

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE
MINISTRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE
SCIENTIFIQUE

UNIVERSITE MOHAMED BOUDIAF - M'SILA

FACULTE des Sciences.

DEPARTEMENT des sciences de
la Nature et de la Vie.

N°.....



DOMAINE : Sciences de la Nature et
de la Vie.

FILIERE : Biotechnologie.

OPTION : Biotechnologie Végétale.

Mémoire présenté pour l'obtention
Du diplôme de Master Académique

Par

BAHLOULI Imane, BRANTI Sylia et YAHIA Ahlam.

Intitulé :

**Pouvoir germinative *in vitro* de quelques
plantes médicinales**

Soutenu le 6.6.2022 devant le jury composé de :

Dr. BEN MEHAIA Radhouane	MCB	Université de Msila	Président.
Dr. BENDIF Hamdi	MCA	Université de Msila	Encadreur.
Dr. GUETTOUCHI Ahlam	MCA	Université de Msila	Examinatrice.

Année universitaire: 2021 / 2022

DEDICACE :

*A celui qui m'a indiqué la bonne voie...à mon père, Que dieu
Le protège. J'espère que je serai toujours à la Hauteur
De ses espérances. Ce mémoire est l'aboutissement De ces efforts.
A celle qui m'a attendu avec amour Les fruits de
Sa patience. Que dieu me la protège...à ma mère,
Qui m'a soutenue et entouré avec beaucoup d'affection.
A celui qui m'a toujours encouragé...à mon oncle Amirouche,
Qui était toujours à mes côtés.
A mon promoteur Dr. Bendif Hamdi qui a encadré ce travail
Avec beaucoup d'intérêt et d'optimisme.
Un grand merci pour tes précieux conseils
Et toujours soutenu.
A mes deux anges Hind et Mariem, que Dieu me les garde.
A mes sœurs Abir, Wissal, Fatima, Chama et tata Fadila.
A toute ma famille en particulier la famille de ma mère.
A mes amies : Basma, Sylia, Ahlam, Aya, Asma²,
Widi, Bushra, Snds, Omaïma, Nahid, Fatiha...
Pour m'aider même avec un sourire.
Enfin à toute A tous mes collègues de promotion et a
Toutes mes amies. Et à tous ceux qui ont
Contribué de près ou de loin pour
Que ce travail soit réalisé.*

IMANE

DEDICACE :

Je dédie ce modeste travail :

*A mes très chers parents. Aucun hommage ne pourrait être
à la hauteur de l'amour dont ils ne cessent de me combler.*

Que dieu leur procure bonne santé et longue vie Inchallah.

*A mon futur mari **Samir** qui est toujours à mes côtés,*

qui m'a aidé et encouragée

*A mon frères : **Salah** A mes sœurs **sawsan** et **asma***

*Ce travail est aussi dédié A mon promoteur Dr. **BENDIF Hamdi***

qui m'a toujours soutenu

*A ma 2ème famille qui est ici à Msila tata **Karima** et **Fadila***

*A mes copines **Buchra** et **Aya***

*A mes sœurs **Imane** et **Ahlam***

Enfin à toute A tous mes collègues de promotion

et a toutes mes amies. Et à tous ceux qui ont

contribué de près ou de loin pour

que ce travail soit réalisé.

Sylian

DEDECACE

*Je dédie ce travail à mes parents Dalila et Touhami
qui m'a doté d'une éducation digne, son amour,
ont fait de moi ce que je suis aujourd'hui*

*A mon marié Abdo qui est toujours à mes coté pour m'encourager
durant mes années d'étude, et mon
fils Gaith que dieu le garde pour moi
A mes frère Soufian, Ali, Zakaria, Ziad
et leur femmes Samia, Aicha, Hala
et mes sœur Soumia, Fatima, Malak et
leur mariés Halim, Walid*

*A ma belle-famille particulièrement ma belle-mère Hayet
qui est toujours là pour moi , et mes belles sœurs Nadia ,
Samiha , Aya , et mes frères Yassine , Mouatez
A mes copines Imane, Sylia ,Basma,Bouchra*

Ahlame

REMERCIEMENTS :

*Il est primordial de remercier « **ALLAH** » le Tout-Puissant de tout ce qu'il nous apporte dans la vie et de nous avoir donné la force et le courage pour réaliser ce travail.*

*Nous tenons tout d'abord à exprimer notre profonde gratitude et nos sincères remerciements à notre promoteur, Dr. **BENDIF Hamdi**, pour son savoir-faire, ses conseils, sa compétence, sa patience, son enthousiasme et l'attention particulière avec laquelle elle a suivi et dirigé ce travail.*

*Nos respects et notre reconnaissance vont au Dr. **BENMEHAIA Radhouane**, pour avoir accepté de présider ce jury ainsi que sa disponibilité, son précieux aide qui trouve ici le témoignage de notre profonde considération.*

*Nous tenons à remercier Dr. **GUETTOUCHI AHLAM**, d'avoir accepté d'examiner ce mémoire, et également pour sa disponibilité à notre égard.*

*Nous sommes essentiellement reconnaissantes à tout le personnel des laboratoires de département Scinces de la Nature et de la Vie, pour le climat sympathique et familiale dans lequel le travail a été réalisé. Particulièrement, je tiens à remercier les ingénieurs de laboratoire : **Laila, Samiha, Fairouze, Safia et Hamid**.*

*Nous voudrions exprimer tous nos remerciements au personnel du L'équipe de travail de la pépinière EPIC M'sila, particulièrement à Monsieur **MEZRAGE Ahmed Reda** et Monsieur **MAATOUGE Toufik** pour leur précieuse aide.*

Nos sentiments de reconnaissance vont à toute personne ayant participé de près ou de loin dans la réalisation de notre travail.

Merci à tous ...

Sommaire

Résumé :	i
Liste des abréviations :	ii
Liste des figures.....	iii
Liste des tableaux :	iv
Introduction :	1
Chapitre I. Généralités:	2
I.1. Plantes médicinales:	2
I.1.1. Utilisation des plantes médicinales :	2
I.1.2. Substances actives des plantes médicinales :	3
I.2. Plantes étudiées :	3
I.2.1. <i>Cuminum cyminum</i> :	3
I.2.2. <i>Mentha pulegium</i> :	6
I.2.3. <i>Ocimum basilicum</i> L. :	8
I.2.4. <i>Pimpinella anisum</i> :	10
I.3. Généralité sur les techniques de multiplication :	12
I.3.1. Semis:	12
I.3.2. Bouturage:	13
I.3.3. Greffage:	15
I.3.4. Marcottage :	17
I.3.5. Culture <i>in vitro</i> :	17
Chapitre II. Matériels et méthodes :	32
II.1. I- Partie pratique au laboratoire :	32
II.1.1. La culture <i>in vitro</i> :	32
II.1.2. Test de germination :	37
II.2. Partie pratique dans la serre :	40
II.2.1. Semis :	40

C.	Mesures et notation effectuées	41
II.2.2.	Bouturage :.....	41
D.	Mesures et notation effectuées pour culture in vitro et bouturage	43
Chapitre III. Résultats et discussion		44
III.1.	Germination dans le sol:.....	44
III.1.1.	Taux de germination :	44
III.1.2.	Vitesse de germination:.....	45
III.1.3.	Paramètres de croissance :	45
III.2.	Germination des graines dans les boites pétries :.....	47
III.2.1.	Taux de germination :	47
III.2.2.	Vitesse de germination.....	49
III.3.	Bouturage :	51
III.3.1.	Culture <i>in vitro</i> :	52
Conclusion :		56
Références bibliographiques :.....		58
III.4.	Annexes.....	70

ملخص:

تمثل النباتات الطبية حاليًا مصدرًا كبيرًا ودائمًا لاستخراج العناصر الفعالة. يوجد أكثر من 200 تخصص صيدلاني عشبي على المستوى الوطني، ويستخدم العديد من الأشخاص الذين تمت مقابلتهم النباتات الطبية للعلاج. من بين النباتات الطبية التي تم تصنيعها وتسويقها في الجزائر، نجد الكمون والريحان واليانسون الأخضر والنعناع، ومع ذلك، فإن إنتاج وتصدير هذه النباتات بشكل عام لا يزال متواضعا للغاية مقارنة بغيرها. يفسر ذلك من خلال الإنتاج غير المنتظم للنباتات الطبية بسبب الالتقاء التلقائي للنباتات البرية من بين التدابير التي يمكن أن تسهم في إنعاش هذا القطاع، نذكر إنشاء مناطق مزروعة بالنباتات الطبية. وبالتالي، فإن البذر والعقل والزراعة في المختبر يمكن أن تكون وسيلة لإنتاج وتوريد النباتات الطبية. هذا العمل التجريبي على أداء إنبات بذور الكمون والريحان واليانسون الأخضر بهدف تحديد معدل الإنبات والنمو في 5 أسابيع بدون علاج في الحاضنة ومع العلاج في المختبر. اعتمادًا على الأنواع، تكون معدلات الإنبات متجانسة تقريبًا في الوسطين الزراعيين لبذور الكمون واليانسون الأخضر الذي تم الحصول عليه لفترة إنبات تتراوح من 2 إلى 5 أسابيع بينما أظهر الريحان تأخيرًا في الإنبات خلال الأسابيع الثلاثة الأولى في الدفيئة، على عكس المختبر الذي أظهرها من الأسبوع الأول وهذا يدل على ضرورة معالجة البذور لتقصير الوقت. هذا العمل التجريبي أيضًا على إكثار النعناع بالعقل والعقل الدقيقة (الزراعة المختبرية)، حيث أعطت الزراعة في المختبر نتائج جيدة فيما يتعلق بتكاثر النعناع وفقًا لمعايير النمو (الساق والجذر والأوراق والعقدة) مقارنة بالعقل.

الكلمات المفتاحية: نبات الكمون، الريحان، النعناع البري، البسباس، الزراعة في الزجاجيات، البذر، العقل، الإنبات.

Abstract:

Currently, medicinal plants (MP) represent a considerable and permanent source for the extraction of active principles. More than 200 herbal pharmaceutical specialties exist. At the national level, several of the interviewees use MPs for treatment. Among the medicinal plants industrialized and marketed by Algeria, we find *Cuminum cyminum*, *Ocimum basilicum*, *Pimpinella anisum* and *Mentha pulegium*, however, the production and exports of these plants in general remain at a very modest level compared to other countries. This is explained by the irregular production of medicinal plants due to the spontaneous picking of wild plants. Among the measures that could contribute to the recovery of this sector, we cite the establishment of cultivated areas of medicinal plants. Thus, sowing, cuttings and *in vitro* culture which could be a means of production and supply of medicinal plants. This experimental work on the germination performance of seeds of *C. cyminum*, *O. basilicum* and *P. anisum*, with the aim of determining the rate of germination and growth in 5 weeks without treatment in the greenhouse and with treatment *in vitro*. Depending on the species, germination rates are almost homogeneous in the 2 compartments of *P. anisum* and *C. cyminum* obtained for a germination period of 2 to 5 weeks while *O. basilicum* showed a delay in germination during the first 3 weeks in the greenhouse, unlike *in vitro* which showed it from the 1st week, and this indicates the need to treat the seeds to shorten the time. This experimental work also on the multiplication of *M. pulegium* by cuttings and by microcuttings (*in vitro* culture), the *in vitro* culture gives good results concerning the multiplication of *M. pulegium* according to the growth parameters (stem, root, leaf and node) in relation to the cuttings.

Keywords: *Cuminum cyminum*, *Ocimum basilicum*, *Mentha pulegium*, *Pimpinella anisum*, *in vitro* culture, Cutting, Sowing, Germination.

Résumé :

Actuellement, les plantes médicinales (PM) représentent une source considérable et permanente pour l'extraction de principes actifs. Plus de 200 spécialités pharmaceutiques à base de plantes existent. Au niveau national, plusieurs des personnes interrogées utilisent des PM pour se faire soigner. Parmi les plantes médicinales industrialisées et commercialisées par l'Algérie, on trouve le *Cuminum cyminum*, *Ocimum basilicum*, *Pimpinella anisum* et *Mentha pulegium*, cependant, la production et les exportations de ces plantes de façon générale restent à un niveau très modeste par rapport à d'autres pays. Ceci s'explique par la production irrégulière des plantes médicinales due à la cueillette spontanée des plantes sauvages. Parmi les mesures qui pourraient contribuer au redressement de ce secteur, nous citons l'instauration des surfaces cultivées des plantes médicinales. Ainsi, le semis, le bouturage et la culture *in vitro* qui pourraient être un moyen de production et d'approvisionnement en plantes médicinales. Ce travail expérimental sur la performance germinative des graines de *C. cyminum*, *O. basilicum* et *P. anisum*, dans le but de déterminer le taux de germination et la croissance dans 5 semaines sans traitement dans la serre et avec traitement *in vitro*. Selon les espèces, des taux de germination presque est homogènes dans les 2 compartiments de *P. anisum* et *C. cyminum* obtenu pour une durée de germination de 2 à 5 semaine tandis que l'*O. basilicum* a montré un retard dans la germination au cours de 3 premières semaines dans la serre, contrairement *in vitro* qui l'a montré dès la 1^{ère} semaine, et cela indique la nécessité de traiter les graines pour raccourcir le temps. Ce travail expérimental aussi sur la multiplication de *M. pulegium* par bouturage et par micro bouture (culture *in vitro*), la culture *in vitro* donne des bons résultats concernant la multiplication de *M. pulegium* selon les paramètres de croissance (tige, racine, feuille et nœud) par rapport au bouturage.

Mots clé : *Cuminum cyminum*, *Ocimum basilicum*, *Mentha pulegium*, *Pimpinella anisum*, Culture *in vitro*, Bouturage, Semis, Germination.

Liste des abréviations :

PMA : Plantes médicinales et aromatiques.

PM : Plantes médicinales.

CIV: Culture *in vitro*.

S: Semaine.

Gg: Graine germée.

PH : potentiel hydrogène

S-T : Sans traitement.

S-H : Sans hormone.

MS : Murashige et Skoog.

F : Feuille

N : Nœud.

R : Racine.

BA : benzyladénine

AIA : Acide-indolyacétique.

Liste des figures

Figure 1- Fleurs de <i>Cuminum cyminum</i> (site web : The original Garden).	4
Figure 2- Feuilles de <i>Mentha pulegium</i> (site web: Aroma-Zen).	6
Figure 3- Feuilles d' <i>Ocimum basilicum</i> (site web : jardinage le monde).	8
Figure 4- Fleur de <i>Pimpinella anisum</i> (site web : booksofdante wordpress).	10
Figure 5- les étapes de germination (site web : istock photo).	13
Figure 6- Multiplication végétative par bouturage (site web : Bricoleur malin).	14
Figure 7- Principales méthode de micropropagation (site web : Alchimia).	18
Figure 8- Totipotence et culture cellulaire végétale (site web: le monde en image).	19
Figure 9- la culture <i>in vitro</i> (formation des organes) (site web : le monde en image).	22
Figure 10- Micropropagation par les bourgeone axilliare (site web : le monde en image).	24
Figure 11- Milieu de culture MS (source original).	35
Figure 12- Mise en culture des microbouturages sur milieu MS (source original).	36
Figure 13- Organisation de zone de travail (Source original).	38
Figure 14- Prétraitement des graines : 1h, 24h, H ₂ SO ₄ (source original).	39
Figure 15- Semences des espèces étudiées (source original).	40
Figure 16- <i>Mentha pulegium</i> récoltée au début de mars 2022(source original).	42
Figure 17- Taux de germination des graines dans la serre pour les 3 espèces.	44
Figure 18- Vitesse de germination des graines des espèces étudiées dans la serre.	45
Figure 19- La croissance (Longueur de Tiges, Racines (cm) et le Nombre de Feuilles).	46
Figure 20- Taux de germination des graines dans laboratoire pour les 3 espèces.	47
Figure 21- Vitesse de germination des graines des espèces étudiées dans laboratoire.	49
Figure 22- Paramètre de croissance de <i>Mentha pulegium</i> sur bouturage.	51
Figure 23- Paramètre de croissance de <i>Mentha pulegium in vitro</i>	53
Figure 24- croissance des vitro plants dans un milieu de culture MS pour <i>M. pulegium</i>	54
Figure 25- Racines des vitroplants dans un milieu de culture MS pour <i>M. pulegium</i>	55

Liste des tableaux :

Tableau 1- classification systématique du cumin.....	4
Tableau 2- Classification systématique de Menthe pouliot.	7
Tableau 3- Classification systématique de basilic	9
Tableau 4- Classification systématique d'Anis vert.....	11
Tableau 5- Constituants du milieu MS (Murashige et Skoog, 1962).....	32
Tableau 6- germination des graines dans les boites pétries après 3 semaines.	48

Liste des équations :

Équation 1- Taux de germination.....	41
---	----



Introduction

Introduction :

L'histoire des plantes médicinales et aromatiques (PMA) est associée à l'évolution des civilisations. Dans toutes les régions du monde, l'histoire des peuples, montre que les plantes ont toujours occupé une place importante en médecine, dans la composition des parfums et dans les préparations culinaires. L'homme utilise les plantes depuis des milliers d'années, pour traiter divers maux. Le monde végétal est à l'origine d'un grand nombre de médicaments (**Lahrech, 2010**).

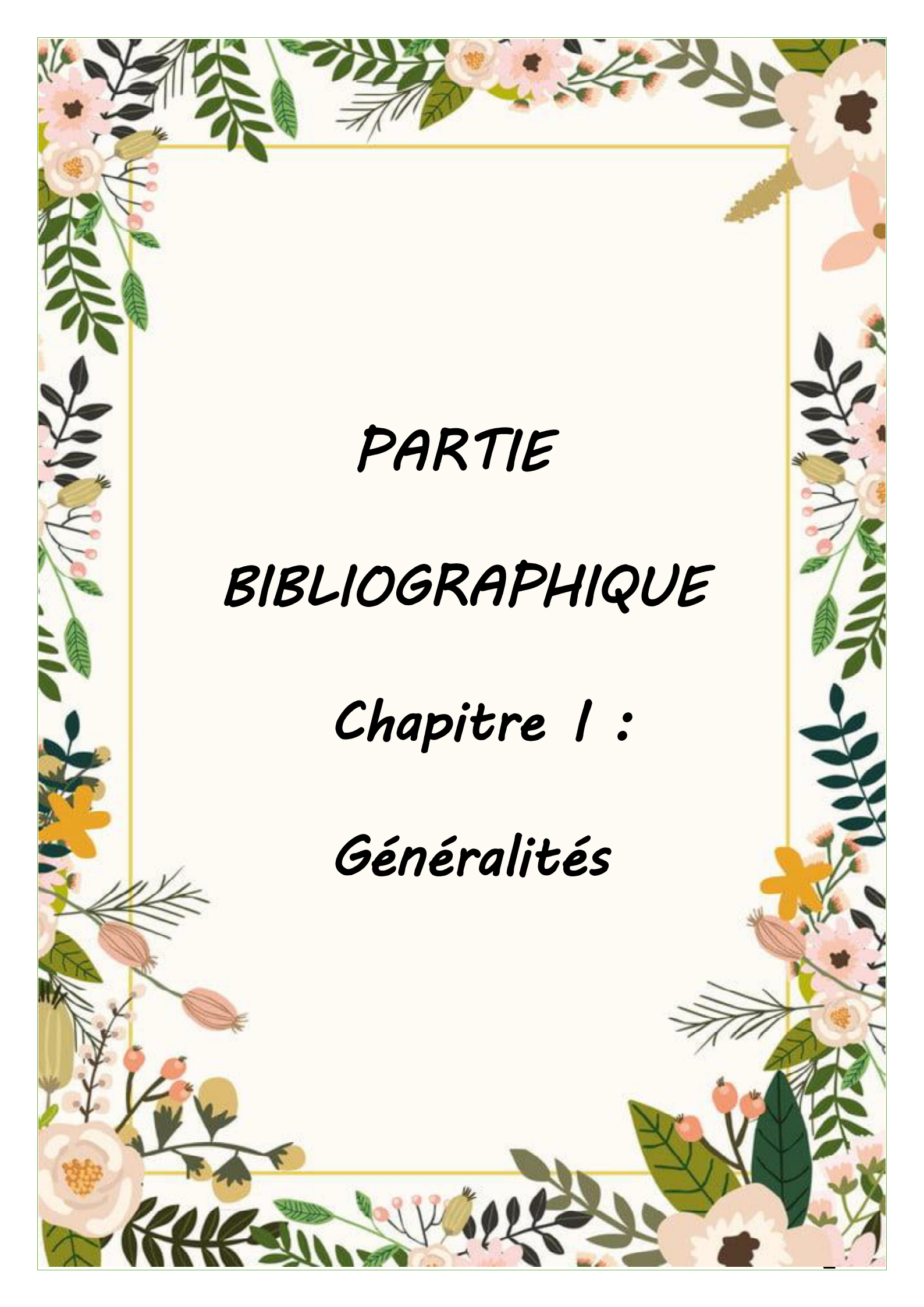
L'Algérie possède d'importantes potentialités en matière de PMA en raison de la flore spontanée, qui est particulièrement riche en plantes utiles telles que basilic, anis vert, cumin, la menthe... etc. ceci est lié principalement à la diversité de son climat et à la nature de ses sols (**Benbouali, 2006**).

L'exploitation de ces espèces en Algérie est loin d'être rationnelle. Elle peut, parfois, hypothéquer la survie et la pérennité des peuplements. PMA, longtemps considérées par les gestionnaires du secteur comme produits secondaires, n'ont pas retenu toute l'attention méritée. Les cahiers des charges établis pour l'exploitation des PMA ne sont pas adaptés à toutes les plantes et ne met pas en relief les conditions d'exploitation (niveau et intensité des coupes, outillage et période de récolte etc..).

Parmi les mesures qui pourraient contribuer au redressement de ce secteur, nous citons l'instauration des surfaces cultivées des PMA. Ainsi, le semis, le bouturage et la culture *in vitro* qui pourraient être un moyen de production et d'approvisionnement en plantes médicinales (**Aid et al., 2003**).

L'objectif dans ce contexte est la perspective d'avoir *in vitro*, les réponses face aux traitements préliminaires de graines de 4 espèces de plantes médicinales : *Cuminum cyminum*, *Ocimum basilicum* et *Pimpinella anisum* en vue de définir les prétraitements adéquates pour les espèces étudiées et de réduire le temps de latence, d'optimiser le pourcentage et la vitesse de germination des graines. Les essais aussi réalisés dans ce sens ont permis de définir les différents paramètres de multiplication *in vitro* et *ex vitro* (par bouturage) de *Mentha pulegium* pour déterminer la méthode de propagation la plus appropriée pour cette plante.

Notre mémoire est structuré en deux parties : la première partie représente des rappels bibliographiques sur les PM, les plantes étudiées et les techniques de multiplication utilisées. Quant à la deuxième partie, elle présente le matériel, les méthodes utilisées, résultats et discussion, et la conclusion



PARTIE

BIBLIOGRAPHIQUE

Chapitre 1 :

Généralités

Chapitre I. Généralités:

I.1. Plantes médicinales:

Une plante médicinale est une plante qui contient de nombreux principes actifs qui lui confèrent ses propriétés thérapeutiques. Par conséquent, ils sont utilisés par l'homme en médecine ou en santé. Le nombre de plantes utilisées en médecine est estimé à 70 000 (**Daniel, 2006**).

Les plantes aromatiques et médicinales font partie de notre quotidien. On les trouve dans nos aliments, certaines boissons alcoolisées, des médicaments, des cosmétiques, des parfums, des colorants, etc. Dans les aliments, ils sont couramment utilisés pour leur goût, leur couleur et leur saveur, mais ils possèdent également de nombreuses propriétés, notamment des propriétés antioxydantes, antimicrobiennes, médicinales et nutritionnelles (**Peter et al., 2012**).

D'après la X^{ème} édition de la Pharmacopée française, les PM sont des drogues végétales au sens de la Pharmacopée européenne, dont certaines au moins ont propriétés médicales.

Elles impliquent les deux origines à la fois. Premièrement, les plantes spontanées sont appelées "sauvages" ou "de cueillette", puis en second les plantes cultivées (**Bézanger, 1986**).

- **Plantes spontanées** : elles étaient les seules plantes utilisées dans le passé et représentent encore une grande partie du marché algérien aujourd'hui. Leur distribution dépend du sol, en particulier climatique.
- **Plantes cultivées** : celles-ci assurent une matière première en quantité suffisante pour répondre aux besoins et les drogues recueillies sont homogènes du point de vue aspect et composition chimique. Autre avantage, et pas des moindres, toute confusion possible par la cueillette est ici exclue, ce qui permet aussi une récolte plus opportune (**Chabrier, 2010**).

I.1.1. Utilisation des plantes médicinales :

Pendant longtemps, les plantes n'ont été utilisées que sous leur forme physique tisane ou poudre. Beaucoup sont maintenant en capsules, mais il y a aussi les plantes médicinales utilisées sous de nombreuses formes. Quelle que soit leur présentation, leur intérêt est largement suscité et soutenu par des publicités et des publicités d'innombrables œuvres populaires.

De plus en plus de plantes sont utilisées dans le mélange. Pour ces préparations, les règles des bonnes pratiques pharmaceutiques ont été établies. De nombreux paramètres doivent être

respectés comme le nombre de plantes, les associations possibles, le goût, et même devrait du sur-mesure pour les clients. L'âge et l'état du patient doivent également être pris en compte.

I.1.2. Substances actives des plantes médicinales :

Pour les médicaments à base de plantes, les matières premières peuvent être de natures variées et elles se présentent sous deux formes potentielles :

- **Les plantes fraîches** : elles servent de base à la préparation des teintures mères, qui permettent à leur tour l'élaboration de médicaments homéopathiques.
- **Les plantes sèches** : elles constituent la base des teintures officinales, des nébulisas, des extraits, mais aussi des poudres.

L'action des plantes médicinales est attribuée à un ou plusieurs principes actifs l'analyse chimique est possible, ce qu'il faut savoir pour comprendre comment Ils agissent sur le corps. Sous différentes formes existantes, le principe actif peut être manifeste de différentes manières. C'était à l'origine de la poudre, de l'huile essentielle, extraits ou teintures, constituant les préparations dites galéniques (**Chabrier, 2010**).

I.2. Plantes étudiées :

I.2.1. *Cuminum cyminum*:

Le cumin (*Cuminum cyminum* L.) est une petite plante annuelle et herbacée appartenant aux Apiacées famille. C'est une espèce végétale polyvalente cultivée au Moyen-Orient, en Inde, en Chine et dans plusieurs Pays méditerranéens, dont la Tunisie. Son fruit, connu sous le nom de graine de cumin, est le plus largement utilisé pour fins culinaires et médicinales. Il est généralement utilisé comme additif alimentaire, épice populaire et agent aromatisant. Dans de nombreuses cuisines. Le cumin a également été largement utilisé en médecine traditionnelle pour traiter diverses maladies, y compris l'hypolipémie, le cancer et le diabète (**Sami et Sami, 2015**).

La littérature présente de nombreuses preuves de la biologie et les activités biomédicales du cumin, qui ont généralement été attribuées à son contenu et à l'action de ses constituants actifs, tels que les terpènes, les phénols et les flavonoïdes. Le présent document donne un aperçu de profil phytochimique, activités biologiques et usages ethno médicaux et pharmacologiques du Cumin (**Sami et Sami, 2015**).



Figure 1- Fleurs de *Cuminum cyminum* (site web : The original Garden).

I.2.1.1. Caractéristiques systématiques :

D'après Ali Esmail Al-Snafi en 2016, la classification systématique de la *C. cyminum* est la suivante :

Tableau 1- classification systématique du cumin

Règne	<i>Plantae</i>
Division	<i>Tracheophyta</i>
Classe	<i>Magnoliopsida</i>
Ordre	<i>Apiales</i>
Famille	<i>Apiaceae</i>
Genre	<i>Cuminum</i>
Espece	<i>Cuminum cyminum L</i>

I.2.1.2. Description botanique :

La plante est une annuelle délicate et glabre, de 10 à 50 cm de hauteur. Base de la tige fourchue, glabre. Les feuilles sont glabres, fissurées pennées, oblongues à l'extrémité et généralement triples à la partie inférieure (**PDR for Herbal Médecine, 2000**).

Les fleurs sont en ombelles radiales, 3 à 5 dans chaque groupe. Les pétales sont blancs ou rouges, oblongs, avec des bords sombres et de longues pointes dentelées. Les bractées involuquées sont longues et simples. Le style est plus court et se termine à l'envers, l'ovaire est infère et compte 3 cellules. Le fruit est un fruit segmenté, d'environ 6 mm de long et 1,5 mm de large, avec un épi de calice en forme de cône. (**Sami et Sami, 2015**).

La section transversale de la sous-carpe est presque ronde, avec 5 filaments, avec des soies sur le bord principal et des soies sur le second bord (**PDR for Herbal Médecine, 2000**).

I.2.1.3. Distribution géographique :

Le cumin (*Cuminum cyminum* L.) fait partie des Apiacées originaire de la région méditerranéenne, du Turkestan et de l'Égypte, mais qui s'est propagée dans diverses régions arides et semi-arides du monde, notamment au Moyen-Orient, en Inde et en Turquie. C'est l'une des espèces végétales les plus anciennes et économiquement importantes dont la culture nécessite généralement un long été chaud de 3 à 4 mois, avec des journées des températures d'environ 30° ou plus. Il est tolérant à la sécheresse et principalement cultivé dans les climats méditerranéens (**Hajlaoui et al., 2010**).

Le cumin pousse en Afrique du Nord et en Asie du Sud-Ouest, dans le sol Bien éclairé, bien drainé, au soleil (**Bremness, 2002**). Ses graines sont cueillies en fin d'été, à mesure qu'ils mûrissent (**Vican, 2001**).

La plante est cultivée à partir de graines, semées au printemps, nécessite un sol fertile et bien drainé, et le fruit a un akène fusiforme ou ovale transversal de 4 à 5 mm de long contenant une seule graine (**Hajlaoui et al., 2010**).

I.2.2. *Mentha pulegium* :

Mentha pulegium Linné, connue localement sous le nom de "**Fliyou**" en 1753, est très commune en Méditerranée et est connue sous le nom de "**pouliot**". Elle est commune dans les zones humides et est parfois cultivée comme plante d'assaisonnement pour ses feuilles très aromatiques. Le nom "**pouliot**" vient du latin *pulegium*, de *pulex* : puce, plante aux propriétés anti-puces. Malgré son utilisation ancestrale dans les sauces, les desserts et les boissons, ses retombées économiques sont limitées (Sutour, 2010).

Il a de nombreuses propriétés médicinales, comme être un bon expectorant et sédatif, utilisé pour soulager la toux, Les infusions Pouliot après les repas peuvent grandement faciliter la digestion, résister à la fermentation, et être très lourdes ; c'est l'une des meilleures boissons digestives, Très bénéfique, surtout pour les personnes souffrant d'insuffisance hépatique.

Des doses élevées sont toxiques et peuvent provoquer une fausse couche. Cette plante a également une spécificité insecticide, puisqu'elle a été utilisée pour repousser les insectes.



Figure 2- Feuilles de *Menthe pulegium* (site web: Aroma-Zen).

I.2.2.1. Caractéristiques systématiques :

D'après **Quézel et Santa en 1963** et **Guignard et Dupont en 2004**, la classification systématique de la *Mentha pulegium* est la suivant

Tableau 2- Classification systématique de Menthe pouliot.

Règne	<i>Plantae</i>
Division	<i>Magnoliophyta</i>
Classe	Magnoliopsida
Ordre	<i>Lamiales</i>
Famille	<i>Lamiaceae</i>
Genre	<i>Mentha</i>
Espece	<i>Mentha pulegium L.</i>

I.2.2.2. Description botanique :

Plante vivace aromatique (**Iserin, 2001**) à feuilles, opposées, petites, sont ovales presque entières (légèrement dentelées) et munies d'un court pétiole. Les fleurs sont rose lilas, parfois blanches, échelonnées le long de la tige (**Sutour, 2010**), les tiges à section carrée, sont plus ou moins dressées, verdâtres ou grisâtres, très ramifiées (**Bouhaddouda, 2016**). Sa saveur est fortement aromatique et son odeur est intense.

I.2.2.3. Distribution géographique :

Fliyou est une herbe aromatique et pérenne tomenteuse indigène d'Europe, d'Afrique du Nord et d'Asie et du Moyen-Orient, qui pousse dans les plaines alluviales, les habitats riverains et les zones humides d'eau douce (**Stavrescu-Bedivan et al., 2019, Caputo et al., 2021**).

C'est une espèce trouvée dans les zones humides et marécageuses, près des routes et elle est plus abondante dans les pâturages de montagnes (**Chalchat, 2000**). En Algérie, *Mentha pulegium* est très abondante et pousse spontanément (**Quézel et Santa, 1963**).

I.2.3. *Ocimum basilicum* L. :

Ocimum basilicum L. Populairement connu sous le nom de "basilic doux" ce genre est riche en composés phénoliques et sont très utiles pour leur potentiel thérapeutique et utilisé dans les systèmes de médecine (Muralidharan et Dhananjayan 2004 ; Ramesh et Satakopan, 2010). De plus, parmi plus de 150 espèces du genre *Ocimum*, le basilic est la principale culture d'huile essentielle qui est cultivée commercialement dans de nombreux pays (Hussain et al., S-D). C'est une herbe populaire, appréciée pour sa saveur riche et épicée, légèrement poivrée, avec une trace de menthe et de clou de girofle, qui a été largement utilisée comme ingrédient alimentaire pour aromatiser les confiseries, les aliments cuits au four et les produits carnés (Chang et al., 2009). Elle est utilisée à la fois comme herbe culinaire et ornementale (Javanmardi et al., 2002).



Figure 3- Feuilles d'*Ocimum basilicum* (site web : jardinage le monde).

I.2.3.1. Caractéristiques systématiques :

D'après **Kirtikar et Basu (2003)**, la classification systématique de l'*Ocimum basilicum* est la suivante :

Tableau 3- Classification systématique de basilic

Règne	<i>Plantae</i>
Division	<i>Magnoliophyta</i>
Classe	<i>Magnoliopsida</i>
Ordre	<i>Lamiales</i>
Famille	<i>Lamiaceae</i>
Genre	<i>Ocimum</i>
Espèce	<i>Ocimum basilicum</i>

I.2.3.2. Description botanique :

Herbe à ramification érigée, de 0,6 à 0,9 m de haut, glabre, plus ou moins hispidiqument pubescent. Les tiges et les branches sont vertes ou parfois violacées. Les feuilles d'*Ocimum basilicum* sont simples, opposées de 2,5-5 cm ou plus de long (**Jayaweera, 1981**), ovales, aiguës, entières ou plus ou moins dentées ou lobées avec une base cunéiforme et entière. Le pétiole a une longueur de 1,3-2,5 cm. de long. Les feuilles possèdent de nombreuses glandes oléifères en forme de points qui sécrètent des substances fortement parfumées glandes qui sécrètent une huile volatile fortement parfumée (**Kirtikar et Basu, 2003**).

I.2.3.3. Distribution géographique :

Le basilic doux est indigène à la Perse, au Sind et aux basses collines du Pendjab en Inde (**Nadkarni, 2005**). La plante est largement cultivée comme plante ornementale et comme culture de plein champ dans la plus grande partie de l'Inde, en Birmanie, au Cylone (**Kirtikar et Basu, 2003**).et dans plusieurs pays méditerranéens dont la Turquie.

I.2.4. *Pimpinella anisum* :

Anis (*Pimpinella anisum* L.), appartenant aux Ombellifères famille est une herbacée annuelle et une plante aromatique typique, qui pousse dans plusieurs régions du monde (Omidbaigi et al., 2003 ; Rodrigues et al., 2003 ; Askari et al., 2005).

Il est rustique en zone 8 et est sensible au gel. Il est en feuilles à partir de mai à octobre, en fleur en juillet, et les fruits mûrissent à partir d'août à septembre. La graine aromatique est consommée crue ou utilisée comme arôme dans les aliments crus ou cuits tels que les soupes, les biscuits, confiserie, tartes, pains et gâteaux (Hedrick, 1972 ; Riotte, 1978 ; Philips et Foy, 1990).

Une huile essentielle de la graine est utilisée comme arôme alimentaire dans le poisson, la volaille, les soupes, les plats de légumes-racines, les sucreries, la crème glacée, le chewing-gum, les cornichons (Bown, 1995 ; Omidbaigi et al., 2003).



Figure 4- Fleur de *Pimpinella anisum* (site web : booksofdante wordpress).

I.2.4.1. Caractéristiques systématiques :

Selon Wikipédia :

Tableau 4- Classification systématique d'Anis vert.

Règne	<i>Plantae</i>
Division	<i>Tracheophyta</i>
Classe	<i>Magnoliopsida</i>
Ordre	<i>Apiales</i>
Famille	<i>Apiaceae</i>
Genre	<i>Pimpinella</i>
Espece	<i>Pimpinella anisum L</i>

I.2.4.2. Description botanique :

Pimpinella anisum L., une plante appartenant aux Ombellifères famille, est l'une des plus anciennes plantes médicinales. C'est une graminée annuelle à fleurs blanches de 30–50 cm de hautes, et petites graines vertes à jaunes (Salehi, 2010).

L'Anis vert c'est une plante herbacée annuelle ou bisannuelle, mesurant de 50 à 80 cm de haut, à tiges dressées creuses.

- Les feuilles longuement pétiolées sont composées de trois folioles dentelées.
- Les fleurs blanches petites sont groupées en ombelles.
- Les fruits sont gris verdâtre, oblongs et très parfumés.
- Toutes les parties de la plante sont aromatiques : feuilles, tiges, fruits, fleurs, racines.

I.2.4.3. Distribution géographique :

L'anis (*Pimpinella anisum L.*) fait partie des ombellifères et est largement cultivé dans les régions de l'Est Région méditerranéenne, Asie occidentale, Moyen Orient, Mexique, Égypte et Espagne (Salehi, 2010).

I.3. Généralité sur les techniques de multiplication :

I.3.1. Semis:

Par définition, le semis est le mode naturel de production des plantes. C'est une méthode rapide et peu coûteuse d'épandage d'espace et parfois de variétés (**Cuissance, 1980 In Baoun, 2001**), et de grandes quantités de graines peuvent être obtenues.

Cependant, dans de nombreux cas, il permet une reproduction illimitée de la plante mère (**Gauthier, 1993**).

I.3.1.1. Semence :

En phytologie, au sens le plus large et en termes agronomiques, c'est une semence utilisée pour la multiplication des plantes (**Maciejewski, 1991**), c'est tout matériel végétal utilisé pour semer des cultures (**GAT, 2001**). Selon **Binet et Brunel (1968)**, le terme graine est trop vague pour en donner une définition botanique précise. Pour toutes les plantes supérieures, c'est la partie fructifère qui se propage, pour les plantes cultivées elle est « **semée** ».

I.3.1.2. Structure de la graine :

Les graines sont composées de tissus de plusieurs origines différentes, l'embryon et le germe sont le résultat de la fécondation (**Nouara, 2007**). L'embryon, qui représente l'élément principal de la graine, est entièrement recouvert de l'albumen, qui est la zone de stockage des réserves nécessaires au développement des semis (**Anzala, 2006**).

I.3.1.3. Dormance de la graine :

La définition classique de la dormance des graines est l'incapacité à germer dans toutes les conditions environnementales clairement favorables, l'obstacle à la germination sera dans la graine elle-même et ne sera pas influencé par des facteurs externes (**Camo, 1992**).

I.3.1.4. Germination :

La germination représente le passage d'une vie lente à une vie active. - Au préalable, on s'assure que la réserve métabolique résiduelle de l'embryon sera activement métabolisée pour assurer la croissance de la plantule (**Lafon et Levy, 1988**). La germination est un processus dont les limites sont l'initiation de l'hydratation des graines et l'initiation de la croissance des racines (**Evenari, 1957**).



Figure 5- les étapes de germination (site web : istock photo).

I.3.1.4.1 Phases de germination :

Phase 1 : ou stade d'imbibition, l'imbibition est le processus par lequel la semence passe d'un état déshydraté à un état hydraté (Vertucci, 1989). Ce processus s'accompagne d'une augmentation de l'intensité de la respiration et d'une réorganisation considérable des composants cellulaires (Leopol, 1983).

Phase 2 : est appelée étape de germination, qui est strictement une étape importante du processus de germination, car elle régule la croissance de la plantule, et est donc l'élaboration de la plantule, c'est une activation de l'embryon qui permet à la radicule et germe pour être en harmonie grandir (Mazliak, 1998). Cette phase est caractérisée par des niveaux élevés et stables d'hydratation et d'activité respiratoire. Au cours de cette phase relativement brève, elle dure également de 12 à 48 heures. Les graines peuvent être déshydratées et réhydratées de manière réversible sans altérer sensiblement leur viabilité (Heller et al., 1990).

Phase 3: C'est la phase de croissance, caractérisée par une absorption d'eau, une augmentation de la radicule suivie de pousses, à ce stade, il faut bien distinguer l'activité métabolique de la plantule se développant à partir de l'embryon, tendant à être dérivée des tissus de réserve (albumine, cotylédons) , tendant à diminuer en raison de l'épuisement des réserves, stade auquel la déshydratation des tissus entraîne la mort des graines (Heller, 1982).

I.3.2. Bouturage:

Consiste à mettre en terre un fragment de plante dépourvu de racines, la bouture est capable de régénérer une plante entière par la formation des racines adventives (Robert et al., 1998), Selon Peyeru et al., (2007), le bouturage consiste à couper un fragment ou bouture d'une

pousse ou d'une tige, une masse cellulaire indifférenciée, appelée cal se forme sur la cicatrice, émet des racines adventives et produit des pousses.

La reproduction asexuée a longtemps attiré les horticulteurs et jardinières. Contrairement à la façon dont l'ensemencement se propage, la reproduction à partir de boutures (technique de reproduction asexuée classique) n'entraîne pas de recombinaison génétique et donc pas de mutation. Le génome de la souche fille est identique ou similaire à la plante mère (**Boutherin et Bron, 2002**).

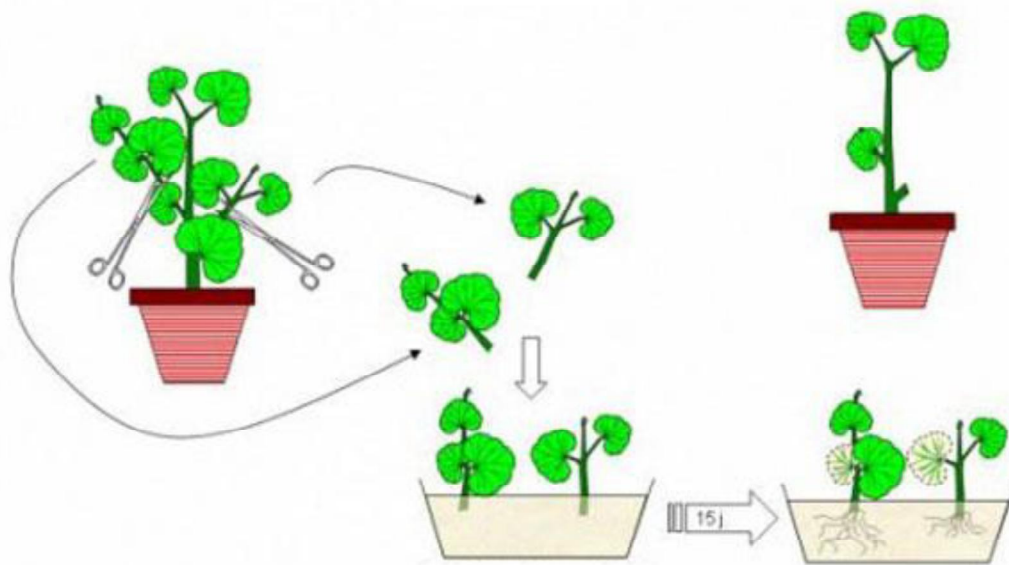


Figure 6-Multiplication végétative par bouturage (site web : Bricoleur malin).

I.3.2.1. Différentes formes de bouture :

1) Bouture herbacée :

Les boutures herbacées sont prélevées sur les jeunes parties de la plante mère luxuriante. Les meilleures dates d'échantillonnage pour les boutures herbacées sont généralement de la mi-juin à la mi-juillet, mais la récolte peut être effectuée presque n'importe quelle année sur des plantes mères cultivées en serre et maintenues en croissance. Lorsque les boutures herbacées sont de bonne qualité, le dégagement racinaire commence bien avant le développement des bourgeons axillaires (**Sbay et Lamhamedi, 2015**).

2) Bouture semi-ligneuse :

Les boutures semi-ligneuses commencent à connaître un début et un durcissement en août, accompagnés d'une augmentation de leur teneur en matière sèche. La période optimale de

bouturage est relativement courte et bien définie ; ces opérations sont généralement réalisées au printemps, juste avant le redémarrage, soit fin mars, début avril, soit en fin de saison de végétation. Cette technique est largement utilisée pour multiplier les arbres à feuillage persistant et les conifères à feuilles plates (**Sbay et Lamhamedi, 2015**).

3) Bouture ligneuse :

Les boutures ligneuses seules les 2 ou 3 feuilles supérieures seront conservées ou habillées ; les feuilles de base sont sectionnées. Cette technique sous ombrière est souvent doublée d'emploi d'auxines. Elle donne de bons résultats avec le goyavier.

4) Bouture de rameaux non feuillé :

Elles se réalisent uniquement sur des végétaux ligneux (arbustes et arbres) pendant le repos végétatif. Les boutures de 20 à 25cm de longueur sont coupées au sécateur sous un nœud pour la partie basale et avec un léger biseau au-dessus d'un œil à la partie supérieure. La plantation de ces boutures se fait généralement au début printemps, comme il est également possible de les mettre en place aussitôt faites (**Boutherin et Bron, 1989**).

5) Bouture d'œil :

Elle se compose d'un petit morceau de rameau de l'année (2 à 5 cm de long) doté d'un œil axillaire (à l'aisselle d'une feuille), ce dernier ayant la possibilité de se développer et de former une tige. Cette technique permet d'obtenir plusieurs boutures sur une même tige, mais le développement de la bouture en plante est long. Cette technique est utilisée essentiellement pour le Camélia qui est lent à s'enraciner, mais aussi l'hortensia, le rhododendron, la vigne et les ronces. La bouture d'œil est réalisée entre la fin de l'été et le début d'automne (**Isabelle, 2021**).

I.3.3. Greffage:

Le greffage aujourd'hui, tel que défini par **Robert et al. 1998**, est " : C'est une pratique agronomique impliquant l'implantation d'un greffage dans un tissu végétal dans lequel le porte-greffe fournit les racines et le greffon fournit le système aérien ".

Il s'agit de la jonction du greffon et le porte-greffe, le porte-greffe se développe dans le système racinaire, tandis que le greffon développe la partie fructifère supérieure de l'arbre greffé. Les porte-greffes peuvent être des semis, des boutures enracinées ou des plantes en couches. Les porte-greffes peuvent affecter diverses caractéristiques des plantes greffées, notamment la taille et le mode de croissance des arbres, le rendement, la taille et le temps de maturation des fruits (**Mukherjee et Litz, 2009**).

Le greffage peut être utilisé pour améliorer la reproduction des arbres en phase de reproduction en prélevant des greffons dans la canopée ontogénique des grands arbres (**Grolleau 1989 ; Hartmann et al., 1997**). De cette façon, la période juvénile de l'arbre est considérablement raccourcie (**Hackett 1985 ; Hartmann et al., 1997**).

Le greffage est également une option viable pour domestiquer certaines espèces agroforestières jus'ici sous-exploitées (**Jaenicke et Beniest, 2003**).

I.3.3.1. Porte-greffe :

C'est la partie souterraine de la plante ou sa partie inférieure, incluant dans certains cas une partie de la tige et quelques branches qui fourniront le système racinaire de la nouvelle plante. Cette partie peut également contenir des bourgeons dormants, mais il faut éviter qu'ils ne se développent sur de nouvelles plantes, car ils formeront des rejets qui n'ont pas les caractéristiques souhaitées que l'on souhaite reproduire (**Charles, 1892**).

I.3.3.2. Greffon :

Le greffage apporte un système foliaire, qui réalise la photosynthèse et la nutrition carbonée combinée. Il est capable de produire des molécules organiques à partir de molécules minérales. Il apporte également le système reproducteur, qui est la fleur, puis le fruit. Pour choisir sa qualité de fruit, il faut aussi l'adapter au climat.

I.3.3.3. Différent techniques de greffage:

- 1) La greffe en fente.
- 2) La greffe par incrustation.
- 3) La greffe en couronne.
- 4) La greffe en écusson.
- 5) La greffe en flûte.
- 6) La greffe en chip-budding.
- 7) Greffe Par Approche.
- 8) La greffe en oméga.
- 9) La greffe anglaise.

I.3.4. Marcottage :

Selon **Boutherin et Bron (1989)**, le marcottage est une méthode de multiplication végétative visant à provoquer l'enracinement de rameaux, ceux-ci restant reliés au pied mère pendant toute la période de l'enracinement.

Il a pour but de provoquer l'enracinement d'un rameau lorsqu'il est encore attaché à la plante mère (**Bellefontaine et al., 2015**). Le fragment à multiplier est appelé marcotte. Il est séparé de la plante mère après l'apparition des racines.

Le marcottage débute par la néoformation de racines adventives au niveau d'une tige ou d'une branche. Une marcotte peut être produite par la mise en contact d'une branche basse ou rampante avec le sol, marcottage terrestre, éventuellement par buttage, ou en entourant la tige d'un manchon de substrat humide, marcottage aérien (**Bellefontaine et Monteuis, 2002**).

Les différentes techniques de marcottage :

- 1) Marcottage par couchage : en archet.
 - ✓ Le marcottage en serpenteau.
 - ✓ Le marcottage à plat ou chinois ou à long bois.
 - ✓ Le marcottage des extrémités.
- 2) Marcottage en butte ou en cépée.
- 3) Marcottage aérien.

I.3.5. Culture *in vitro*:

La multiplication *in vitro* est un mode de reproduction asexué (reproduction végétative artificielle) (**Boccon, 1989**), le terme de culture *in vitro* est appliqué à toute culture sous verre (tube, bocal, etc...) en milieu aseptique (**Boutherin et Bron ,2002**).

Les cultures de plantes peuvent être créées en extrayant des tissus de plantes ou de fragments d'organes, puis en les transférant sur un milieu nutritif artificiel, dans des conditions stériles (**Zryd, 1988**). D'autre part la mise en place d'un environnement parfaitement contrôlé : milieux définis pour chaque espèce végétale, conditions optimales de température, photopériode, d'humidité (**Dutuit et Gorenflot, 2008**).

La CIV peut cultiver des fragments de tissus ou d'organes isolés de plantes, tels que des pointes capables de régénérer des pousses, des nœuds et des racines avec des types de croissance indéfinis, et même des feuilles qui restent viables.

Cette technique peut également faire croître des cellules isolées et même des protoplastes. Capable de diviser, de former des callosités, d'organiser les tissus et même de régénérer des plantes entières. Par conséquent, la CIV peut exploiter tout le potentiel de régénération des plantes, jusqu'à la totipotence cellulaire qui peut se traduire suivant cette formule simple :

1 cellule = 1 plante entière (Jay-Allemand et Capelli, 1997).

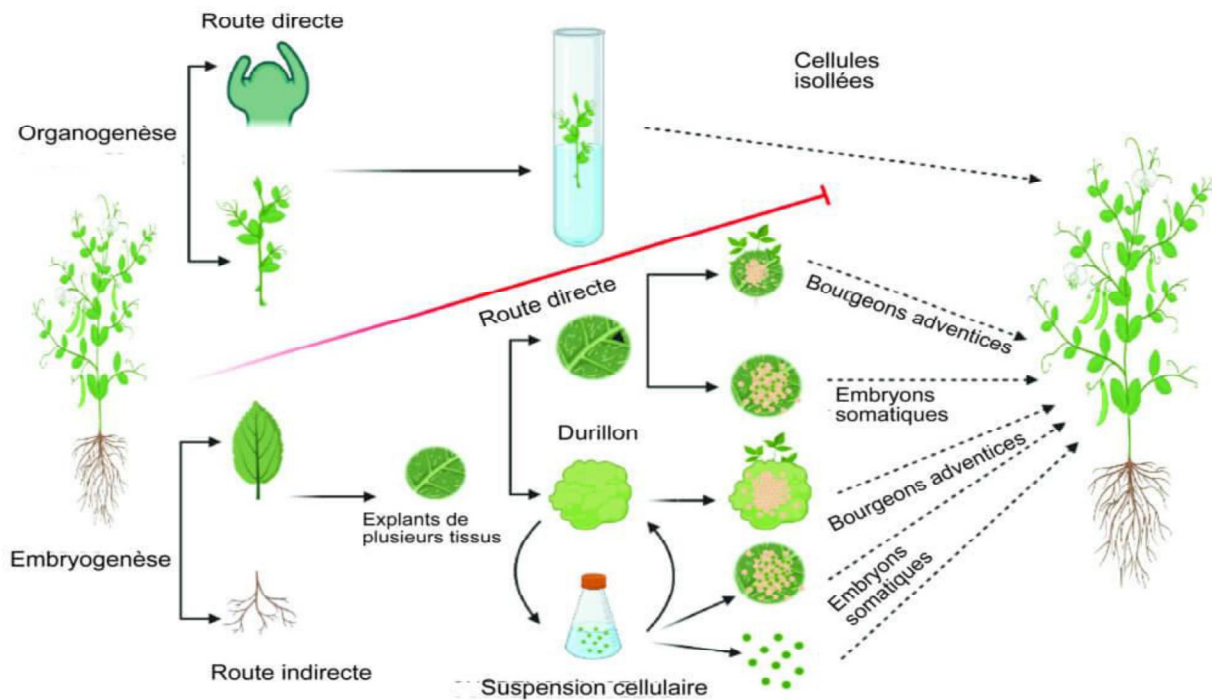


Figure 7- Principales méthode de micropropagation (site web : Alchimia).

I.3.5.1. Totipotence :

La théorie de la totipotence énoncée en 1902 par Haberlandt a été reprise et banalisée par **Steward (1967)**. Cette théorie se base sur le fait que toutes les informations génétiques et donc le programme de l'embryogenèse sont présents dans le noyau de chaque cellule vivante (**Norreel, 1973**).

Le terme "**totipotent**" s'applique aux cellules somatiques cultivées in vitro pour produire des cellules embryogènes, qui donnent naissance à des embryons somatiques et à des plantes entières régénérées (**Verdeil et al., 2007**).

Les cellules sont capables de se régénérer si elles sont placées dans des conditions appropriées. Lorsqu'une cellule est mise dans de bonnes conditions, elle exprime tout son

potentiel et peut donner naissance à un organisme entier. Ce phénomène est surtout observé lors de la croissance des racines des plantes : les méristèmes.

La CIV doit toute son extension à la totipotence cellulaire des végétaux. Toute cellule d'une plante peut, dans certaines conditions, se dédifférencier pour devenir une cellule œuf, appelée cellule embryogène, capable de générer un nouvel individu. Ainsi peut-on obtenir à partir d'un fragment végétal plusieurs dizaines de milliers de plantules (Guyot *et al.*, 2003).

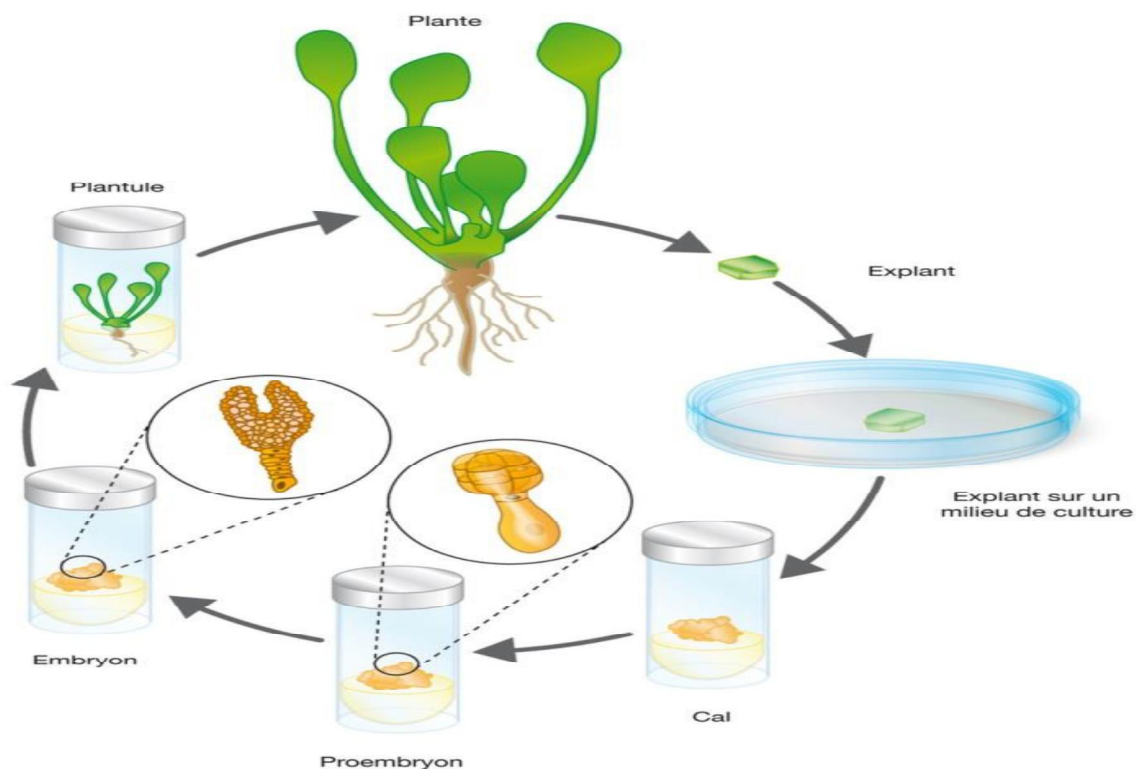


Figure 8-Totipotence et culture cellulaire végétale (site web: le monde en image).

I.3.5.2. Régénération :

La régénération de nouveaux organes ou embryons dépend d'un ensemble de processus de dédifférenciation. Ceux-ci sont suivis par la formation de nouveaux méristèmes de tiges ou de racines, ou par une division cellulaire précise qui aboutit à des embryons somatiques.

La régénération des plantes comprend un processus biologique complexe qui pourrait ne pas être entièrement compris à l'avenir. Ce processus, parmi de nombreux autres, comprend des facteurs tels que la polarité cellulaire et l'organisation du cytosquelette, qui détermine quand et comment les gènes sont activés. Une partie importante de ce processus est la micropropagation (Loberant *et al.*, 2010).

I.3.5.3. Différenciation :

Chaque individu commence comme une cellule indifférenciée. Les ovules se divisent et forment des masses cellulaires, qui se différencient ensuite et construisent le corps. Cette différenciation est en partie due à d'autres types d'informations (**Lachachi, 2010**), comme des signaux dans le corps indiquant aux différentes cellules ce qu'elles doivent faire :

- Les régulateurs de croissance ex : cytokinines favorisent la Caulogénèse.
- Les ressources : les carences/disponibilités orientent les métabolismes et la différenciation.
- Le troisième facteur qui peut influencer l'orientation de la différenciation est l'échange d'énergie. La cellule a besoin d'énergie pour se différencier et pour que cela se produise, il doit y avoir une disponibilité de NTP.

I.3.5.4. Dédifférenciation :

Le terme "**dédifférenciation**" a plusieurs définitions : "processus par lequel des cellules matures ou spécialisées perdent leur caractère différencié et différenciées et rajeunissent" (**Bloch, 1941**),

"Un processus par lequel dès les tissus qui ont subi une différenciation cellulaire peuvent être amenés à processus afin de redevenir une cellule primordiale" (**Hale et al., 2005**).

"Implique une cellule différenciée en phase terminale qui revient à une cellule moins différenciée" (**Hale et al., 2005**).

"Implique une cellule différenciée en phase terminale revient à un stade moins différencié au sein de sa propre lignée" (**Jopling et al., 2011**).

"Son trait distinctif est le retrait d'une est le passage d'un état différencié donné à un état semblable à celui des uns états semblables à celui des "cellules souches" qui confère la pluri-potentialité" (**Grafi, 2004**).

I.3.5.5. Organogenèse :

Les cellules souches végétales naturellement présentes dans la racine et l'apex de tige des plantes intactes sont considérées comme "**pluripotentes**", car elles sont capables de former des types de cellules et de tissus présents soit dans les tissus de racine ou de tige (**Verdeil et al. 2007**).

Dans l'organogenèse, des pousses et des racines se forment spontanément à partir d'explants. Ce processus peut se produire simultanément tant que les conditions environnementales sont réunies, ou il peut être retardé pour se produire à un moment précis. La repousse des tissus n'est possible que lorsqu'ils sont repiqués sur un autre milieu dans des conditions différentes qui favorisent leur formation (**Loberant et al., 2010**).

L'organogenèse est la base fondamentale de la reproduction asexuée *in vitro*, celle-ci est toujours basée sur la nouvelle formation du méristème (**Margara, 1989**). Elle est souvent obtenue en trois étapes distinctes : **callogenèse**, **caulogenèse** et **rhizogenèse**.

I.3.5.5.1 Rhizogenèse :

Les cellules qui sont devenues compétentes pour la rhizogenèse suite à une dédifférenciation *in vitro*, subissent une division cellulaire organisée pour former des primordia de racines adventives dans des conditions de culture appropriées (**Muller et al., 1985**).

I.3.5.5.2 Caulogenèse :

A partir de cellules qui ont acquis la compétence pour la caulogenèse pendant la dédifférenciation, la formation de pousses adventives peut être induite par l'application de cytokines. Induite par l'application de cytokinine (**Kakimoto, 1996**).

I.3.5.5.3 Callogenèse :

La callogenèse correspond à la reprise de la division cellulaire (mitose) et le début de la différenciation se traduit par des tissus relativement homogènes et organisation (**Margara, 1989**). Quant à l'occurrence de tige, elle spécifie le début et les pousses adventives (nouvellement formées) sur cal ou directement sur explants (**Margara, 1989 ; Boxus, 1989**). Pour la rhizosphère, cela signifie nouvellement formé et croissance des racines (**Margara, 1989**).

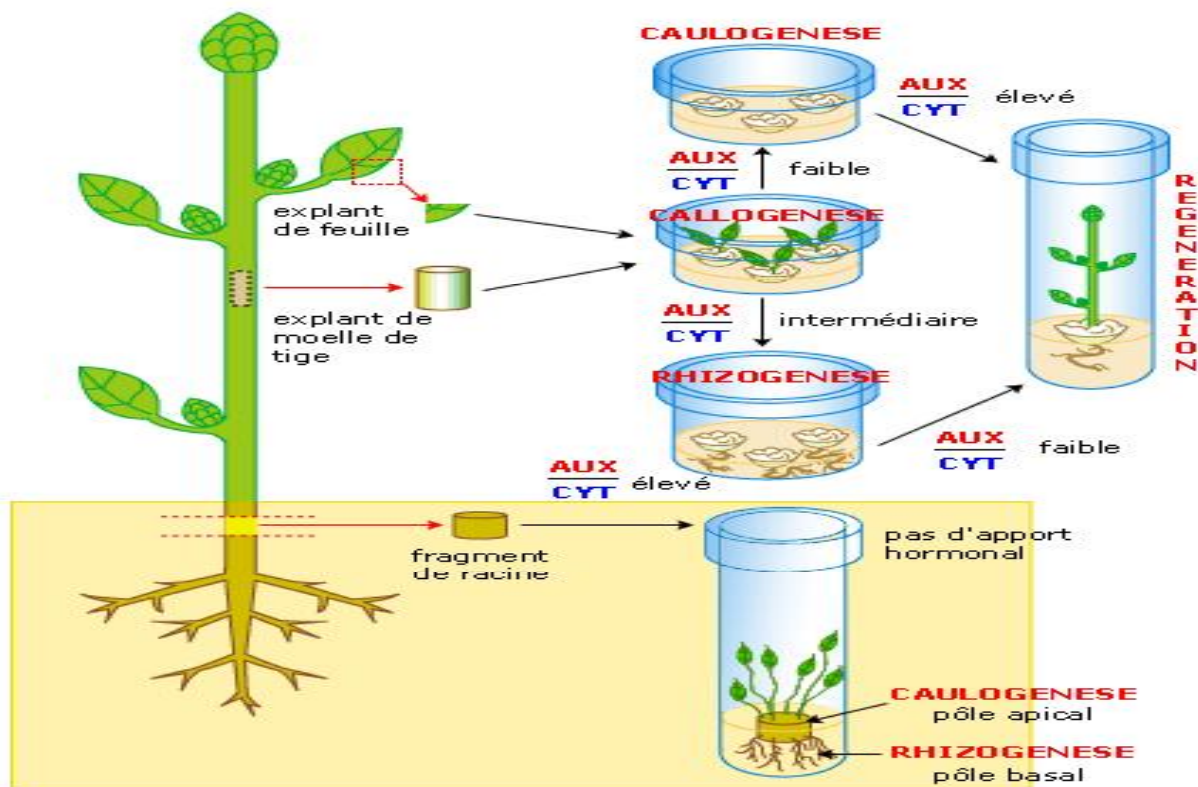


Figure 9-la culture *in vitro* (formation des organes) (site web : le monde en image).

I.3.5.6. Catégories de la culture *in vitro* :

a. Catégorie de la culture *in vitro* conforme :

Culture conforme *in vitro* c'est une méthode de propagation conduit à un individu possédant le même stock d'informations héréditaires que la plante dont il est issu (Nozeran et Bancilhon, 2008). Selon Rousselle et al (1996), la culture des méristèmes a permis de guérir les plantes infectées par des virus depuis les travaux de Morel et Mortin en 1952. La micropropagation *in vitro* est plus ou moins utilisée pour produire des plantes conformes à la propagation de première génération.

Parmi les applications :

- Culture de nœuds ou apex,
- Culture de méristèmes,
- Embryogenèse somatique.

b. Catégorie de la culture *in vitro* non conforme :

Ce procédé utilise du matériel végétal mal régulé et le met dans des conditions qui déstabilisent le signal, et on voit émerger une variabilité importante (**Demarly, 1985**).

- Organogenèse directe.
- Organogenèse sur cal (Callogenèse).
- Haplométhodes.
- Culture et fusion de protoplastes.

I.3.5.7. Applications de culture *in vitro* :**a. Micropropagation :**

Micropropagation (d'autres synonymes incluent : *in vitro* propagation) est le terme le plus couramment utilisé pour clonal, Ce processus peut être effectué en utilisant une variété de tissus et de méthodes de culture cellulaire (**Loberant et al., 2010**).

La micropropagation implique la prolifération de bourgeons axillaires préexistants sur l'explant maternel. Cela fournit une bonne garantie pour la cohérence génétique et la stabilité des traits lors des passages en série (**Zryd, 1988**).

Les plantes se multiplient par semis ou par multiplication végétative. La micropropagation *in vitro*, apporte un progrès considérable par rapport aux méthodes traditionnelles avec un taux de multiplication de 100 à 1000 fois plus élevé et en un temps plus réduit (**Ochette, 2005**).

La micropropagation présente plusieurs avantages sur les méthodes classiques dites "conventionnelles" de propagation. Cette technique a rendu possible la multiplication d'espèces chez lesquelles les semences sont rares ou présentant des difficultés de germination et/ou dont les techniques de bouturage ou de greffage sont inapplicables, ce qui a conduit à une plus grande diversité des plantes commercialisées (**Ferry et al., 1998 ; Semal, 1998**).

Cette technique permet la multiplication végétative de plusieurs plantes alimentaires, médicinales, horticoles, agro-forestières... (**Bretauudeau, 2006**).

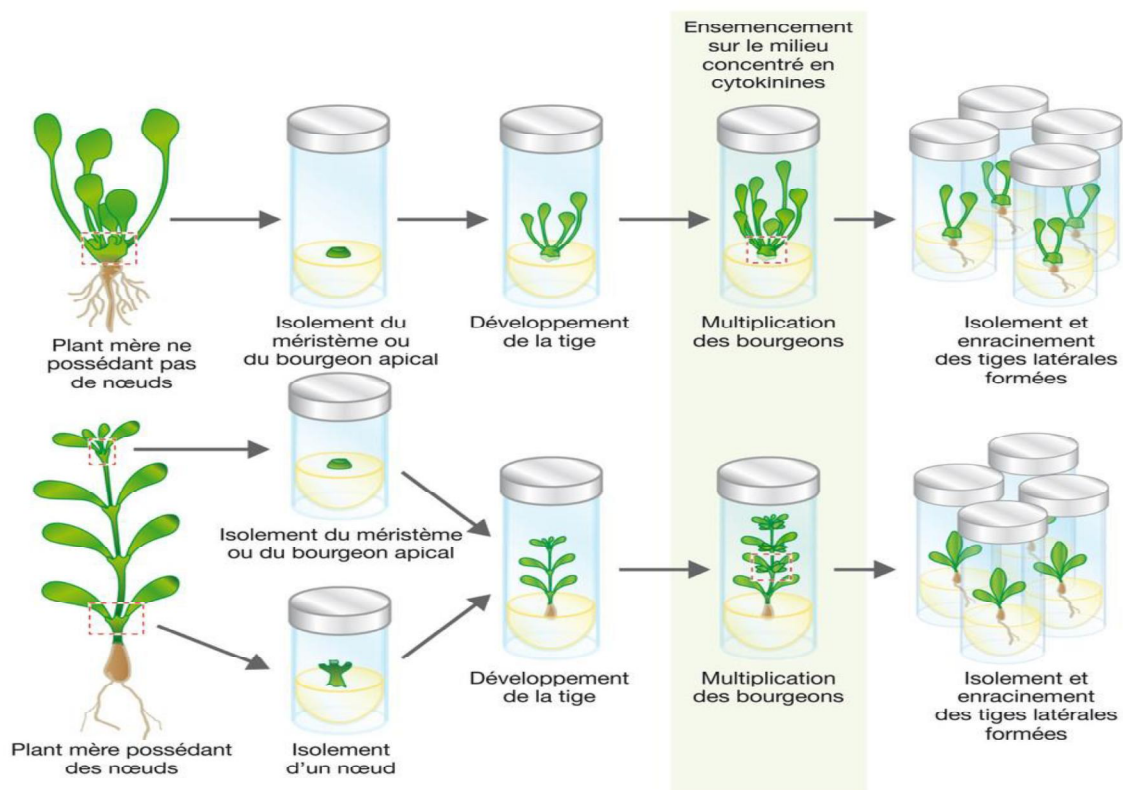


Figure 10- Micropropagation par les bourgeons axillaires (site web : le monde en image).

b. Culture de méristèmes :

Dans le domaine de la culture des tissus végétaux, les techniques de culture de méristèmes occupent une position unique en termes d'application pratique. La technique a trouvé sa place non seulement dans la propagation clonale (Karthan, 2000), la culture des méristèmes devient évidente dans la production de plantes indemnes de maladies, notamment de virus. Les chercheurs ont signalé que les extrémités des pousses et des racines des plantes infectées par des virus sont souvent exemptes d'agents pathogènes ou contiennent de très faibles niveaux de virus, (White 1934 ; Kassanis 1957). De plus, comme les cellules situées au sommet de la pousse sont moins différenciées et génétiquement plus stables, la progéniture régénérée par culture *in vitro* de méristèmes présente une meilleure stabilité génétique par rapport à d'autres méthodes de régénération végétale *in vitro* (Karthan, 2000).

c. Variation soma-clonale :

Le terme "**variation soma-clonale**" fait référence à la variation génétique, épi-génétique ou phénotypique stable induite par la culture de tissus dans les populations de plantes propagées de manière clonale (**Larkin et Scowcroft 1981, 1983**).

Si un matériel végétal suspecte un problème de variation soma-clonale, un chercheur peut identifier ce problème comme résultant soit d'une variation préexistante dans les explants de la plante donneuse, soit d'une variation induite par l'environnement de culture tissulaire. Parfois, il peut y avoir les deux problèmes de variation soma-clonale.

d. Embryogenèse somatique :

L'embryogenèse somatique est différente de l'organogenèse car l'embryon est constitué des mêmes cellules et il est organisé des deux côtés, formant une pousse et une racine. Avec l'embryogenèse somatique, la différenciation a lieu dans l'explant ou dans le cal, selon le type d'explant, la composition du milieu de culture et le régime de repiquage (**Loberant et al., 2010**).

e. Culture d'embryons :

La culture d'embryons est un type de culture de tissus utilisé à de nombreuses fins. Cette technique s'est avérée être la plus utile pour les sélectionneurs et est l'une des premières formes appliquées à des problèmes pratiques (**Dunwell, 1986**). Sa principale application dans la sélection végétale a été l'hybridation interspécifique.

f. Protoplastes :

La fusion de protoplastes, des cellules débarrassées de la paroi pectocellulosique par hydrolyse enzymatique, permettant de créer de nouvelles variétés, d'introduire des caractères à hérédité cytoplasmique, ou d'obtenir des plantes transgéniques à partir de protoplastes transformés par électroporation. Cette méthode permet d'introduire de l'ADN nu (construction génique) dans les protoplastes par l'utilisation d'un champ électrique de haut voltage qui rend perméable leur membrane cytoplasmique (**Pelletier, 1988**).

Les protoplastes peuvent être obtenus à partir de n'importe quel tissu végétal, mais ce sont généralement les parenchymes des jeunes feuilles.

Fusion de protoplastes dans un processus d'hybridation qui insère également le cytoplasme d'une espèce dans une autre. Ceci est important pour le transfert et l'amélioration de caractères à héritage cytoplasmique, tels que la stérilité mâle (**Demerly, 1985**).

L'union de deux ou plusieurs protoplastes entraîne l'addition de trois compartiments héréditaires : le nucléaire, les mitochondries et les chloroplastes, ce qui augmente le niveau de ploïdie (Fowke, 1980).

g. Culture du pollen :

Il a été démontré que différents hétéroploïdes, obtenus *in vitro* à partir du gamétophyte mâle par androgenèse, présentent une plus grande variété que les lignées d'origine. Cette variation concerne le taux de croissance, les caractéristiques morphologiques et les caractéristiques du système reproducteur. Des analyses biochimiques (isozymes, produits du métabolisme secondaire) et moléculaires (organisation) démontrent que la variation est principalement due aux cycles successifs de culture du pollen (R. De Paepe, 1986).

I.3.5.8. Facteurs influençant la culture *in vitro* :

a. Âge physiologique et ontogénique de l'explant :

En général, les cultures *in vitro* de tissus végétaux utilisent des explants immatures, comme les embryons immatures et les jeunes feuilles, car ce sont les états juvéniles des plantes qui offrent le plus de possibilités de régénération (Davis, 1986 ; Saadi, 1991).

b. L'époque du prélèvement :

Ce problème se pose surtout chez les espèces pérennes, où l'on peut distinguer un stade vie active et stades de vie lents des plantes conduisant au développement d'explants différentes réponses en culture *in vitro*. Cette différence peut s'expliquer comme régulateurs de croissance altérés (auxines, cytokinines, gibbérelline...) à différentes saisons (Auge et al., 1989).

c. La taille de l'explant :

Plus l'échelle est grande, plus l'équilibre endogène est décisif, Les conditions externes peuvent avoir un impact. La taille choisie variera en fonction de la nature de l'explant.

Si le tissu végétal est organisé, un ensemble assez complet (qu'il soit nœuds, sommets ou bourgeons entiers) mais dans le cas de structures différenciées (éléments feuilles, tiges, racines, inflorescences, etc.) des fragments de 5 à 10 mm suffisent (Zryd, 1988 ; Auge et al., 1989 ; Hannweg et al., 1996).

d. Influence du génotype :

La plupart des plantes présentent une régénération des génotypes spécifique à l'espèce. Dans la même espèce, un génotype produira des bourgeons tandis que l'autre ne le fera pas. Embryons seulement (Auge et al., 1989). Cependant, certains auteurs mentionnent que,

Seuls certains génotypes semblent avoir la capacité d'induire l'embryogenèse somatique. Chez de nombreuses espèces, cette capacité semble être contrôlée par le génotype (George et Sherrington, 1984 ; Brown, 1988 ; Dodeman et al., 1997).

I.3.5.9. Influence du milieu de culture :

Le milieu de culture synthétique est une source nutritionnelle pour les plantes, et est également appelé milieu base. Ce type de milieu comprend de l'eau distillée, ainsi que du sucre(s) comme source primaire de carbone, sels inorganiques, fournissant des macro- et micro-éléments, vitamines, certaines essentielles, d'autres bénéfiques, et hormones végétales ou régulateurs de croissance (Murashige et Skoog, 1962). Le milieu standard le plus utilisé est celui de Murashige et Skoog (MS).

Les facteurs qui influencent l'adaptabilité et la régénération *in vitro* sont variés, allant du génotype à l'origine de l'explant, en passant par les conditions de culture et les effets hormonaux (Loberant et al., 2010).

I.3.5.9.1 Inorganiques :**a. Macronutriments :**

Interviennent en grande quantité. Il s'agit de 6 éléments présents à des concentrations élevées telles que l'azote (N), le calcium (Ca), le potassium (K), le soufre (S), le magnésium (Mg) et le phosphore (P) (Auge et al., 1989).

b. Micronutriments :

Parfois appelés oligo-éléments, ils jouent un rôle important dans les mécanismes enzymatiques en tant qu'activateur ou composant de coenzymes. Principalement : Fer (Fe), Cuivre (Cu), Zinc (Zn), Manganèse (Mn). Ces éléments sont associés au Nickel (Ni), à l'iode (I) et Aluminium (Al). Le fer est fourni sous forme chélate (Fe-EDTA) pour éviter sa précipitation (Margara, 1989).

I.3.5.9.2 Organique :

a. Vitamines :

En culture *in vitro* certaines vitamines sont favorables aux croissances des tissus (Téoulé, 1999). Par conséquent, il n'est pas exclu que le manque d'entre eux puisse être un facteur limitant le phénomène de l'organogenèse (Margara, 1989).

Les plus couramment utilisées : Les vitamines B sont la thiamine HCL, la pyridoxine, la glycine et le myoinositol. Gautheret (1977) a constaté que ce sont également les plus importantes en termes de carence.

b. Acides aminés :

Certaines cellules végétales cultivées peuvent synthétiser tous les acides aminés, aucun n'est considéré comme essentiel. Cependant, certains milieux contiennent certains acides aminés pour leurs propriétés favorisant la croissance, il a parfois été observé que l'apport d'acides aminés favorisait la prolifération (Auge at al., 1989).

c. Source de carbone :

Les tissus végétaux *in vitro* manquent souvent de chlorophylle pour survivre et se développer. C'est pourquoi des sucres, comme le saccharose, sont ajoutés aux milieux de culture. Les glucides du sucre peuvent être extraits de la photosynthèse avec du dioxyde de carbone de l'atmosphère ou de l'eau du sol (Auge at al., 1989).

d. Régulateurs de croissance :

Les régulateurs de croissance, également appelés « **phytohormones** », sont définis comme suit : substances pouvant être inhibées en fonction de leur concentration absolue ou relative dans le milieu, le processus de différenciation est autorisé ou modifié sous certaines conditions (Vidalis et al., 1989).

Les régulateurs de croissance les plus couramment utilisées pour la culture de cellules végétales sont les auxines et les cytokinines. Cependant, pour des applications spécifiques avec certaines espèces, l'acide abscissique ou l'acide gibbérellique peuvent également être utilisés.

■ Cytokinines :

Composés proches des bases puriques, le rôle des cytokinines est démontré depuis 1958 son application sur les bourgeons, même en présence d'hormone de croissance (Wickson et Thimann, 1958 ; Dun et al., 2012). Ils sont spécialement impliqués dans la répression et la transcription des gènes liés à la répression le débourrement (Roman et al., 2016), ou

stimulation des processus de division et d'élongation cellulaire, notamment par la régulation des expansines (**Roman et al., 2017**).

■ **Auxine :**

L'auxine, dérivée du tryptophane, est synthétisée à l'extrémité des pousses et des jeunes feuilles, transport basal vers le système vasculaire de la tige, via les cellules parenchyme du xylème. En plus des nombreux effets de l'auxine (rhizogenèse, élongation cellulaire, division cellulaire, etc.), ce flux direct d'auxine de SAM vers AxM maintient dormant dans les bourgeons axillaires (**Balla et al., 2011**). En fait, l'apport externe d'auxine dans les tiges décapitées a empêché la croissance des pousses (**Thimann et Skoog, 1933**). Cette le transport de l'auxine est polarisé et régulé par plusieurs transporteurs de la grippe (**Yang et al., 2006**).

■ **Gibbérelline :**

La gibbérelline est connue pour stimuler la croissance en longueur de nombreuses plantes organes, en particulier les entre-nœuds (**Moshkov et al., 2008**). Ils participent aussi développement des aisselles, à mesure que leur synthèse diminue ou augmente leur catabolisme induit le développement d'hyperramifications et d'aisselles (**Lamo et al., 2015**).

e. **Agent gélifiant :**

Il devient de plus en plus évident que non seulement la concentration, mais aussi le type d'agent utilisé pour fabriquer les milieux solides influencent la réponse *in vitro* des tissus végétaux cultivés. Les produits naturels extraits des algues (par exemple, gélose, agarose et alginate) et leurs plus des substituts récemment apparus (par exemple, Gelrite, Phytigel), obtenus à partir de fermentation microbienne.

f. **Température :**

La température est importante pour le maintien des plantes. Elles ont généralement besoin d'une température ambiante de 22 à 27 °C, mais certaines espèces, stades de croissance ou conditions de stockage peuvent nécessiter des régimes de température différents ou variables (**Altman et Loberant, 1998**).

g. Lumière et Photopériode :

La lumière et l'obscurité fonctionnent ensemble par leur durée et leur temps d'exposition. Cependant, une meilleure tubérisation a été observée lorsque les boutures étaient placées sous micropropagation et photopériode longue sous photopériode courte **(16/8 h, j/n) (8/16 h, j/n)** ou microtuberculose dans l'obscurité totale **(Seabrook et al., 1993)**.

I.3.5.10. Intérêts et utilisation de la CIV :

Par ses avantages et ses différentes méthodes, la culture *in vitro* s'applique à Les plantes permettent différentes applications :

- La multiplication rapide, cette dernière est due à l'augmentation de diffusion cellulaire par ces techniques **(Smith et al., 1985 ; Collet et Lé, 1988)**.
- Micropropagation d'un grand nombre d'espèces ornementales ou comestibles, Lorsque ces méthodes sont plus bénéfiques que les méthodes traditionnelles **(Margará, 1989 ; George, 2008 ; Bouterin et Bron, 2013)**.
- En particulier les cultures contaminées par des virus, en raison d'utilisations potentielles de l'échantillonnage du méristème et des procédures d'hyperthermie. Ces méthodes peuvent ensuite être appliquées dans le cas d'une mise à jour de la flotte Plantes mères saines **(Gaveau et D'erreur, 1988)**.
- Méthodes et outils pour la recherche fondamentale (différenciation, morphogenèse, effets des régulateurs de croissance, validation fonction des gènes, etc.) **(Duhoux, 1988)**.
- Création de variétés à travers de multiples techniques et objectifs :
 - Par haploïdisation, y compris l'obtention d'individus doublement haploïde à partir des cellules germinales. Le but est de l'avoir rapidement les variétés homozygotes permis un cycle accéléré de sélection variétale, où plusieurs années sont généralement nécessaires **(Pelletier, 1988)**.
 - Fécondation *in vitro*, permettant d'obtenir des hybrides inaccessibles peut être produit par les voies habituelles grâce à la suppression des barrières incompatibilité de fertilisation naturelle entre espèces, genres ou familles différent **(Duhoux, 1988)**.
 - Par le sauvetage d'embryons, y compris le prélèvement précoce d'embryons, Il est ensuite cultivé *in vitro*, soit pour accélérer le cycle de croissance des plantes, soit parce que par exemple, il ne peut pas se développer dans les tissus maternels Lorsqu'il est produit par hybridation interspécifique **(Monnier, 1988)**.

- Préserver la diversité naturelle par le stockage et la congélation Matériel végétal sous forme de suspensions cellulaires, de protoplastes ou de cals. Certaines espèces peuvent présenter des résistances ou des traits intéressants, et considéré comme un dépositaire de gènes indispensables. Méthodes la cryoconservation peut donc s'avérer indispensable, notamment pour les non- ne produit pas de graines viables (hybrides stériles) ou ses graines ont une durée de vie limitée (palmier à huile, cocotier, etc.) **(Gaveau, 1988)**.

I.3.5.11. Inconvénients :

Cependant, ces méthodes peuvent également présenter un certain nombre d'inconvénients **(Margara, 1989 ; George, 2008 ; Bouterin et Bron, 2013) :**

- Ces méthodes nécessitent une installation de production spécialisée et coûteuse (pour la production de milieux stériles, le repiquage en conditions sécurisées, la croissance en chambres de cultures artificielles, etc.).
- L'exigence d'une main d'œuvre qualifiée pour les repiquages axéniques et pour la récolte **(DEA, 1991)**.



PARTIE

EXPERIMENTALE

Chapitre II

MATERIEL

ET METHODES

Chapitre II. Matériels et méthodes :

II.1. I- Partie pratique au laboratoire :

II.1.1. La culture *in vitro* :

II.1.1.1. Préparation des solutions mères du milieu Murashige et Skoog (1962) :

A. Matériel végétal :

La plantes sur laquelle nous avons travaillé est :

Mentha pulegium (menthe pouliot) à l'origine de pépinière EPIC Msila-Vert, la région d'Ouled Bdaira de Msila, la récolte a été faite au début de mars 2022, manuellement sous forme rameaux comportent des nœuds pour prendre des microboutures.

B. Composition du milieu MS :

Tableau 5- Constituants du milieu MS (Murashige et Skoog, 1962).

	Ingrédients	Solution mère mg/l	Volume de prélèvement	Solution finale mg/l
Macro-éléments	• NH ₄ NO ₃	33 000	50ml	1650
	• KNO ₃	38 000		1900
	• CaCl ₂ .2H ₂ O	6 600		440
	• MgSO ₄ .7H ₂ O	7 400		370
	• KH ₂ PO ₄	3 400		170
Micro-éléments	• MnSO ₄ .H ₂ O	2 230	10ml	22.3
	• ZnSO ₄ .7H ₂ O	860		8.6
	• H ₃ BO ₃	620		6.2
	• KI	83		0.83
	• Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	25		0.25
	• CuSO ₄ .5H ₂ O	2,5		0.025
	• CoCl ₂ .6H ₂ O	2,5		0.025
Fe-EDTA	• Na ₂ -EDTA	3 730	10ml	37.3
	• FeSO ₄ .7H ₂ O	2 780		27.8
Vitamines et Acides aminés	• Acide Nicotinique	50	10 ml	0.5
	• Pyridoxine-HCl	50		0.5
	• Thiamine-HCl	10		0.1
	• Glycine	200		2.0
Sucre	• Saccharose	30000mg/l		30000mg
	• Myo-Inositol	100mg/l		100mg
Agar	Agar	8g/l		8g

II.1.1.1.1 Préparation de la solution mère de macro-éléments : (MS) 20 X elle consiste à :

- Verser 600 ml d'eau distillée dans un bécher de 1L.
- Peser et dissoudre chacun des sels indiqués en chauffant légèrement au besoin.
- Transférer la solution dans un flacon de 1 litre et compléter à 1 litre avec l'eau distillée.
- Identifier le flacon puis le ranger au réfrigérateur.

II.1.1.1.2 Préparation de la solution mère de micro-éléments : (MS) 100 X la préparation de la solution mère consiste à :

- Verser 600 ml d'eau distillée dans un bécher de 1L.
- Peser et dissoudre chacun des sels indiqués (B) en chauffant légèrement au besoin.
- Transférer la solution dans un flacon de 1 litre et compléter à 1 litre avec l'eau distillée.
- Identifier le flacon puis le ranger au réfrigérateur.

II.1.1.1.3 Préparation de la solution mère de Fe-EDTA : (MS) 100X elle consiste à :

- Verser 600 ml d'eau distillée dans un bécher de 1L.
- Ajouter le Na₂ EDTA et mélanger jusqu'à dissolution.
- Ajouter FeSO₄·7H₂O.
- Transférer la solution dans un flacon de 1 litre et compléter à 1 litre avec l'eau distillée.
- Identifier le flacon puis le ranger au réfrigérateur.

II.1.1.1.4 Préparation de la solution mère des vitamines : (MS) 10 X la préparation de la solution mère consiste à :

- Verser 600ml d'eau distillée dans un bécher de 100ml.
- Peser et dissoudre les vitamines indiquées (D).
- Transférer la solution dans un flacon de 1 Litre et compléter à 1 litre avec l'eau distillée.
- Identifier le flacon puis le ranger au réfrigérateur.

II.1.1.2. Préparation du milieu de culture :

Pour préparer un litre de milieu de culture MS (Murashige et Skoog, 1962), les quantités prélevées de chaque solution mère sont égales à :

- Verser 600 ml d'eau dans un bécher de 1 litre, L'eau utilisée doit avoir été déminéralisée et distillée.
- Agiter un à la fois, les composés (mis à part le sucre et l'agar) sont ajoutés à l'eau dans l'ordre macro-micro-fer-vitamines, (NE PAS CHAUFFER).
 - 50 ml de Macro-éléments (concentrés 20 fois)
 - 10 ml de Micro-éléments (concentrés 100 fois)
 - 10 ml de Fer – EDTA (concentré 100 fois)
 - 10 ml de Vitamines (concentré 100 fois)
 - 0.1 g de Myo-inositol
 - 30 g de Saccharose (en chauffant légèrement au besoin)
- Compléter à 1 litre avec l'eau distillée
- Le pH est vitrifié par un pH-mètre et ajusté entre 5,6 et 5,8 (intervalle dans lequel l'agar peut se gélifier) en utilisant une base NaOH (0,1 N) ou un acide HCl (0,1 N) tout en agitant la solution.
- Après fixation du pH, on ajoute 8 gr d'agar et le tout est porté à ébullition sur une plaque chauffante pour dissoudre l'agar. (Jusqu'à ce que le milieu devienne clair)
- Après dissolution totale de l'agar, le milieu est versé dans des flacons verre (préalablement lavés et desséchés dans l'étuve à 180 °C).
- Après la stérilisation de milieu de culture par l'autoclave, transférer le milieu dans des petits flacons environ 30ml dans une chaque flacon.

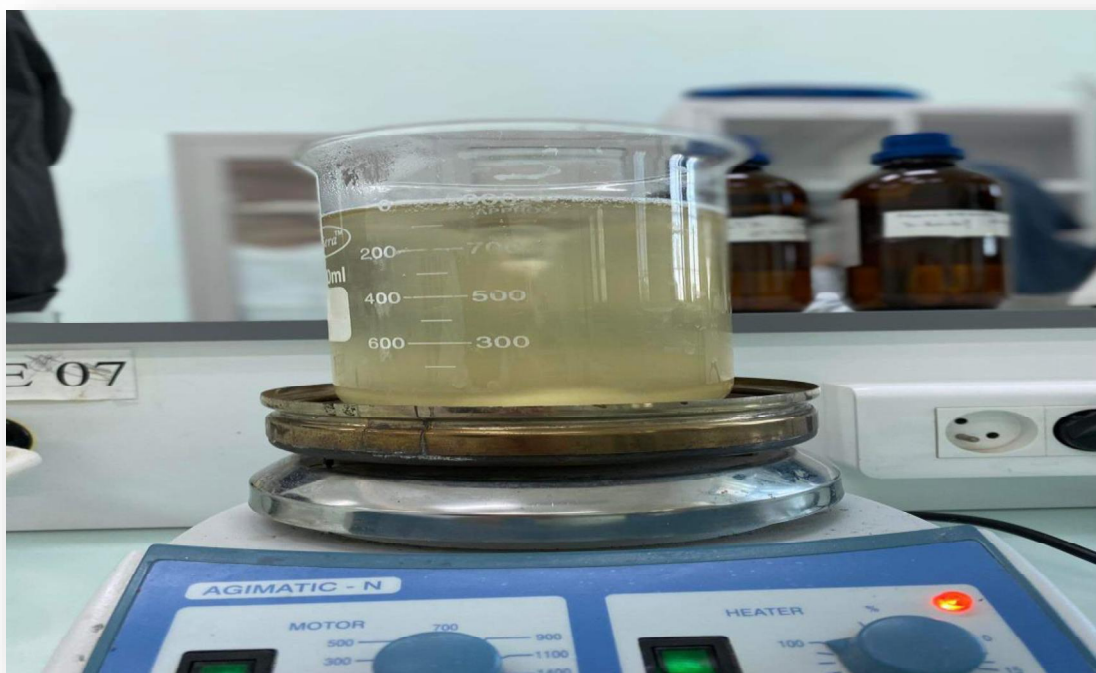


Figure 11- Milieu de culture MS (source original).

II.1.1.3. Stérilisation de la zone de travail et désinfection matériel utilisé :

- Nettoyage de la hotte et de son entourage avec de l'eau de javel (12°), puis avec de l'éthanol (99°),
- Allumage de la hotte avec UV, au moins une demi-heure avant chaque manipulation.
- Les instruments de travail (scalpels et pinces) qui sont ainsi stérilisés par étuvage pendant 30 min, sont trempés dans l'éthanol 99° puis flambés pendant toute la durée des expériences.
- Placé et allumé 2 becs benzène (stérilisateur) au centre de la zone désinfectée (sous la hotte). 20 minutes avant les expériences ont commencé
- Déposer tout le matériel stérile autour du bec Bunsen. (Les petits flacons contenant le milieu de culture, et autres pissette contient l'eau distillée, pinces, scalpel, etc...).
- Se laver les mains et les avant-bras au savon.

II.1.1.4. Mise en culture :

II.1.1.4.1 Matériel végétal :

Les rameaux de *Mentha pulegium*, utilisés dans le présent travail, sont âgés d'un mois et demi (2 à 4 mm de diamètre) et sont tous issus d'un même pied-mère maintenu en culture en serre à $25^{\circ}\text{C} \pm 2$.

II.1.1.4.2 Désinfection et préparation des explants :

Les rameaux sont effeuillés, désinfectés dans un bain d'alcool (70 %, 2 min), suivi d'un traitement par une solution d'hypochlorite de sodium à 10 %, pendant 10 min. Ils sont ensuite rincés par passages successifs dans trois baigns d'eau distillée stérilisée pendant 3 min à chaque fois. Les rameaux sont fragmentés en boutures de 3 à 4 cm portant un seul nœud chacune.

Les boutures sont ensuite placées sur un milieu de culture MS. Les cultures sont placées ensuite à l'obscurité à $25 \pm 2^{\circ}\text{C}$ pendant une semaine, transférée à la lumière sous une photopériode de 16h (tubes fluorescents lumière du jour, 40 W, 3000 LUX).



Figure 12- Mise en culture des microbouturages sur milieu MS (source original).

II.1.2. Test de germination :**A. Matériel végétal :**

Les semences utilisées dans nos tests sont des graines proviennent des herboristes de Msila en mars 2022, Elles ont été conservées dans des boîtes pétris, munis d'une étiquette avec le nom de l'espèce.

Les semences de :

- a. *Cuminum cyminum* (cumin).
- b. *Ocimum basilicum* (basilic).
- c. *Pimpinella anisum* (anisvert)

II.1.2.1. Stérilisation :

Tous les instruments métalliques (pinces, embouts, scalpels, etc.) ou verrerie (béchers, tubes de culture, boîtes de pétri, etc.) sont recouverts d'une feuille d'aluminium et placés dans une étuve à 170°C, 200°C pendant 2 heures.

Pendant le fonctionnement, l'instrument métallique est immergé dans de l'alcool à 70%, qui est ensuite passé dans la flamme d'une buse de benzène pour brûler l'alcool. L'opération est réalisée sous une hotte à flux laminaire horizontal. Nettoyez la hotte aspirante avec de l'alcool à 70° et désinfectez avec la lampe UV située sur le dessus de la hotte aspirante.

Stériliser les graines en les trempant dans de l'éthanol à 70 % pendant 70 s, puis les transférer dans une solution d'hypochlorite de sodium à 6 % (NaO Cl) pendant 15 min, suivi de 3 rinçages consécutifs avec de l'eau distillée stérile pendant 10 min chacun. Les graines ont été semées dans des boîtes de pétri dans de l'eau distillée stérile.

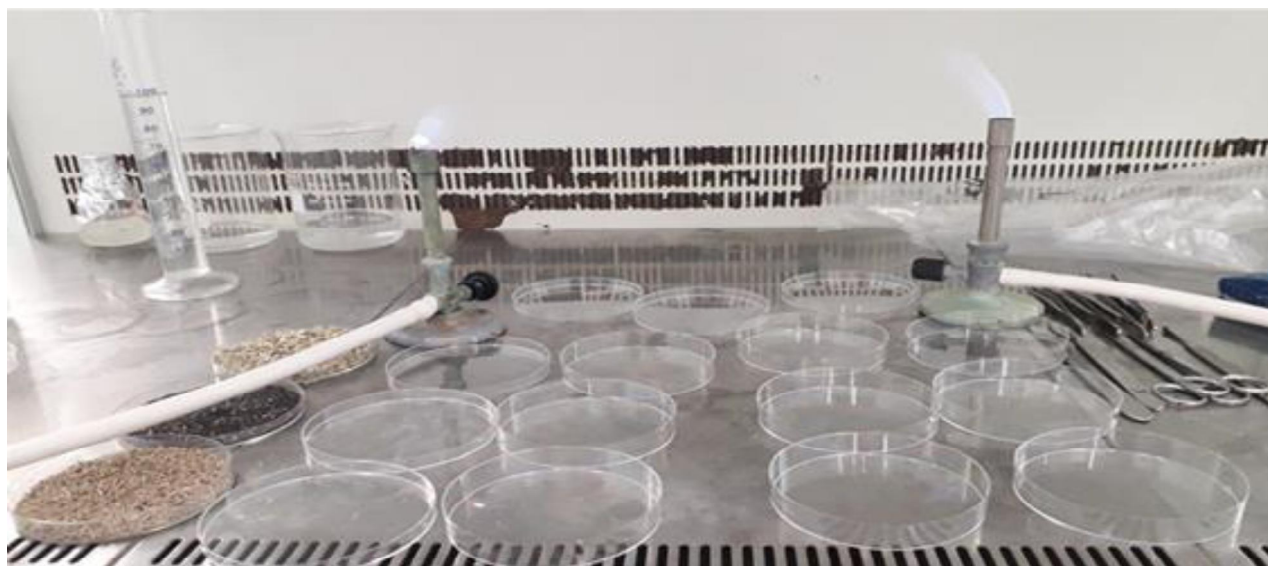


Figure 13- Organisation de zone de travail (Source original).

II.1.2.2. Prétraitement des graines :

Afin de comprendre l'aptitude germinative des graines des espèces étudiées présentent un certain degré de dormance, et si un prétraitement des graines peut influencer ou améliorer les aptitudes germinatives, nous leurs avons fait subir quatre prétraitements :

- Un lot de graines est mis à germer directement sans trempage (sans traitements).
- Le second lot de graines est mis à imbiber dans l'eau distillé pendant une heure à température ambiante.
- Le troisième lot séjourne pendant 24h dans l'eau distillé à température ambiante.
- Un quatrième traitement chimique pour les graines a été assuré par un trempage dans une solution concentrée d'acide sulfurique H_2SO_4 pendant 5 minutes.
- Les graines sont ainsi rincées abondamment à l'eau distillée stérile.

Suite à cette opération, les graines sont mises à germer dans des boites de pétri tapissées de papier imbibé d'eau distillé à raison de 15 à 80 graines par boite selon la taille des graines.

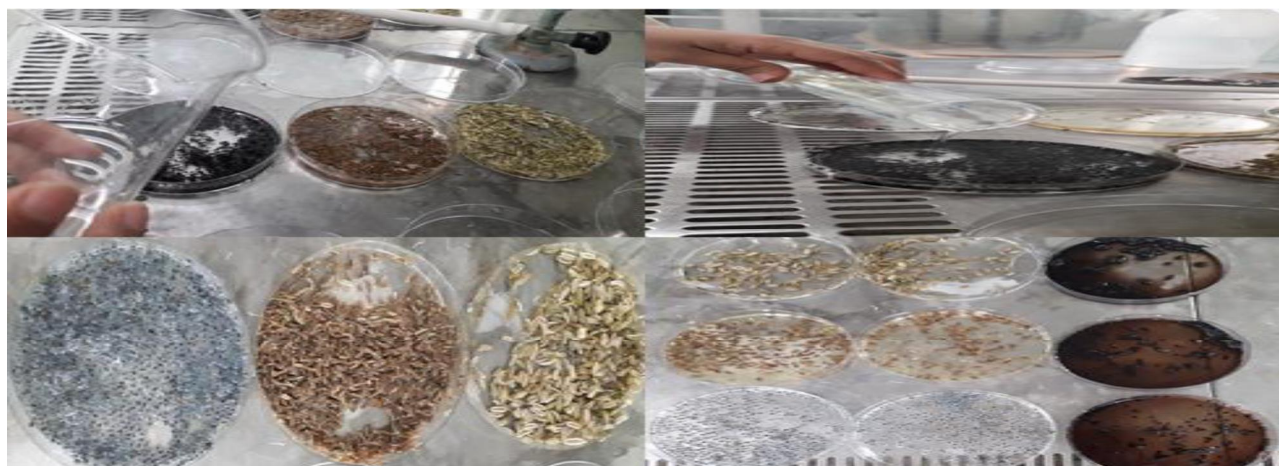


Figure 14- Prétraitement des graines : 1h, 24h, H₂SO₄ (source original).

II.1.2.3. Mise en culture des graines

- Disposer une ou deux couches de papier buvard au fond des boites de pétri.
- Humidifier avec un vaporisateur ou une pipette. Attention de ne pas le détremper ! Lorsqu'on le retourne, l'eau ne doit pas s'écouler, sous risque de pourriture des semences. (A partir du moment où il y a un milieu saturé en humidité, il y a risque de pourriture).
- Placer les graines à tester, dans des boites de Pétri, de 90 mm de diamètre, tapissées d'une double couche de papier absorbant imbibé de 20 ml d'eau distillée. Elles ne doivent pas se toucher (espace de trois fois la taille de la graine au minimum).
- Les boites sont déposées dans un incubateur réglé à (25°C± 2°C) de température (**Ben Khaled et al, 2003**).
- Hydrater le papier absorbant tous les deux jours environ (quand le papier commence à se dessécher) en prenant soin de ne pas le détremper.
- On considère qu'une semence a germé lorsque la radicule perce le tégument (**Come, 1970 et Baoji et al, 1998**)

II.2. Partie pratique dans la serre :

II.2.1. Semis :

A. Matériels végétaux :

Les semences utilisées dans nos tests sont des graines qui proviennent des herboristes de Msila en mars 2022, Elles ont été conservées dans des boîtes pétris, munis d'une étiquette avec le nom de l'espèce.

Les semences de :

- a. *Cuminum cyminum* (cumin).
- b. *Ocimum basilicum* (basilic).
- c. *Pimpinella anisum* (anisvert).

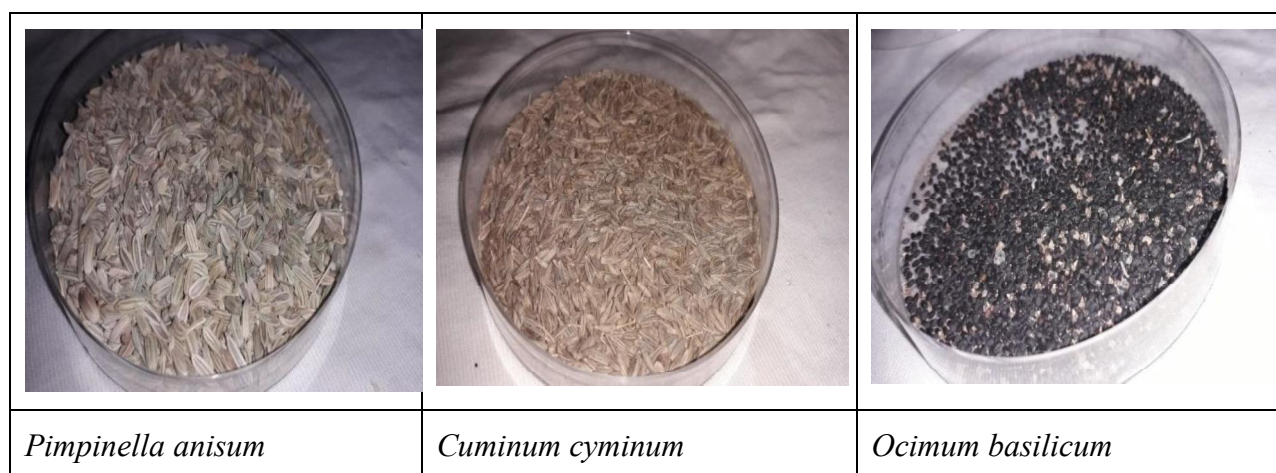


Figure 15- Semences des espèces étudiées (source original).

B. Technique :

- Dans un plateau d'alvéole remplir leurs trous par terreau.
- On dépose quelques graines dans chaque trou puis on les recouvre de terre bien tassée (la même méthode dans les 3 espèces).
- Puis l'arrosage par l'eau pour garder le semi-humide.

C. Mesures et notation effectuées

Lors de la lecture des tests (Germination dans la serre, germination en boîtes pétri), il faut compter séparément :

□ **Les graines germées** (représente le **taux de germination** durant 30 jours). D'après **Come (1968)**, le taux de germination représente le pourcentage de semences capables de germer dans les conditions de l'expérimentation, Il est exprimé par le rapport nombre de graines germées sur le nombre total de graines semées.

Équation 1- Taux de germination.

$$\text{Taux de germination} = \frac{\text{nombre des graines germées}}{\text{nombre total mis en germination}} \times 100$$

- Vitesse de germination : nous avons représenté le nombre des graines germées chaque jour.
- Période de germination : l'intervalle de temps enregistré entre la semaine de semis des graines et la fin de la germination.

On mesure les paramètres de croissance pour les graines germées dans la serre : longueur de tiges, racines et le nombre de feuilles.

D. Analyses statistiques

Les résultats et présentations ont été réalisés à l'aide du logiciel Excel 2007.

Les résultats de germination sont présentés sous formes graphiques montrant le taux et la vitesse de germination en fonction du temps.

II.2.2. Bouturage :

A. Outils et produit :

- Plateau d'alvéole.
- Terreau.
- Vaporisateur d'eau
- Sécheur

B. Matériel végétal :

Les plantes sur laquelle nous avons travaillé est :

M. pulegium (Menthe pouliot). Leur origine c'est la pépinière EPIC Msila-Vert, la région de ouled bdaira de Msila, la récolte a été faite au début de mars 2022 (issues de jeunes plants), manuellement sous forme rameaux pour prendre des boutures.

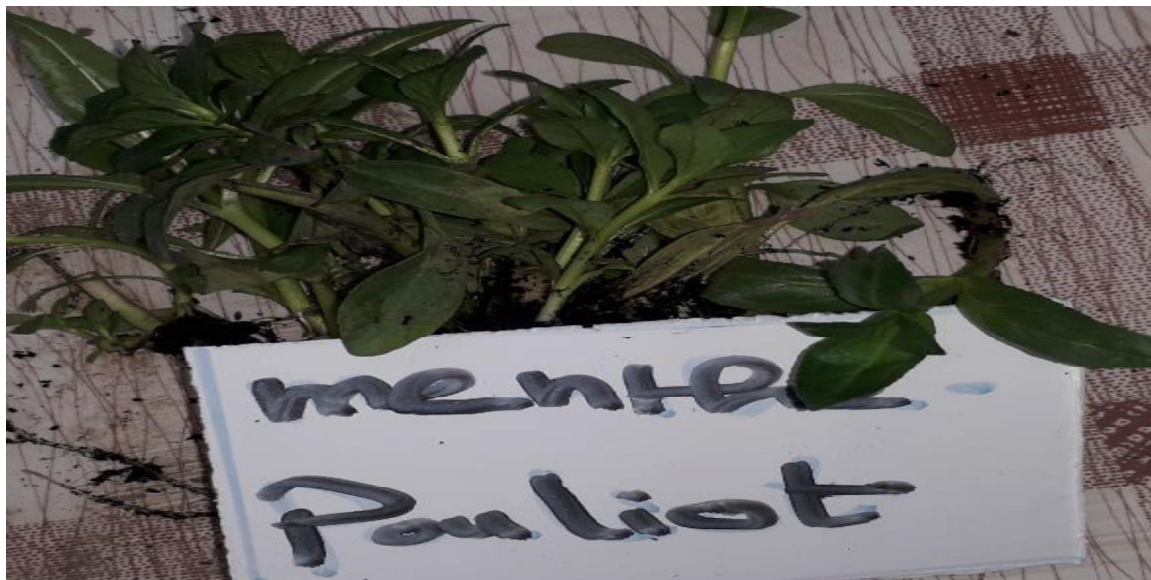


Figure 16- *Mentha pulegium* récoltée au début de mars 2022(source original).

C. Technique générale :

- Choisir un rameau bien aoûté
- Chaque bouture a une 6 à 8 de centimètres de long.
- Une coupure nette (en biseau Afin d'éviter la pourriture causée par l'accumulation d'eau) est faite au Sommet de la bouture, immédiatement au-dessus d'un nœud, et une autre à sa base, au-dessous d'un nœud.
- On coupe presque toutes les feuilles au ras de la tige en laissant une ou deux au sommet pour tirer la sève.
- Si les feuilles sont grandes, on en coupera la moitié pour éviter une évaporation excessive.
- On enfonce les boutures à moitié de leur longueur dans un terreau déjà bien préparé dans un plateau d'alvéole.
- Les boutures doivent être solidement enfoncées, en général, verticalement de façon que leur base soit partout en contact avec le sol.
- Puis l'arrosage par l'eau pour garder l'humidité.

D. Mesures et notation effectuées pour culture in vitro et bouturage

Au cours de cette étude, nous avons évalué les paramètres de croissance (les vitroplants micropropagés et les boutures) il faut compter séparément.

Paramètres de suivi :

- longueur des racines.
- longueur des tiges.
- nombre de racines.
- nombre de feuilles.
- nombre de nœuds.

E. Analyses statistiques

Les résultats et présentations ont été réalisés à l'aide du logiciel Excel 2007.

Les résultats de germination sont présentés sous formes graphiques montrant les paramètres de croissance en fonction du temps.



Chapitre III :
RESULTATS
ET
DISCUSSION

Chapitre III. Résultats et discussion

III.1. Germination dans le sol:

Les essais sur la germination et la croissance ont été conduits sur 3 espèces (*Cuminum cyminum*, *Ocimum basilicum*, *Pimpinella anisum*) en pépinière.

L'objectif de l'étude était de déterminer le taux de germination et la vitesse de croissance dans 6 semaines.

III.1.1. Taux de germination :

La figure 17 présente les taux moyens de germination pour les 3 espèces :

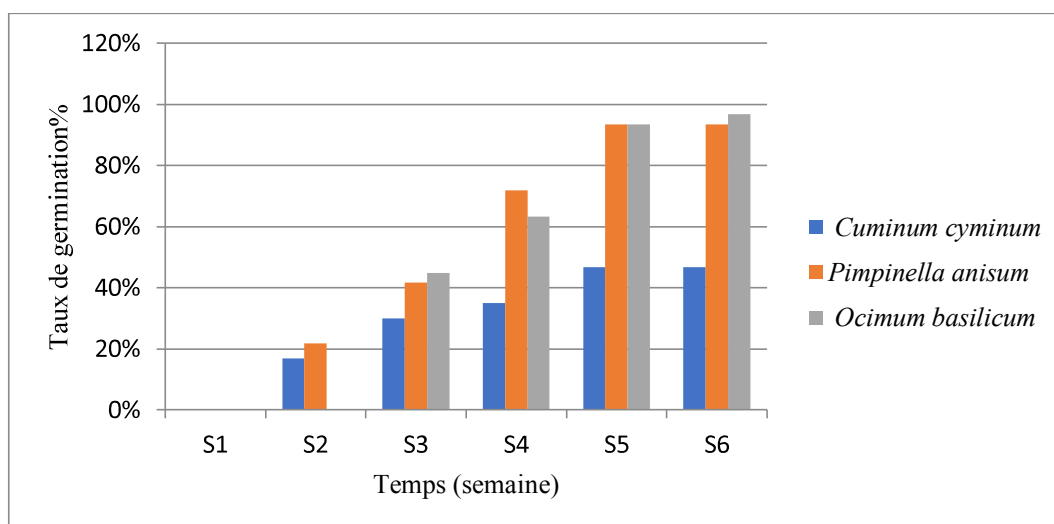


Figure 17- Taux de germination des graines dans la serre pour les 3 espèces.

Selon les 3 espèces, un taux de germination de 47-100% a été obtenu pour une durée de germination de 2 à 6 S.

Les graines qui ont répondu positivement, ont germés et poussés au minimum après un temps des 8 jours et au maximum après 42 jours.

Les espèces *O. basilicum* et *P. anisum* ont données les meilleurs taux de germination avec les durées d'attente et de germination les plus courtes avec des taux de germination élevé respectivement 97%, 93%. Par contre les taux de germination de *C. cyminum* est de 47%.

Ainsi *O. basilicum* et *P. anisum* ont donnés un taux de germination supérieur ou égal à 90% en pépinière. Cette performance pourrait s'expliquer probablement par l'état sanitaire des graines semées.

III.1.2. Vitesse de germination:

C. cyminum et *P. anisum* ont enregistré une germination moyenne et sensiblement identique tandis que *O. basilicum* n'a montré aucune germination au cours des 2 premières semaines.

La **figure 18** a montré l'accélération des courbes de vitesse de germination pour les 3 espèces, à partir de la 3^{ème} semaine, les courbes pour l'*O. basilicum* et *P. anisum* sensiblement homogènes avec des valeurs supérieures à 55 Gg / 60 G, tandis que le *C. cyminum* a enregistré une valeur inférieure à 30 Gg/60 G.

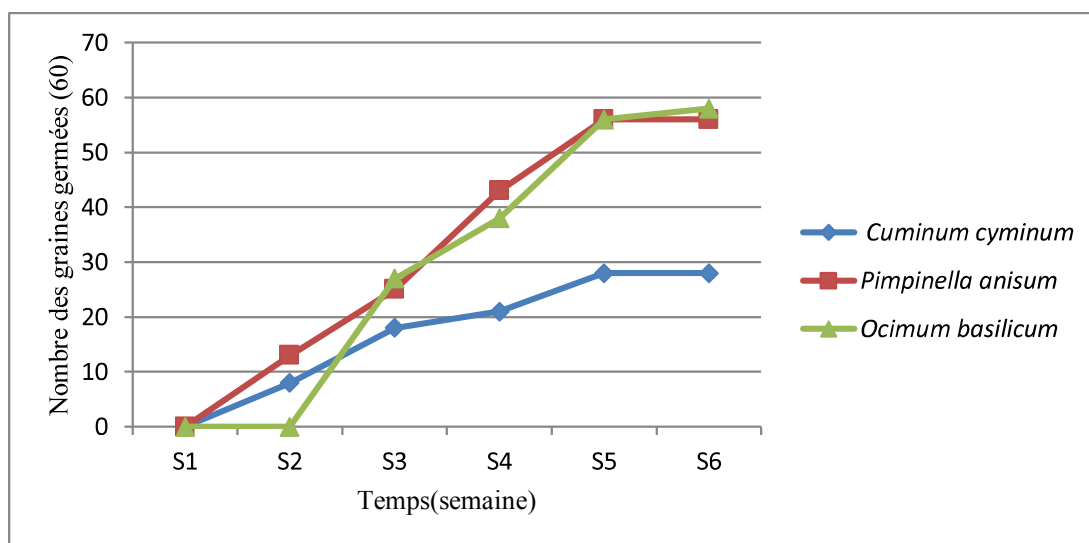


Figure 18- Vitesse de germination des graines des espèces étudiées dans la serre.

III.1.3. Paramètres de croissance :

L'espèce de *P. anisum* :

Les valeurs les plus élevées de ces paramètres sont notées sur cette espèce. En effet, on déduit de la **figure 19** que la longueur de tiges et de racines a augmenté progressivement au cours de 6 semaines avec moyenne de 11.5 cm et 3.7 cm respectivement.

Le nombre des feuilles des plants n'a pas varié après la germination jusqu'à la 4^{ème} semaine, où il commence à augmenter progressivement pour atteindre la moyenne de 7.

L'espèce de *C. cyminum* :

Il ressort de l'analyse du **figure 19** qu'en ce qui concerne la longueur de tiges et de racines des plants, on note l'accroissement graduellement à partir la 2^{ème} jusqu'à la 6^{ème} semaine avec longueur moyenne de : 4.25 et 1.75 respectivement.

Dans la 2^{ème} semaine les résultats montrent que le nombre de feuilles dans la valeur 2 et est resté constant jusqu'à la 5 et 6^{ème} semaines qui a vu de moyenne augmentée de 4 à 6.

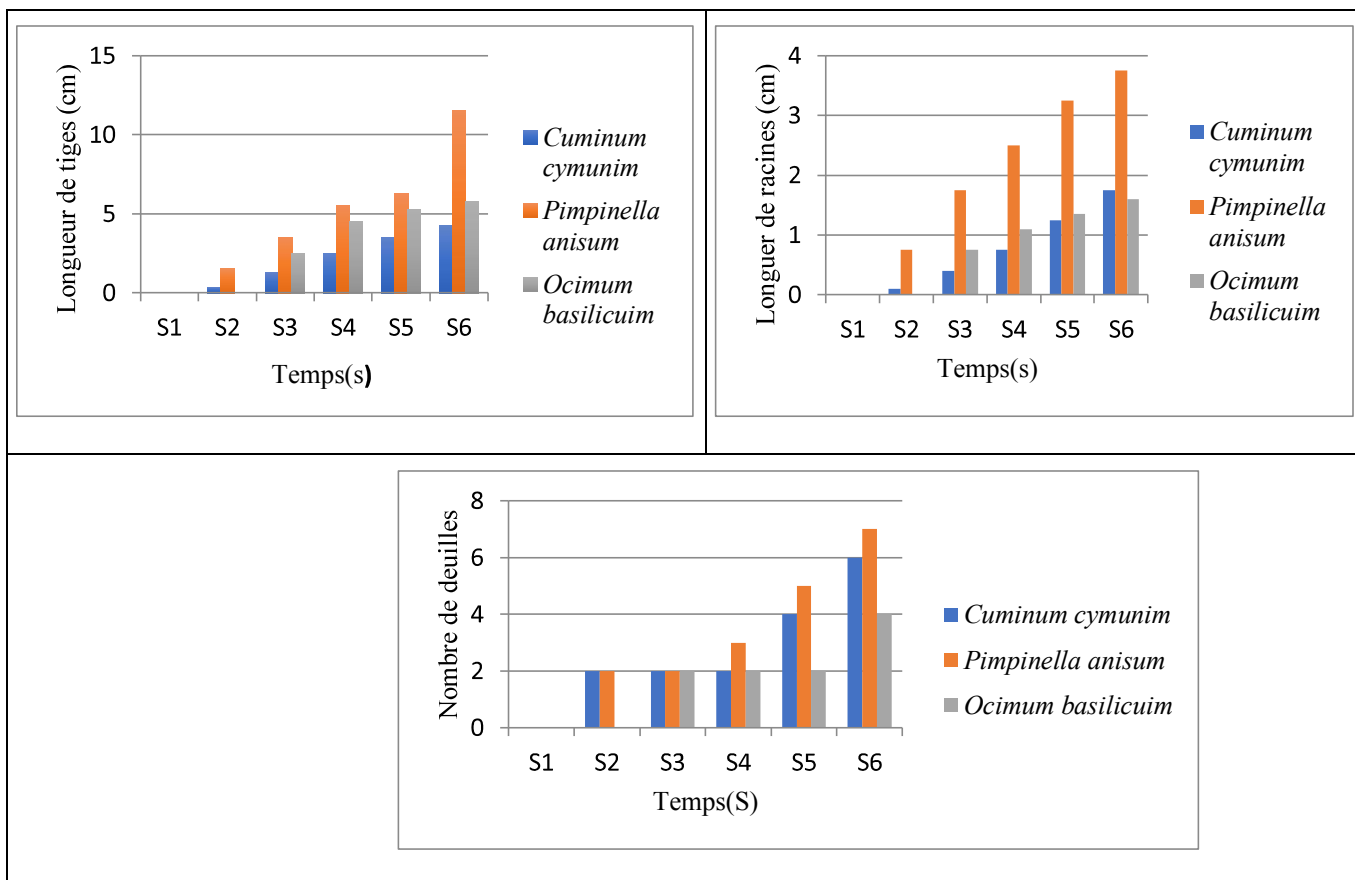


Figure 19- La croissance (Longueur de Tiges, Racines (cm) et le Nombre de Feuilles).

L'espèce d'*O. basilicum* :

On déduit de la **figure 19** que la longueur de tiges et de racines a augmentée progressivement à partir la 3^{ème} semaine avec moyenne respectivement de 5.75 cm et 1.6 cm.

Le nombre de feuilles des plantes n'a pas varié après la germination jusqu'à la sixième semaine, où il a atteint la moyenne de 4.

Les plus fortes productions en feuilles, racines et tiges sont significativement notées verser à l'espèce *P. anisum* après la 2^{ème} S de germination, suivi par l'espèce *C. cymunim* et l'espèce *O. basilicum*.

Ce résultat est dû à la taille et le stade de dormance des graines, conformément à nos observations et à celles faites par **Boh Nestor et al., (2019)** : « les grosses graines germent plus vite que les moyennes et les petites. Ainsi, les meilleures valeurs de la date de germination et de la vitesse de germination ont été obtenues dans grosse graine ».

Il est fréquent que des semences, placées dans de bonnes conditions de germination, ne germent pas ou lentement. On parle communément de dormance (Lang *et al.*, 1987, Makhloufi, 1999).

III.2. Germination des graines dans les boîtes pétries :

Les traitements destinés à lever la dormance sont appelés prétraitement. Ils sont généralement appliqués avant le semis, selon cette nouvelle stratégie est très intéressante car elle permet de germer les graines on même temps et pour accélérer la germination.

III.2.1. Taux de germination :

L'objectif de cette étape est de définir l'effet du traitement et de génotype sur la réponse des graines des espèces étudiées à la germination. Les résultats de la comparaison des taux de germination des graines pour les quatre traitements sont présentés dans la **figure 20**.

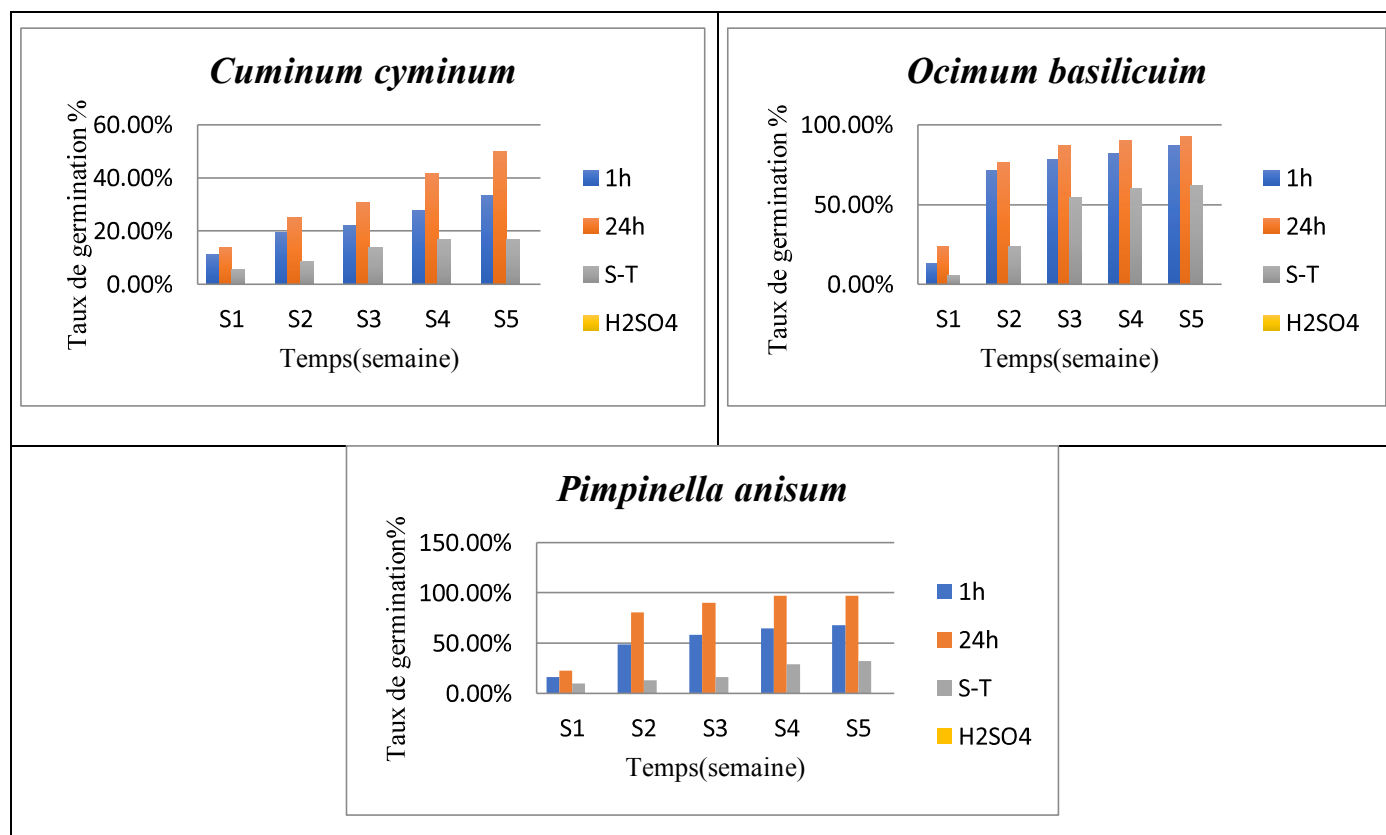


Figure 20- Taux de germination des graines dans laboratoire pour les 3 espèces.





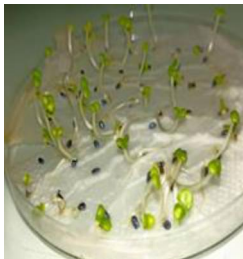



La comparaison entre les 4 traitements et 3 espèces a révélé une différence pour la germination d'*O. basilicum* qui montre le plus grand taux de germination des graines et cela sans traitement préliminaire des graines (S-T), avec un taux plus de 60 % par rapport aux autres espèces tel que le taux de *P. anisum* qui était plus de 30% et 15% pour *C. cyminum*.

Pour le traitement préliminaire avec le trempage dans l'eau pendant 24 heures (**24h**), les graines des espèces *O. basilicum* et *P. anisum* ont montré des taux très élevés plus de 90% Par rapport au taux de germination de *C. cyminum* (50%).

En ce qui concerne le traitement : trempage des graines dans l'eau pendant 1 heure (**1h**), l'espèce d'*O. basilicum* réapparaître donner un taux élevé (87%) que les autres espèces : *P. anisum* (67%) et *C. cyminum* (33%).

Le traitement avec le trempage dans l'acide sulfurique(H_2SO_4). On ne remarque aucune germination dans les 3 espèces.

Tableau 6- germination des graines dans les boîtes pétries après 3 semaines.

	Sans traitement (S-T)	Traitement dans l'eau (24h)	Traitement dans l'eau (1h)	Traitement dans l' H_2SO_4
<i>Cuminum cyminum</i>				
<i>Ocimum basilicum</i>				
<i>Pimpinella anisum</i>				

III.2.2. Vitesse de germination

La vitesse de germination calculée pour les quatre traitements (témoin, Traitement dans l'eau (24 h/1h), et par l'acide sulfurique H_2SO_4), nous a permis de tracer les courbes de la vitesse de germination en fonction de temps.

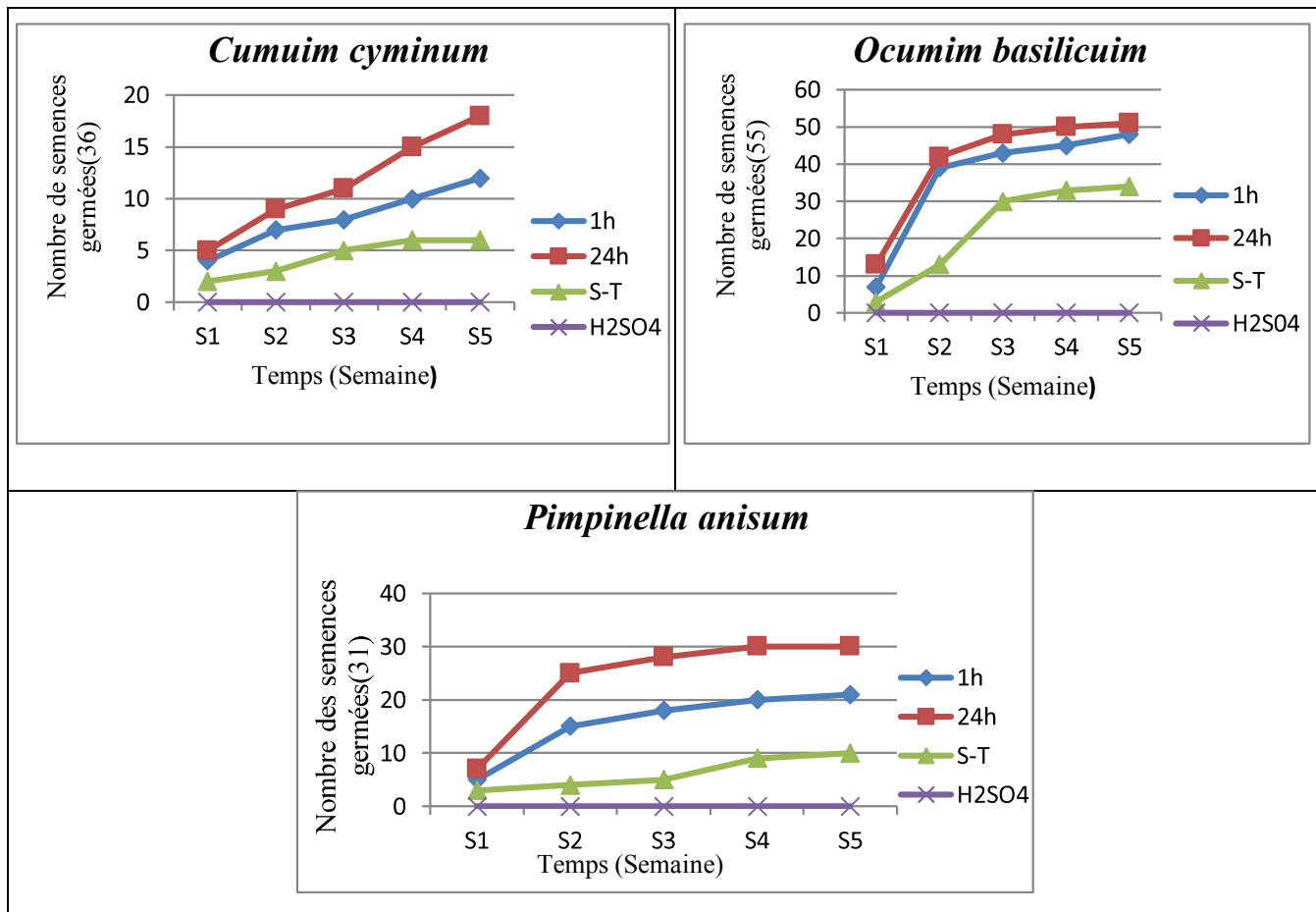


Figure 21- Vitesse de germination des graines des espèces étudiées dans laboratoire.

D'après la **figure 21**, la germination des graines d'*O. basilicum* sans traitements (S-T) se manifeste durant la 1^{ère} S de semis avec une vitesse de 3Gg/semaine et augmentée progressivement jusqu'à atteindre 34Gg/S dans la 5^{ème} S, alors que pour *C. cyminum* et *P. anisum*, la germination des graines se manifeste durant la 1^{ème} S et augmente pour atteindre au maximum 10Gg/S au 5^{ème} semaine.

Les résultats obtenus pour la vitesse de germination des graines des espèces étudiées en fonction de temps pour les lots prétraiter avec le traitement dans l'eau pendant 24 heures apparaissent dans la **figure 21**.

Les graines de *P. anisum* germe avec une vitesse de 7Gg/S au 1^{ème} S et augmentent rapidement jusqu'à 28Gg/s au 3^{ème} S, par suite arrivent au 30Gg/s au 4^{ème} S. La même cinétique est enregistrée pour l'espèce *O. basilicum* (S1 : 13 ; S2 : 42 ; S3 : 48 ; S4 : 50 ; S5 : 51). Tandis

que les graines de *C. cyminum* enregistrent une vitesse de 7Gg/s dans le 1^{ère} S qui a augmenté progressivement jusqu'à la cinquième semaine au 18Gg/s.

Les résultats relatifs à la vitesse de la germination des graines des espèces étudiées pour les lots prétraités avec le trempage dans l'eau pendant 1 heure apparaissent dans la **figure 21**. Le traitement des graines de *O. basilicum* par le trempage dans l'eau pendant 1h a donné un nombre de graines germées élevée (7) au 1^{ère} S jusqu'à la quatrième semaine avec 45Gg/semaine, ces taux restent stables jusqu'à la fin de l'essai. La même cinétique était enregistrée pour l'espèce *P. anisum*. Aussi les graines *C. cyminum* présentent une faible vitesse de germination pour les 5 S avec 12Gg/s.

Les résultats relatifs à la vitesse de la germination des graines des espèces étudiées pour les lots prétraités avec le trempage dans H₂SO₄ apparaissent dans la **figure 21**.

Les graines des 3 espèces n'ont présentées aucune germination durant toute la période de l'essai. A partir des résultats obtenus pour les taux de germination élevés de toutes les espèces prétraitées (trempage dans l'eau pendant 24 heures), on peut discuter ce résultat en suivant la définition de la phase d'imbibition par de l'eau selon **Come (1970) et Vertucci (1989)**, correspond à une prise d'eau. Ce processus marque la période où les graines passent d'un état déshydraté à un état hydraté, ce qui entraîne une augmentation de l'activité respiratoire.

Cette performance pourrait s'expliquer par le prétraitement (surtout *O. basilicum*) mais très probablement par le bon état sanitaire des graines semées (Cela signifie que le faible taux de germination des graines de *C. cyminum* est dû à l'état sanitaire des graines).

Ce prétraitement réputé dans l'élimination des inhibitions chimiques tégumentaires et des dormances embryonnaires (**Come, 1982 ; Heller et al., 1990 ; Macheix et al., 2005**). Les travaux de **Neffati et al. (1996)** se rapportant à l'étude de la viabilité des semences de quelques espèces tunisiennes montrent que l'effet de ce prétraitement peut être positif ou négatif selon les espèces.

Selon nos observations et à celles faites par **Amani et al., (2015)** " Les performances de germination expliquées par prétraitement, mais très probablement par bonnes conditions d'hygiène et l'état sanitaire de graines ".

Les 3 espèces démontrent une faculté germinative et une aptitude pour la germination sans traitement préliminaire des graines mais avec différent taux d'une espèce à l'autre.

III.3. Bouturage :

Les essais sur bouturage ont été conduits sur l'espèce *M. pulegium* issus de jeunes plants en pépinière.

Pour chaque bouture, des paramètres ont été mesurés et qui sont : le nombre et la longueur de racines émises par la partie racinaire de la bouture. En outre, le nombre de feuilles, le nombre de nouvelles pousses développées par bouture ainsi que leur longueur ont été déterminées.

Les bourgeons axillaires et les feuilles ont été dénombrés en partant de la base de la tige vers l'extrémité apicale. La hauteur des plants a été prise entre le collet et le bourgeon terminal de la tige. La prise des mesures débute lors du repiquage sur site des plants germés en pépinière. Les mesures ont été effectuées à un intervalle régulier d'une semaine, pendant 5 semaines.

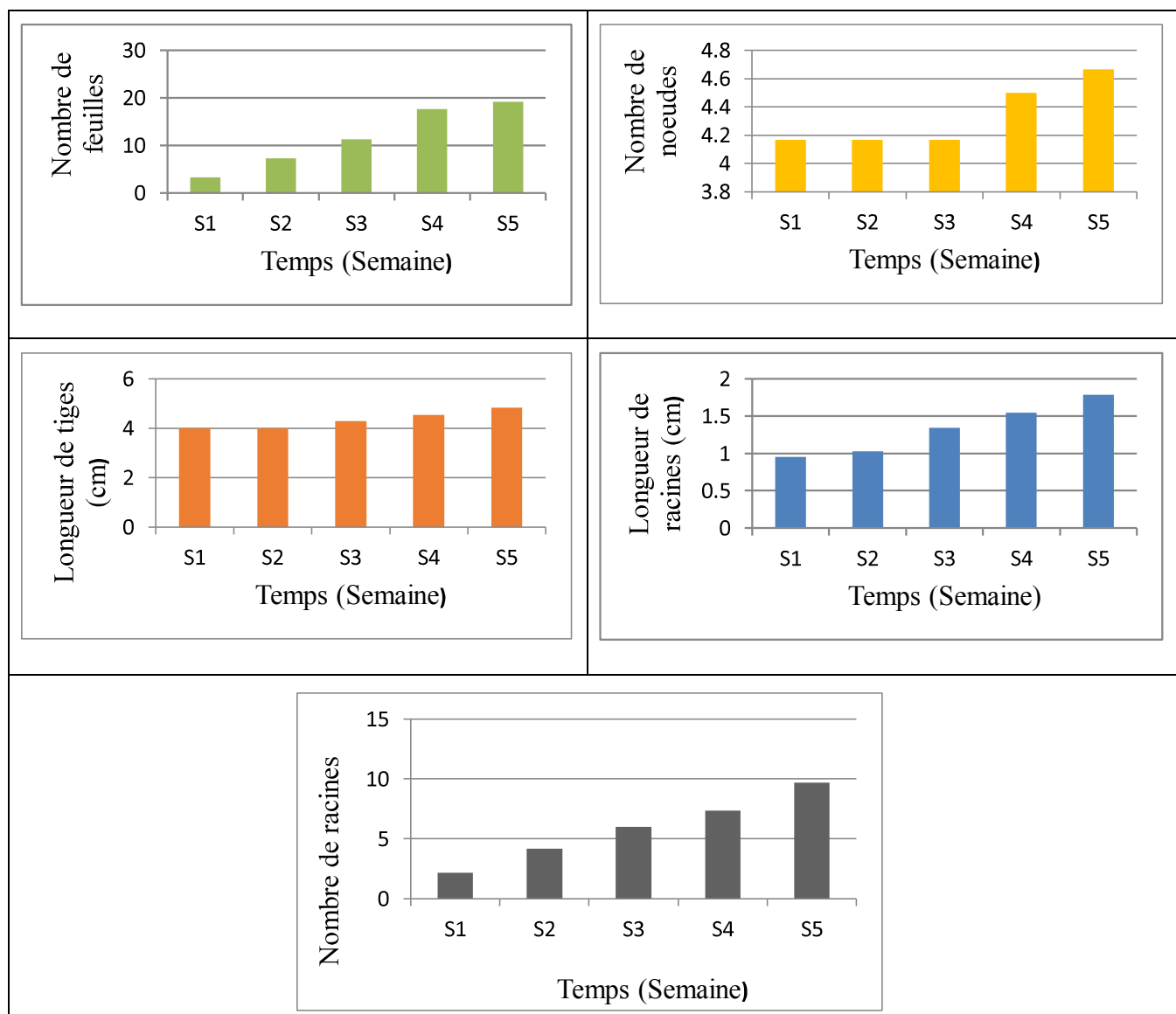


Figure 22- Paramètre de croissance de *Mentha pulegium* sur bouturage.

Comme le montre la **figure 22**, les boutures ont présenté le nombre moyen des racines : 23,43 R avec une longueur de 2,12cm. Concernant le paramètre de nombre de nœuds les boutures ont montré la valeur plus que 1,47 N. La moyenne de longueur de tiges des boutures atteintes 3,02 cm. Les boutures présentent le nombre de feuilles en moyenne de 7 F.

Ces résultats sont similaires avec plusieurs travaux utilisant d'autres espèces selon **Roussel en 1974** pour le bouturage des segments issus de jeunes plants : Le succès relatif du bouturage chez les jeunes plants suggère à priori l'effet de l'âge. En effet, le taux de survie des boutures de segments de jeunes plants traités ou non à l'AIA est supérieur à celui des plantes adultes suggérant ainsi une disponibilité en AIA endogène chez ces jeunes segments. En effet, la synthèse de l'AIA s'effectue dans les organes jeunes.

La faible performance des boutures serait liée à leur âge de prélèvement. En effet, la qualité des boutures est très dépendante du stade de développement qu'elles ont atteint au moment de leur collecte (**Ahanhanzo et al.,2008**).

III.3.1. Culture *in vitro* :

Les essais d'initiation de la culture de *Mentha pulegium* ont été évalués après 5 semaines de culture à travers des observations qui ont porté sur le taux de reprise de la végétation *in vitro* fragment nodal mis en culture sur milieu MS sans hormones.

La méthodologie utilisée pour la stérilisation des explants était très efficace permettant l'établissement de cultures aseptiques avec un taux élevé de prolifération de pousses.

La croissance des vitro pousses a été appréciée par différentes mesures : longueurs de tiges, racines et du nombre de nœuds, de feuilles et de racines. Les 5 paramètres ont été évolués en fonction du temps. Ainsi après 35 jours de culture sur le milieu à base MS, les vitro plants ont atteint :

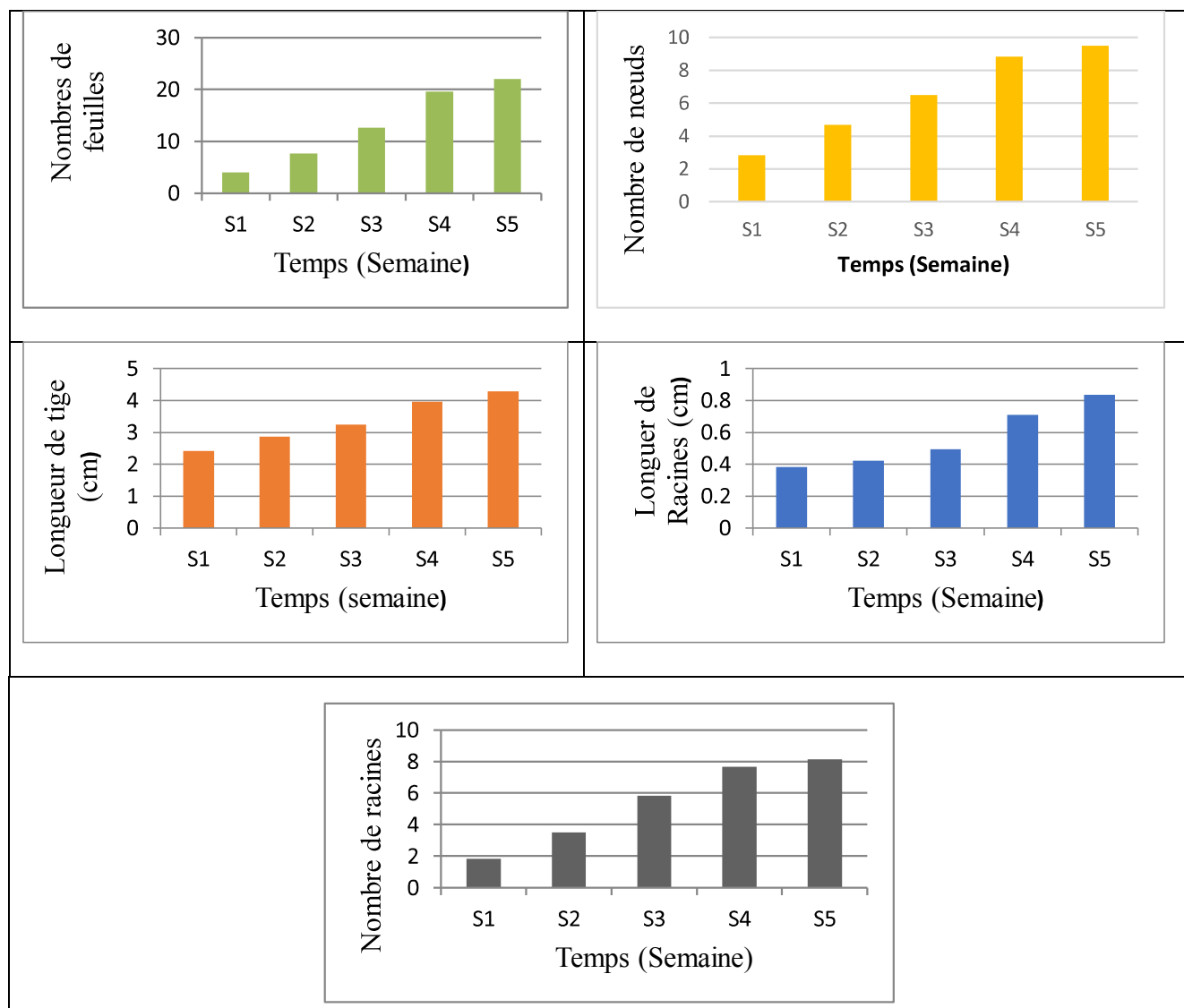


Figure 23- Paramètre de croissance de *Mentha pulegium in vitro*.

Dans cette étude, la première réponse des explants cultivés s'est manifestée par un élargissement initial ou gonflement des bourgeons axillaires préexistant, suivi par leur débourrement et le démarrage des feuilles après environ 7 jours de culture.

Selon les résultats présentés dans la **figure 23**, le comportement des vitro pousses varie en fonction de temps, l'espèce de *M. pulegium* montre la capacité de croissance dans le milieu sans hormone, avec moyenne de formation de 9.5 N. Et 22 F. En parallèle, les tiges : 4,23 cm.

- Pousses courtes avec des nœuds rapprochés.
- Vitro plants courts mal formé.

Ces résultats sont similaires avec plusieurs travaux utilisant d'autres espèces (**Ariket et al., 2004 ; Zezurate et al., 2010**). Ces derniers auteurs ont démontré que les segments nodaux sont plus faciles à multiplier que les bourgeons axillaires, et que le plus grand nombre de pousses ayant une longueur supérieure ou égale à 0,5cm, pour les explants de segment nodal, a été obtenu dans un milieu additionné de 0,25mg/L BA.

Les essais d'enracinement *in vitro* ont abouti à une rhizogenèse chez toutes les pousses mises en culture **figure 23**, le nombre de racines augmente progressivement en fonction de temps, qui atteint 8.16 R par vitroplants d'une longueur moyenne de 0,38 cm.

Dans notre travail, l'enracinement des pousses s'est fait (**Figure 23**). Cette observation est partagée par d'autres travaux (**Jordan et al. 1998 ; Zezurate et al., 2010**), alors que d'autres études ont utilisé des milieux additionnés d'Ana pour augmenter significativement le nombre de racines (**Echeverrigaray et al., 2005**). Notre résultat est important car d'une part, il permet un gain du temps, et d'autre part, il évite l'utilisation d'auxines qui sont connues pour induire la formation de cals et les connexions vasculaires anormales entre les pousses et les racines adventices (**Nemeth, 1986**).



Figure 24- croissance des vitro plants dans un milieu de culture MS pour *M. pulegium*.



Figure 25- Racines des vitroplants dans un milieu de culture MS pour *M. pulegium*.



CONCLUSION

Conclusion :

Nous avons entrepris ce travail expérimental sur la performance germinative des graines des plantes médicinales, dans le but de déterminer le prétraitement adéquate. L'étude effectuée au laboratoire montre un effet des prétraitements sur la germination de des graines des espèces étudiées Les comparaisons permettent de :

O. basilicum a été enregistré un taux de germination élevé (97%) avec un temps de germination lente sur le sol dans les 3 premières S, contrairement chez l'espèce *C. cyminum* montre taux diminue (47%) et temps rapide, tandis que l'Espèces *P. anisum* a été enregistré un meilleur temps de germination avec un taux élevé (96%) à partir de la 2^{ème} S.

Le trempage dans l'eau pendant 24 heure a été montrés les meilleurs résultat de taux (presque homogènes avec le taux de germination dans le sol) et temps de germination dans les 3 espèces sur la 1^{ère} semaine après le traitement, Alors que le trempage dans l'eau pendant 1 heure, a été montrés un taux élevé pour *O. basilicum*, moyenne pour *P. anisum* et faible pour *C. cyminum* . Tandis que le trempage dans l'acide sulfurique aucune résultat dans les 3 espèces.

La présente étude a mis en évidence que le traitement des graines à l'aide l'eau est les plus efficaces pour lever la dormance pour les 3 espèces notamment *O. basilicum*.

L'évaluation des paramètres de croissance, a aussi permis de mettre en évidence l'importance de la teneur en eau par rapport au développement des jeunes plants. Elle a aussi mis en évidence que l'arrosage à jour est la meilleure méthode pour un bon développement des jeunes plants au début de leur développement mais par contre il faut espacer la fréquence irrigation afin de favoriser l'allongement du système racinaire de plantes étudiées en pépinière.

Notre travail aussi a été effectué dans le but de mettre au point une technique de multiplication *ex vitro* et/ou *in vitro* du *M. pulegium* compte tenu de l'importance de ce dernier dans le domaine pharmaceutique. Suite aux essais réalisés dans ce cadre de travail, nous avons pu montrer que la culture *in vitro* s'est avérée plus efficace que celle en conditions *ex vitro*.

La micropropagation du Fliyou (*Mentha pulegium L.*) est possible à partir de microboutures de 2 à 3 cm de longueur portant chacune un nœud, tandis que la longueur de boutures de bouturage de *M. Pulegium* comprise entre 6 à 8 cm avec 3 N au moins.

La multiplication *in vitro* de cette plante sont réalisées sur un milieu de base MS sans hormones qui permet l'obtention de 9,5 N par explants et par mois. Il peut également être obtenu par bouturage sans hormone avec l'obtention de 4,6 N.

L'enracinement des vitro pousses est obtenu après 5 semaines avec formation de 8,16 racines par vitro plant d'une longueur moyenne de 0,38 cm. cependant que les boutures montrent de valeurs supérieures que celle des vitro plants avec longueur 3,77 cm de 9,88 R.

Cette voie de micro propagation du *M. pulegium* permettant une obtention massive de vitro plants à partir des micro boutures pourrait être exploitée dans les programmes de sélection clonale et dans la production de plantes uniformes. Contrairement la technique de bouturage nécessite une quantité énorme de plante mère.



REFERENCES

BIBLIOGRAPHIQUES

Références bibliographiques :

A

- **Amani A., Inoussa M., Guimbo D., Mahamane, Saadou M., et Lykke A.M. (2015)**, Germination et croissance de quatre espèces de Combretaceae en pépinière, TROPICULTURA, vol. 2, PP.135-145.
- **Aid K., Alami I., Benali D., Zemzami M., Mokhtari A. et Soulaymani A. (2003)**, Multiplication massive in vitro de *Mentha pulegium*, Biologie & Santé vol. 3, n° 2, PP.244-251.
- **Al-Snafi A. (2016)**, The pharmacological activities of *Cuminum cyminum*. *iosr Journal Of Pharmacy*. Vol. 6, Issue 6 Version. 2, PP. 46-65.
- **Altman A. (1998)**, Loberant B. Micropropagation. In: Altman A, editor. *Agricultural biotechnology*. New York: Marcel Dekker, Inc. pp. 19–48.
- **Anzala F. (2006)**. Contrôle de la vitesse de germination chez le maïs (*zeamays*) : étude de la voie biosynthèse des acides aminés issus de l'aspartate et recherche de QTLs. Thèse doctorat. Université d'Angers. 148p.
- **Ariket N.A., Jawad F.M., Karam N.S., Shibli R.A., (2004)**. Micropropagation and
- **Askari F., Sefidkon F., Mozafarian V. (2005)**. Essential oil composition of *Pimpinella aurea* D.C. from Iran. *Flavour Fragr. J.*, 20: 115-117.
- **Augé R., Beauchesne G., Boccon-Gibod J., Decourtye L., Digat B., Jalouzot R., Munier R., Morand J-Cl., Reynoird J.P., et Strullu D.G. (1989)**. La culture in vitro et ces applications horticoles. 3ème édition revue. Corrigée et augmentée. Ed. Tec et Doc. Lavoisier 225p.

B

- **Balla J., Kalousek P., Reinöhl V., Friml J., et Procházka S. (2011)**. Competitive canalization of PIN-dependent auxin flow from axillary buds controls pea bud outgrowth. *Plant Journal*, 65(4), 571–577. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2010.04443.x>.
- **Bekhechi C., (2008)**, Analyse des huiles essentielles de quelques espèces aromatiques de la région de Tlemcen par CPG, CPG-SM et RMN 13 C et étude de leur pouvoir antibactérien. Thèse Doctorat. Univ. Tlemcen, 205 p.
- **Bellakhdar J., (1978)**. Médecine traditionnelle et toxicologique Ouest Saharienne, contribution à l'étude de la pharmacopée marocaine. Ed. Technique nord africaines, Rabat.

- **Bellefontaine, R., Meunier, Q., Aboubacar, I. et Le Bouler, H. (2015).** Multiplication végétative à faible coût au profit des paysans et éleveurs des zones tropicales et méditerranéennes. Vertigo - la revue électronique en sciences de l'environnement. [En ligne] sur <http://journals.openedition.org/vertigo/16516>. Consulté le 04 Mai 2019.
- **Bellefontaine, R., Monteuis O., (2002).** Le drageonnage des arbres hors forêt : un moyen pour revégétaliser partiellement les zones arides et semi-arides sahéliennes ? In : Verger M. (coord.). Multiplication végétative des ligneux forestiers, fruitiers et ornementaux. Troisième rencontre du groupe de la Sainte Catherine, Orléans, 22-24 novembre 2000. Cédérom Cirad-Inra. Montpellier, France, Cirad.
- **Benbouali M., (2006).** Valorisation des extraits de plantes aromatiques et médicinales de : *Mentha rotundifolia* et *Thymus vulgaris*, Mémoire de magister, Université Hassiba Ben Bouali, Chlef.
- **Bloch, R. (1941).** Wound healing in higher plants. Bot. Rev. 7, 110–146. doi: 10.1007/BF02872446.
- **Boccon-Gibod J., Jalouzot R., (1989).** Les biotechnologies en horticulture, possibilités et perspectives .In La culture in vitro et ces applications horticoles. Ed J.B. Bailliéte. pp 91-131.
- **Boh N., Ahebe M., Gnigouan G., Affoué S. et Doffou S. (2019).** Influence de la taille des graines sur les paramètres de viabilité et de vigueur de la cucurbité *Citrullus lanatus* (Thunb.) Matsum. & Nakai, UFR Agroforesterie, Université Jean Lorougnon Guède, PP 150.
- **Bouhaddouda N. (2016).** Activités antioxydants et antimicrobienne de deux plantes du sol Local : *Origanum vulgare* et *Mentha pulegium*. Thèse de Doctorat, université Badji Mokhtar, Annaba, 205 p.
- **Boutherid D. et Bron G. (1989).** Multiplication des plantes horticoles. Ed. Tec et Doc. Lavoisier, Paris.212 p.
- **Boutherin B., Bron G.,(2002).** Multiplication des plantes horticoles. Ed : 2 tec et doc. 248 pages.
- **Boutherin D. et Bron G. (1989).** Multiplication des plantes horticoles. Ed. Tec et Doc. Lavoisier, Paris.212 p.
- **Boutherin D. et Bron G. (1989).** Multiplication des plantes horticoles. Ed. Tec et Doc. Lavoisier, Paris.212 p.
- **Boutherin, D., & Bron, G. (2013).** Multiplication des plantes horticoles, 3ème édition. Lavoisier.
- **Bown D. (1995).** Encyclopedia of Herbs and their Uses. Dorling Kindersley, London
- **Bremness, L. (2002).** Plantes aromatiques et médicinales. Bordas (Ed). Paris, 303 p.

- **Bretaudeau A. (2006).** Les techniques de culture in vitro et la micropropagation des espèces végétales, IPR/Kolibougou Koulikoro B, 06 p.
- **Brown, C.W., (1988).** Gemplasm of in-vitro somatic embryogenesis in alfalfa. Hortscience. 23(3): PP. 526 - 531.

C

- **Caputo, L., Cornara, L., Raimondo, F. M., De Feo, V., Vanin, S., Denaro, M., & Smeriglio, A., (2021).** Mentha pulegium L.: A Plant Underestimated for Its Toxicity to Be Recovered from the Perspective of the Circular Economy. Molecules, 26(8): PP. 21-54.
- **Cassells AC, Joyce SM, O’Herlihy EA, Perez-Sanz MJ, Walsh C. (2003).** Stress and quality in in vitro culture. Acta Hortic (ISHS); 625: PP. 153–164.
- **Chalchat, J. C., Gorunovic, M. S., Maksimovic, Z. A., & Petrovic, S. D., (2000).** Essential oil of wild growing Mentha pulegium L. from Yugoslavia. Journal of Essential Oil Research, 12(5) : PP. 598-600.
- **Chang X., Alderson PG., Wright CJ. (2009),** Variation in the essential oils in different leaves of Basil (O. basilicum L.) at day time, The OpenHorticulture Journal; 2: PP. 13-16.
- **Charles Baltet. (1869).** L’Art de greffer .G. Masson Éditeur, (1892).PP. 1-5.
- **Côme D. (1992).** Les végétaux et le froid.Hermann.Édi.Des sci.Et des arts, Paris, PP. 406 409.
- **Côme D., (1970).** Obstacles à la germination, ed. Masson et cie . Paris. PP.1-PP.26.

D

- **Daniel M., (2006).** Medicinal Plants: Chemistry and Properties.
- **Demarly Y., (1985).** L’épigénétique. Bull. Soc. Bot. Fr.132. Actual. Bot (314),pp 79- 94.
- **Deza L.G., (1991).** Construction à la caractérisation de variants somaclonaux obtenus à partir d’explants de pomme de terre (Solanum tuberosum L ssp. tuberosum cv. Désirée) irradiés aux rayons Gamma. Faculté des Sciences Agronomiques de Gembloux, U.E.R. de phytopathologie, Belgique, 127p.
- **Dodeman, V.L., Ducreux, G., et Kreis, M. (1997).** Zygotic embryogenesis versus somatic embryogenesis. Journal of Experimental Botany. 48 (313): 1493 -1509.
- **Duhoux, E. (1988).** Organogénèse et multiplication végétative chez les arbres. In J.-P. Zrýd (Ed.), Culture de cellules, tissus et organes végétaux: Fondements théoriques et utilisations pratiques (pp. 59–68).

- **Dun, E. A., Germain, A. de Saint, Rameau, C., & Beveridge, C. A. (2012).** Antagonistic action of strigolactone and cytokinin in bud outgrowth control. *Plant Physiology*, 158(1), 487–498. <https://doi.org/10.1104/pp.111.186783>
- **Dunwell, J.M. (1986).** Pollen, ovule and embryo culture as tools in plant breeding, p. 375–404. In: L.A. Withers and P.G. Alderson (eds.). *Plant tissue culture and its agricultural applications*. Butterworths, London
- **Dutuit P. et R. Gorenflot. (2008).** Glossaire pour le développement durable : des Norrel, B. (1973). *Cultures de tissus végétaux et embryogenèse non zygotique*. Soc. Bot mémoire. coll Morphologie. PP. 71 – 98.

E

- **Echeverrigaray S., Basso R., Andrade L.B., (2005).** Micropropagation of *lavendula dentata* from axillary buds of field-grown adult plants. *Biologia plantarum*, 49: 439-442.
- **Evenari M., (1957).** Les problèmes physiologiques de la germination Bull.Soc Frnc.physiol-végé ,3(4), PP.105-124.

F

- **Ferry, M., Bouguedoura, N., et El Hadrami, I. (1998).** Patrimoine génétique et
- **Fowke, L. C., and 0. L. GAMBORG. (1980).** Applications of protoplasts to the study of plant cells. *Int. Rev. Cytol.* 68: PP.9-51.

G

- **Gazeau, C.-M., & Derreudre, J. (1988).** La culture des méristèmes. In J.-P. Zryd (Ed.), *Culture de cellules, tissus et organes végétaux: Fondements théoriques et utilisations pratiques* (pp. 13– 30). Presses Polytechniques Romandes.
- **Gazeau, C.-M., & Derreudre, J. (1988).** La culture des méristèmes. In J.-P. Zryd (Ed.), *Culture de cellules, tissus et organes végétaux: Fondements théoriques et utilisations pratiques* (pp. 13– 30).
- **Gat. (2001).** Seeds are life, Seed sector projects in German development cooperation. Deutche Gesellschaft fur technishe zusammenarbeit (GTZ) Gmb H, Ed. Kleim O. Germany, 27 p.
- **George, E. F., & Debergh, P. C. (2008).** Micropropagation: Uses and Methods. In E. F. George, M. A. Hall, & G. J. De Klerk (Eds.), *Plant Propagation by Tissue Culture 3rd Edition Volume 1. The Background* (pp. 29–64). Springer.

- **George, F. et Sherrington, P.D. (1984).** Plant propagation by tissue culture. Exegetic.England. pp 125 -129.
- **Grafi, G. (2004).** How cells dedifferentiate: a lesson from plants. *Dev. Biol.* 268, 1–6. doi: 10.1016/j.ydbio.2003.12.027.
- **Guignard J.L. et Dupont F. (2004).** Botanique : Systématique moléculaire, 13 ème éd. Ed. Masson, Paris. 237 p.
- **Guyot M.J., Segulier-Guis M. et D. Duris. (2003).** Terre des cafés, Ed CIRAD, p 141 mots pour les maux de la planète, Ed des archives contemporaines, p 182.
- **Grolleau A. (1989).** Contribution à l'étude de la multiplication végétative par greffage du karité (*Vitellaria paradoxa* Gaertn.f.=*Butyrospermum paradoxum* Hepper). *Bois et Forêts des Tropiques* 222: 38–40.

H

- **Hackett W.P. (1985).** Juvenility, maturation and rejuvenation in woody plants. *Horticultural Reviews* 7: 109–155.
- **Hajlaoui H., Mighri H., Noumi E., Snoussi M., Trabelsi N., Ksouri R. et Bakhrouf A. (2010).** *Food Chem. Toxicol.* 2010, 48, 2186.
- **Hale, W. G., Margham, V. A., and Saunders, J. P. (eds). (2005).** Collins Dictionary of Biology, 3d Edn. London: Collins.
- **Hannah Jaenicke et Jan Beniest.** La multiplication végétative des ligneux en agroforesterie Manuel de formation et bibliographie. Page 65.
- **Hannweg, K., Watt, M.P., et Berjak. (1996).** A simple methode for the Micropropagation of *Bowiea volubilis* from inflorescence explants. *Bot.Bull. Acad .Sin.* 37: 213 - 217.
- **Hartmann H.T., Kester D.E., Davies F.T. and Geneve, R.L. (1997).** *Plant Propagation: Principles and practices.* Prentice Hall Inc., Upper Saddle River, New Jersey, 770 p.
- **Hartmann H.T., Kester D.E., Davies F.T., and Geneve R. (2002).** *Hartmann and Kester's Plant Propagation: Principles and Practices*, 7th edn (New Jersey: Prentice Hall), <https://doi.org/10.2307/1555059>.
- **Hartmann HT, Kester DE, Davies FT, Geneve RL. (2002).** *Plant propagation principles and practices.* 7th ed. Upper Saddle River, NJ: Prentice Hall; 849pp.
- **Hedrick U.P. (1972).** *Sturtevant's Edible Plants of the World.* Dover Publications.
- **Heller R., Esnault R., Lance C. (1990).** *Physiologie végétal.* Masson.paris, 4 édi.162p.

- **heller R.,(1982).** Physiologie végétale, 2-Développement, Paris.new york, milan, pp 151 .
- **Hopkins W.G. (1999).** Physiologie vegetal ; All rights reserved authorized translation from the English, Language edition published,442 p.
- **Hussain AI, Anwar AF, Sherazi STH, Przybylski R.** Chemical composition, antioxidant and antimicrobial activities of basil (*Ocimum basilicum*) essential oils depends on seasonal variations. <http://www.aseanfood.info/Articles/11023219.pdf> 986 - 96.

I

- **Iserin P. (2001).** Encyclopédie des plantes médicinales, La rousse, Hong Kong, p.234.
- **Isabelle C. (2021).** fiche pratique, les différentes techniques de bouturage.

J

- **Jain SM. (2001).** Tissue culture-derived variation in crop improvement. *Euphytica* 118:153–166.
- **Javanmardi J., Khalighi A., Kashi A., Bais HP. et Vivanco JM. (2002).** Chemical characterization of Basil (*Ocimum basilicum* L.) found in local accessions and used in traditional medicines in Iran. *J. Agric. Food Chem*; 50: 5878- 83.
- **Jayaweera DMA. (1981).** Medicinal Plants, (Indigenous and Exotic) Used in Ceylon. Part III. Colombo: The National Science Foundation of Sri Lanka;. 101-3.
- **Jopling, C., Boue, S., and Izipisua Belmonte, J. C. (2011).** Dedifferentiation, transdifferentiation and reprogramming: three routes to regeneration. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 12, 79–89. doi: 10.1038/nrm3043.
- **Jordan A.M., Calvo M.C., Segura J. (1999).** Micropropagation of adult *lavendula dendata* plants. *J. horst.Sci. Biotechnol.*73:PP. 93-96.

K

- **Kakimoto T. (1996).** CKI1, a histidine kinase homolog implicated in cytokinin signal transduction. *Science*, 274:982-985.
- **Karp A. (1994).** Origins, causes and uses of variation in plant tissue cultures. In: Vasil IK, Thorpe T, editors. *Plant cell and tissue culture*. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers;. pp. 139–151.
- **Kartha K.K. (2000).** Meristem culture and germplasm preservation *in* Cryopreservation of Plant Cells and Organs,canada,pp.116-130.

- **Kirtikar KR. et Basu BD. (2003).** Indian Medicinal Plants with Illustrations. 2 nd ed. Vol VIII. Uttaranchal: Oriental Enterprises; PP.2701-2705.

L

- **Lachachi, S. (2010).** Organogénèse et embryogénèse somatique directe chez la tomate. Mémoire pour l'obtention du titre de magister en Amélioration des plantes, Faculté des sciences, Département de biologie, Univ. d'Oran,p.22.
- **Lahrech, K. (2010).** Extraction et analyses des huiles essentielles de *Mentha pulegium* L. et de *Saccocalyx satureioides*. Tests d'activités antibactériennes et antifongiques, Thèses, Université d'Oran Es-Senia, Oran.
- **Lang A.G., Early J.D. ,Martin G.C. et Darnell R.L. (1987).** Endo-, Para-, And Ecodormancy:Physiological terminology and classification for dormancy research, Hort, Sei, 22, pp 371-377.
- **Lafon J.P., Tharaud, Prayer C. et Levy G., (1988).** Biologie des plantes cultivées Tome-I-, Organisation Physiologie de la nutrition, Technique et documentation, Lavoisier, pp 84-85.
- **Larkin PJ. et Scowcroft WR. (1981).** Somaclonal variation: a novel source of variability from cell cultures for plant improvement. Theor Appl Genet 60:197–214 .
- **Larkin PJ et Scowcroft WR. (1983).** Somaclonal variation and crop improvement. In: Kosuge T et al (eds) Genetic engineering of plants: an agricultural perspective. Plenum, New York, pp 289–314.
- **Lemordant D., Boukef K. et Bensalem M. (1977).** Plantes utiles et toxiques de Tunisie. Fitoterapia, 48(5): 191-214.
- **Leopol D A.C. (1983).** temperature effects on soybean inhibition and leakage. plant physiol, 65, p.1096-1098.
- **Loberant, Altman, Desert, Yotvata, Robert et Smith (2010).** Micropropagation of plants, academia.pp.1-17.

M

- **Maciejewski J. (1991).** Semences et plants, Ed. Technique et documentation Lavoisier. 233 p.
- **Makhloufi M.N. (1999).** Technique d'exploitation des pépinières, sujet : Les graines forestières, Institut de technologie forestières-Batna, pp 4-38.
- **Margara J. (1989).** La multiplication végétative le méristème et l'organogénèse. Ed INRA, Paris. 230p.

- **Martin B. (1997).** Le bouturage des arbres forestiers progrès récent, perspectives de développement. *Revu Forst France* N0 4 ,262 P.
- **Martin B. (1997).** Le bouturage des arbres forestiers progrès récents - perspectives de développement p 245.
- **Maziliak P. (1982).** Croissance et développement. Éd. Herma. Collection méthodes.
- **Monnier M. (1988).** Culture d'embryons et d'ovules. In J.-P. Zryd (Ed.), *Culture de cellules, tissus et organes végétaux: Fondements théoriques et utilisations pratiques*, pp. 105–118.
- **Morel G. et Martin C. (1952).** Guérison de dahlias atteints d'une maladie a virus. *CR Hebd Seances Acad Sci* 235:1324-1325 .
- **Morel G. et Martin C. (1955).** Guérison de pommes de terre atteintes de maladies a virus. *CR Seances Acad Agric Fr* 41:472-475.
- **Moshkov I. E., Novikova G. V., Hall M. A. et George E. F. (2008).** Plant Growth Regulators III: Gibberellins, Ethylene, Abscisic Acid, their Analogues and Inhibitors; Miscellaneous Compounds. In E. F. George, M. A. Hall, & G. J. De Klerk (Eds.), *Plant Propagation by Tissue Culture 3rd Edition Volume 1. The Background*, pp. 227–282. Springer.
- **Mukherjee S. et Litz R. (2009).** La mangue : Botanique, production et usages . (Richard E. Litz, éd.) (2e éd.). CAB International.
- **Muller J-F., Goujard J. et Caboche M. (1985).** Isolation in vitro of naphthaleneacetic acid-tolerant mutants of *Nicotiana tabacum*, which are impaired in root morphogenesis. *Mol Gen Genet*, 199:194-200.
- **Munjuga M., Kariuki W., Njoroge J., Ofori D. et Jamnadass R.(2013).** Effect of rootstock type, scion source and grafting methods on the healing of *Allanblackia stuhlmanni* grafts under two nursery conditions. *Afr J Hortic Sci.* 7:1–10.
- **Muralidharan A. et Dhananjayan R. (2004).** Cardiac stimulant activity of *Ocimum basilicum* Linn. extracts. *Indian J Pharmacol*; 36: 163-6.
- **Murashige T. et Skoog R. A. (1962).** Revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol Plant*; 15: 473–497.

N

- **Nadkarni K. (2005).** *The Indian Plants and Drugs*. New Delhi: Shrishti Book Distributors, P.263.
- **Németh G. (1986).** Induction of rooting. In *Biotechnology in Agriculture and Forestry. Trees I*, Bajaj, Y.P.S. (Ed.), vol. 1. Springer-Verlag, Berlin, Germany, PP.49-64.

O

- **Ochette C. (2005).** Growth, quality and biotechnology, WFP publisher.finland.
- **Omidbaigi R., Hadjiakhoondi A. et Saharkhiz M. (2003).** Changes in content and chemical composition of Pimpinella anisum oil at various harvest time. *J. Essent. Oil Bearing Plants*, 6 (1), PP. 46- 50.

P

- **PDR for Herbal Medicines (2000)**, Medical Economics Company, Inc. at Montvale, PP. 237-238.
- **Pelletier G. (1988).** Production de plantes haploïdes. In J.-P. Zrýd (Ed.), *Culture de cellules, tissus et organes végétaux: Fondements théoriques et utilisations pratiques* Presses, Polytechniques Romandes, PP. 135–142.
- **Peter K. et Nirmal B. (2012).** Introduction to herbs and spices: medicinal uses and sustainable production. In: *Handbook of Herbs and Spices: Volume 2.* 1–16.
- **Peyeru P., Baehr J., Cariou F., Grandperrin D. et Perrier C. (2007).** Biologie tout en un 2^{eme} année BCPSI .Edt. Dunod RParis .P.110.
- **Póvoa O. and Delgado F. (2014).** Propagação de PAM. Guia para a Produção de Plantas Aromáticas e Mediciniais. Uma Recolha de Informação e Boas Práticas para a Produção de Plantas Aromáticas e Mediciniais em Portugal (EPAM, ADC Moura), <http://epam.pt/guia/propagacao-de-pam>.

Q

- **Quézel P. & Santa S., (1963).** Nouvelle flore de l'Algérie et des régions désertiques méridionales. Edition : Paul Le chevalier, Paris. Tome 2. CNRS.

R

- **R De Paepe (1986).** Variation induite par l'androgenèse, *Bulletin de la Société Botanique de France. Actualités Botaniques*, 133:4, PP. 41-50,
- DOI: 10.1080/01811789.1986.10826797.
- **Ramesh B., Satakopan V. (2010).** In vitro antioxidant activities Of Ocimum species: Ocimum basilicum and Ocimum sanctum. *Journal of Cell and Tissue Research* 10(1):PP. 21.45.50.

- **Riotte H. (1978).** Companion Planting for Successful Gardening. Garden Way, Vermont, USA.
- **Robert D, Dumas C et Bayon C., (1998).** La reproduction .Edt .Doun initiatives santé PP 373.
- **Rodrigues V., Rosa P., Marques M., Petenale A. et Meireles M. (2003).** Supercritical extraction of essential oil from aniseed (*Pimpinella anisum* L.) using CO₂ solubility, kinetics and composition data. *J. Agric. Food Chem.*, 51: PP. 1518- 1523.
- **Roman H., Girault T., Le Gourrierec J., et Leduc, N. (2017).** In silico analysis of 3 expansin gene promoters reveals 2 hubs controlling light and cytokinins response during bud outgrowth. *Plant Signaling & Behavior*, 12(2), e1284725.
<https://doi.org/10.1080/15592324.2017.1284725>.
- **Roussel L. (1974).** Les auxines, agents essentiels de la croissance des végétaux ; Bois et Forêts des Tropiques n° 158 ; 51 p.
- **Rousselle P., Yvon R. et Crosnier J. (1996).** La pomme de terre : production, amélioration, ennemis et maladies. Ed INRA, 640p.

S

- **Saadi A. (1991).** Régénération de plantes de pois *Pisum sativum* L par embryogenèse somatique. Thèse de doctorat. Paris Grignon. 162p.
- **Sami M. et Sami A. (2015).** Cumin (*Cuminum cyminum*) from Traditional Uses to Potential Biomedical Applications. *Chemistry & Biodiversity*, 12(5), PP.733–742. doi:10.1002/cbdv.201400305.
- **Salehi S. (2010),** Medicinal Plants and Phytotherapy, vol. 1, Donyay Taghziah Press, Tehran, Iran.
- **Sanou H., Kambou S., Teklehaimanot Z., Dembele M., Yossi H., Sina S., Djingdia L. et Bouvet JM. (2004).** Vegetative propagation of *Vitellaria paradoxa* by grafting. *Agrofor Syst.* 60:PP. 93–99.
- **Sbay H. et Lamhamedi M. (2015).** (éds.). Guide pratique de multiplication végétative des espèces forestières et agroforestières: Techniques de valorisation et de conservation des espèces à usages multiples face aux changements climatiques en Afrique du Nord, Royaume du Maroc, Haut-Commissariat aux Eaux et Forêts et à la Lutte Contre la Désertification, Centre de Recherche Forestière, 124 p.
- **Seabrook J., Coleman S. et Levy D. (1993).** Effect of photoperiod on in vitro tuberization of potato (*Solanum tuberosum* L.). *Plant Cell. Tissue and Organ Culture* 34: PP. 43-51.

- **Semal J. (1998).** Reproduire à l'identique : Mythe et réalité .Cahier Agriculture. (7) : 6-8
- **Skirvin R., McPheeters K. et Norton M. (1994).** Sources and frequency of somaclonal variation. HortScience; 29:PP. 1232–1237.
- **Skoog F. et Miller C. (1957).** Chemical regulation of growth and organ formation in plant tissues cultured in vitro. In Vitro Symp. Soc. Exptl. Biol., 11, 118–140.
- **Smith R., Bhaskaran S. et Miller, F. (1985).** Screening for drought tolerance in Sorghum activity: localization using cell culture in Vitro cell. Dev. Biol. 21:541-545.
- **Stavrescu B., Scăețeanu G. et Madjar R.(2019).** Soil requirements and environmental considerations for pennyroyal (*Mentha pulegium* L.): A case study from Romania. Agronomy Series of Scientific Research/Lucrari Stiintifice Seria Agronomie, 61(2).
- **Sutour S. (2010).** Etude de la composition chimique d'huiles essentielles et d'extraits de menthes de corse et de kumquats. Thèse de Doctorat. Université de corse pascal Paoli .Faculté des sciences et techniques.

T

- **Téoulé E. (1999).** Biotechnologie et Amélioration des plantes in Biotechnologie Seriban R.EdT TEC et DOC. PP. 565-589.
- **Thimann K. et Skoog F. (1933).** On the inhibition of bud development and other functions of growth substance in vicia faba. Proceedings of the Royal Society of London, PP. 114, 317–339.

V

- **Verdeil J., Alemanno L., Niemenak N. et Tranbarger T. (2007).** Pluripotent versus totipotent plant stem cells: dependence versus autonomy? Trends Plant Sci 12:PP. 245–252.
- **Vertucci C. (1989).** The kinitie of seeds inhibition controlling factors and relevance to seedling vigor. Seed moisture CSSA special publication. N°14. P.93-115.
- **Vican P. (2001).** Encyclopédie des plantes médicinales. Larousse (Ed). Paris, 355p.
- **Vidalis H., Augé R. et Beauchesne G. (1989).** La culture in vitro et ses applications horticoles. Lavoisier, Tec et Doc (ed).PP. 7- 24.
- **Viguié M. (2006).** Les perspectives économiques des secteurs de l'horticulture publique française. Ed: Conseil économique et social.

W

- **White P. (1934).** Multiplication of the viruses of tobacco and Aucuba mosaics in growing excised tomato root tips. *Phytopathology* 24:PP. 1003-1011.
- **Wickson M., et Thimann K. (1958).** The Antagonism of Auxin and Kinetin in Apical Dominance. *Physiologia Plantarum*, 11(1), PP. 62–74. <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.1958.tb08426.x>.

Y

- **Yang Y., Hammes U., Taylor C., Schachtman D. et Nielsen E. (2006).** High -Affinity Auxin Transport by the AUX1 Influx Carrier Protein. *Current Biology*, 16(11), PP. 1123–1127. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2006.04.029>

Z

- **Zryd J. (1988).** Culture de cellules, tissus et organes végétaux. Ed Press.Polytechniques Romandes Suisse. 308p.
- **Zryd J. (1988).** Culture de cellules, tissus et organes végétaux. Fondements théoriques et utilisations pratiques. Lausanne, Suisse : Presses Polytechnique Romandes, 305 p.
- **Zuzurate M., Dinis A., Cavaleiro C., Salgueiro L. et Canhoto J. (2010).** Trichomes, essential oils and in vitro propagation of *lavandula pedunculata* (Lamiaceae). *Ind Crops prod.*, 32: PP. 580-587.



ANNEXE

III.4. Annexes

Annexe 1 : La culture *in vitro* :

Préparation des solutions mères du milieu Murashige et Skoog (1962) :

A. Matériel :

- Plaque chauffante
- Réfrigérateur,
- Balance de précision
- Pipettes graduées de 10 ml et 25 ml + pipeteur
- Fioles de 500 ml et 1000 ml
- Bêchers de 50 ml, 250 ml, 500 ml et 1000 ml
- Erlenmeyer de 200 ml
- Un agitateur et un barreau magnétique
- Spatules
- Gants isolants
- Papier aluminium
- Pissettes
- Ruban à étiqueter et crayon à encre permanente ;
- L'autoclave
- Flacons verre

B. Produits :

a) Sels minéraux :

- NaOH (0,1 N+1N)
- Acide HCl (0,1 N+1N)
- NH₄ NO₃
- K NO₃
- Mg SO₄ 7H₂O
- Ca Cl₂ 2H₂O

- $K H_2PO_4$
- H_3BO_3
- $Mn SO_4 4H_2O$
- $Zn SO_4 4H_2O$
- KI
- $Na_2 Mo O_4 2H_2O$
- $Cu SO_4 5H_2O$
- $Co Cl_2 6 H_2O$
- $Fe SO_4 7H_2O$
- $Na_2 EDTA$,

b) Vitamines :

- Glycine, Acide nicotinique, Pyridoxine HCl, Thiamine HCl,
- L'eau distillée, savon, l'éthanol.

Annexe 2 : Test de germination :

B. Matériels et outils :

- Pincés
- Béchers
- Boîtes de Pétris
- Papier aluminium
- L'étuve
- Becs Benzènes
- La hotte
- Papier buvard
- Vaporisateur ou une pipette

C. Produits :

- L'éthanol à 70%

- Nao Cl 6%
- L'eau distillée
- D'acide sulfurique H₂SO₄.

Annexe 3 : Semis :

Outils et produit :

- Plateau d'alvéole.
- Terreau.
- Vaporisateur d'eau.

Annexe 4 : Bouturage :

Outils et produit :

- Plateau d'alvéole.
- Terreau.
- Vaporisateur d'eau
- Sécateur