été obtenus chez l'oignon [124].

CONCLUSION

Au terme de notre modeste travail, nous avons été initié à la culture in vitro d'une espèce de plante médicinale algérienne qui pousse dans le sud : *Cassia obovata*

La germination in vitro des graines de *Cassia obovata* a donné des vitroplants que nous avons développé pendant deux mois sur milieu MS, afin de suivre la biosynthèse des molécules actives (sennosides) dans chaque organe du vitroplant

L'étude statistique révèle que le dosage du sennoside présente des valeurs comparables dans le temps (du premier au troisième mois de culture) mais aussi pour les trois parties du vitroplant.

L'induction de la callogénèse à partir d'explants issus des feuilles , racines et tiges des vitroplants a montré que :

-Le taux de callogénèse est très élevé dans les cals issus des explants caulinaires.

Concernant l'effet de la combinaison hormonale sur la biomasse des cals nous avons démontré que celle-ci n'avait pas d'effet sur le poids frais et sec des cals foliaires et caulinaires, mais que c'est la combinaison hormonale¹

(MS +1mg 2,4 D + 1mg kinetine) qui donnait la meilleure biomasse chez les cals racinaires.

L'étude de l'effet de la combinaison hormonale sur la biosynthèse des sennosides a montré que :

-La composante hormonale¹ (1mg2,4 D +1mg kinetine) est celle qui favorise davantage une bonne biosynthèse du sennoside B et que le résultat est meilleur lorsqu'il s'agit de cals foliaires.

Enfin l'effet de deux types de stress : salin et thermique en culture in vitro a révélé que :

-Pour le stress salin : les concentration en NaCl de 0,5% 1% 1.5% entraine une diminution du poids frais des cals, le meilleur rendement s'observe dans les cals racinaires.

- Le même résultat a été enregistré concernant le poids sec

-Concernant la biosynthèse du sennoside nous avons enregistré une augmentation de la biosynthèse du sennoside B pour un stress de 0,5% de NaCl dans les racinaires et foliaires mais que au-delà de cette concentration (1%et 1,5%) la biosynthèse des molécules actives est diminué d'où l'effet inhibiteur du Na Cl partir d'un certain seuil.

L'étude de l'effet du stress thermique sur la biosynthèse des molécules actives a donné le résultat suivant :

-Dans les vitroplants le stress n'a pas d'effet marqué sur la biosynthèse du sennoside B

-Dans les cals la biosynthèse du sennoside B est meilleure dans les feuilles et les racines et significativement moindre pour les tiges

-Le stress thermique inhibe la biosynthèse du sennoside B dans les feuilles

Enfin, des études plus poussées seront nécessaires pour établir des résultats plus approfondis, notamment :

- Etudier la culture in vitro des graines de séné sur plusieurs milieu de culture,
- Elargir le spectre des concentrations salines utilisées,
- Etudier plusieurs températures concernant le stress thermique,
- Utiliser d'autres techniques pour le dosage des molécules actives.

Appendice A

Réactifs utilisées :

Acide sulfurique H₂SO₄ à 95%
 Benomyle à 0.4%
 Ethanol à 70%
 Bichlorure de mercure Hg Cl₂
 Ethanol à 50%
 Eau distillée

Composition du milieu Murashige et Skoog (MS):

Macroéléments		Microéléments	
	mg.l ⁻¹		mg.l ⁻¹
KNO ₃	1900	H ₃ BO ₃	6,2
MgSO ₄ , 7H ₂ O	370	MnSO ₄ , 4H ₂ O	22,3
NH ₄ NO ₃	1650	ZnSO ₄ , 7H ₂ O	8,6
CaCl ₂ , 2H ₂ O	440	KI	0,83
KH ₂ PO ₄	170	NaMoO ₄ , 2H ₂ O	0,25
		CuSO ₄ , 5H ₂ O	0,025
		CoCl ₂ , 6H ₂ O	0,025
		Na ₂ -EDTA	37,3
		FeSO ₄ , 7H ₂ O	27,8

Vitamines utilisées mg.l-1 :

Panthotenate de calcium 0.001mg/l
 Biotine 0.01 mg/l
 Acide nicotinique 0.001 mg/l
 Pyridoxine (B6) 0.001 mg/l
 Thiamine (B1) 0.1 mg/l

EDTA (Na₂EDTA*2H₂O) 37,2 mg/lb

Myo-Inositol 100 mg/l

Saccharose 20 g/l

Agar agar 10 g/l

Appendice B

Matériels

Tubes à essai.

Pipettes graduées.

Burettes

Erlenmeyer

Bocaux

Tubes à vis

Becher

Spatules

Papier filtre

Papier aluminium

Film plastique

Entonnoir

Fioles

Pinces

Scalpels

Portoirs

Appareillage

Balance analytique

Vortex

Etuve (NUVE en 500)

Bain -marie (NUVE nb 20)

Spectrophotomètre UV Vis (SHIMADZU)

Hotte à flux laminaire horizontal

Plaque chauffante + agitateur magnétique

Autoclave vertical

Etuve Memmert

Appendice C

Liste des abréviations et symboles utilisés

ADN : acide désoxyribonucléique.

ANA : acide naphtalène acétique.

BAP : benzylaminopurine.

2,4 D : 2,4 dichlorophenoxyacétique.

°C : degrés Celsius .

g : grammes.

Log₁₀ : logarithme décimal.

min : minute.

mg : milligrammes

ml : millilitres.

MS : Murashige et Skoog.

NaCl : chlorure de sodium.

nm : nanomètre.

UV-Vis : ultra violet- visible

ANNEXES

Annexe 1:

Dosage du sennoside B en fonction du temps et du type

Période	Type	Feuilles	Tiges	Racines
1er mois		1,8916	1,8916	1,8704
2ème mois		2,1715	0,9847	1,6188
3ème mois		3,4219	1,006	1,2823

Annexe 2:

Dosage du sennoside B en fonction du temps et du type (ANOVA à effets principaux)

Effect	Univariate Tests of Significance				
	SS	Degr. of Freedom	MS	F	p
Intercept	28,9401	1	28,9401	62,4230	0,0014
Période	0,1833	2	0,0917	0,1977	0,8282
Type	2,3481	2	1,1741	2,5324	0,1947
Error	1,8545	4	0,4636		

Annexe 3: Effet de la combinaison hormonale sur la biomasse des cals, tableau des données :

FEUILLES	Hormone	Poids frais	Poids sec	TIGES	Poids frais	Poids sec	RACINES	Poids frais	Poids sec
	1	3,82	0,2945		2,12	0,2112		4,48	0,2617
	1	2,34	0,3112		4,82	0,4218		2,24	0,2112
	1	2,19	0,128		2,98	0,119		4,23	0,2982
	1	3,34	0,119		2,38	0,2821		3,12	0,232
	1	2,58	0,2008		3,9	0,1449		1,96	0,2402
	1	2,13	0,1907					3,33	0,2094
	1	1,72	0,2211					1,26	0,1888
	1	3,08	0,1482					2,02	0,2138
	1	2,02	0,2837					4,18	0,1917
	1							3,38	0,258
	2	1,28	0,112		4,29	0,2318		3,82	0,213
	2	3,74	0,1138		3,6	0,2592		1,12	0,1882
	2	2,21	0,324		1,92	0,1223		1,29	0,2902
	2	1,8	0,2018		2,56	0,2408		2,31	0,2838
	2	1,72	0,2169		2,38	0,2427		1,19	0,216
	2				1,34	0,1963		2,8	0,1912
	2				1,27	0,4275		1,93	0,2201
	2							3,45	0,2894
	2							2,13	0,2517
	2							1,16	0,2564
	3	2,12	0,1062		2,98	0,1872		2,86	0,1208
	3	2,27	0,1022		2,24	0,3219		1,1	0,1232
	3	1,52	0,2612		1,91	0,2212		0,82	0,0964
	3	1,18	0,1578		2,36	0,11		1,08	0,0886
	3	1,07			3,97	0,1921		1,76	0,1225

3			2,02	0,2817	1,01	0,1064
3			1,87	0,2442	1,08	0,0958
3			1,45	0,3881	0,96	0,1161
3					0,67	0,1022

Annexe 4 : Poids frais et secs moyens en fonction de la combinaison hormonale (1,2 ou 3) :

1) Feuilles :

		N	Mean	Std. Deviation
Poids frais	Comb. Horm. 1	9	2,580000	,6919718
	Comb. Horm. 2	5	2,150000	,9481561
	Comb. Horm. 3	5	1,632000	,5426509
Poids sec	Comb. Horm. 1	9	,210800	,0726397
	Comb. Horm. 2	5	,193700	,0875226
	Comb. Horm. 3	4	,156850	,0740312

2) Tiges :

		N	Mean	Std. Deviation
Poids_frais	Comb. Horm. 1	5	3,240000	1,1173182
	Comb. Horm. 2	7	2,480000	1,1272533
	Comb. Horm. 3	8	2,350000	,7906959
	Total	20	2,618000	1,0166125
Poids_sec	Comb. Horm. 1	5	,235800	,1217065
	Comb. Horm. 2	7	,245800	,0923107
	Comb. Horm. 3	8	,243300	,0867231
	Total	20	,242300	,0927160

3) Racines :

		N	Mean	Std. Deviation
Poids_frais	Comb. Horm. 1	10	3,020000	1,1058732
	Comb. Horm. 2	10	2,120000	,9814389
	Comb. Horm. 3	9	1,260000	,6703171
	Total	29	2,163448	1,1645332
Poids_sec	Comb. Horm. 1	10	,230500	,0345611
	Comb. Horm. 2	10	,240000	,0395114
	Comb. Horm. 3	9	,108000	,0130705
	Total	29	,195759	,0673806

Annexe 5 : Comparaison par ANOVA des poids frais puis des poids secs moyens en fonction de la combinaison hormonale (1,2 ou 3) :

1) Feuilles :

		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Poids frais	Between Groups	2,919	2	1,460	2,714	0,097
	Within Groups	8,604	16	,538		
	Total	11,524	18			
Poids sec	Between Groups	,008	2	,004	,677	0,523
	Within Groups	,089	15	,006		
	Total	,097	17			

2) Tiges :

		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Poids_frais	Between Groups	2,642	2	1,321	1,322	0,293
	Within Groups	16,994	17	1,000		
	Total	19,637	19			
Poids_sec	Between Groups	,000	2	,000	,016	0,984
	Within Groups	,163	17	,010		
	Total	,163	19			

3) Racines :

		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Poids_frais	Between Groups	14,702	2	7,351	8,213	0,0017
	Within Groups	23,270	26	,895		
	Total	37,972	28			
Poids_sec	Between Groups	,101	2	,050	50,156	0,00000
	Within Groups	,026	26	,001		
	Total	,127	28			

Annexe 6 : L'effet de la combinaison hormonale sur la biosynthèse des sennosides dans les 3 types de cals :

Hormone	Type	SenB	SenA	SenC	senD	Rehine_8_Glucose
1	1	2,302	0,375	0,383	0,375	0,386
2	1	1,481	0,411	0,407	0,397	0,400
3	1	1,258	0,383	0,368	0,365	0,386
1	2	0,921	0,567	0,457	0,407	0,411
2	2	0,468	0,383	0,365	0,361	0,372
3	2	0,521	0,386	0,375	0,372	0,383
1	3	1,428	0,379	0,358	0,379	0,383
2	3	0,698	0,407	0,375	0,379	0,397
3	3	0,896	0,390	0,375	0,390	0,400

1 : Combinaison hormonale 1

2 : Combinaison hormonale 2

3 : Combinaison hormonale 3

Type 1 : Feuilles

Type 2 : Tiges

Type 3 : Racines

Annexe 7 :

L'effet de la combinaison hormonale sur la biosynthèse des sennosides, moyennes globales :

Plante entière		Moyenne	Erreur standard	SEM
Combinaison hormonale 1	SenB	1,55033	,403325	,698580
	SenA	,44033	,063344	,109715
	SenC	,39933	,029723	,051481
	SenD	,38700	,010066	,017436
	Reh_8_Glu	,39333	,008876	,015373
Combinaison hormonale 2	SenB	,88233	,306609	,531062
	SenA	,40033	,008743	,015144
	SenC	,38233	,012667	,021939
	SenD	,37900	,010392	,018000
	Reh_8_Glu	,38967	,008876	,015373
Combinaison hormonale 3	SenB	,89167	,212765	,368519
	SenA	,38633	,002028	,003512
	SenC	,37267	,002333	,004041
	SenD	,37567	,007446	,012897
	Reh_8_Glu	,38967	,005239	,009074

Annexe 8 : Biosynthèse des sennosides, comparaison par ANOVA à effets principaux pour l'effet de « l'hormone » et du « type de cal » :

SennosideA

Univariate Tests of Significance for SenA					
Effect	SS	Degr. of Freedom	MS	F	p
Intercept	1,505529	1	1,505529	323,6073	0,000056
Hormone	0,004712	2	0,002356	0,5064	,636729
Type	0,005949	2	0,002974	0,6393	,574216
Error	0,018609	4	0,004652		

Sennoside C

Univariate Tests of Significance for SenC					
Effect	SS	Degr. of Freedom	MS	F	p
Intercept	1,332485	1	1,332485	1072,615	0,000005
Hormone	0,001094	2	0,000547	0,440	,671785
Type	0,001327	2	0,000663	0,534	,622914
Error	0,004969	4	0,001242		

Sennoside D

Univariate Tests of Significance for SenD					
Effect	SS	Degr. of Freedom	MS	F	p
Intercept	1,303403	1	1,303403	3326,893	0,000001
Hormone	0,000204	2	0,000102	0,260	,783296
Type	0,000022	2	0,000011	0,028	,973047
Error	0,001567	4	0,000392		

Rehine_8_Glucoside

Univariate Tests of Significance for Reh_8_Glu					
Effect	SS	Degr. of Freedom	MS	F	p
Intercept	1,375147	1	1,375147	5106,798	0,000000
Hormone	0,000027	2	0,000013	0,050	,951881
Type	0,000033	2	0,000016	0,061	,941619
Error	0,001077	4	0,000269		

Senoside B

Univariate Tests of Significance for SenB					
Effect	SS	Degr. of Freedom	MS	F	p
Intercept	11,05119	1	11,05119	334,5523	0,000053
Hormone	0,88015	2	0,44008	13,3224	,017037
Type	1,67956	2	0,83978	25,4227	,005319
Error	0,13213	4	0,03303		

Annexe 9 : Poids moyens du senoside B :

1) En fonction de la combinaison hormonale :

Weighted Means					
Current effect : F(2, 4)=13,322, p=,01704					
Effective hypothesis decomposition					
Hormone	Masse	SEM			
1	1,550333	0,403325			
2	0,882333	0,306609			
3	0,891667	0,212765			

2) En fonction du type de cal :

Weighted Means					
Current effect : F(2, 4)=25,423, p=,00532					
Effective hypothesis decomposition					
Type	Masse	SEM			
Feuilles	1,680333	0,317429			
Tiges	0,636667	0,142988			
Racines	1,007333	0,217961			

Annexe 10 : Effet du stress salin sur la biomasse des cals :

Poids frais (g)

	%NaCl Période	0%	0,50%	1%	1,50%
Feuilles	1er mois	2,082	1,94	1,267	1,282
	2ème mois	2,823	2,10	1,89	1,275
	3ème mois	3,33	2,36	2,17	1,50
Tiges	1er mois	2,227	1,845	1,260	1,232
	2ème mois	2,245	1,818	1,687	1,43
	3ème mois	4,42	1,907	1,793	1,293
Racines	1er mois	1,696	1,278	1,13	1,080
	2ème mois	2,823	1,624	1,32	1,01
	3ème mois	5,91	2,43	1,52	0,973

Poids sec (g)

	%NaCl Période	0%	0,50%	1%	1,50%
Feuilles	1er mois	0,12	0,115	0,108	0,104
	2ème mois	0,16	0,134	0,12	0,071
	3ème mois	0,205	0,145	0,132	0,08
Tiges	1er mois	0,156	0,143	0,117	0,10
	2ème mois	0,186	0,145	0,120	0,101
	3ème mois	0,253	0,189	0,14	0,08
Racines	1er mois	0,236	0,216	0,147	0,139
	2ème mois	0,256	0,210	0,286	0,135
	3ème mois	0,283	0,271	0,261	0,131

Pourcentage poids sec/poids frais (mg/100mg)

	%NaCl	0%	0,50%	1%	1,50%
	Période				
Feuilles	1er mois	5,73	5,93	8,59	8,08
	2ème mois	5,67	6,39	5,8	5,6
	3ème mois	6,18	6,15	5,64	5,34
Tiges	1er mois	6,84	7,75	8,29	8,12
	2ème mois	6,58	7,84	7,12	7,06
	3ème mois	5,72	9,94	7,78	6,33
Racines	1er mois	13,9	16,9	13,06	12,86
	2ème mois	9,06	12,96	21,62	13,57
	3ème mois	4,79	11,17	17,15	13,55

Annexe 11 : Effet du stress salin sur la biosynthèse des sennosides dans les cals issus de différents explants et cultivés in vitro pendant 3 mois :

Temps	Sennoside	Type	0%	0,50%	1,00%	1,50%
1	B	Feuilles	3,234	3,578	0,981	0,794
2	B	Feuilles	3,67	3,847	1,116	1,435
3	B	Feuilles	2,862	2,242	1,105	1,25
1	A	Feuilles	0,492	0,567	0,638	0,499
2	A	Feuilles	0,542	0,414	0,581	0,432
3	A	Feuilles	0,694	0,514	0,51	0,485
1	C	Feuilles	0,386	0,461	0,585	0,485
2	C	Feuilles	0,411	0,404	0,404	0,358
3	C	Feuilles	0,606	0,422	0,411	0,404
1	D	Feuilles	0,347	0,4	0,549	0,482
2	D	Feuilles	0,344	0,333	0,333	0,319
3	D	Feuilles	0,567	0,383	0,347	0,34
1	R	Feuilles	0,312	0,358	0,531	0,478
2	R	Feuilles	0,337	0,319	0,319	0,283
3	R	Feuilles	0,549	0,351	0,312	0,298
1	B	Tiges	1,477	3,142	1,477	1,321
2	B	Tiges	1,155	2,543	2,048	1,743
3	B	Tiges	1,245	1,389	0,843	0,733
1	A	Tiges	0,503	0,595	0,485	0,337
2	A	Tiges	0,337	0,489	0,439	0,609
3	A	Tiges	0,4	0,404	0,531	0,379
1	C	Tiges	0,485	0,521	0,453	0,305
2	C	Tiges	0,294	0,397	0,358	0,468
3	C	Tiges	0,351	0,358	0,91	0,322
1	D	Tiges	0,478	0,485	0,443	0,259
2	D	Tiges	0,266	0,308	0,305	0,393
3	D	Tiges	0,319	0,337	0,319	0,319
1	R	Tiges	0,475	0,294	0,436	0,269
2	R	Tiges	0,28	0,305	0,305	0,312

3	R	Tiges	0,322	0,308	0,276	0,29
1	B	Racines	1,424	2,88	1,548	1,144
2	B	Racines	2,21	3,078	1,853	1,208
3	B	Racines	1,63	3,078	1,69	1,07
1	A	Racines	0,418	0,602	0,414	0,439
2	A	Racines	0,57	0,574	0,432	0,375
3	A	Racines	0,393	0,542	0,489	0,39
1	C	Racines	0,358	0,461	0,344	0,372
2	C	Racines	0,436	0,443	0,358	0,326
3	C	Racines	0,337	0,429	0,365	0,337
1	D	Racines	0,326	0,39	0,308	0,34
2	D	Racines	0,358	0,358	0,312	0,294
3	D	Racines	0,312	0,365	0,315	0,301
1	R	Racines	0,294	0,347	0,28	0,301
2	R	Racines	0,337	0,319	0,319	0,283
3	R	Racines	0,283	0,322	0,283	0,308

Annexe 12 : Biosynthèse du sennoside B avec stress salin :

1) Cals issus des feuilles :

Test of Homogeneity of Variances

Levene Statistic	df1	df2	Sig.
4,473	3	8	0,040

ANOVA

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	13,566	3	4,522	17,787	0,00067
Within Groups	2,034	8	,254		
Total	15,599	11			

2) Cals issus des tiges :

Test of Homogeneity of Variances

Levene Statistic	df1	df2	Sig.
1,562	3	8	0,273

ANOVA

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	2,405	3	,802	2,223	0,16295
Within Groups	2,884	8	,361		
Total	5,289	11			

3) Cals issus des racines :

Test of Homogeneity of Variances

Levene Statistic	df1	df2	Sig.
4,154	3	8	0,048

ANOVA

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	5,626	3	1,875	36,200	,00005
Within Groups	,414	8	,052		
Total	6,041	11			

Annexe 13 : Effet du stress thermique sur la biosynthèse du sennoside B dans les différentes parties des vitroplants pendant trois mois :

Période	Type	Sans stress	Avec stress
1	1	1.8916	2,745
2	1	2.1715	3,41
3	1	3.4219	3,82
1	2	1.8916	1,279
2	2	0.9816	0,946
3	2	1.006	1,045
1	3	1.8704	2,048
2	3	1.9188	1,484
3	3	1.2823	1,785

Période : 1 : 15 jours 2 : 30 jours 3 : 60 jours

Type : 1 : Feuilles 2 : Tiges 3 : Racines

Annexe 14 : Teneur en sennoside B dans les feuilles, tiges et racines (avec stress)

ANOVA

	Univariate Tests of Significance				
	SS	Degr. of	MS	F	p
Type	7,87158	2	3,93579	29,2834	0,000802
Error	0,80642	6	0,13440		

Annexe 15 : Teneur en sennoside B dans les feuilles, tiges et racines

Statistiques descriptives : (intervertir avec et sans, la correction au propre suivra)

		Feuilles Descriptive Statistics		
Variable	Valid N	Mean	Standard Error	
Sans stress	3	3,325000	0,313222	
Avec stress	3	2,495000	0,470441	

		Tiges Descriptive Statistics		
Variable	Valid N	Mean	Standard Error	
Sans stress	3	1,090000	0,098727	
Avec stress	3	1,294100	0,298813	

		Racines Descriptive Statistics		
Variable	Valid N	Mean	Standard Error	
Sans stress	3	1,772333	0,162936	
Avec stress	3	1,590500	0,170359	

Annexe 16 : Biosynthèse des sennosides chez les cals issus des différents explants et cultivées in vitro pendant 3 mois (avec stress thermique)

	sen B	sen A	sen C	sen D	rehine-8-glu
F1	2,682	0,372	0,28	0,269	0,255
F2	2,023	0,358	0,276	0,241	0,266
F3	2,086	0,351	0,262	0,234	0,266
T1	0,489	0,305	0,266	0,244	0,266
T2	0,622	0,259	0,255	0,227	0,248
T3	0,864	0,259	0,241	0,237	0,227
R1	1,789	0,372	0,252	0,237	0,252
R2	1,991	0,358	0,283	0,248	0,248
R3	2,086	0,28	0,259	0,248	0,237

Annexe 17 : Biosynthèse du sennoside B chez les cals issus des différents explants (cultivés in vitro) :

Période	Type	Sans stress	Avec stress
1	1	3,234	2,682
2	1	3,670	2,023
3	1	2,862	2,086
1	2	1,477	0,489
2	2	1,155	0,622
3	2	1,245	0,864

1	3	1,424	1,789
2	3	2,210	1,991
3	3	1,630	2,086

Période : 1 : 15 jours 2 : 30 jours 3 : 60 jours
Type : 1 : Feuilles 2 : Tiges 3 : Racines

Annexe 18 :

Test of Homogeneity of Variances (Echantillons avec et sans stress thermique)

	Levene Statistic	df1	df2	Sig.
Sans_stress	1,043	2	6	,408
Avec_stress	2,618	2	6	,152

Annexe 19 :

ANOVA

		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Sans_stress	Between Groups	6,319	2	3,160	26,531	0,00105
	Within Groups	,715	6	,119		
	Total	7,034	8			
Avec_stress	Between Groups	4,354	2	2,177	34,126	0,00053
	Within Groups	,383	6	,064		
	Total	4,737	8			

Poids moyens (sans stress et avec stress)

Type; Weighted Means (3D stress thermique.sta)						
Current effect: F(2, 6)=26,531, p=,00105						
Effective hypothesis decomposition						
Cell No.	Type	Sans stress	Sans stress	Sans stress	Sans stress	N
1	Feuilles	3,255333	0,233493	2,250693	4,259974	3
2	Tiges	1,292333	0,095919	0,879627	1,705039	3
3	Racines	1,754667	0,235305	0,742231	2,767102	3

Type; Weighted Means (3D stress thermique.sta)						
Current effect: F(2, 6)=34,126, p=,00053						
Effective hypothesis decomposition						
Cell No.	Type	Avec stress	Avec stress	Avec stress	Avec stress	N
1	Feuilles	2,263667	0,209956	1,360300	3,167034	3
2	Tiges	0,658333	0,109767	0,186044	1,130622	3
3	Racines	1,955333	0,087572	1,578543	2,332123	3

Annexe 20 :

Comparaison de la biosynthèse du sennoside B dans les feuilles, avec et sans stress thermique)

T-tests; Grouping: Stress (3D stress thermique.sta)									
Group 1: Avec stress									
Group 2: Sans stress									
Variable	Mean Avec stress	Mean Sans stress	t-value	df	p	Std.Dev. Avec stress	Std.Dev. Sans stress	F-ratio Variances	p Variances
Poids	2,263667	3,255333	-3,15810	4	0,034246	0,363654	0,404422	1,236781	0,894142

REFERENCES

1. Donadieu.Y « Les thérapeutiques naturelles ». Missouri Botanical Garden, Bulletin d'information, 2003, p183.
2. Mogode.D.J « Etude Phytochimique et Pharmacologique de *Cassia nigricans Vahl* ». (Caesalpinaceae) utilisé dans le traitement des dermatoses au Tchad.Thèse de docteur en pharmacie, 2004/2005,pp1-2.
3. Buckles. D « Plein feux sur les plantes médicinales »,l'apothicaire consultant .mars 2001,pp7-8.
- 4 Mutuejo. A« Les plantes médicinales en Afrique et en Europe », université des Saarlands, Allemagne, 2000,p137.
5. Dionne .J.Y«L'efficacité clinique des plantes médicinales », l'apothicaire consultant en ligne ,mars 2001
.
6. Aquaron. M «Relation entre les hommes et les plantes médicinales », conférences sur les causeries en montagnes, Sabencade la valeia, Barcelone, Août 2008.micheleaquaron.com.
.
7. Houmani. Z «Country profile of Algeria », Profil de L'Algérie, INA, El Harrach, Algerie , 1998,pp105-113.
8. Leclerq J, Hazebroucq, « Dorvault l'officine XXII ème » ed Vigot, Paris, 1987, 2089p
9. Benarous K. « Effets des extraits de quelques plantes médicinales locales sur les enzymes d'analyses trypsique et lipase », universités Amar Telidji, Laghouat, Algérie, mémoire online.
10. Duke. J« Le pouvoir des plantes », encyclopedie des plantes médicinales, 2008, p697.
11. Pastor. G « Précis de phytothérapie », édition Alpen, 2006, pp3-4.
12. .Boullard Bernard, « Dictionnaire des plantes médicinales du monde » : Réalités et croyance édition 2001,636p.
13. Fouché J.G, Marquet.A, Hambuckers. A « les plantes médicinales, de la plante aux médicaments », Observatoire du monde des plantes ,2000.

- 14.** Frexinos. J « L'art de purger », Histoire générale et anecdotique des laxatifs. Ed L Pariente, 1997,223p.
- 15.** Chevalier. L, Crozet Segara. C « Le Vademecum médicaments à base de plantes »,Massion édition ,Paris,354p.
- 16.** Anonymes « Importance de l'utilisation des plantes médicinales » Programme VICN d'Afrique du nord ,2005.
- 17.** Pelt J.M, « Actualités des plantes médicinales » Groupe de réflexion et d'action pour une politique écologique, Grappe, Février 2007,pp3-4.
- 18.** Lavergne. R, Vera.R « Médecine traditionnelle et pharmacologique » ,Etude des plantes utilisées dans la pharmacopée traditionnelle,ACCT Paris, 1989,p75.
- 19.** Hurtel .J.M « phytomania » ,phytothérapie en ligne,2001.
- 20.** Larrey. D « Plantes médicinales, intérêts thérapeutiques et risque d'hépatotoxicité » , Service d'hépatogastrologie, hôpital Saint-Eloi Montpellier-France, Elsevier, 2001.p15.
- 21.** Rouleau .A « Prévention des interactions entre les plantes médicinales et les médicaments », pp 42-53.
- 22.** Anonymes, « Plantes et médicaments Semences la lettre » gnis , bulletin de l'institut biotechnologique des plantes, conseil national de recherches ,Canada ,IBP.CNRC , Numéro 01,Avril 2003,
- 23.** Cabalion. P « Les substances naturelles végétales, leur intérêt biologique, leur perspectives d'application », colloques, plante matières première pour l'industrie ; une ressource à gérer, Mulhouse, bulletin N°04 ,1990.
- 24.** Quetin Leclercq, « Le voyage insolite de la plante au médicament »Ecole de pharmacie (pharmacognosie) journal de pharmacie de Belgique, 2002, pp11-22.
- 25.** Bruneton. J «pharmacognosie :phytochimie des plantes médicinales », Ed Tec et Doc ,1999,1120p.
- 26.** British pharmacopoeia "Browse. Medicinal and pharmaceutical substances volumel et II., 2004.
- 27.** Lindel.G, techniques d'analyses et de contrôles dans les industries agroalimentaires techniques et documentation. Paris, Lavoisier, 1991,p510.
- 28.** sahara nature .com. juillet.2004
- 29.**Bezanger-Beauquesne. L, Pinkas. M, Torck. M, Trotin. F, Les plantes médicinales des régions tempérés , Edition maloire ,1999,395p.

- 30.** Grin Taxonomy of plants USDA, agricultural research service Beltsville Area, base de données en ligne, Octobre 2007.
- 31.** Pousset .J.L «Plantes médicinales africaines, utilisation pratique», Paris, 1989, pp38-43
- 32.** Benchlac. A. C, Makta.M. Fleur du Sahara « voyage ethnobotanique avec les Touareg du Tassili », Paris ,2000, pp150-152.
- 33.** Peris .J.B, Stubing .G, « phytothérapie appliquée Valence : MI collège officiel des pharmaciens », 1995 , p467.
- 34** Chinese medicine data base .June 2006.
- 35.** Schiller. R, The therapy of constipation USA, Review article 15(6), 2001, pp749-763.
- 36.** Rombi. M, «100 plantes médicinales » composition, mode d'action et intérêts thérapeutiques Ed Romard, Nice, 1991, 527p.
- 37.** Waltenberger B, Avula. B, Ganzera M, Khan I .A Stuppner H., Khan S.I Transport of sennosides and sennidines from *cassia angustifolia* and *cassia senna* across coco-2 monolayers and in vitro model for intestinal absorption, Elsevier, Mai 2007, pp373-377.
- 38.** Evans. D.A, "Soy bean tissue cultures soy bean genetic" Nextelter (8) 1981, pp27-28
- 39.** Novello .C, TAP.J « Introduction à la culture in vitro chez les végétaux », maîtrise IUP , SIAL , 2005.
- 40.** Lafon.J.P, Tharaud Prayer. C, Levy.G .Biologie des plantes cultivées .2ème édition, Paris, Lavoisier, 1998, 150p
- 41.** Augé R, «La nouvelle botanique culture in vitro» , revue Sciences et vie , Paris, pp48-55.
- 42.** Goacolou. J et Pedrizet. E .«Multiplication végétative et culture des plantes in vitro» Ed INRA –Paris, 1988.
- 43.** Margara.J, «Bases de multiplication végétatives les méristèmes et l'organogénèse » , Ed INRA Paris, 230p.
- 44.** Anonymes, « la culture in vitro », INRA Versailles, 1997.
- 45.** Beauchesne. G « Les milieux minéraux utilisés en culture in vitro et leur incidence sur l'apparition de boutures d'aspect pathologique », CR Acad Agric , Paris 67, 1981, pp1389-1397.
- 46.** Lambé. P, « culture in vitro de plantes rares », Phytessia, 2003 , pp 3-4-5.

47. Boucherin. D, Bron. G « Multiplication des plantes horticoles », Paris, Lavoisier, 1989, p212.
48. Boxus .P.H « Multiplication végétative, Biotechnologies végétales » Ed Belgique, 1995,458 p.
49. Augé et Al « la culture in vitro et ses applications horticoles », Lavoisier France, 1989, 22 5p.
51. Zryd .J.P , Bretelle R , Derreudre .J, Duhoux E, Gaspar T, « Culture des cellules ,tissus et organes végétaux » Fondement technique et utilisation pratique, Paris,Lavoisier,1988 ,p 308
50. Teoule .E, « Biotechnologie et amélioration des plantes » ,5^{ème} é édition, technique et documentation, Paris, pp597-627.
52. Piatti. M.F « Embryogenèse somatique et synchronisation du développement embryonnaire » Mémoire du docteur d'état en agronomie INES Blida ,P86
53. Zhang.V, Boccon-Gibod.J, Lespinasse.Y « Obtention d'embryons de pommiers » (*Malus domestica*) après culture d'anthères, CRA cad.Sci.Paris,1987,pp305-443.
54. Moret. D « culture in vitro évolution des techniques » Boutures –Microbouture .Minituberisation : La pomme de terre française.pp43-46.
55. Sihachakr .D, Cavalcante-Alves.J.M, Tizroutine S, Allor.M, Mussio I, Sevaesa.A, Nzoche.O. Ducreux. G « embryogenèse somatique chez la patate douce » (*Ipomea batatas L*) Ed John Liebby.France,1995, pp254-260.
56. Saka. H, Amara. A.B , Kermiche. A « Embryogénèse somatique du palmier dattier » *Phoenix dactilifera L* .Induction de la collogénèse à partir d'organe de rejets de quelques cultivars, Ed INRA Rev semestrielle.Alger pp1-7.
57. Boccon- Gibod .J « la nouvelle botanique » la production du saint Paulia Ed.science et vie .Paris,1984, p56-63
58. Bateson .J.M, Grout BW « The confluence of container dimension of multiplication rate of regenerating plant cell culture “, colloque d'Angers,1987.
59. Choi .Y.E, KIM .Y.N, Yoon. E.S, « Height frequency of plant production via somatic embryogenesis from cellusor cell suspension culture in *Eleutherococcus senticosus*” Rev.Annals of botany ,1999, pp309-314
60. Boulay Jacques, « la culture in vitro et ses applications à la culture des plantes carnivores » Labo de biologie des ligneux, université de Nancy,1993,pp62-70.
61. Bouzoula.R « Essai d'obtention de cals embryogènes à partir de plantules In vivo et in vitro chez l' *Atripex halimus* ».2000,p53

62. Brhhada N, Abousalim A, Dou EL Macane W.L, Ben Ali Doha « effets du milieu de culture sur le microbouturage de l'olivier » *Oléa europea* L. C.V Picholine marocaine .Bitetechnol.argon, soc enviro (B.A.S.E), 2003,7(3-4) ,177-182.
63. Peter H Raven, Ray F, Susan E Eichhom, Jules Bouharmont «La nutrition des plantes et le sol » Biologie végétale p727
64. Chaussat.R et Bigot .C « .la multiplication végétative des plantes » Ed Gauthier et villar.Paris ,1980 ,p 277.
65. Mazliak .P .Physiologie végétales « Nutrition et métabolisme ».Ed.Hermann, Paris T1, 349p.
66. Talamali. A . « Essai de mise au point de l'embryogenèse somatique et de clonage chez l'*Atriplex halimus* » .mémoire d'ingénieur d'état en agronomie, Blida, 63p.
- 67.Heller.R ,Esnault .E.R , C lance.C , « les principales hormones végétales impliquées dans la morphogénèse végétative physiologie végétale » édition DUNOD 2000,323p.
- 68.Quennoz.M , « la culture in vitro premiers pas ... »Encyclopédie au cactus Francophone 11,2001 ,pp51-54.
- 70.BIGOT.G « multiplication végétative in vitro par néoformation de bourgeons et d'embryons somatique » INA, Paris ,1980,pp133-157.
69. MEKSEM .A « la cytokinine oxydase de maïs » (CKOM) cristallographie de deux enzymes mutants.master en nutrition, INA,Paris 2006.
- 71.ELKHIFI .O. « contribution à l'étude de la variabilité chez la pomme de terre » .Analyse de clones néoformés sur cals issus de souches diploides et dihaploides mémoires de docteur 3^e cycles. Paris –sud ,1984,p101.
72. Lebrun. A , « multiplication du romarin par embryogénèse somatiques » Isla-Gembloux Laboratoire d'application pyrotechniques,1986 ,p145.
- 73.DAIKH. H, « Essai d'induction de variantes de pomme de terre »*colinum rubrosum* à partir de tissus in vitro » Mémoire ingénieur agronomie, INA ,El Harrach,1983,p52.
- 74.D'HALLUIN .B. F,CEUSTERMANS. N ,DEBERGH. P, MAENE .L , «Multiplication de céleris blancs et rares démontrant une résistance naturelle à des viroses .in vitro à l'amélioration des plantes potagères »,INRA, France,1980,pp14-19.
- 75.TANG .D ,ZHANG .J,NIU.Y et TSUI.O « the effect of plant hormones on callus formation and plantlet regeneration in *cucumis melo*” .Rev Acta *sotanica sinica* V22 1980,p132-135.

76. DUMAS DE VAULX R et POCHAARD D « Parthénogenèse et androgenèse chez le piment » Rôle acériel dans les programmes de sélectionneur français ,1986, pp3-16.
77. ZID.E , GRIGNON.C , « les tests de sélection précoce pour la résistance des plantes au stress. Cas des stress salin et hydriques » Amélioration des plantes pour l'adaptation aux milieux arides ,Ed Auplef –UREF.John Libbey Eurotext.Paris ,1999.96p.
78. OUDJIDA.F , ISMAÏLI.M , « Effet de NaCl sur l'embryogénèse somatique et sur les capacités de régénération chez le blé »,étude de la compétence embryogène des cultures de blé initiées directement en présence de NaCl. Africain crop science journal .Vol10,Num3,2002,p221.
79. LEVITT. J « réponses of plants to environmental » Ed Académie press, 2 vol,1980,607p.
80. LEVGNERRON .A ,LOPEZ. F,VANSUYT .G,BERTHOMIEU.P FOURCRO.Y.P, CASSE DELBART. F, « les plantes face au stress salin » Rev cahiers agricultures. Montpellier ,France, p263-273
81. SEELIG. B .D « Salinity and sodicity in north Dakota sols» NDSU.Extension services, north Dakota,1991,p16.
82. CALU . G , «Effet du stress salin sur les plantes » comparaison entre deux plantes modèles ,*arabidopsis thaliana*,et *thellungilla haoptila* », 2004-2006,p1-8.
83. DUBOIS J , « les chocs thermiques et leurs applications »,Amélioration des plantes pour l'adaptation aux milieux arides , Ed AUPELEF-UREF.JOHN LIEBBEY.Eurotext Paris 1991,pp159-163
84. GAVOT. A« les réponses de stress chez les vegetaux »support de cours.fev2009.
85. Sahki .A et Sahki .R , “Le Hoggar, promenade botanique” .Ed Esopé,2004,311p.
86. Reynoso- Cuevas. L,Gallegos- Martinez. M.E, Cruz-Sosa. F, Gutierrez-Rojas. M. In vitro evaluation of germination and growth of five plant species on medium supplemented with hydrocarbons associated with contaminated soils. Journal of Elsevier, 2008,pp6379-6385.
87. Shrivastava.N, Patel. T. Shrivastava .A.Biosynthetic potential of in vitro grown callus of *cassia senna* L var *senna*, Current science vol 90 N°11,10 june2006, pp1472 -1473.
88. Nazif.N.M,Rady.M.R, Seif El-Nasr M.M. Stimulation of anthraquinones production in suspension cultures of *Cassia acutifolia* by salt stress. The journal of Elsevier., June 1999 ,pp34-40.

- 89- Pharmacopée européenne 5eme ed, Strasbourg, conseil d'europe ,2005.2600p
- 90-Rouibi.A, Saidi.F, Boutoumi.H « extraction and characterization of some active principles of *senna* “. Bulten USAMV.CN, Vol63, 2007, pp 400-404.
91. Neergheen.V., Bahorun.T. Optimisation of growth and polyphenolic production in *Cassia fistula* callus cultures. Asian J. Microbiol, 2002,pp181-185.
- 92.Pareilleux.A, Vinas.R. Application of Microbial. Biotechnology,1984, p316
- 93-El-Bahr.M. K., Hussein.M. S. and Moursy,H. A. E ffect of some growth regulators on the growth and alkaloid production of *Datura stramonium* L. cultured in vitro. Egypt. J. Bot.,1988,pp 32-53.
- 94.Hussein,.M. S., Reda,.A. A., El-Bahr, M. K. and Ghanem, S. A., 1994. effect of some amino acids on the growth and alkaloid production of *Datura stramonium* L. cultured in vitro. Egypt. J.Pharm. Sci. 35 (1) ,1994,p561.
- 95.Lindsey.K. and Yeoman.M.M. The relationship between growth rate, differenciation and alkaloid accumulation in cell cultures. J. Exp. Bot,1983,p34.
96. Tejas.P, Shrivastava.N., Shrivastava.A., 2006. Biosynthetic potential of in vitro grow callus of *Cassia senna* L. var. *senna*. Current Science, Vol. 99, no. 11,2006,p1472.
- 97.Rai.P.P. Indian J Pharm ,1978,p11.
- 98.Strobel. J., Hieke. M., George. D. Plant cell tissue ,Org Cult ,1991,p24.
- 99.Kurosaki. F, Nagase.H., Nishi.A. Phytochemistry,1992,p31.
- 100.Bohm.H, In Springer G. F., Wittman.H.G., Molecular Biology. Biochemistry and Biophysics Berlin: Springer-Verlag,1977,pp118-119.
- 101.Van-der-leer.T., Wijnsma.R., Van-der-Heijden. R., Verpoorte.R, Baerheim. A., Plant Physiol Biochem ,Paris ,1991,p29.
- 102.Godoy-Hernandez.G., Loyola-Vargas.V.M., Plant cell reports ,1991,p10.
- 103.Subbaiah, K.V., Mehta, A.R., Shah, R.R.,. Studies on polyphenol content in tissue cultures of *Datura* and *Cassia* grown on defined medium. In 3rd International congress of plant tissue culture, Leicester, 1974,181p.
- 104.Shah.R.R., Subbaiah. K.V., Mehta.A.R.,. Hormonal effect on polyphenol accumulation in *Cassia* tissues cultered in vitro. Can. J. Bot.54,1976,pp1240-1245.
- 105.Mahesh.V.K., Sharma. R., Singh.R.S. Anthraquinones and kaempferol from *Cassia fistula* species. J. Nat. Prod,1984, .pp733-751.

- 106.El-Bahr.M. K, Ghanem.S. A. Responses of *Vigna sinensis* callus cultures to NaCl salinity. Egypt. J. Hort17(1),1990,p85.
- 107.Youssef. A.A, Rady. M. R, Ghanem. S. A. Growth and some primary products in callus cultures of *Nigella sativa* as influenced by various cultural condition and salt stress. Fitoterapia, LXIX (4),1998,p 329.
- 108.Tyagi. A. K.Rashid, A, Maheshwari.S. C. Sodium chloride resistant cell line from haploid *Datura innoxia* mill. A resistance trait carried from cell to plantlet and vice versa in vitro. Protoplasma ,1981,p195.
- 109.Chang. S.j., Doubler.C, Kilo. T. V, Suttner, R, Klein. J, Schmidt.M.E, Gibson. P.T, Lignot. D. A. Association of loci underlying field resistance to soybean sudden death syndrome (SDS) and cyst nematode (SCN) race 3. Crop Sci. 37,1997, pp965-971.
- 110.Zhu.J. K. Plant salt tolerance. Trends Plant Sci. 6,2001, pp 66-71.
- 111.Gomez. J. M., Hernandez. J. A., Jimenez. A. L., Del Rio.A., Sevilla. F. Differential response of antioxidant system of chloroplasts and mitochondria to long-term NaCl stress of pea plant. Free Rad. Res. 3, 1999, pp11-18.
- 112.Hernandez.J.A., Campillo. A., Jimenez. A., Alarcon. J.J., Sevilla. F. Response of antioxidant systems and leaf water relations to NaCl stress in pea plant. New Phytol,1999,pp 241-251.
- 113.El Yacoubi. H., Rochdi. A., Koutoua. A., Rachidai,.A. , Sélection et évaluation de lignées de callus stables et tolérantes vis-à-vis du stress salin chez le citrange (*Citrus sinensis* (L) x *Poncirus trifoliata* (L) Raf.) CIRAD, EDP Sciences,2004,
- 114Rady. M.R., Nazif, N.M.Fitoterapia LXVIII ,1997,349p.
- 115.Kitanaka. S., Igarashi.H., Takido. M., 1985. Chemistry Pharmacological Bulletin ,1985 ,p33.
- 116.Tabata. M., Hiraoka. N., Ikenoue. M., Sano. Y., Konoshima,.M. Lioydia 1975 p38.
- 117.Robins R. I., Rhodes, M.J.C.Application of Microbiological Biotechnology 1986,p24.
- 118Suzuki.H., Matsumoto.T., Mikami. Y. Agricultural Biological Chemistry 1985,p49.
- 119.Wijnsma. R. Van-Weerden I, Ruighaver. J.E., Harkes. P.A.A. Verpoorte. R., Baerheim-Svendson, A. Plant Tissue Cell Culture , 6th int Congr,1986,p141.
- 120.Dornenburg.H., Knorr. D.J. Process Biochemistry, 1992,p27.
- 121.Gonzalez-Olmedo. J. L., Borroto. C. G. Use of plant growth regulators to control flowering in *Citrus* ,Biol Plantarum 29(5),1987,pp.342-349.

122. Brown, J. T., Charlwood, B. V. Differentiation and monoterpene biosynthesis in plant cell cultures. In *Secondary Metabolism in Plant Cell Cultures* Press Syndicate of the University of Cambridge, Cambridge, 1986, pp. 68-74.

123. Han, Y. S., Van-der-Heijden, R., Verpoorte, R. *Plant Cell Tissu. Org. Cult.* 67, 2001, pp 201-220.

124. Collin, H. A., Musker, D., Britton, G., 1986. Flavour production in onion tissue culture. In *Secondary Metabolism in Plant Cell Cultures*, Press Syndicate of the University of Cambridge, Cambridge, 1986, pp. 54-62.