

**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**  
**VEGETAL**

**Mémoire présenté pour l'obtention**  
**Du diplôme de Master Académique**  
**(En biotechnologie végétale)**

**Par:**

**(DJOUDI Nacira et HADJI Bochra)**

**Intitulé**

**Application de la biotechnologie de la culture in vitro pour les plantes médicinales**

**Soutenu le .../9/2020 devant le jury composé de:**

Mme. KHALFA Hanane	MAA	Université de M'Sila	Président.
Dr. BENDIF Hamdi	MCA	Université de M'Sila	Rapporteur.
Mr. HARRAR Abdenacer	MAA	Université de M'Sila	Examineur.

**Année universitaire : 2019/2020.**

## Dédicace

*Je dédie ce travail...*

*A ma chère Mère, mon chère Père,*

*En qui j'ai trouvé le soutien immense et l'amour dans le parcours de ma vie, j'espère que ce travail déployé avec beaucoup d'effort exprime pour eux le témoignage Sincère de mon amour, ma profonde affection et mon grand respect.*

*A mes chers frères et mes chères sœurs,*

*Et*

*A toute ma famille*

*A Mes enseignants respectivement :*

*Encadreur : monsieur Hamdi bendif*

*Président : monsieur Mme. KHALFA Hanane*

*Examineur : Mr. HARRAR Abdenacer*

*Je remercie aussi le reste de tous mes enseignants.*

*Touts mes amis et mes collègues de ma promotion de master (2019/2020)*

*De ce travail.*

**WISSAM (NACIRA)**

## Remerciements

Avant tout, nous remercions Allah le tout puissant de nous avoir donné le courage et la patience de mener à bien ce travail.

الحمد والشكر لله

C'est avec beaucoup de reconnaissance que nous adressons nos sincères remerciements à l'égard de notre promoteur **Dr. BENDIF HAMDI**, Maître de conférences –A- au département des Sciences de la nature et de vie à L'université de M'SILA pour avoir proposé ce thème, suivi et dirigé ce travail, nous le remercions infiniment, pour son aide, ses conseils, ses orientations ainsi que, ses remarques et ses critiques qui nous ont été d'un apport précieux. Sans oublier l'ensemble de nos professeurs qui nous ont accompagnés tout au long de notre cursus universitaire.

On aimerait aussi remercier **Mme. Khalfa Hanane**, Maître assistante au département des Sciences de la nature et de vie à L'université de M'SILA, pour nous avoir fait l'honneur de présider ce jury.

On veut exprimer nos vifs remerciements au **Mr. HARRAR Abdenacer**, Maître Assistant A au département des Microbiologie et biochimie à L'université de M'SILA, d'avoir accepté de faire partie du jury et examiner de ce mémoire.

Pensée tous nos amis et toute la promotion du Master Biotechnologie végétale 2019/2020.

Nos remerciements vont également à **toutes les personnes** qui ont **contribué**, de près ou de loin, à la réalisation de ce mémoire

**DJOUDI Nacira et HADJI Bochra**

# Sommaire

Liste des Figures

Liste des Tableaux

Liste des Abréviations

Introduction.....1

## Chapitre I. Manipulation *in vitro* de plantes médicinales

1. Mise en place de cultures aseptiques.....2

2. Milieux de culture de base.....2

3. Substances de croissance.....2

4. Conditions d'incubation.....4

5. Acclimatation et implantation sur le terrain.....4

## Chapitre II. Différentes techniques de la culture *in vitro* appliquées

1. Clonage végétale et variation soma-clonale.....5

1.1. Clonage végétal.....5

1.2. La variation somaclonale.....7

1.2.1. Définition de la variation somaclonale .....7

1.2.2. Principe de la variation somaclonale.....7

1.2.3. Origine de la variation somaclonale .....8

1.2.4. Nature des variations somaclonales.....8

1.2.5. Type de variation somaclonale .....9

1.2.6. Facteurs ayant une action sur la variation soma clonale.....9

1.2.7. Avantages de la variation somaclonale .....10

1.2.8. Inconvénients de la variation somaclonale .....11

2. Culture de méristème et de bourgeons.....11

3. Culture d'embryons.....13

3.1. Culture d'embryons immatures.....13

3.2. Sauvetage d'embryons interspécifiques.....14

3.3. Embryogenèse somatique.....14

4. Culture de protoplastes et hybridation somatique .....17

5. la culture cellulaire isolée (support solide et en agitation).....23

6. Culture d'anthère et de pollen= Androgenèse.....26

7. Culture d'ovaires et d'ovules=Gynogenèse.....28

### **Chapitre III. Applications de la culture *in vitro* pour les plantes médicinales**

1. Production des huiles essentielles.....	31
2. Multiplication <i>in vitro</i> de plantes médicinales.....	33
3. Culture <i>in vitro</i> pour la production d'antioxydants.....	35
<b>Conclusion</b> .....	43
<b>Références</b> .....	45
<b>Résumé</b>	

## Liste des figures

<b>Figure 1.</b> Principale méthodes du clonage végétal <i>in vitro</i> .....	6
<b>Figure 2.</b> Culture de méristèmes avec la thermothérapie et la détection des virus par détection sérologique de type ELISA.....	12
<b>Figure 3.</b> Régénération des plantes à partir la culture de méristème.....	12
<b>Figure 4.</b> Cycle de sélection avec culture d'embryons immatures.....	13
<b>Figure 5.</b> Sauvetage d'embryons interspécifiques chez la tomate.....	14
<b>Figure 6.</b> Stades de développement successifs au cours de l'embryogenèse (de gauche à droite): globulaire, cordiforme, torpille, cotylédonaire.....	15
<b>Figure 7.</b> Induction de l'embryogenèse somatique directe.....	16
<b>Figure 8.</b> Induction de l'embryogenèse somatique indirecte.....	16
<b>Figure 9.</b> Obtention de protoplastes.....	18
<b>Figure10.</b> Obtention de protoplastes (Digestion enzymatique).....	19
<b>Figure11.</b> Obtention de protoplastes (mécaniques).....	19
<b>Figure12.</b> Hybridation somatique.....	21
<b>Figure13.</b> Divers comportements de produits de fusion entre protoplastes.....	22
<b>Figure14.</b> Schéma de l'isolement, de la fusion et de la culture de protoplastes.....	23
<b>Figure15.</b> Principe de la culture cellulaire unique (Taba).....	24

## Liste des Tableaux

<b>Tableau 1.</b> Production d'huile essentielle et de composés apparentés en culture Cellulaire.....	32
<b>Tableau2.</b> Exemples sélectionnés de Micropropagation de plantes médicinales par culturein vitro.....	34
<b>Tableau3.</b> Exemples sélectionnés de production d'antioxydants à partir de cultures Végétales in vitro.....	37

## Liste des Abréviations

**2,4-D** : Acide 2,4-dichlorophénoxyacétique

**BAP** : 6-benzyladénine

**mg/l** : milligramme par litre

**OMS** : Organisation mondiale de Santé

**SH** : Sans Hormones

**ADN** : Acide désoxyribonucléique

**MS** : Murashige et Skoog(1962)

**DPPH**: 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl free radical

**FRAP**: ferric reducing ability of plasma)

**TBARS**: Thiobarbituric reactive substances

**ORAC**: Oxygen radical absorption capacity

**ROS**: reactive oxygen species

**PVP**: polyvinylpyrrolidone.

**DCQAs**: dicaffeoylquinic acids

**TPC**: Total phenolic content;

**HPLC**: High-performance liquid chromatography.

**FRAP**: Ferric reducing antioxidant power

**CUPRAC**: Cupric ion reducing antioxidant capacity

**ORAC**: Oxygen radical absorbance capacity

**ABTS**: 2,2-Azinobis (3-ethylbenzthiazoline-6-sulphonic acid.

# **Introduction Générale**

### Introduction Générale

Depuis les temps les plus anciens, les grandes civilisations (chinoise, égyptienne, babylonienne, grecque, romaine, etc.) ont eu recours aux plantes médicinales pour leurs propriétés thérapeutiques, cosmétiques, chimiques, diététiques, pharmaceutiques, agro-alimentaires et industrielles. Selon l'OMS (2008), plus de 80% de la population mondiale utilisent les plantes médicinales pour traiter plusieurs maladies (Pierangeli *et al.*, 2009). Les plantes fournissent également de nombreux composés, tels que les arômes, les huiles, les parfums, les cosmétiques et plusieurs activités biologiques (médicaments) comme l'activité antioxydante, anti-inflammatoire, anticancéreuse, antimicrobienne... etc.

Dans le domaine pharmaceutique, 60% à 70% des médicaments antibactériens et anticancéreux sont des substances d'origine naturelle, et près de 25% des prescriptions sont à base de plantes, l'intérêt thérapeutique des plantes médicinales est dû à la présence d'une catégorie de molécules synthétisées par la plante considérées comme étant, pratiquement sans rôle spécifique pour le développement de la plante, ces molécules appelées métabolites secondaires. Parmi ces molécules, plusieurs ont des propriétés médicamenteuses très intéressantes, malheureusement la culture de ces plantes est très limitée et ne pas suffisante pour couvrir tous les domaines vis-à-vis leur vaste utilisations et certaines espèces sont en danger. Cela peut être dû à la destruction de leurs habitats naturels, mais aussi à une surexploitation des ressources en lien avec des difficultés techniques de cultures. L'ensemble de ces facteurs aggravants conduit à une réduction de la diversité végétale (Sato *et al.*, 2001) et pousse les professionnels à chercher des méthodes de culture alternatives (Roberts,1998), face à ces problèmes, La biotechnologie peut jouer un rôle moteur essentiel comme outil performant dans les programmes de domestication des plantes médicinales, l'outil biotechnologique présenté, permettra à court terme, d'apporter certaines solutions intéressantes pour protéger la grande diversité botanique des plantes médicinales, la domestication de plantes médicinales pour la production de molécules à haute valeur ajoutée pour les différents secteurs bioindustriels, constitue une branche de recherche nouvelle et originale, la culture *in vitro* s'impose comme moyen efficace et complémentaire aux ces problèmes. L'objectif dans ce contexte est : Synthèse les différentes techniques de la biotechnologie de la culture *in vitro* appliquées sur les plantes médicinales ainsi que pour la conservation des ressources phytogénétiques. Ce document est organisé en : Chapitre I. Manipulation *in vitro* de plantes médicinales ; Chapitre II. Différentes techniques de la culture *in vitro* appliquées et Chapitre III. Applications de la culture *in vitro* pour les plantes médicinales.

# **Chapitre I. Manipulation *in vitro* de plantes médicinales**

### Chapitre I. Manipulation *in vitro* de plantes médicinales

#### Introduction

Ces dernières années, il y a eu un regain d'intérêt pour les médicaments naturels obtenus à partir de parties de plantes ou d'extraits de plantes. Environ 40% ou plus des produits pharmaceutiques actuellement utilisés dans les pays occidentaux sont déjà dérivés ou au moins partiellement dérivés de sources. La forêt abrite un grand nombre d'espèces végétales, mais la déforestation a été responsable de la perte rapide de la richesse des plantes médicinales, de sorte que de nombreuses plantes médicinales précieuses sont menacées d'extinction. Les sociétés pharmaceutiques dépendent en grande partie des matériaux achetés dans des peuplements naturels qui s'épuisent rapidement.

La culture de tissus végétaux est une méthode alternative de multiplication commerciale (**George et Sherrington, 1984**) et est largement utilisée pour la multiplication commerciale d'un grand nombre d'espèces végétales, y compris de nombreuses plantes médicinales. Des applications de plantes médicinales traditionnelles à usage humain ont également été signalées (**Shimomura et al., 1997**).

La biotechnologie impliquant la culture tissulaire moderne, la biologie cellulaire et la biologie moléculaire offre l'opportunité de développer de nouveaux germoplasmes bien adaptés à l'évolution des demandes.

#### 1. Mise en place de cultures aseptiques

Les explants prélevés sur les plantes cultivées sur le terrain sont généralement contaminés par divers micro-organismes. Outre les contaminants de surface, il peut y avoir certains infectants internes qui peuvent être exprimés même après des années de culture en raison de certaines bactéries ou champignons endophytes; l'éradication n'a pas encore été réalisée. Des agents stérilisants courants tels que l'hypochlorite de sodium ou de calcium (5–10%), l'alcool éthylique (50–95%) et le chlorure mercurique (0,01–0,1%) sont utilisés pour exclure les contaminants de surface en les lavant dans la solution appropriée pendant 10–25 min suivi de plusieurs rinçages à l'eau stérile. Un dépistage rigoureux des cultures mères pour la contamination bactérienne est très essentiel (**Rout et al., 2000**).

#### 2. Milieux de culture de base

Bien que plus de 50 formulations de milieux différents aient été utilisées pour la culture *in vitro* de tissus de diverses espèces végétales (**Gamborg et al., 1976; Huang et Murashige,**

1977), la formulation décrite par **Murashige et Skoog (1962)** (milieu MS) est le plus couramment utilisé, souvent avec des changements relativement mineurs.

Fondamentalement, un milieu nutritif comprend tous les éléments nutritifs essentiels majeurs et mineurs des plantes, des vitamines, des régulateurs de croissance des plantes et un glucide comme source de carbone avec d'autres substances organiques comme additifs facultatifs.

La composition des différents milieux nutritifs et la nature, la source et l'utilisation des ingrédients ont été discutées en détail par **Murashige (1974) et Torres (1989)**.

Le pH du milieu (5,0–6,0) est généralement plus stable et de meilleurs résultats sont obtenus lorsque le milieu contient à la fois des sources d'azote nitrate et ammonium. Les macronutriments N, P, K, Ca, Mg et S sont nécessaires dans tous les types de cultures végétales, mais la concentration optimale de chacun peut varier selon les espèces végétales. Bien que les cellules végétales en culture puissent se développer sur les nitrates seuls. Les micronutriments essentiels nécessaires à l'état de traces pour les plantes entières et pour les tissus en culture comprennent Fe, Mn, Zn, B, Cu, Cl, Mo et Ni. Le fer est généralement ajouté sous forme chélatée pour éviter les précipitations et faciliter l'absorption. Co, I et Na sont également inclus dans certains médias bien que leurs exigences et leurs rôles physiologiques n'aient pas été établis (**Rout et al., 2000**).

Les besoins en glucides dans les milieux de culture sont généralement satisfaits par l'incorporation de 2 à 3% de saccharose ou moins fréquemment par le glucose. D'autres glucides, notamment le lactose, le maltose, le galactose et l'amidon, n'ont été utilisés que rarement. En plus de leur rôle de source de carbone, les glucides agissent comme osmotique et contribuent à maintenir un potentiel osmotique dans le milieu de culture propice à la croissance cellulaire et tissulaire (**Rout et al., 2000**).

Les plantes entières synthétisent toutes les vitamines; comme les biocatalyseurs, nécessaires à la croissance et au développement normal, mais des vitamines spécifiques, notamment la thiamine (B1), l'acide nicotinique (B3), la pyridoxine (B6) et le myo-inositol sont généralement des ajouts nécessaires aux cultures de tissus et de cellules. Bien que les cellules cultivées soient normalement capables de synthétiser tous leurs acides aminés nécessaires, l'ajout de L-glutamine, de L-cystéine, de L-proline et de L-tyrosine ou d'un mélange d'acides aminés comme l'hydrolysate de césine au milieu peut augmenter la croissance cellulaire (**Rout et al., 2000**).

L'agar est le plus couramment utilisé pour préparer des milieux de culture semi-solide ou solide, mais d'autres agents gélifiants sont parfois utilisés, notamment la gélatine, l'agarose, l'alginat et la gélrine (**Rout et al., 2000**).

### 3. Substances de croissance

Les niveaux et les types de régulateurs de croissance des plantes inclus dans le milieu de culture déterminent en grande partie le succès des travaux de culture tissulaire. L'initiation des racines et des pousses et le processus de différenciation à partir du tissu calleux non organisé sont étroitement régulés par les concentrations relatives d'auxines et de cytokinine dans le milieu (**Rout et al., 2000**). Les rapports auxine: cytokinine de 10 donnent une croissance rapide de cals indifférenciés, un rapport de 100 favorise le développement des racines et un rapport de 4 favorise le développement des pousses (**Murashige, 1980**). Les gibbérellines stimulent la croissance des organes mais ne favorisent généralement pas l'initiation des organes (**Rout et al., 2000**).

### 4. Conditions d'incubation

La lumière, la température et l'humidité relative sont des paramètres importants dans l'incubation des cultures. L'activité photosynthétique n'est pas très importante pendant les phases initiales de la culture *in vitro* mais à des stades ultérieurs, les matériels de culture sont amenés à devenir autotrobes dans une certaine mesure (**Rout et al., 2000**).

La lumière est essentielle aux processus morphogénétiques tels que l'initiation des pousses et des racines et l'embryogenèse somatique. La qualité et l'intensité de la lumière ainsi que la photopériode sont essentielles au succès de certaines expériences de culture (**Murashige, 1977**). Une exposition à la lumière pendant 12 à 16 h par jour sous 35 à 112  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  fournie par des lampes fluorescentes blanches et froides est généralement recommandée. La lumière bleue favorise la formation des pousses tandis que la lumière rouge induit l'enracinement chez de nombreuses espèces (**Murashige, 1977**). La température habituellement utilisée dans la chambre d'incubation de culture est environ 25°C (**Rout et al., 2000**).

## **Chapitre II. Différentes techniques de la culture *in vitro* appliquées**

### Chapitre II. Différentes techniques de la culture *in vitro* appliquées

#### Introduction

L'utilisation d'un fragment de plante pour reproduire un individu comme dans le bouturage, ou pour l'associer à une autre plante, comme dans la greffage, fait partie des biotechnologies anciennes. De nos jours il existe des techniques qui sont des méthodes plus fines, partant de fragments de plus en plus réduits, jusqu'à la cellule isolée (Tabti, 2009). Les applications de la culture *in vitro* sont nombreuses aujourd'hui tant dans le domaine de l'horticulture que dans celui de la recherche (notamment en amélioration des plantes), ou encore pour conserver la diversité variétale (Conservatoires) pour sauvegarder des espèces menacées (conservations *ex-situ*) (Dellaa, 2013).

La gamme des technologies de routine s'est élargie pour inclure l'embryogenèse somatique, l'hybridation somatique, l'élimination du virus ainsi que l'application de bioréacteurs à la propagation de masse. La liste comprend: Propagation clonale, Multiplication axillaire des pousses, Organogenèse directe (accidentelle), Cal jusqu'à l'organogenèse, Embryogenèse somatique, Élimination du virus, Greffe *in vitro*, Banques de gènes *in vitro*, banques de plantes mères, Variation somatique, Gestion de la variation " naturelle ", Induite mutation, criblage et sélection *in vitro*, culture-production d'anthers ou de microspores d'haploïdes, conduisant à des haploïdes doubles; Culture de protoplastes, fusion somatique, systèmes de transformation d'ADN, récupération de régénérants à partir de cellules transformées, culture cellulaire et biosynthèse dans des bioréacteurs (production de métabolites secondaires) (Idowu *et al.*, 2009).

#### 1. Clonage végétale

##### 1.1. Définition du clonage végétal

La micropropagation ou propagation clonale en masse, est la multiplication *in vitro* des plantes par la culture de tissus pour produire des copies ou clones génétiquement semblables à la plante mère (Ferry *et al.*, 1998 ). En biotechnologie, le **clonage** ou multiplication conforme désigne la reproduction en laboratoire de cellules ou organismes à partir d'une même entité originale. Par conséquent, il est possible de produire des copies génétiques exactes de la cellule ou de l'organisme original (Cottier et Guerry, 2000). Cette technique appelée aussi microbouturage.

Les plantes obtenues à partir de culture tissulaire sont appelées vitroplants et peuvent être dérivées de cultures tissulaires (**figure 1**) :

- A partir de la culture de nœuds, méristèmes ou apex.
- Suite à la morphogenèse directe

- Par la formation d'embryons somatiques directe.

Cette technique s'avère utile pour la propagation des espèces sexuellement stériles tels les triploïdes, les aneuploïdes qui ne peuvent pas être perpétués par des graines, les plantes sans gaines comme la banane ou celles dont les semences sont rares ou présentent des difficultés de germination.

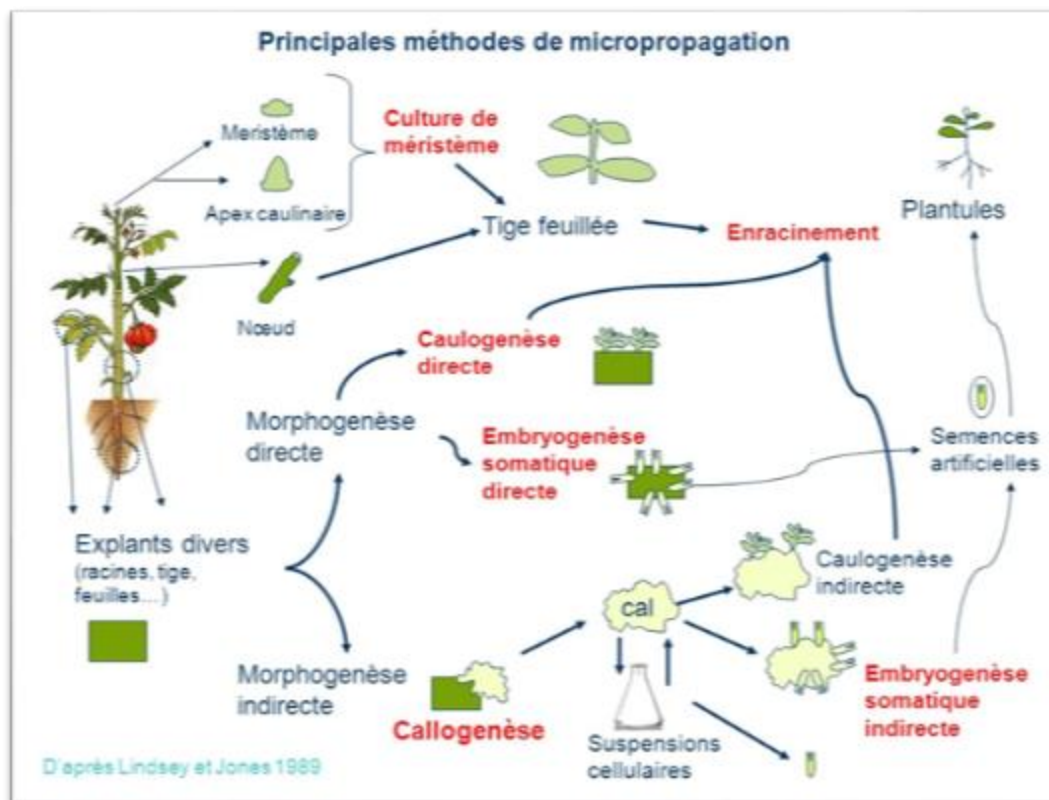


Figure 1. Principales méthodes du clonage végétal *in vitro*.

### 1.1.2. Avantages du clonage végétal

- Les plantes obtenues sont génétiquement identiques à la plante ou variété de départ,
- Production d'un grand nombre de plantes génétiquement homogènes en un temps court.
- Les plantes obtenues sont de qualité : bon état sanitaire, enracinement régulier, nombreuses ramifications.
- Le volume de plantes nécessaire à la mise sur le marché des nouvelles variétés est plus rapidement atteint.
- La réduction du nombre de pieds mères nécessaire à la production de boutures permet un gain de place dans les serres d'où une économie d'énergie.
- Le microbouturage permet de multiplier des espèces difficiles à reproduire naturellement telles les orchidées d'où une diminution du coût de production. En faisant germer les graines d'orchidées *in vitro*, la présence des champignons symbiotiques est inutile.

### 1.2. Variation somaclonale

#### 1.2.1. Définition de la variation somaclonale

Durant la phase de callogénèse il peut faire des modifications génétiques aléatoire d'ADN (Eric, 2003), d'une source inconnu, et modification non habituelle dite la variation somaclonale (ELHamdouni et al, 1999). Donc c'est l'ensemble des modifications génétiques obtenues après le passage par les conditions du laboratoire (Dubois, 1989). Et ce par l'apparition d'autre copie non conforme morphologiquement ou physiologiquement à la plante originale, les nouveaux phénomènes patterns nommé «phénovariant » ou «vitro variant» (SIBI, 1971),

D'après Nowbuth et al., (2005) on appelle variation somaclonale des modifications du phénotype des plantes qui apparaissent le plus souvent lors de la régénération de nouvelles plantules à partir de tissus déjà différenciés.

Larkin et Scowcroft, (1981) ont montré, qu'il pouvait être très intéressant d'exploiter la variabilité génétique induite par certaines cultures *in vitro*, dans le but de création variétale.

#### 1.2.2. Principe de la variation somaclonale

##### Callogenèse

Le cal est un amas cellulaire (n'a pas de forme précise) dont la croissance se fait de manière anarchique. Le cal est le tissu de néoformation produit par l'explant initial ou après des repiquages successifs (Margara, 1989). Pour la production de cals, on utilise généralement des explants dépourvus de méristèmes comme les morceaux de racines, d'hypocotyles ou d'entre-nœuds (Eric, 2003 ; Richard, 2005). dans un milieu renforcé par des régulateur de croissance (Dubois, 1989 ; Rousselle et al., 1996).

Cependant, les embryons zygotiques et les méristèmes sont souvent utilisés pour la production de cals embryogènes. Il y a plusieurs catégories de cals qui se distinguent par :

- Couleur ; Aspect: lisse ou noduleux et Consistance: compact ou friable

D'après Murashige (1974), les caractéristiques de l'explant initial qui influencera les capacités de callogenèse sont :

- L'espèce est le génotype de la plante mère.
- L'âge est la position de l'organe sur la plante mère.
- La nature de l'organe dont il est issu.
- La taille de l'explant.

Les spécialistes arrivent à distinguer d'après l'aspect du cal sa capacité à régénérer des plantules par:

- **Organogenèse**: ce sont des cals qui sont capables, dans des conditions de milieu favorables, de former des bourgeons. Ces derniers peuvent alors être excisés pour former des plantes entières. Ce sont des cals organogènes.
- **Embryogenèse somatique**: ce sont des cals capables de former des embryons somatiques.

### 1.2.3. Origine de la variation somaclonale

- Des variations peuvent s'accumuler au sein des cals suite aux nombreuses divisions anarchiques et probablement sous l'effet de régulateurs de croissance agressives comme le 2.4D ou la BAP.
- Des variations préexistantes au niveau des cellules de l'explant: les cellules embryonnaires ou méristématiques sont en général conformes, mais les cellules différenciées comprennent des variations dont la fréquence dépend du génotype, de l'âge, du tissu et des conditions de culture. La variatonsomaclonale peut être trouvée se forme:

**Génotypique** : génétiquement stable, circulant aux prochaine générations (**Parrot et al., 1992**), permet l'isolations des mutations stables, déterminée dans les conditions de laboratoire ou après le renouvellement des plantes, il est utilisé dans les programmes de l'amélioration des plantes (**Kole , 2006**).

elle résulte selon (**EL Hamdouni et al., 1999**) par :

-changement dans le nombre de chromosome :

-Aspect multitude des ploïdes. Aspect inhabituel des ploïdes.

-changement dans la structure de chromosome et qui se produit par divers mécanisme :

\*la coupure du chromosome en deux parties et ce par cassure interne.

\*élimination d'un fragment intermédiaire du chromosome.

\*transfert des fragments de chromosome entre les chromosomes asymétriques.

\*les fragments du chromosome prennent une situation inverse par rapport à sa position originale à l'intérieur du chromosome.

\*changement dans le nombre des nucléotides.

\*mutations cytoplasmique.

**Phénotypique** : épidémique non stable et éteint après la production sexué (**Skivin et al., 1994**), et ce par trouble physiologique ou l'amplification génique (**Kole, 2006**).

### 1.2.4. Nature des variations somaclonales

Les variations somaclonales sont des modifications qui touchent le génome nucléaire ou cytoplasmique par:

- Mutations ponctuelles
- Modifications de séquences: délétions, additions ou inversions de séquences.
- Polyploidie
- Aneuploïdie

### 1.2.5. Type de variation somaclonale

Selon **Evans et al (1984)** il existe deux types de variation somaclonales :

- **Variations héritables:** Est stable à travers le cycle sexuel ou renouvelée à travers une propagation asexuée.
- **Variations épigénétiques :** Sont dues à l'environnement physico chimique de la culture c'est-à-dire: Composition du milieu devenue mal adaptée avec l'allongement du temps de culture: épuisement de certains éléments, acidité, pression osmotique etc...

Les variations épigénétiques disparaissent en général après le repiquage ou sevrage.

Elles ne se transmettent pas à la descendance.

Elle peut être instable même quand elle est propagée asexuellement.

La variation somaclonale bien qu'elle constitue un inconvénient quand on cherche la production conforme peut être une source très utile pour l'amélioration des plantes (**Kacem, 2005**).

### 1.2.6. Facteurs ayant une action sur la variation soma clonale

#### 1.2.6.1. Matière végétale

On peut obtenir une variation somaclonale à partir du cal formé, de n'importe quelle partie de la plante ; feuille, tige et racine..., mais l'influence reste liée à la nature de chaque partie de la plante, et l'aspect physiologique (**Filippone et al., 1992 ; Robert et al., 1994**).

Le génotype flexible ainsi que l'espèce ont une importance rôle dans l'apparition de la modification génétique (**Demarly et Sibi, 1989**). par ailleurs le nombre de chromosome se reflète sur la moyenne et la qualité de la variation qui se produit, on observé que la variation génétique se fait boucaux dans les individus multiploïde par rapport les monoploïde et diploïde (**Yeoman, 1986**).

### 1.2.6.2. Duré de la culture de tissus

La durée de la culture de tissus influe sur la variation somaclonale, par ce que la moyenne des mutations liée par le nombre des transformations dans les conditions de laboratoire (Demarly et Sibi, 1989). La lente croissance stimule la production de nombreuse variation somaclonale (Wang *et al.*, 1994).

### 1.2.6.3. Composite de milieu de culture

La composite de milieu de culture considéré comme un facteur important dans la formation du variation somaclonale (Angela, 1995) ; parce que la production des cals lié de première classe avec le balance de régulateur de croissance, et qui différencie selon la nature de l'explant et le variété étudié (Andre *et al.*, 2003), lorsque les programmes morphogénétiques différencies selon le pourcentage de cytokinine/ auxine, à travers le balance hormonale on peut obtenus sur la forme organique (Akbar et Hakoomat, 2004),

Les cytokinines synthétiques (comme la BAP) et des auxines synthétiques fortes (comme le 2.4D). Le travail de régulateur de croissance exactement dans l'événement des modifications somaclonales reste inconnu (Charlotte *et al.*, 1987).

### 1.2.6.4. Le génotype

La fréquence des variations somaclonales dépend de l'espèce et même de la variété ou du cultivar. Par exemple le bananier montre beaucoup de variations.

### 1.2.6.5. La technique

En général les techniques de multiplication basées sur l'utilisation d'un méristème préexistant (culture de nœuds, de méristèmes) ne permettent pas la formation de variants.

Toutes les techniques qui nécessitent des néoformations directement sur l'explant ou par l'intermédiaire d'un cal présentent un risque de variation. Ces techniques impliquent l'organogenèse directe ou sur cal et l'embryogenèse somatique.

Les variants sont très fréquents parmi les plantes régénérées à partir de protoplastes

### 1.2.7. Avantages de la variation somaclonale

- un grand nombre de mutations
- source de la diversité qui utilisé par fois dans la sélection et l'amélioration des plantes.
- peu coûteux par rapport à l'hybridation somatique et la transformation génétique.
- N'est pas important de savoir la base des changements génétiques qui se produisent (Eric, 2003 ; Angela, 1995).

- Certaines variations somaclonales peuvent s'avérer intéressantes et enrichir la base génétique de la plante.
- En effet, certains variants sont résistants à certains stress comme la salinité, la sécheresse ou certains pathogènes.

### 1.2.8. Inconvénients de la variation somaclonale

- l'absence de contrôle sur la quantité, le lieu et l'importance des mutations qui se produisent, et les facteurs qui la concernent.
- l'émergence de changement inattendu.
- faible stabilité des caractéristiques obtenues et qui disparaissent prochainement.
- obtenir les caractéristiques de la plante désirée un peut être garantie.
- dans un nombre de plante améliorée, l'analyse et le contrôle de la variation somaclonale reste difficile (**Eric, 2003 ; Angela, 1995**).
- La variation somaclonale est un facteur limitant pour le clonage commercial.
- Certaines techniques très rentables comme l'organogenèse ou l'embryogenèse somatique ont encore un impact commercial limité à cause du risque de variations.
- Ces techniques sont choisies lorsque les techniques de multiplication conformes sont difficiles (palmier dattier) ou impossibles (palmier à huile).

## 2. Culture de méristème et de bourgeons

### 2.1. Définition

Les méristèmes sont des zones de cellules à divisions intenses, situés au cœur des bourgeons et des extrémités de racines et à l'origine des tiges feuillées ou du système racinaire. (**Espinosa et al., 1992**). Cette technique est utilisée pour obtenir des plantes saines à partir des plantes viros(**Auge, 1992**), surtout si il est associé à la thérapie (culture à température élevée, pour favoriser l'élimination des virus) (**Griffiths et al, 1990**).La culture de méristèmes est une technique délicate et ne peut pas être considérée comme une technique de multiplication. Mais c'est une étape essentielle à la multiplication de matériel assaini.

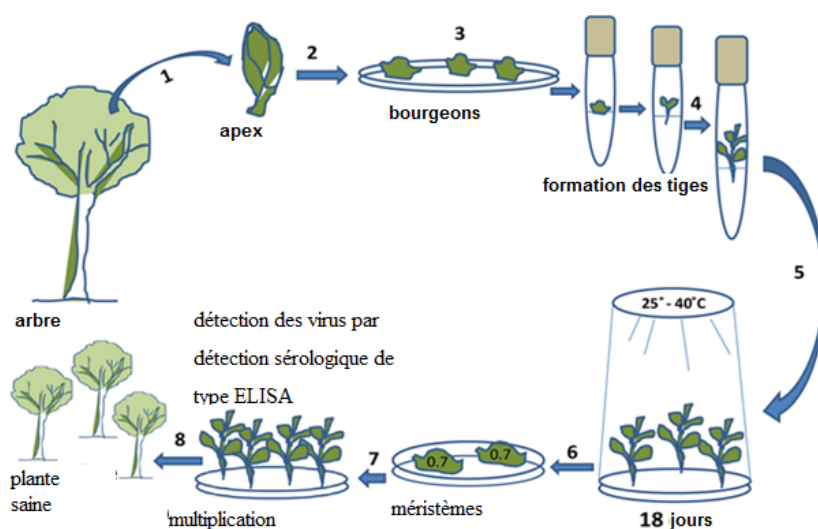
### 2.2. Technique de la culture de méristème

- L'isolement des méristèmes se fait sous loupe binoculaire avec lumière froide pour éviter la dessiccation.
- La taille du méristème prélevé est de l'ordre de 0,2 à 0,5 mm.
- En général plus le méristème prélevé est grand plus la probabilité de survie augmente et celle de l'assainissement diminue.

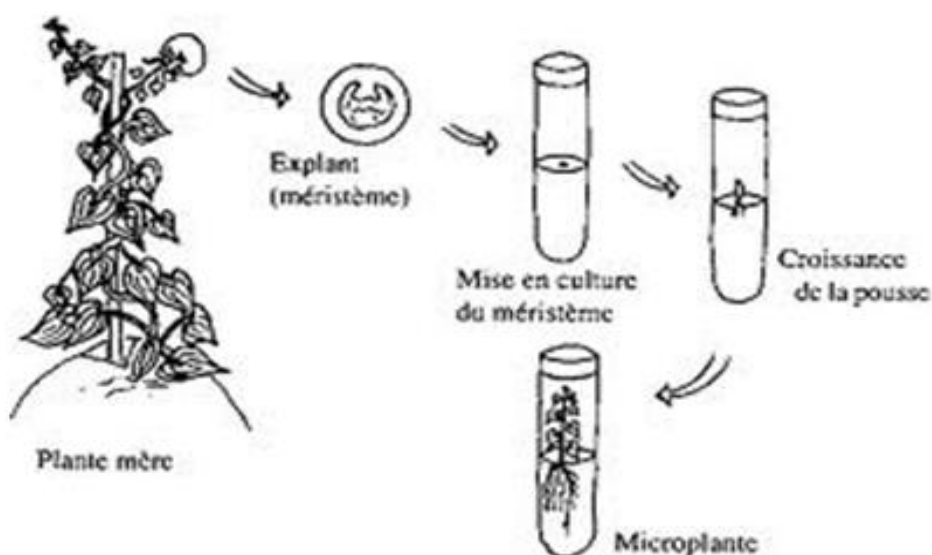
- La combinaison de la culture de méristèmes avec la thermothérapie permet d'augmenter la chance de réussite **figure 2**.

- Méristèmes sont cultivés sur milieu MS additionné de phytohormones.

- La détection des virus peut se faire soit par indexage en greffant la plante supposée infectée sur des plantes indicatrices sensibles ou par détection sérologique de type ELISA ou Dot-ELISA (**figure 3**).



**Figure 2.** Culture de méristèmes avec la thermothérapie et la détection des virus par détection sérologique de type ELISA.



**Figure 3.** Régénération des plantes à partir la culture de méristème

### 2.3. Avantages de la culture de méristème

- La culture de méristèmes permet le sauvetage des variétés virosées menacées.

- Elle concerne essentiellement les plantes à reproduction par voie végétative tels la pomme de terre, le fraisier, ...etc.
- Les plantes produites sont saines: sans virus, champignons et bactéries et répondent aux normes phytosanitaires d'échanges internationaux de plus en plus draconiennes.
- Les plantes assainies ont une vigueur accrue, et des qualités de floraison et de fructification restaurées.

### 2.4. Limites de la culture de méristème

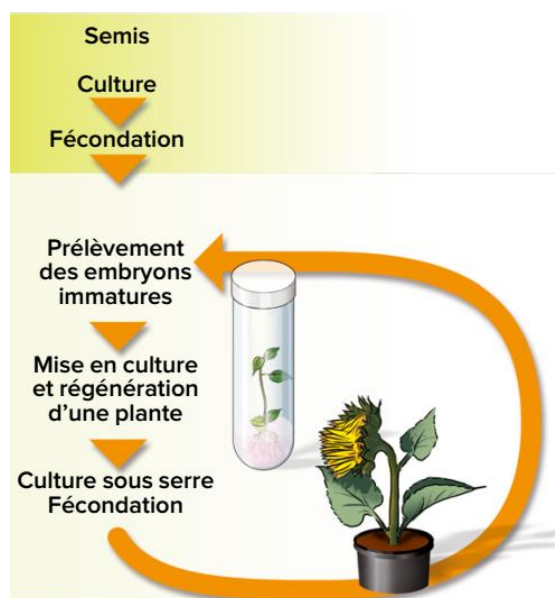
- Les plantes obtenues sont indemnes de virus mais ne sont pas devenues résistantes aux virus. Elles peuvent être recontaminées via des insectes ....

## 3. Culture d'embryons

### 3.1. Culture d'embryons immatures

Les embryons sont prélevés quelques jours après la fécondation et non à maturité de la graine. La survie et le développement de ce dernier ne sont alors possibles que par prélèvement et repiquage sur un milieu de culture approprié (**Branchard, 1984**). Un très jeune embryon risque d'avoir une croissance perturbée et plus lente, contrairement à un embryon plus développé qui est par ailleurs plus facile à prélever.

Les embryons sont ensuite mis en culture pour régénérer une plante entière.



**Figure4.** Cycle de sélection avec culture d'embryons immatures

#### 3.1.1. Avantages de la culture d'embryons immatures

- Réduire fortement la dormance des graines fraîchement récoltées, et ainsi d'assurer un développement homogène des embryons.

- permet d'éviter la phase de maturation et à la levée de dormance des graines (Alissa *et al*, 1986 ; Azpiroz *et al*, 1987).
- permet un gain de temps, par réduction de la durée entre deux générations.

### 3.2. Sauvetage d'embryons interspécifiques

Lors de croisements interspécifiques, des barrières naturelles empêchent le développement complet de l'embryon. Pour remédier à cette situation, on pratique après fécondation un prélèvement précoce des embryons pour les mettre en culture sur un milieu artificiel nutritif (GNIS pédagogie).

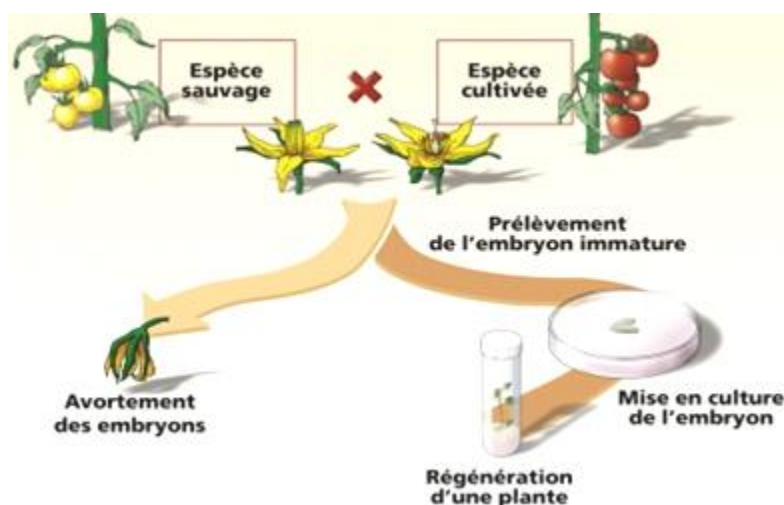


Figure 5. Sauvetage d'embryons interspécifiques chez la tomate

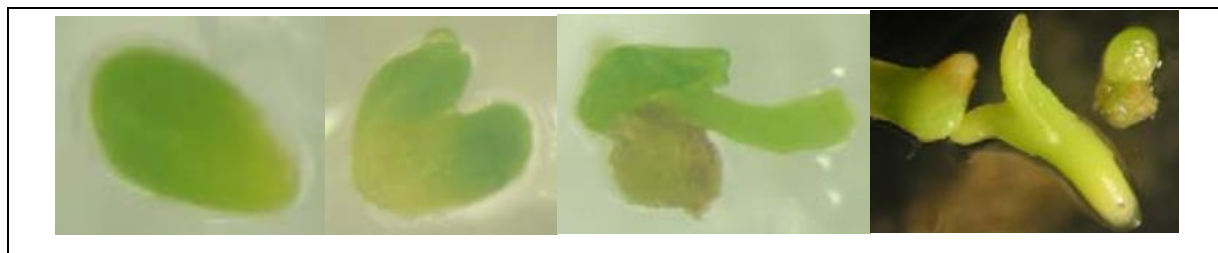
### 3.3. Embryogenèse somatique

#### 3.3.1. Principe de l'embryogenèse somatique

L'embryogenèse somatique est la formation d'embryons à partir de cellules somatiques (non issues de la fusion des gamètes) permet de générer un embryon à partir d'un cal ou de suspensions cellulaires. Ces embryons peuvent se développer à partir des cellules à  $2n$  chromosomes issues de tissus, organes ou cellules isolées.

Le développement de l'embryon ressemble étroitement à celui de l'embryon zygotique à la fois morphologiquement et physiologiquement avec : l'existence d'un axe polarisé terminé par un méristème de tige et un méristème de racine.

Son développement s'effectue selon une séquence de stades définis dont les principaux sont : le *stade globulaire*, *cordiforme*, *torpille*, et *cotylédonaire* (figure 6).



**Figure6.** Stades de développement successifs au cours de l'embryogenèse (de gauche à droite): globulaire, cordiforme, torpille, cotylédonaire (*INRA Dijon, S Ochatt*)

### 3.3.2. Induction de l'embryogenèse somatique

L'explant dans un premier temps placé dans un milieu primaire **contenant de l'auxine** pour la différenciation (former des amas globulaires ou amas proembryogène). (Cellules de ces amas sont caractérisées par un cytoplasme dense et une taille réduite).

Après cette période d'initiation embryonnaire, le transfert dans un milieu secondaire **sans auxine** permettra le développement des embryons somatiques.

Ces structures sont hautement organisées et consistent soit en primordia racinaires soit en tissus méristématiques capables de régénérer des pousses feuillées et des racines (**Cure et Mott, 1978 ; Wernicke *et al.*, 1982**) **figure7.**

### 3.3.3. Modèles de l'embryogenèse somatique :

#### 1. Embryogenèse somatique directe

Dans ce cas, l'embryon apparaît directement sur l'explant mis en culture.

Ces embryons sont issus de cellules déjà prédéterminées.

L'environnement *in vitro* sert uniquement à déclencher le processus de divisions organisées menant à l'embryogenèse.

L'embryon peut se former au sein d'une masse qui peut être assimilée à un cal.

Sur le plan histologique cette masse est formée presque entièrement de proembryons.

Ce cas est généralement considéré comme faisant partie de l'embryogenèse directe.

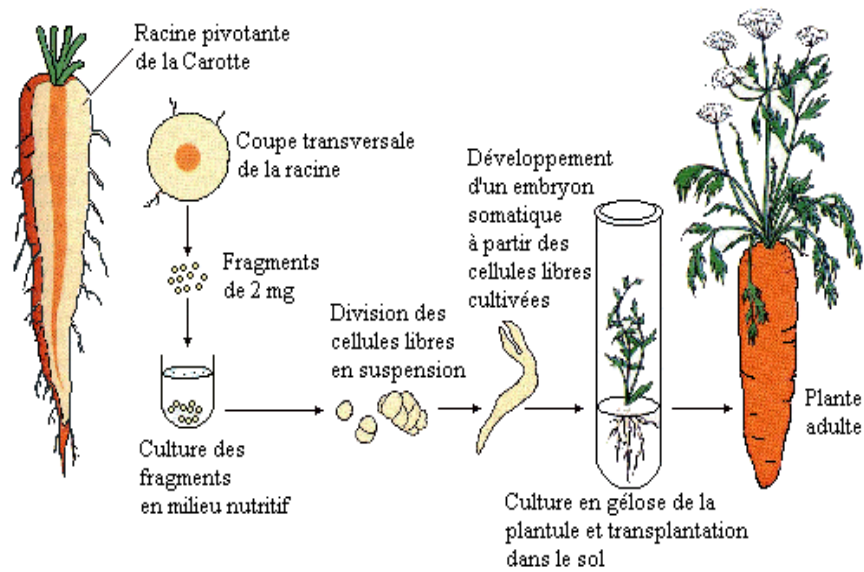


Figure7. Induction de l'embryogenèse somatique directe

## 2. Embryogenèse somatique indirecte

Dans ce cas, une phase intermédiaire de callogénèse est nécessaire à l'embryogenèse.

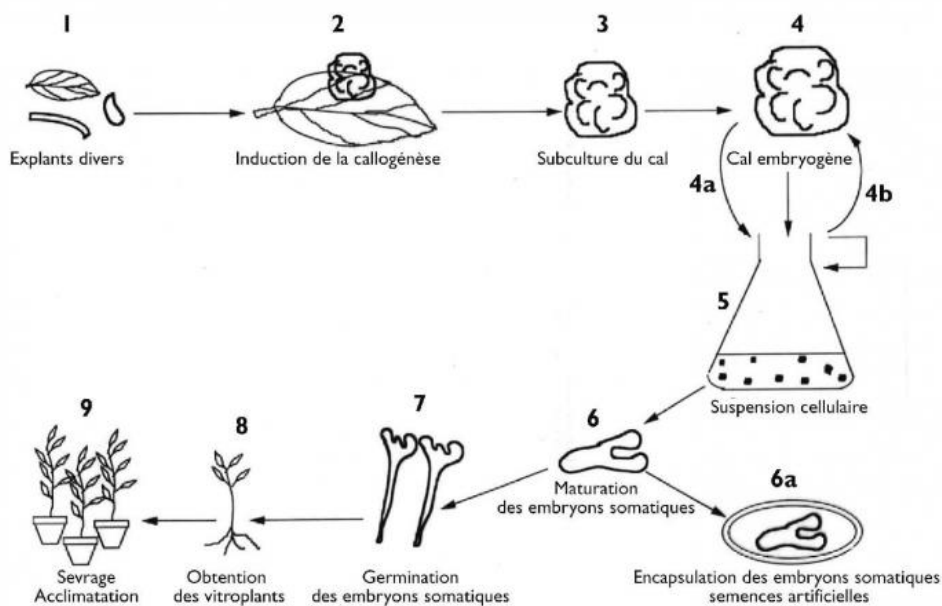


Figure8. Induction de l'embryogenèse somatique indirecte

### 3.3.4. Maturation et conservation des embryons somatiques

Malgré l'abondance des embryons au stade globulaire et cordiforme, rare sont ceux qui atteignent les stades supérieurs.

Les populations d'embryons ne sont pas uniformes, les embryons somatiques peuvent être transformés en semences artificielles. Ils sont enrobés par un gel composé d'alginate avec les éléments nutritifs nécessaires à la germination de l'embryon. L'ensemble est protégé de dessiccation par un film de résine soluble dans l'eau (polyox) (Kitto et Janick., 1985).

La durée de conservation est actuellement faible mais pourrait s'allonger par l'induction de la dormance. Actuellement les graines artificielles ne peuvent être conservées, à l'état humide et au froid, qu'une huitaine de jours. Il reste donc de nombreux problèmes à résoudre.

### 3.3.5. Avantage de l'embryogenèse somatique

- utilisée pour une production industrielle (culture des cellules en bioréacteur), car les embryons peuvent être induits à partir de cellules cultivées en suspension. Donc une technique de multiplication s'adapte à l'automatisation, ce qui permet de réduire les coûts de production.
- Le rendement en plantes produites est très élevé.
- Les embryons obtenus sont d'origine unicellulaire, il n'y a donc pas de problème de chimères.
- bon moyen pour produire des clones d'individus élites chez les ligneux.
- l'embryogenèse somatique est souvent utilisée pour le clonage surtout pour les espèces pour lesquelles le microbouturage est difficile voire impossible.
- C'est une technique très productive surtout en suspensions cellulaires.
- Les manipulations sont donc simplifiées par rapport à la micropropagation traditionnelle qui nécessite plusieurs milieux différents pour le développement des tiges et des racines et l'obtention de plantules complètes.
- les embryons peuvent être transformés en semences artificielles.

### 3.3.6. Inconvénients de l'embryogenèse somatique

- L'induction du potentiel embryogène et la régénération restent souvent difficiles.
- Le passage par cal peut amener des risques de dérive génétique.
- Mains d'œuvre qualifiée.
- Cout élevé.

### 4. Culture de protoplastes et hybridation somatique

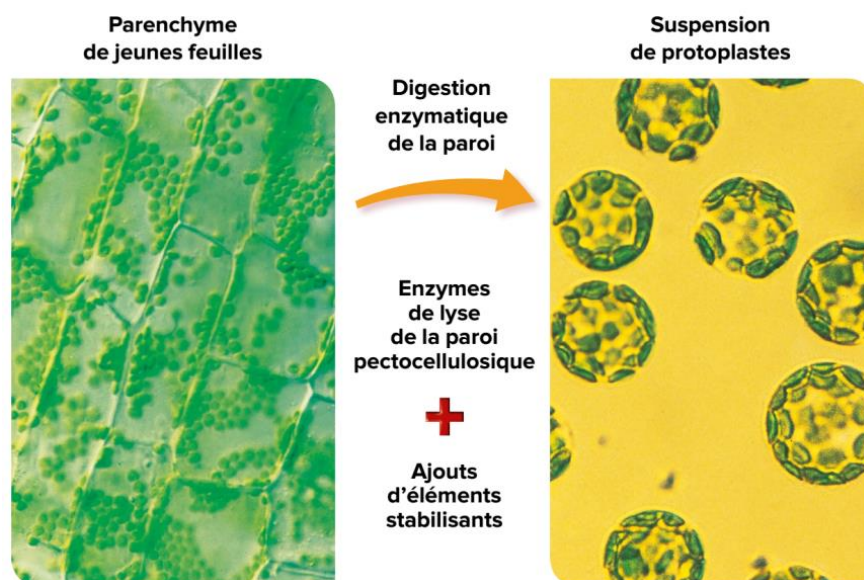
#### 4.1. Culture de protoplastes

##### 4.1.1. Définition de protoplastes

Les biologistes ont constaté, au cours des manipulations cellulaires, que l'on pouvait obtenir des agrégations entre des cellules débarrassées de leurs parois pecto-cellulosiques appelées protoplastes (**Demarlyet Sibi, 1996**). Un protoplaste est une cellule de plante, bactérienne ou fongique, qui a eu sa paroi cellulaire entièrement ou partiellement éliminée à l'aide de moyens, soit mécaniques, soit enzymatiques.

##### 4.1.2. Obtention de protoplastes

Les protoplastes peuvent être obtenus à partir de n'importe quel tissu végétal, mais ce sont généralement les parenchymes des jeunes feuilles (**figure9**).



**Figure 9.** Obtention de protoplastes

##### 4.1.2.1. La plasmolyse

Les agents plasmolysants les plus couramment utilisés et qui fournissent les meilleurs résultats sont le mannitol et parfois le sorbitol. Mannitol est considéré comme métaboliquement inerte, il s'infuse très lentement à l'intérieur du protoplaste (**Tage, 1986**). Il est généralement utilisé à une concentration allant de 0.4 à 0.8 moles (**Arthur et al, 1988**). Lorsque la plasmolyse est complète, les protoplastes prennent une forme arrondie à l'intérieur du cadre pectocellulosique, ils peuvent alors être libérés.

### 4.1.2.2. Digestion enzymatique

On peut séparer les cellules d'un tissu végétal grâce à l'action d'enzymes (généralement extraites de champignons), qui dégradent la cellulose et les matières pectiques de la paroi (Pectinase, Cellulase);

Des agents stabilisants tels que des sucres ou des sels minéraux en concentrations déterminées sont ajoutés au milieu pour empêcher l'éclatement de la cellule. On obtient ainsi des cellules « déshabillées », qui deviennent sphériques : les protoplastes (**figure 10**).



**Figure 10.** Obtention de protoplastes (**Digestion enzymatique**)

### 4.1.2.3. Obtention mécanique

L'isolement de protoplastes s'adresse à des tissus à cellules allongées et consiste à effectuer des coupes perpendiculairement à la longueur.

-Si on sectionne des cellules en milieu hypotonique, la cellule meurt et la plupart des organites se désagrègent.

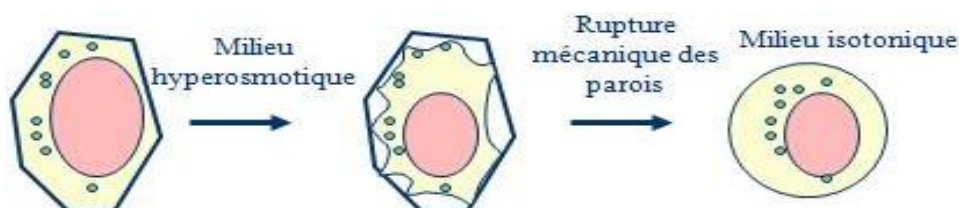
-En maintenant les tissus dans des conditions isotoniques bien précises, on peut récupérer des organites intacts. C'est ainsi que l'on peut obtenir des préparations homogènes de mitochondries ou de chloroplastes.

-Si on augmente la pression osmotique du milieu, on obtient la plasmolyse des cellules et une séparation physique de la membrane plasmique et de la paroi. On observe alors de protoplastes "*in situ*".

-Lorsqu'on sectionne transversalement le tissu, deux situations sont possibles:

A- La section passe par l'espace de rétraction. Le protoplaste intact peut sortir du cadre pariétal ainsi que divers subprotoplastes.

B- La section lèse le protoplaste. Seuls des subprotoplastes et des vacuoles sont libérés (**Figure 11**).



### Figure11. Obtention de protoplastes (mécanique)

#### 4.1.3. Culture de protoplaste

La culture sur milieu semi solide peut être conduite sous deux formes :

La suspension de protoplastes peut être distribuée sous forme d'une fine couche à la surface du milieu semi solide (Razdan,2003).cette méthode stimule la formation de colonies cellulaires, surtout lorsqu' un papier filtre est intercalé entre les deux couches semi solide et liquide (Davey, 2004).La solution de protoplastes doublement concentrée est délicatement mélangée à un même volume (généralement 2 ml) d'un milieu de culture comprenant deux fois sa concentration finale en agent gélifiant (Chawla, 2002)

L'agarose est généralement la plus utilisée, son avantage majeur réside dans sa température de gélification (approximativement 45°C) qui est inférieure à celle de l'agar évitant ainsi aux protoplastes cultivés de subir un choc thermique (Davey, 2005)

L'utilisation des milieux semi solides permet la fixation des protoplastes et donc l'obtention de clones issus de cellules individuelles, ceci se traduit par un coefficient de division plus réel (Chawla, 2002).

Toutefois la combinaison de milieux liquide et semi solide peut être envisagés. Le milieu gélifié dans lequel sont incrustés les protoplastes peut être coupé en petits blocs que l'on peut placer dans un milieu liquide de même constitution, l'ensemble étant soumis à une faible agitation, selon TAGE (1986) ceci stimule le développement des protoplastes.Cette méthode permet aussi de réduire la pression osmotique en changeant le milieu liquide ou baignent les blocs de milieux solidifiés contenant les protoplastes ou cellules (Davey et al., 2005).

#### 4.1.4. Intérêt des protoplastes

Comme elles n'ont plus de paroi, ces cellules se prêtent à divers types d'expérimentation :

- Introduction de matériel génétique étranger,
- Fusion inter-spécifique,
- Etude électrophysiologique de la membrane plasmique,

#### 4.2. Hybridation somatique (Fusion de protoplastes)

La fusion de protoplastes conduit à une hybridation des noyaux, mais aussi à celle des cytoplasmes. Ceci est très intéressant pour le transfert et l'amélioration de caractères à **hérédité cytoplasmique**, comme la stérilité mâle. On parle d'hybridation somatique (car issue de cellules non reproductrices de la plante, Soma = corps).La fusion de deux ou de plusieurs protoplastes

aboutit à l'addition totale de trois compartiments héréditaires: **nucléaire, mitochondrial et chloroplastique**, Cette addition accroît le niveau de ploïdie (Gleba et Hoffmann, 1980).

Les protoplastes sont des cellules chargées négativement et la fusion spontanée n'est que très rarement observée.

### 4.2.1. Fusion par méthodes chimiques

On peut neutraliser la charge électrique des protoplastes par des cations  $\text{Ca}^{2+}$  et un pH élevé. Ensuite, on utilise le polyéthylène glycol (PEG) qui provoque une forte agrégation des cellules et déstabilise la membrane plasmique. Après retour aux conditions initiales, les protoplastes fusionnent.

### 4.2.2. Fusion par méthodes électriques

Cette technique, l'électro fusion, plus récente, utilise des champs électriques intenses et de courte durée, qui en déstabilisant les membranes entraînent la fusion des protoplastes.

La dernière étape consiste à induire la division des cellules. Elle aboutit à la formation de cals. Ensuite, la différenciation des tissus est provoquée pour reformer une plante entière (figure12).

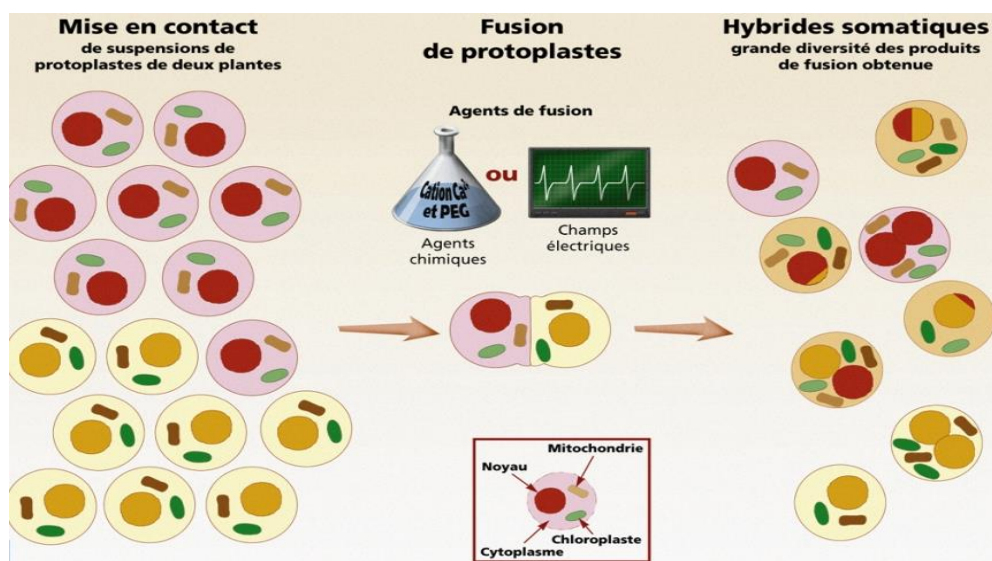


Figure 12. Hybridation somatique

### 4.2.3. Diversité des produits de fusion des protoplastes

Lors de la fusion des protoplastes, divers événements peuvent avoir lieu : **homofusions**, **hétéro-fusions** ou des **fusions partielles**.

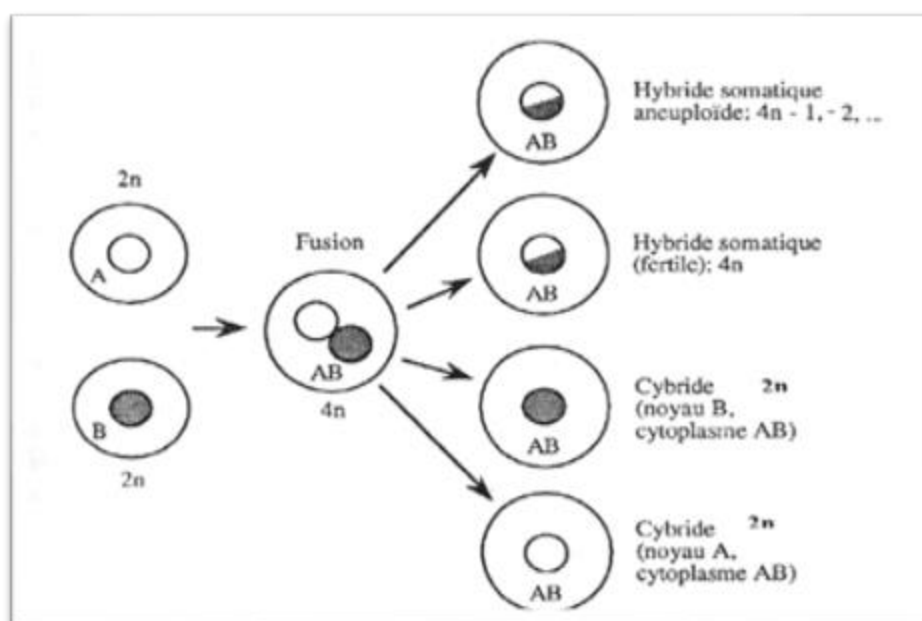
Pour les populations de protoplastes fusionnés par couple, toute une gamme d'événements peut se produire :

1. Pour le génome nucléaire, ou bien un seul noyau parental va être conservé (cybride), ou bien les deux noyaux vont fusionner. Dans ce dernier cas, soit tous les chromosomes seront

conservés (hybrides somatiques **symétriques**), soit il se produira le plus souvent une élimination partielle de l'un des génomes dans cette fusion (hybrides somatiques **asymétriques**).

2. Pour le génome chloroplastique des plantes supérieures qui est constitué d'une population de molécules circulaires de même taille, le maintien d'un état hétéroplasmique est fugace, et les plantes régénérées possèdent, dans pratiquement tous les cas, l'un ou l'autre type de chloroplastes.
3. Pour le génome mitochondrial des végétaux qui est constitué de molécules très hétérogènes de nouvelles molécules d'ADN sont produites par recombinaison entre des sites homologues (**Palmer et Shields, 1984**).

Après la fusion, le génome mitochondrial pourra se réorganiser : soit une seule population parentale sera conservée, soit il y aura recombinaison de l'ADN mitochondrial, et il semble que ce soit les cas le plus fréquent (**Belliard et al., 1979**).



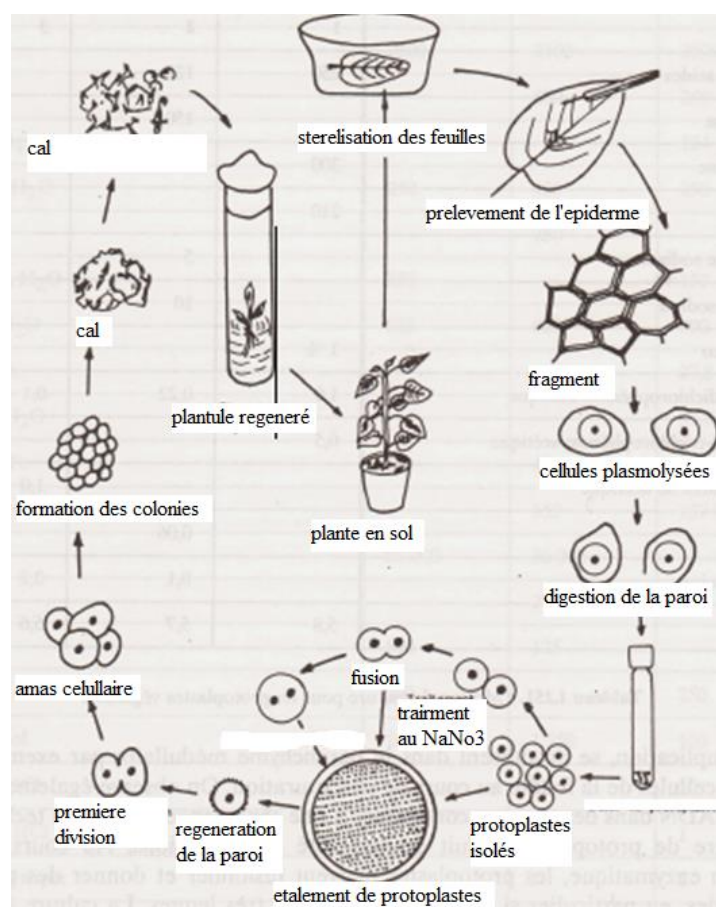
**Figure 13.** Divers comportements de produits de fusion entre protoplastes (**Auge et Boccon-gibod, 1989**).

### 4.2.4. Avantages

On peut travailler sur un nombre de chromosomes diminué de moitié.

On peut rassembler, en peu de temps, au sein d'un même individu tétraploïde un ensemble de plusieurs caractères intéressants (ce qui est quasiment improbable en sélection traditionnelle) (**boccon-gibod et jalouzot, 1989**).

L'introduction de caractères mono ou oligogéniques (en particulier la résistance à une maladie ou à un prédateur) par transfert d'ADN dans des protoplastes à l'aide d'agrobactéries (**Ellouz et al., 1994**).



**Figure 14.** Schéma de l'isolement, de la fusion et de la culture de protoplastes.

Les protoplastes peuvent constituer un intéressant système expérimental pour étudier la formation de parois ainsi que les facteurs contrôlant son organisation moléculaire et sa texture (**Toshiyuki, 1970 ; Roland, 1973**).

### 5. Culture cellulaire isolée (support solide et en agitation)

Avec l'avancement de la technologie, il est possible aujourd'hui non seulement de cultiver des cellules individuelles, mais aussi d'induire la division cellulaire et d'en faire sortir une plante entière. L'avantage d'une culture cellulaire isolée sur culture de cal ou de suspensions cellulaires ou culture d'organes intacts est que le système de culture cellulaire unique est un système idéal pour étudier le métabolisme cellulaire, l'effet de diverses substances sur les réponses cellulaires et obtenir un clone cellulaire unique. Les cellules libres dans les cultures permettent une administration et un retrait rapide de divers produits chimiques ou substances, ce qui en fait des cibles faciles pour la sélection des mutants.

### 5.1. Définition de la culture cellulaire isolée

La culture de cellules individuelles est une méthode de culture de cellules isolées sur un milieu nutritif dans des conditions contrôlées.

### 5.2. Principe de la culture cellulaire unique

Le principe de base de la culture cellulaire unique est l'isolement d'un grand nombre de cellules vivantes intactes et les cultiver sur un milieu nutritif approprié pour la croissance et le développement requis. Les cellules individuelles peuvent être isolées à partir d'une variété de tissu et d'organe de plante verte ainsi que de tissu calleux et de suspension cellulaire.

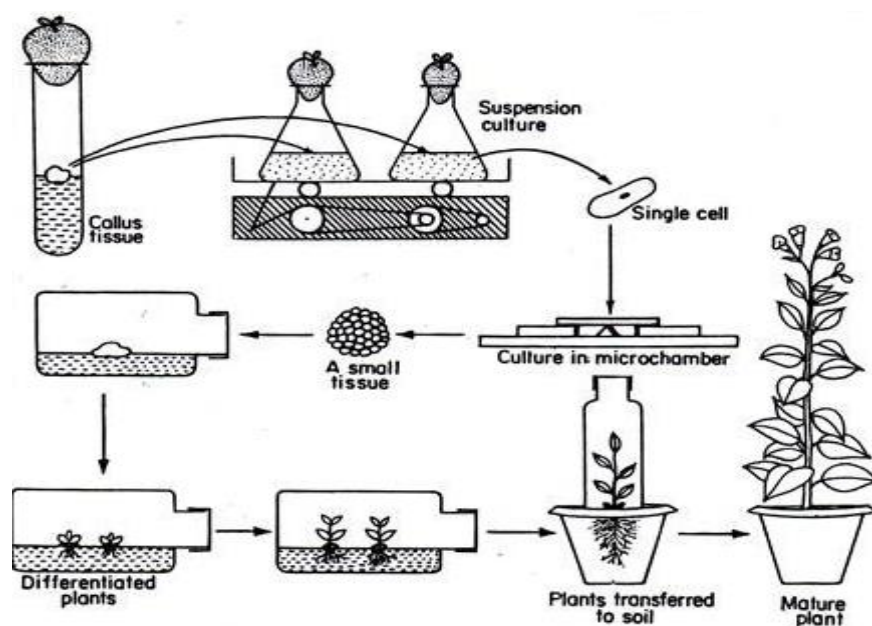


Figure15. Principe de la culture cellulaire unique (*Tabac*)

### 5.3. Méthodes d'isolation cellulaire unique

#### 5.3.1. De l'organe de la plante:

Le matériau le plus approprié pour l'isolement de cellules individuelles est le tissu foliaire, car une population plus ou moins homogène de cellules dans les feuilles offre de bons candidats pour élever une culture cellulaire à grande échelle définie et contrôlée. A partir de tels organes végétaux intacts, des cellules uniques peuvent être isolées en utilisant des méthodes mécaniques ou enzymatiques.

### 5.3.1.1. Méthode mécanique:

L'isolation mécanique consiste à déchirer ou à hacher l'explant stérilisé en surface pour exposer les cellules, puis à mettre les cellules au rebut avec un scalpel fin pour libérer les cellules individuelles en espérant qu'elles ne sont pas endommagées. **Gnanam et Kulandaivelu (1969)** ont développé une procédure pour isoler les cellules mésophylles, actives dans la photosynthèse et la respiration, des feuilles matures de plusieurs espèces de dicotylédones et de monocotylédones.

La procédure implique une macération modérée de 10 g de feuilles dans 40 ml de milieu de broyage (20  $\mu$  mol de saccharose, 10  $\mu$  mol de  $MgCl_2$ , 20  $\mu$  mol de tampon tris-HCL, Ph7,8) avec un mortier et un pilon.

L'homogénat est passé à travers deux couches de tissu de mousseline et les cellules ainsi libérées sont lavées par centrifugation à basse vitesse en utilisant le même milieu.

L'isolement mécanique des cellules parenchymateuses libres peut également être réalisé à grande échelle.

### 5.3.1.2. Méthode enzymatique:

**Takebe et al. (1968)** ont traité du tissu de feuille de tabac avec de l'enzyme pectinase et obtenu un grand nombre de cellules métaboliquement actives. Le sulfate de dextrane et de potassium dans le mélange d'enzymes a amélioré le rendement en cellules libres.

L'isolement de cellules individuelles par la méthode enzymatique a été trouvé commode, car il est possible d'obtenir des rendements élevés à partir de la préparation du parenchyme spongieux avec un minimum de dommages ou de lésions des cellules. Ceci peut être accompli en fournissant une protection osmotique aux cellules tandis que le macerozyme enzymatique dégrade la lamelle moyenne et la paroi cellulaire du tissu pranchymateux.

L'application de la méthode enzymatique aux céréales (*Hordeumvulgare*, *Zeamays*) s'est avérée plutôt difficile car les cellules mésophylles de ces plantes sont apparemment allongées avec un nombre de constriction imbriquées, empêchant ainsi leur isolement.

### 5.3.2. A partir de tissu de culture:

L'approche la plus largement appliquée consiste à obtenir un système à une seule cellule à partir de tissus cultivés. Des morceaux fraîchement coupés d'organes végétaux stérilisés en surface sont simplement placés sur un milieu nutritif constitué d'une proportion appropriée d'auxines et de cytokinines pour initier des cultures.

Explanter sur un tel milieu callusing aux extrémités coupées, qui s'étend progressivement à la surface entière du tissu. Le cal est séparé d'un explant et transféré sur un milieu frais de la même composition pour lui permettre de constituer un tissu de masse.

Une sous-culture répétée sur un milieu gélosé améliore la friabilité du cal, pré-requis pour élever une fine suspension cellulaire dans un milieu liquide.

Le morceau de cal indifférencié et friable est transféré dans un milieu liquide agité en continu constitué d'un flacon ou de flacons appropriés.

L'agitation est faite en plaçant le milieu de culture exerce une légère pression sur les petits morceaux de tissu, les brisant en cellules libres et en agrégats de petites cellules.

En outre, il augmente l'échange de gaz entre le milieu de culture et l'air de culture et assure également une distribution uniforme des cellules ainsi que des grumeaux dans le milieu.

### 5.4. Facteurs affectant la culture cellulaire unique:

1. La composition du milieu pour la croissance d'une culture cellulaire unique est généralement plus complexe que la culture de cals et de cellules en suspension. Par exemple, les cellules de *Convolvulus* nécessitent une cytokinine et des acides aminés qui ne sont pas nécessaires pour la culture de cal de cette espèce.
2. L'induction de la division de cellules individuelles en utilisant la technique du radier en papier indique que les cellules isolées reçoivent le nutriment essentiel exact de la masse de cal. Il a été suggéré que la masse de cal lessive l'élément nutritif essentiel à travers la membrane plasmique des cellules.
3. Dans le cas de la technique de placage de boîte de Pétri, la densité de cellules de placage initiale est très critique.

## 6. Culture d'anthère et de pollen= Androgenèse

### 6.1. Définition

Cette technique consiste à prélever des anthères à partir des épis et de les placer sur un milieu nutritif où quelques unes des microspores des anthères se divisent pour former des cals ou des embryons. Ces structures se différencient ensuite pour régénérer un mélange de plantes haploïdes, haploïdes doublées, tétraploïdes, aneuploïdes et mixoploïdes.

### 6.2. Principe d'androgenèse

Repose sur la réorientation de la voie de développement gamétophytique naturel vers la voie sporophytique.

Normalement à l'issue de la méiose, le gamétophyte mâle connaît un nombre limité de mitoses (généralement une mitose) et se stabilise à l'état de grain de pollen, forme de conservation momentanée haploïde de l'espèce, mais si le grain de pollen est placé dans des conditions artificielles particulièrement favorables à sa croissance, la voie sporophytique est déclenché par une mitose du grain de pollen qui se transforme en cal ou en embryon en suivant l'une des deux voies principales d'androgenèse : l'androgenèse directe et l'androgenèse indirecte.

Dans le cas de la **variation gamétoclonale**, c'est l'**androgenèse indirecte** qui est favorisée. La microspore au stade uninucléée médian à tardif va se diviser, ce qui provoque la formation d'un cal haploïde. Des tiges et des racines parfois des embryons secondaires (chez certaines espèces) se différencient sur le cal (**Sangwan et Sangwan-Norrel, 1987 ; Maraschin et al., 2005**).

### 6.3. Étapes de l'androgenèse

L'androgenèse indirecte *in vitro* comporte deux étapes (**Sarrafi et Ghaemi, 1995**).

**Induction** : c'est une phase de développement des microspores (callogenèse). Cette phase implique une bifurcation morphogénétique de la microspore à un stade précis, et un retour à la totipotence de cette cellule gamétique. Pendant le passage *in vitro* des anthères, la population des microspores se divise en deux groupes, un premier dont les microspores dégèrent et un deuxième formé de la faible portion des microspores qui se réorientent vers la callogenèse (**Demarly, 1986**).

**Régénération** : permettant une organogenèse à partir des cals. Les jeunes plantes sont très souvent haploïdes, et se sont des plantes entières chlorophylliennes, albinos ou chimériques.

### Doublement des chromosomes

- Spontané (parfois)
- Utilisation d'agents mitoclasiques
  - Blocage de la polymérisation des microtubules
    - Colchicine
    - Oryzaline (pesticide ou plus précisément une nouvelle substance active herbicide)
- Contrôle de la ploïdie
  - Cytométrie en flux ((CMF) technique permettant de faire défiler des particules, molécules ou cellules à grande vitesse dans le faisceau d'un laser).

### 6.4. Facteurs affectant l'androgénèse

Le taux de succès de l'androgénèse *in vitro* est sous l'influence de nombreux facteurs :

1. Le génotype : Certaines familles, genres, espèces et variétés sont plus « doués » que d'autres pour l'androgénèse. A L'intérieur du genre il ya des différences entre espèces ; A L'intérieur des espèces il ya des différences entre variétés.
2. La variabilité génétique des mitochondries et des chloroplastes.
3. l'état physiologique et de santé des plantes-mères
4. les conditions de croissance des plantes-mères (température, photopériode, spectre lumineux, nutrition minérale, conditions hydriques et humidité relative),
5. le stade de maturité et la viabilité des microspores affectent de façon importante la réussite de l'androgénèse *in vitro*.
6. La densité des anthères par rapport au volume de milieu d'induction utilisé, affecte également la réussite androgénique.

**Roberts-Oehlslager et Dunwell (1990)** ont étudié l'effet de la densité des anthères en culture *in vitro*. Une densité de 60 à 120 anthères par millilitre de milieu d'induction, ce qui est assez élevé, est recommandée.

### 6.5. Applications

C'est une technique utilisée chez le blé, le riz, la pomme de terre, le tabac, le maïs, l'asperge, le piment, etc. et en routine chez le colza, l'orge et l'aubergine. Aujourd'hui de nombreux cultivars de diverses espèces et issus de ces techniques d'haplo-diploïdisation sont déposés chaque année.

### 6.6. Avantages

Cette technique amène un important gain de temps, ce qui permet de mettre plus rapidement sur le marché de nouvelles variétés présentant des avantages pour l'agriculteur, l'industriel ou le consommateur. En effet une plante homozygote est directement obtenue, ce qui évite de faire une dizaine de générations d'autofécondations pour obtenir une lignée pure, état nécessaire aux programmes de sélection végétale. Les plantes obtenues par cette technique sont totalement homozygotes, cela permet de dévoiler des caractères intéressants par l'expression des allèles récessifs habituellement cachés. Ces gènes pouvant être exploités éventuellement. Des recombinants intéressants peuvent ainsi être détectés et exploités, une résistance à une maladie par exemple.

### 7. Culture d'ovaires et d'ovules=Gynogenèse

La régénération de plantes haploïdes à partir des cellules sexuelles semble plus logique par la voie femelle, puisque l'oosphère est destinée naturellement à devenir embryon. Cependant, toutes les tentatives de régénération de plantes à partir de la culture *in vitro* d'un ovule non fécondé, avaient échoué jusqu'aux premiers résultats de **San Nœum. (1976)** qui, cultivant des ovaires d'orges non pollinisés, a obtenu les premières plantes haploïdes issues du développement du sac embryonnaire.

#### 7.1. Définition

Elle correspond à la culture d'ovules ou des ovaires non fécondés. On obtient des plantules ayant un seul stock de chromosomes. Elle a été appliquée avec succès sur un certain nombre d'espèces cultivées : l'orge, le blé, le riz. Chez le maïs l'obtention de plantes haploïdes par cette technique semble difficile. Peu étudié par rapport à l'androgenèse. La culture des ovules est un système expérimental élégant par lequel les ovules sont isolés aseptiquement de l'ovaire et sont cultivés de manière aseptique sur un milieu nutritif chimiquement défini dans des conditions contrôlées.

#### 7.2. Principe:

Un ovule est un megasporangium recouvert d'un tégument. Un ovule contient une mégaspore ou un ovule. Après la fécondation, il se forme un zygote monocellulaire qui conduit finalement à la formation d'un embryon mature possédant des pousses et des primordiums racinaires. La culture *in vitro* des ovules aide à comprendre les facteurs qui régulent le développement du zygote à travers des stades organisés en un embryon mature.

#### 7.3. Protocole de culture des ovules:

1. Recueillir la fleur ouverte. Si l'on désire des ovules fécondés, recueillir les fleurs ouvertes où les anthères sont déhiscentes et où la pollinisation a eu lieu. Pour assurer la fécondation, récoltez la fleur après 48h de déhiscence de l'anthère.
2. Retirer les sépales, pétales, androecium, etc. des ovaires contenant des ovules fécondés ou nonfécondés.
3. Trempez les ovaires dans une solution de NaOCl à 6%.
4. Rincer les ovaires 3-4 fois avec de l'eau distillée stérile.
5. En utilisant une technique stérile, on soulève doucement les ovules à l'aide d'une statuette en forme de cuillère en brisant les funicules au niveau de son tissu placentaire de jonction.
6. La spatule avec les ovules est doucement descendue dans le milieu solide ou liquide stérile lorsque le flacon de culture est incliné d'environ 45 ° C.

7. Ovules endommagés ou non organisés sont rejetés si possible pendant le transfert.

8. Incuber la culture dans l'obscurité ou la lumière à 25 0C.Haut du formulaire

### **7.4. Applications de la Gynogenèse**

La gynogenèse *in vitro* a été étendue à d'autres graminées (riz, blé, maïs), à des composées (gerbera, laitue), à des solanacées (tabac) ainsi qu'à d'autres espèces de grande importance économique (tournesol, betterave à sucre), la pastèque, le pommier, le triticale,

### **7.5. Avantages de la Gynogenèse**

Par rapport à l'androgenèse, les risques d'obtention de plantes albinos sont fortement diminués voire nuls.Utilisée chez les espèces qui sont récalcitrantes à l'androgenèse.

# **Chapitre III. Applications de la culture *in vitro* pour les plantes médicinales**

### Chapitre III. Applications de la culture *in vitro* pour les plantes médicinales

#### Introduction

Le terme culture tissulaire, également appelé culture cellulaire *in vitro* ou milieu de culture stériles, a une grande importance dans les études de base et appliquées. Principalement, il est largement utilisé dans un sens large pour inclure la culture *in vitro* de cellules végétales, de tissus ainsi que d'organes. Aujourd'hui, les applications de culture de tissus végétaux englobent beaucoup plus la propagation clonale. La gamme des technologies de routine s'est élargie pour inclure l'embryogenèse somatique, l'hybridation somatique, l'élimination du virus ainsi que l'application de bioréacteurs à la propagation de masse des plantes (**Gaurav et al., 2018**).

Ce chapitre met en évidence certaines des applications de la culture de tissus végétaux aux plantes médicinales, les réalisations et les limites de la culture de tissus et quelques aperçus sur les développements actuels et futurs possibles.

#### 1. Production des huiles essentielles

Les huiles essentielles, sont un groupe important de produits naturels présentant un intérêt industriel, elles sont par exemple utilisées en parfumerie, comme produit aromatique, comme agent aromatisant dans les aliments et les boissons, dans les produits cosmétiques et comme médicaments (**Mulder-Krieger et al., 1988**). Bien que les cultures de tissus végétaux soient utilisées depuis long temps, leur adaptation pour la production de composés aromatiques n'a commencé que dans les années 1970 (**Hrazdina, 2006**). Les cultures de tissus sont capables de produire des constituants volatils d'huiles essentielles et de nombreux rapports ont été produits à ce sujet (**Mulder-Krieger et al., 1988; Hrazdina, 2006**).

L'utilisation de cultures de tissus dans la production d'arômes a ses avantages, car les cellules végétales, contrairement aux plantes entières, ne sont pas limitées aux emplacements géographiques ou aux saisons. La masse cellulaire peut être doublée relativement rapidement et peut être induite pour la production de composés d'une manière coordonnée. Les composés peuvent être isolés des cellules ou du milieu avec une relative facilité (**Hrazdina, 2006**).

Cependant, les cultures cellulaires présentent également certains problèmes. La production de composés aromatiques ou de leurs précurseurs est en quantités relativement faibles, et donc ce procédé de production est coûteux. Les dépenses supplémentaires sont le coût du milieu et la purification des composés à usage alimentaire. De plus, les cultures cellulaires ne peuvent être utilisées efficacement que dans des systèmes pour lesquels la voie biochimique des composés aromatiques est connue (**Hrazdina, 2006**).

Un facteur généralement compliquant dans la production de composés aromatiques dans un système de culture tissulaire est que la plupart des arômes ne sont pas le résultat de la

### Chapitre III. Applications de la culture *in vitro* pour les plantes médicinales

présence d'un seul composé dans la plante respective, mais sont dus à la présence de multiples composés. Un exemple est la fraise cultivée, dans laquelle 143 composés différents ont été identifiés (Zabetakis and Holden, 1997).

**Tableau 1.** Production d'huile essentielle et de composés apparentés en culture cellulaire

Espèces	Famille	Origin d'explants	Milieu de culture	Type de Culture	Conditions de culture	Constituents produits	Référence
<i>Ocimum basilicum</i> <i>Ocimum gratissimum</i>	Lamiaceae	Graines	MS Sans hormones	Micro propagation	27 °C ±1 intensité lumineuse 6000 lux humidité relative 80% photopériode 12 h/j	Monoterpènes : γ-terpinène Ortho-cymène α-Terpinolène Terpinen-4-ol Linalool - Sesquiterpènes : Caryophyllène Trans-α-bergamotène	Dossoukpevi et al. (2016)
<i>Perilla frutescens</i> Britt. var. <i>crispa</i> Deane2 Japan	Lamiaceae	Feuilles	MS+ 2,4-D (1.0 ppm), kinétine (5.0 ppm)	Callogenèse	30 g saccharose/litre), agar (0.9% w/v).	Isolation and Identification of Monoterpènes (limonène)	Sugisawa and Ohnishi, (1976).
<i>Calypogeia granulata</i> . Japan	Calypogeiaceae	Spores	MSK-4 milieu+2,4-D	Callogenèse / suspension culture	2% glucose	Isolation and Détermination of Sesquiterpénols.	Takeda and Katoh, 1981)
<i>Valeriana officinalis</i> and <i>Centranthus macrosiphon</i> Belgium	Caprifoliaceae	Seeds	Milieu solide	In vitro cultures of seed		Isolément d'huile essentielle	Violon, and Sonck, 1984).

### 2. Multiplication *in vitro* de plantes médicinales

Elle est connue sous le nom de culture *in vitro* ou micropropagation qui implique généralement cinq étapes distinctes: a) Sélection de la plante mère, b) Initiation des cultures, c) Multiplication des pousses, d) Enracinement des cultures *in vitro* et e) Acclimatation (**Gaurav et al., 2018**).

La micropropagation, est une pratique utilisée pour propager des plantes dans des conditions stériles ou dans un environnement contrôlé, souvent pour produire des clones d'une plante. Dans ces procédés, les tissus ou cellules, soit sous forme de suspensions, soit sous forme de solides, sont maintenus dans des conditions propices à leur croissance et multiplication. Ces conditions comprennent une température appropriée, un environnement gazeux et liquide approprié et un apport adéquat en nutriments.

La culture de tissus végétaux repose sur le fait que de nombreuses cellules végétales ont la capacité de régénérer une plante entière (totipotence). Des cellules individuelles, des cellules végétales sans parois cellulaires (protoplastes), des morceaux de feuilles ou (moins fréquemment) des racines peuvent souvent être utilisés pour générer une nouvelle plante sur des milieux de culture étant donné les nutriments et les hormones végétales nécessaires (**Vidyasagar, 2006**). La culture de tissus, appliquée aux plantes, est actuellement considérée comme une méthode coûteuse. Bien que la micropropagation représente l'un des rares moyens par lesquels une grande partie de la foresterie, des plantations et d'autres espèces difficiles à enraciner peuvent être reproduites par clonage, le coût élevé des techniques de culture tissulaire a empêché une application plus large sur le marché. Par conséquent, l'apparition de forêts clonales, de champs et de cultures ne s'est pas matérialisée (**Idowu et al., 2009**).

La micropropagation permet la production d'un grand nombre de plantes à partir de petits morceaux de l'usine mère sur des périodes de temps relativement courtes. Selon l'espèce en question, le morceau de tissu d'origine peut être prélevé sur le bout de la pousse, la feuille, le bourgeon latéral, la tige ou le tissu racinaire. Dans certains cas, la plante d'origine n'est pas détruite dans le processus, un facteur d'une importance considérable pour le propriétaire d'une plante rare ou inhabituelle. Une fois la plante placée dans un milieu de culture tissulaire, la prolifération des bourgeons latéraux et des pousses adventives ou la différenciation des pousses directement à partir du cal, se traduit par une augmentation considérable du nombre de pousses disponibles pour l'enracinement. Des «micro-boutures» ou des «plantules» enracinées de nombreuses espèces ont été établies dans des situations de production et ont été cultivées avec succès dans des conteneurs ou dans des plantations au champ. Les deux leçons les plus importantes tirées de ces essais sont que cette méthodologie est un

moyen de multiplication asexuée accélérée et que les plantes produites par ces techniques répondent de la même manière à toute plante à racines propres multipliées par voie végétative. Étant donné que la culture de tissus végétaux est un processus à forte intensité de main-d'œuvre, ce serait un facteur important pour déterminer quelles plantes seraient commercialement viables pour se propager en laboratoire (**Idowu et al., 2009**).

La micropropagation offre plusieurs avantages distincts qui ne sont pas possibles avec les techniques de propagation conventionnelles.

i) Multiplication rapide de plantes génétiquement uniformes (clones) possédant des caractéristiques souhaitables. Un seul explant peut être multiplié en plusieurs milliers de plantes en très peu de temps. Une fois établies, les cultures en division active sont une source continue de micro-boutures qui peuvent entraîner la production de plantes dans des conditions de serre sans interruption saisonnière.

ii) La production de multiples de plantes en l'absence de graines ou de pollinisateurs nécessaires pour produire des graines.

iii) La régénération de plantes entières à partir de cellules végétales qui ont été génétiquement modifiées. En utilisant des méthodes de micropropagation, le pépiniériste peut introduire rapidement des clones de qualité supérieure sélectionnés de plantes ornementales en quantité suffisante pour avoir un impact sur le marché des plantes paysagères.

iv) La production de plantes dans des conteneurs stériles qui leur permet d'être déplacés avec des risques considérablement réduits de transmission de maladies, de ravageurs et d'agents pathogènes.

v) La production de plantes à partir de graines qui, autrement, ont de très faibles chances de germer et de pousser, par ex. orchidées et nepenthes.

vi) Nettoyer une plante particulière des infections virales et autres et multiplier rapidement ces plantes en tant que «stock nettoyé» pour l'horticulture et l'agriculture. La procédure de micropropagation comprend 4 étapes: (**Idowu et al., 2009**).

i) Initiation à la culture

ii) Multiplication des bourgeons

iii) Régénération des plantules et

iv) Acclimatation (durcissement ou sevrage) dans un greenmaison.

**Tableau2.** Exemples sélectionnés de Micropropagation de plantes médicinales par culture *in vitro*

Especies	Family	Origin d'explant s	Milieu de culture	Type de Culture	Conditions de culture	Objectives	Référence
<i>Salvia splendens</i> India	Lamiaceae	Stem segments	MS/3 % (w/v) sucrose/	Micro propagation	25 ± 2 C/16-h photoperiod // relative	Developing an efficient protocol for <i>in vitro</i> clonal	Sharma et al., 2014

			0.8 % (w/v) agar/ pH 5.8		humidity 55 ± 5 %	propagation and method of germplasm conservation through synseeds	
<i>Ricinus communis</i> L. Bangladesh	Euphorb- iaceae	Seeds, shoot segments, shoot tips	axillary shoot proliferatio n :MS / cytokinins . root formation in the in vitro regenerate d shoots: MS auxins	axillary shoot proliferatio n/ root formation in the in vitro regenerated shoots	media / 20 g/l/ sucrose / 8 g/l of agar/ pH 5.7-5.8	Establish a high frequency plant regeneration system from the seedling explants	Rahman et al., 2010

### 3. Culture *in vitro* pour la production d'antioxydants

#### 3.1. Introduction

L'utilisation de la méthodologie de culture cellulaire et tissulaire végétale comme moyen de produire des métabolites médicinaux a une longue histoire (**Rout et al., 2000; Verpoorte et al., 2002**). Les cellules végétales cultivées synthétisent, s'accumulent et exsudent parfois de nombreuses classes de métabolites (**Matkowski, 2008**).

Les cultures *in vitro* de plantes sont capables de produire et d'accumuler de nombreux métabolites secondaires à valeur médicinale (**Rout et al., 2000; Verpoorte et al., 2002**). Au cours des dernières décennies, l'intérêt pour les produits naturels végétaux chimiopréventifs s'est rapidement développé. De nombreuses études ont été entreprises pour rechercher les antioxydants les plus efficaces (**Halliwell, 1995; Aruoma, 2003; Soobrattee et al., 2005**). De nombreuses approches *in vitro* différentes ont été utilisées pour augmenter la biosynthèse et l'accumulation de composés antioxydants dans les cellules végétales. La présente revue résume les réalisations de la technologie de culture cellulaire et tissulaire végétale pour la production avec des métabolites secondaires.

##### 3.1.1. Comment appelle-t-on un antioxydant?

L'antioxydant est un composé qui inhibe ou retarde l'oxydation des substrats même si le composé est présent à une concentration nettement inférieure à celle du substrat oxydé (**Halliwell, 1995; Halliwell et Gutteridge, 2007**). Les composés antioxydants peuvent être recyclés dans la cellule ou sont irréversiblement endommagés (**Halliwell et Gutteridge, 2007**). De nombreux composés contiennent une activité antioxydante en plus de leur fonction physiologique spécialisée, et leur importance en tant qu'antioxydants *in vivo* est parfois ambiguë (**Azzi et al., 2004**).

### 3.1.2. Pourquoi chasser les antioxydants *in vitro*?

Les ressources naturelles des antioxydants potentiels et établis sont vastes. Certains composés antioxydants sont extraits de sources facilement disponibles, comme le pin, la calotte, la sauge, le romarin, le tormentil et bien d'autres (González-Paramás et al., 2004; Obied et al., 2005). utilisant des méthodes biotechnologiques pour la production de métabolites végétaux secondaires économiquement viables ont été fermement établis: valeur économique élevée, abondance insuffisante dans les plantes intactes, disponibilité limitée à partir de sources naturelles (rares, menacées) (Misawa, 1994; Verpoorte et al., 2002). La technologie *in vitro* offre les avantages suivants: extraction et purification plus simples à partir de matrices interférentes, nouveaux produits introuvables dans la nature, indépendance des facteurs climatiques et des saisons.

### 3.1.3. Méthodes utilisées pour évaluer les propriétés antioxydantes

Dans la majorité des papiers de culture de tissus signalant la production de métabolites secondaires, leur activité antioxydante n'a pas été réellement déterminée, dans la plupart des cas le pouvoir antioxydant de nombreux métabolites secondaires est si bien établi. Il existe un certain nombre de méthodes simples, légèrement plus complexes et assez sophistiquées pour les tests antioxydants (Halliwell, 1995; Aruoma, 2003; Sanchez-Moreno, 2002; Matkowski, 2006). Les essais antioxydants peuvent révéler divers mécanismes d'action. Les méthodes simples comprennent le balayage des radicaux libres à l'aide de radicaux stabilisés artificiels colorés comme le 2,2'-azinobis-(3-éthylbenzothiazoline-6-sulfonate) (Re et coll., 1999) et le DPPH (radical 1,1-diphényl-2-picrylhydrazyl free) (Molyneux, 2004). Ces tests sont faciles et abordables et peuvent être utilisés dans le criblage à haut débit. Plusieurs tests basés sur une inhibition de la dégradation du substrat sont disponibles qui peuvent être utilisés pour déterminer si le composé testé peut vraiment protéger les biomolécules contre les dommages oxydatifs. Les produits de dégradation sont surveillés par spectrophotométrie (réactivités thiobarbituriques — TBARS, blanchiment du carotène), fluorescence (ORAC assay — pour la capacité d'absorption des radicaux oxygénés) ou chromatographie (Halliwell, 1995; Matkowski, 2006; Aruoma, 2003; Sanchez-Moreno, 2002). Certaines des méthodes décrites ont été utilisées pour tester l'activité antioxydante de composés issus de cultures *in vitro* de plusieurs substances **Tableau 2**.

**Tableau3.** Exemples sélectionnés de production d'antioxydants à partir de cultures végétales in vitro

Espèces	Composés	Système de culture	Test Antioxydant	Références pour la culture in vitro	Références pour antioxydant activité
<i>Arachishypogea</i>	Piceatannol (astilbène)	Callus	Dommages oxydatifs à l'ADN dans la culture cellulaire	Ku et al., 2005	Ovesna and Horvathova-Kozics, 2005
<i>Passifloraquadangularis</i>	Flavone-C-glycosides	UV irradiatedcallus	DPPH	Antognoni et al., 2007	Antognoni et al., 2007
<i>Rosmarinusofficinalis</i>	Carnosicacide	Callus, culture de pousses	Réduction du stress oxydatif dans les cellules vivantes et de nombreux essais chimiques in vitro	Caruso et al., 2000	e.g. Wijeratne and Cuppett, 2007
<i>Scutellariabaicalensis</i>	Baicalin, wogonoside	Hairyroots, suspension cellulaire	De nombreux essais chimiques in vitro	Morimoto et al., 1998; Nishikawa et al., 1999; Stojakowskaand Malarz, 2000	e.g. Huang et al., 2006
<i>Steviarebaudiana</i>	Flavonoides	Callus	FRAP, DPPH	Tadhani et al., 2007	Tadhani et al., 2007
<i>Torreyanucifera</i>	Abietanediterpenoids	suspension cellulaire	Oxydation du LDL, inhibition du nitricoxide	Orihara et al., 2002	Lee et al., 2006
<i>RutagraveolensL</i>	Phénolicsm Flavanols Flavanoids Psoralène Bergapten Xanthotoxine	Fruits, pousses et racines	DPPH ABTS Dosage du phosphomolybdène Réduction de la puissance Nitricoxiderection	Diwan et al., 2012.	Diwan et al., 2012
<i>Justiciagendarusa</i>	Phénolique	feuilles, callus et suspension cellulaire	TPC et DPPH	Amid et al., 2011	Amid et al., 2011
<i>Rehmanniaglutinosa</i>	phénolique et flavonoides	The leaves and roots	DPPH, ABTS, FRAP et Tests P-Mo	Piąteczak et al., 2014	Piąteczak et al., 2014
<i>Cotoneasterhorizotalis</i>	b-carotene, ascorbic acid and less amounts of a-tocopherol and amygdalin (vitamin B17)	Callus	DPPH	Sokkar et al., 2013	Sokkar et al., 2013
<i>VitisflexuosaThunb</i>	Flavonoides Phenoliques	Segments nodaux Racines adventices	DPPH	Park et al., 2015	Park et al., 2015
<i>RosmarinusofficinalisL</i>	acide carnosique, carnosol et rosmarinique	Pousses différenciées, callus, suspension cellulaire	DPPH	Kuhlmann et Röhl (2006)	Kuhlmann et Röhl (2006)
<i>Clinacanthus</i>	les polyphénols, les	Culture de tissus	DPPH	Haida et al., 2020	Haida et al., 2020

### Chapitre III. Applications de la culture *in vitro* pour les plantes médicinales

<i>utans</i>	phénoliques, flavonoïdes		ABTS FRAP		
<i>Cnidium officinale</i>	phthalides, polyphénols et flavonoïdes	Callus	DPPH HPLC Catalase (CAT) et peroxydase de guaiacol (GPX) pour éviter les radicaux libres.	Adil et al.,2019	Adil et al.,2019
<i>Isodonrugosus</i>	acide plectranthoïque (PA), acide bêtaulinique (BA) et acide oléanolique (OA) et acides phénoliques comme l'acide caféique (CA) et l'acide rosmarinique (RA)	Callus	DPPH ORAC ABTS, FRAP CUPRAC	Abbasiet al.,2019	Abbasiet al.,2019
<i>Salvia viridis</i>	l'acide rosmarinique	callus, pousses	DPPH FRAP	Grzegorzcyk-Karolak et al.,2019	Grzegorzcyk-Karolak et al.,2019
<i>Thymus lotocephalus</i>	acides (caféique et rosmarinique)	Callus	TEAC et ORAC	Costa et al.,2012	Costa et al.,2012
<i>Lepidium sativum</i> L.	acide férulique, acide sinapique, acide protocatéchuic, acide vanillique et acide caféique	Callus	DPPH, FRAP, HPLC, ABTS Peroxidase (POD) and Superoxide Dismutase (SOD) Activity	Ullah et al., 2019	Ullah et al., 2019

### 3.2. Classes chimiques des métabolites secondaires antioxydants des cultures *in vitro*

#### 3.2.1. Polyphénols

Les polyphénols dérivent principalement de la voie de l'acide shikimique par l'acide carboxylique aromatique cinnamique ou benzoïque. d'autres groupes de polyphénols antioxydants. Les acides phénoliques peuvent être libres ou intégrés dans de plus grandes molécules rosmarinic (De-Ewamkul et Ellis, 1984,1985; Su et Humphrey, 1990; Su et coll., 1993). Les flavonoïdes sont l'un des groupes les plus importants de phénylbenzopyrane tricyclique. Inclure les flavonols, les flavones, les isoflavonoïdes et les propriétés antioxydantes des flavones Flavone Cglycosides (Antognoni et al., 2007). Les pigments sont utiles en tant que produits parce que leur importance en tant qu'aliments bioactifs et naturels (Stintzing and Carle, 2004), les anthocyanes ne sont pas si chères, obtenues à partir de cultures *in vitro* (Durzan et coll., 1991; Blando et coll., 2005). Le silybummarianum qui est un antioxydant puissant, les mêmes auteurs révèlent le rôle central de la privation de calcium dans la stimulation de la biosynthèse du silybummarinum (Sanchez-Sampedro et coll., 2005b). Les stilbènes sont des polyphénols bicycliques (Medina-Bolivar et al., 2007) c'est le santioxydant que l'industrie pharmaceutique (Tassoni et al., 2005).

#### 3.2.2. Isoprénoïdes

Les isoprénoïdes sont produits dans les cellules végétales à partir de pyrophosphate d'isopentynyle (IPP) et de pyrophosphate de diméthyle (DMAPP). Ces basicunits sont synthétisés par des voies de phosphate de mévalonate cytoplasmique ou de plastidicdésoxyxylulose (ou méthylérythritol). IPP et Le DMAPP est ensuite fusionné avec des ensembles de prenyltransferases et de synthases terpéniques et avec une variété d'enzymes modifiantes en d'éventuels composés extrêmement variables dans de nombreux groupes d'érypénoïdes (mono, sesqui, di et triterpènes et leurs dérivés), caroténoïdes et stéroïdes (Bouvier et coll., 2005; Tholl, 2006). Les terpénoïdes volatils responsables des propriétés odorantes des organes végétaux servent d'arme de défense chimique polyvalente contre les pathogènes bactériens et fongiques.

#### 3.2.3. Autre structures

Les tocophérols, largement utilisés dans la nutrition humaine comme vitamine E et dans la conservation des environnement lipophile (Kruk et al., 2005). Les plantes sont la principale source de tocopherolsisolated naturels à partir d'huiles végétales ou d'embryons de maïs. Les bétalaines, les bétacyanines violettes et les pigments jaunes des bétaxanthines remplacent fonctionnellement les anthocyanes dans 13 taxons regroupés dans l'ordre des Carayophyllales

(auparavant Centrospermae), tels que les familles : Chenopodiaceae, Amaranthaceae... Par exemple, la betterave rouge (*Beta vulgaris*) est une riche source naturelle de bétacyanines.

### 3.3.Stratégies pour accroître la production

La surveillance continue d'un métabolite choisi est une condition préalable au développement réussi de la technologie de production et peut être effectuée en utilisant un certain nombre de méthodes différentes. Les méthodes chromatographiques comme la CLHP et la CG avec la détection appropriée sont suffisantes. Des techniques plus rapides et moins élaborées impliquent la spectrophotométrie qui peut être utilisée pour certains groupes de composés. Le premier groupe contient des composés colorés — flavonoïdes, caroténoïdes et pigments quinoïdes ou phénoliques absorbant les UV (**Durzan et coll., 1991; Smith, 2000**). Les progrès rapides dans le développement de l'instrumentation phytochimique et la tendance vers une approche métabolomique et un criblage à haut débit sont également susceptibles d'influencer la surveillance de la production de métabolites secondaires *in vitro*.

#### 3.3.1. Optimisation de la biosynthèse par conditions de culture

Une série de facteurs environnementaux et nutritionnels sont connus pour influencer les voies biosynthétiques des métabolites secondaires. L'induction de pigments anthocyaniques par la lumière est un exemple bien documenté (**Harborne, 2001; Stintzing et Carle, 2004**). Pour la production d'anthocyanes ont été établis comme *Glehnia littoralis* (**Miura et al., 1998**), *I. batatas* (**Konczak et al., 2005**) ou *Aralia cordata* (**Kobayashi et al., 1993**). Chez cette dernière espèce, plusieurs facteurs ont été optimisés (p. ex., supplémentation en CO<sub>2</sub>) pour obtenir un rendement final de plus de 17 % de la masse sèche. La composition du milieu doit être optimisée pour une augmentation intensive de la biomasse et l'accumulation du métabolite désiré. Les auxines et les cytokinines sont cruciales pour la stimulation adéquate des voies biosynthétiques. Un système de croissance à deux ou trois stades peut également être utile pour optimiser la production de métabolites. Il a été appliqué avec succès aux anthocyanes chez *R. hirta* (**Luczkiewicz et Cisowski, 2001**), où les tissus de la deuxième stagemedia optimisée contenaient jusqu'à 5 % d'anthocyanes dans la masse sèche.

#### 3.3.2. Production dans les tissus différenciés

Dans certains cas, le plein développement dans des conditions naturelles est utile pour produire une quantité considérable de produits secondaires, surtout si la culture cellulaire indifférenciée est soit incapable ou à peine accumulant des composés antioxydants. Le potentiel de culture d'embryons somatiques à croissance rapide peut également être utilisé pour la production de métabolites médicinaux, comme le paclitaxel (**Lee et Son, 1995**).

### 3.3.3. Sélection de lignées cellulaires à production élevée

Les clones super-efficaces de cellules ou de tissus de culture peuvent être sélectionnés en surveillant le niveau du composé d'intérêt, ou peuvent être complétés par un agent de sélection. La lignée sélectionnée doit dépasser à la fois les niveaux de production obtenus dans des cultures cellulaires non sélectionnées et la productivité biosynthétique naturelle d'un organisme intact.

### 3.3.4. Précurseurs et biotransformation

Lors du démarrage d'une culture *in vitro* d'une plante médicinale, qui dans sa forme intacte accumule de grandes quantités substantielles de produits précieux, il arrive parfois qu'une masse de cellules dédifférenciées est incapable de compléter la biosynthèse. Cela est dû au désaccouplement de la machinerie enzymatique, à l'expression insuffisante de gènes biosynthétiques régulés par le développement ou à l'absence de stimuli environnementaux. Par conséquent, le choix d'un précurseur approprié est essentiel pour l'amélioration réussie de la production d'antioxydants *in vitro*.

### 3.3.5. Production induite par la sollicitation et le stress

L'un des rôles les mieux établis des métabolites secondaires est la participation aux réactions au stress (**Grassmann et coll., 2002**). Phytoalexins sont synthétisés en réaction à une attaque pathogène. La régulation ascendante de la biosynthèse du métabolisme secondaire après exposition à des facteurs de stress a été utilisée pour obtenir un rendement élevé de nombreux composés médicinaux (**Verpoorte et coll., 2002; Vanisree et coll., 2004**). Les propriétés antioxydantes de certains métabolites ainsi que les enzymes antioxydantes peuvent aider la plante à restaurer l'homéostasie redox (**Matkowski, 2006**). Le matériel de culture *in vitro* peut être obtenu par des lysats bactériens ou fongiques ou des médiateurs de la réponse au stress comme le salicylate. Les régulateurs de croissance liés au stress, l'acide jasmonique, en particulier le méthyljasmonate (MeJa) ont été largement utilisés pour promouvoir la biosynthèse des deux inductibles, y compris les composés médicinaux tels que les alcaloïdes anticancéreux (**Vanisree et Tsay, 2004; Verpoorte et coll., 2002**). L'utilisation d'éliciteurs biotiques naturels améliore également le métabolisme secondaire. L'irradiation aux UV a également été utilisée pour rendre les cellules végétales plus antioxydantes, en particulier les flavonoïdes.

### 3.3.6. Transformation avec *Agrobacterium rhizogenes*—racines svelues

Il s'agit d'une méthode couramment utilisée pour améliorer la production de métabolites secondaires. Des milliers d'espèces ont été transformées avec *A. Rhizogenes* dans le but d'obtenir une induction des racines transformées. La manipulation et l'optimisation de la productivité des racines transformées sont généralement les mêmes que celles d'autres systèmes

de culture avec des conditions de culture parfaites, la sélection des lignées cellulaires, l'alimentation des précurseurs et l'élicitation. Outre les nombreux résultats positifs des racines transformées produisant des métabolites secondaires, spécifiquement, en deux espèces boraginacées : *E. sericeum* et *L. erythrorhizon*, (Boulgakov et al., 2005).

#### 3.3.7. Mise à l'échelle ou histoire sans fin du bioréacteur

L'objectif ultime de la biotechnologie des plantes médicinales est la production industrielle de produits naturels utiles. L'un des rares systèmes commerciaux établis est la technologie shikonine bien connue utilisant *L. erythrorhizon* (Misawa, 1994; Boulgakov et al., 2001). D'autres documents ont été produits sur des systèmes de bioréacteurs expérimentaux dans lesquels les cellules, les agrégats ou les organes différenciés sont des sources de composés antioxydants. La technologie des bioréacteurs, bien qu'elle soit parfois remarquablement efficace en termes de production, ne semble pas susceptible d'approcher l'application industrielle à l'échelle de l'usine dans un avenir proche.

#### 3.3.8. Remarques finales et perspectives futures

Dans la nature, nous avons une variété d'antioxydants obtenus à partir de différentes sources, nous avons obligé la technologie applicable à la culture *in vitro* pour améliorer les quelques antioxydants de l'acide rosmarinique,  $\alpha$ -tocophérol et encourager plus de recherche axée sur la régulation de la biosynthèse et sa faisabilité économique accrue.

#### \* Culture de brunissement

De nombreuses plantes sont naturellement riches en composés polyphénoliques qui sont communément considérés comme des agents inhibiteurs. Dans la plupart des cas, le milieu est devenu brun lorsque les explants ont été cultivés (Basu et Chand, 1998; Mathur et Ahuja, 1991; Rout et al., 1992). Le brunissement des milieux s'est produit à la suite de l'oxydation des polyphénols exsudés des explants. Divers remèdes pour surmonter ces problèmes liés à la culture *in vitro* des polyphénols ont été examinés par Compton et Preece (1986) et George et Sherrington (1984). Le problème du brunissement pourrait être surmonté en plaçant les explants dans du milieu frais toutes les deux semaines (Mathur et al, 1988; Rout et al., 1999).

# **Conclusion**

### Conclusion

D'après notre étude, la culture *in vitro* des plantes médicinales offre l'avantage de produire des métabolites secondaires spécifiques, à partir des différents explants végétaux. Ces explants peuvent révéler de nouvelles molécules absentes chez les plantes sources, ou être utilisés comme lignées cellulaires, notamment les molécules d'intérêt thérapeutique à très haute valeur, pour la production de quantités élevées de métabolites secondaires, souvent plus que les plantes mères, pourrait être utile pour la multiplication et la propagation conforme de certaines espèces médicinales difficiles à multiplier par la voie naturelle ou menacées, la sauvegarde aux rares individus en voie de disparition pour permettre un repeuplement des stations encore existantes. La création de nouveaux caractères sélection selon le besoins de l'agriculture, obtention des plantes saines et indemne des virus, La maîtrise de la multiplication de ces plantes ouvre la voie à l'exploitation économique de l'espèce. Les cultures *in vitro* peuvent permettre d'obtenir des clones ou des souches présentant des caractères nouveaux tant sur le plan qualitatif que quantitatif, ce qui peut conduire à des rendements accrus ou à des composés originaux possédant de meilleures propriétés. La micro-propagation par la pointe des pousses et la culture nodale est la méthode la plus largement utilisée qui a contribué à conserver dans une large mesure le matériel génétique des plantes médicinales d'élite et a permis de satisfaire la demande et le rapport de l'offre d'espèces médicinales importantes pour la production de médicaments dérivés de plantes. Bien que les exigences *in vitro* varient selon les plantes, la standardisation de protocoles de micro-propagation fiables pour chaque plante se poursuit dans différents laboratoires à travers le monde. Nous avons donc découvert ce qu'était exactement la culture *in vitro*. Cette technique est donc un réel progrès qui, par ses nombreuses techniques, a révolutionné le monde agricole mais aussi le monde de la recherche puisqu'elle est utilisée depuis quelques années pour réaliser des transgénèses. En effet cette technique permet la sauvegarde la biodiversité tout en assurant un développement économique. La culture *in vitro* est donc un progrès, c'est indéniable, mais sa mise en oeuvre reste très compliquée à cause des conditions d'asepsie à respecter et demande des qualifications comme la dextérité et la rigueur. La culture *in vitro* est donc, tout comme les OGM, la preuve que l'Homme est de plus en plus apte à contrôler la nature qui l'entoure mais cette aptitude grandissante ne pourrait-elle pas la preuve que l'Homme est de plus en plus apte à contrôler la nature qui l'entoure. Cependant, les techniques de floraison *in vitro*, qui recèlent un immense potentiel pour produire des graines autofécondées, n'ont pas été exploitées dans les moindres détails dans la majorité des plantes, y

## Conclusion

---

compris les espèces médicinales. Cette technique restera très utile mais nécessite un amélioration spécifique et une standardisation des protocoles pour différentes usines.

# Références

### Références

1. Abbasi B. H., Siddiquah A., Tungmunnithum D., Bose S., Younas M., Garros L. et Hano C. (2019). *Isodon rugosus* (Wall. ex Benth.) Codd in vitro cultures: Establishment, phytochemical characterization and in vitro antioxidant and anti-aging activities. *International journal of molecular sciences*, 20(2), 452.
2. Adil M., Ren X. et Jeong B. R. (2019). Light elicited growth, antioxidant enzymes activities and production of medicinal compounds in callus culture of *Cnidium officinale* Makino. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 196, 111509.
3. Akbar M.A., Hakoomat A. (2004). B. Effect of Culture Medium on Direct Organogenesis from Different Explants of Various Potato Genotypes. *Biotechnology* 3, 187-193.
4. Alissa A., Jonard R., Serieys H., Vincourt P. (1986). La culture d'embryons isolés in vitro dans un programme d'amélioration du tournesol. *C R Acad Sc Paris Série III* 302, 161-164.
5. Amid A., Johan N. N., Jamal, P. et Zain W. N. W. M. (2011). Observation of antioxidant activity of leaves, callus and suspension culture of *Justicia gendarusa*. *African Journal of Biotechnology*, 10(81), 18653-18656.
6. André L., Coelho Da Silva., Cecília S., Caruso., Renato D., Azevedo Moreira., Ana C., Góes horta. (2003). In vitro induction of callus from cotyledon and hypocotyls explants of *Glycine wightii* (Wight & Arn.) Verdc. *Cienc. Agrotec., Lavras* 27,6, p.1277-1284.
7. Angela K. (1995). Somaclonal variation as a tool for crop improvement. *Euphytica* 85, 295-302.
8. Antognoni F., Zheng S., Pagnucco C., Baraldi R., Poli F. et Biondi S. (2007). Induction of flavonoid production by UV-B radiation in *Passiflora quadrangularis* callus cultures. *Fitoterapia*, 78(5), 345-352.
9. Aruoma O. I. (2003). Methodological considerations for characterizing potential antioxidant actions of bioactive components in plant foods. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 523, 9-20.
10. Arthur Geoffrey. Norman et Nayle C. Brady. (1988). *Advances in agronomy* volume 28, 411p.
11. Auge D. (1992). *La culture in vitro et ses applications horticoles*, 3ème édition. Technique et documentation, Lavoisier, Paris, Paris, 225p.
12. Auge R. et Boccon-Gibod J. (1989). Les applications à l'horticulture. In *La culture in vitro et ses applications horticoles*, 3ème édition revue, corrigée et augmentée (pp. 63-89).

## Références

---

13. Azpiroz H.S., Vincourt P., Serieys H., Gallais A. (1987) La culture in vitro des embryons immatures dans l'accélération du cycle de sélection des lignées de tournesol et ses effets morphovégétatifs. *Helia* 10, 35-38.
14. Azzi A., Davies K. J. et Kelly F. (2004). Free radical biology–terminology and critical thinking. *FEBS letters*, 558(1-3), 3-6.
15. Bazargani M. M., Tabatabaei B. E. S. et Omid M. (2011). Multiple shoot regeneration of cotton (*Gossypium hirsutum* L.) via shoot apex culture system. *African Journal of Biotechnology*, 10(11), 2005-2011.
16. Behera S., Nayak N., Shasmita B. D. et Naik S. K. (2015). An efficient micropropagation protocol of *Bacopa monnieri* (L.) Pennell through two-stage culture of nodal segments and ex vitro acclimatization. *J Appl Biol Biotechnol*, 3, 16-21.
17. Belliard G., Vedel F. et Pelletier G. (1979). Mitochondrial recombination in cytoplasmic hybrids of *Nicotiana tabacum* by protoplast fusion. *Nature*, 281(5730), 401-403.
18. Boccon-Gibod J. et Jalouzot R. (1989). Les biotechnologies en horticulture: possibilités et perspectives. In *La culture in vitro et ses applications horticoles*, 3ème édition revue, corrigée et augmentée (pp. 91-131).
19. Bouvier F., Rahier A. et Camara B. (2005). Biogenesis, molecular regulation and function of plant isoprenoids. *Progress in lipid research*, 44(6), 357-429.
20. Branchard M. (1984). Application des vitrométhodes à la mise en oeuvre de programmes de sélection de plantes résistantes à des maladies.
21. Bulletin de la Société Botanique de France. *Lettres Botaniques*, 136(3), 187-197.
22. Bulgakov V. P., Kozyrenko M. M., Fedoreyev S. A., Mischenko N. P., Denisenko V. A., Zvereva L. V. et Zhuravlev, Y. N. (2001). Shikonin production by p-fluorophenylalanine resistant cells of *Lithospermum erythrorhizon*. *Fitoterapia*, 72(4), 394-401.
23. Blando F., Scardino A. P., De Bellis L., Nicoletti I., & Giovinazzo, G. (2005). Characterization of in vitro anthocyanin-producing sour cherry (*Prunus cerasus* L.) callus cultures. *Food Research International*, 38(8-9), 937-942.
24. Caruso J. L., Callahan J., DeChant C., Jayasimhulu K. et Winget, G. D. (2000). Carnosic acid in green callus and regenerated shoots of *Rosmarinus officinalis*. *Plant cell reports*, 19(5), 500-503.
25. Charlotte H., Hanisch T.C. and Sree R.k. (1987). Callus growth, Tumor development and polyploidization in the tetraploid potato cultivar bintje, *Plant science* 49, 209-216.
26. Chawla H.S. (2002). *Introduction to Plant Biotechnology*. Published by Science Publishers, Inc. Enfield, NH, USA. 538 pages.

27. Chen C. P., Yokozawa T. et Chung H. Y. (1999b). Inhibitory effect of caffeic acid analogues isolated from *Salviae Miltiorrhizae Radix* against 1, 1-diphenyl-2-picrylhydrazyl radical. *Experimental and Toxicologic Pathology*, 51(1), 59-63.
28. Costa P., Gonçalves S., Valentão P., Andrade P. B., Coelho N. et Romano A. (2012). *Thymus lotocephalus* wild plants and in vitro cultures produce different profiles of phenolic compounds with antioxidant activity. *Food Chemistry*, 135(3), 1253-1260.
29. Cottier et Guerry, (2000), Génie Génétique et Clonage [www.unifr.ch/nfp37](http://www.unifr.ch/nfp37) Organismes Transgéniques.
30. Cure W. W. et Mott R. L. (1978). A comparative anatomical study of organogenesis in cultured tissues of maize, wheat and oats. *Physiologia Plantarum*, 42(1), 91-96.
31. Davey M. R., Anthony P., Power B. J. et Lowe K. C. (2004). Plant protoplasts ; Statut and biotechnological perspectives .
32. Davey M. R., Anthony P., Power J. B. et Lowe K. C. (2005). Plant protoplasts: status and biotechnological perspectives. *Biotechnology advances*, 23(2), 131-171.
33. De-Eknamkul W. et Ellis B. E. (1985). Effects of macronutrients on growth and rosmarinic acid formation in cell suspension cultures of *Anchusa officinalis*. *Plant Cell Reports*, 4(2), 46-49.
34. Dellaa A. (2013). La culture in vitro. <http://fr.slideshare.net/AhmedDellaa/culture-in-vitro-des-plantes>.
35. Demarly Y., (1985). L'épigénétique. *Bull. Soc. Bot. Fr.*132. *Actual. Bot* (314), pp 79- 94.
36. Demarly Y., Sibi M. (1989). *Amélioration des plantes et biotechnologies*. Ed. John Libbey Eurotext, Paris, 152 p.
37. Demarly Y., Sibi M. (1996). *Amélioration des plantes et biotechnologie*. Edition J.L
38. Diwan R., Shinde A. et Malpathak N. (2012). Phytochemical composition and antioxidant potential of *Rutagraveolens* L. in vitro culture lines. *Journal of Botany*, 2012.
39. Dossoukpevi R., Ahanhanzo C., Gbaguidi F., Agbangla C., Agbidinoukoun A. et Cacaï G. (2016). Incidence des plantes régénérées in vitro sur les huiles essentielles de deux espèces de *Ocimum* cultivées au Bénin. *Journal of Applied Biosciences*, 99, 9441-9449.
40. Dubois J. (1989). *Biotechnologie et amélioration des plantes*. *Plantes vivrières tropicales*. Ed. Aupelfuree john libbey eurotext. Paris. Pp. 19-25.
41. Durzan D. J., Hansen K. et Peng C. (1991). Anthocyanin production in cell suspension cultures of *Prunus cerasus* cv. Vladimir. *Advances in Horticultural Science*, 3-10.

42. El hamdouni E. M., Lamarti A., Badoc A. (1999). la régénération in vitro du fraisier (fragaria x ananassa duch.), ii - les possibilites offertes par la culture in vitro, bull. Soc. Pharm. Bordeaux 138, 49-74.
43. Eric D. (2003). OGM Végétaux., Commission de l'éthique de la science et de la technologie pour une gestion éthique des ogm commission de l'éthique de la science et de la technologie, document complémentaire, Pp1-40.
44. Espanoza N., Lizzarraga R., Siguna S. C., Brayn J., Dodds H. (1992). Tissu culture: Eurotexte, pp 99-111.
45. Evans D. A., Sharp W. R. et Medina-Filho H. P. (1984). Somaclonal and gametoclinal variation. American Journal of Botany, 71(6), 759-774.
46. Fan C. Q. et Yue J. M. (2003). Biologically active phenols from Saussureamedusa. Bioorganic & medicinal chemistry, 11(5), 703-708.
47. Ferry M., Bouguedoura N., El Hadrami I. (1998). Patrimoine génétique et techniques de propagation in vitro pour le développement du palmier dattier. Spécial Oasis. Sécheresse 9(2):139-146
48. Filippone E., Leone M. et Penza R. (1992). Recent advances in cell and tissue culture. In *Biotechnology: enhancing research on tropical crops in Africa* (pp. 105-166). IITA Ibadan (Nigeria)
49. Gamborg O.L., Murashige T., Thorpe T.A., Vasil I.K.(1976). Plant tissue culture media. In *Vitro*. 12:473-8.
50. Gaurav N., Singh A. P., Srivastava A., Kumar A. et Hira S. G. (2018). In vitro propagation of *Withania somnifera* L.(dunal) from callus of embryonic cotyledon explants in B5 medium. *Indian Forester*, 144(1), 36-40.
51. Gaurav, N., Komal, P. J., Tyagi, M., Chauhan, N., & Kumar, A. (2018). A review on in vitro propagation of medicinal plants. *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry*, 7(6), 2228-2231.
52. George E.F., Sherrington P.D. (1984). In: *Plant Propagation by Tissue Culture*. Exegetics Ltd., Eversley, England, pp.39-71.
53. Gleba Y. Y. et Hoffmann F. (1980). "Arabidobrassica": A novel plant obtained by protoplast fusion. *Planta*, 149(2), 112-117.
54. Gnanam A. et Kulandaivelu G. (1969). Photosynthetic studies with leaf cell suspensions from higher plants. *Plant physiology*, 44(10), 1451-1456.

55. González-Paramás A. M., Esteban-Ruano S., Santos-Buelga C., de Pascual-Teresa S. et Rivas-Gonzalo J. C. (2004). Flavanol content and antioxidant activity in winery byproducts. *Journal of agricultural and food chemistry*, 52(2), 234-238.
56. Grassmann J., Hippeli S. et Elstner E. F. (2002). Plant's defence and its benefits for animals and medicine: role of phenolics and terpenoids in avoiding oxygen stress. *Plant Physiology and Biochemistry*, 40(6-8), 471-478.
57. Griffiths H. M., Slack S.A., Dodds J. H. (1990). Effect of chemical and heat therapy on virus concentration in *in vitro* plantlets. *Can. J. Bot.* 68:1515-1521.
58. Grzegorzczak I., Królicka A. et Wysokińska H. (2006). Establishment of *Salvia officinalis* L. hairy root cultures for the production of rosmarinic acid. *Zeitschrift für Naturforschung C*, 61(5-6), 351-356.
59. Grzegorzczak I., Matkowski A. et Wysokińska H. J. F. C. (2007). Antioxidant activity of extracts from *in vitro* cultures of *Salvia officinalis* L. *Food Chemistry*, 104(2), 536-541.
60. Grzegorzczak-Karolak I., Kuźma Ł., Lisiecki P. et Kiss A. (2019). Accumulation of phenolic compounds in different *in vitro* cultures of *Salvia viridis* L. and their antioxidant and antimicrobial potential. *Phytochemistry Letters*, 30, 324-332.
61. Haida Z., Nakasha J. J. et Hakimian M. (2020). *In Vitro* Responses of Plant Growth Factors on Growth, Yield, Phenolics Content and Antioxidant Activities of *Clinacanthus nutans* (Sabah Snake Grass). *Plants*, 9(8), 1030.
62. Halliwell B. (1995). Antioxidant characterization: methodology and mechanism. *Biochemical pharmacology*, 49(10), 1341-1348.
63. Halliwell B. et Gutteridge J. M. (2007). *Free radicals in biology and medicine*. Oxford University Press, USA.
64. Harborne J. B. (2001). Twenty-five years of chemical ecology. *Natural product reports*, 18(4), 361-379.
65. Hrazdina G. (2006). Aroma production by tissue cultures. *Journal of agricultural and food chemistry*, 54(4), 1116-1123.
66. Huang L. C. et Murashige T. (1977). Plant tissue culture media: Major constituents, their preparation and some applications. *TCA Manual/Tissue Culture Association*, 3(1), 539-548.
67. Huang W. H., Lee A. R. et Yang C. H. (2006). Antioxidative and anti-inflammatory activities of polyhydroxyflavonoids of *Scutellaria baicalensis* GEORGI. *Bioscience, biotechnology, and biochemistry*, 70(10), 2371-2380.

68. Idowu P. E., Ibitoye D. O. et Ademoyegun O. T. (2009). Tissue culture as a plant production technique for horticultural crops. *African Journal of Biotechnology*, 8(16).
69. Kacem N. S. (2005). Embryogenèse somatique et variation somaclonale chez le blé dur et tendre (culture d'embryons matures et immatures). *Mémoire de magister, Université, Mentour-Constantine*, 126.
70. Kitto S. L. et Janick J. U. L. E. S. (1985). Hardening treatments increase survival of synthetically-coated asexual embryos of carrot. *J. Am. Soc. Hort. Sci.*, 110(2), 283-286.
71. Kobayashi Y., Akita M., Sakamoto K., Liu H., Shigeoka T., Koyano T. et Furuya T. (1993). Large-scale production of anthocyanin by *Aralia cordata* cell suspension cultures. *Applied microbiology and biotechnology*, 40(2-3), 215-218.
72. Kole P.C. (2006). Variability, Correlation and regression analysis in third somaclonal generation of barley, *Barley genetics newsletter* 36, 44-47.
73. Konczak I., Terahara N., Yoshimoto M., Nakatani M., Yoshinaga M. et Yamakawa O. (2005). Regulating the composition of anthocyanins and phenolic acids in a sweetpotato cell culture towards production of polyphenolic complex with enhanced physiological activity. *Trends in food science & technology*, 16(9), 377-388.
74. Kruk J., Holländer-Czytko H., Oettmeier W. et Trebst A. (2005). Tocopherol as singlet oxygen scavenger in photosystem II. *Journal of plant physiology*, 162(7), 749-757.
75. Ku K. L., Chang P. S., Cheng Y. C. et Lien C. Y. (2005). Production of stilbenoids from the callus of *Arachis hypogaea*: a novel source of the anticancer compound piceatannol. *Journal of agricultural and food chemistry*, 53(10), 3877-3881.
76. Kuhlmann A. et Röhl, C. (2006). Phenolic antioxidant compounds produced by in vitro. Cultures of Rosemary (*Rosmarinus officinalis*.) and their anti-inflammatory effect on lipopolysaccharide-activated microglia. *Pharmaceutical biology*, 44(6), 401-410.
77. Larkin P.J. et Scowcroft W.R. (1981). Somaclonal variation –a novel source of variability from cell culture for plant improvement. *Theor. Appl. Genet.*, 60, 197-214.
78. Lee B. S. et Son S. H. (1995). A method for producing taxol and taxanes from embryo cultures of *Taxus* species. *WO Patent*, 95, 02063.
79. Lee W. S., Kim J. R., Han J. M., Jang K. C., Sok D. E. et Jeong T. S. (2006). Antioxidant activities of abietane diterpenoids isolated from *Torreya nucifera* leaves. *Journal of agricultural and food chemistry*, 54(15), 5369-5374.

80. Luczkiewicz M. et Cisowski W. (2001). Optimisation of the second phase of a two phase growth system for anthocyanin accumulation in callus cultures of *Rudbeckia hirta*. *Plant cell, Tissue and organ culture*, 65(1), 57-68.
81. Maraschin S. D. F., De Priester W., Spink, H. P. et Wang, M. (2005). Androgenic switch: an example of plant embryogenesis from the male gametophyte perspective. *Journal of Experimental botany*, 56(417), 1711-1726.
82. Margara F. (1989). Bases de multiplication végétative : les méristèmes et l'organogénèse. Ed INRA Paris 262p.
83. Matkowski A. (2006). Plant phenolic metabolites as antioxidants and mutagenesis inhibitors. *Cell biology and instrumentation: UV radiation, nitric oxide and cell death in plants*, 129-148.
84. Medina-Bolivar F., Condori J., Rimando A. M., Hubstenberger J., Shelton K., O'Keefe S. F. et Dolan M. C. (2007). Production and secretion of resveratrol in hairy root cultures of peanut. *Phytochemistry*, 68(14), 1992-2003.
85. Micropropagation .Conservation and export of potato germplasm .CIP Recherche Ghidde, edtCIP,19p.
86. Misawa M. (1994). *Plant tissue culture: an alternative for production of useful metabolites* (No. 108). Food & Agriculture Org.
87. Miura H., Kitamura Y., Ikenaga T., Mizobe K., Shimizu T., Nakamura M. et Goda, Y. (1998). Anthocyanin production of *Glehnia littoralis* callus cultures. *Phytochemistry*, 48(2), 279-283.
88. Molyneux P. (2004). The use of the stable free radical diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity. *Songklanakarin J. sci. technol*, 26(2), 211-219.
89. Morimoto S., Tateishi N., Matsuda T., Tanaka H., Taura F., Furuya N et Shoyama, Y. (1998). Novel Hydrogen Peroxide Metabolism in Suspension Cells of *Scutellaria baicalensis* Georgi. *Journal of Biological Chemistry*, 273(20), 12606-12611.
90. Mulder-Krieger T. H., Verpoorte R., Svendsen A. B. et Scheffer J. J. C. (1988). Production of essential oils and flavours in plant cell and tissue cultures. A review. *Plant cell, tissue and organ culture*, 13(2), 85-154.
91. Murashige T. Skoog F. (1962). A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum*, 15 (3), 473-497.
92. Murashige T. (1974). Plant propagation through tissue cultures. *Annual review of plant physiology*, 25(1), 135-166.

93. Murashige T. (1977) Manipulation of organ culture in plant tissue cultures. *Botanical Bull Acad Sinica*, 18:1–24. Torres KC. *Tissue Culture Techniques for Horticultural Crops*. New York: Van Nostrand Reinhold Co., 1989.
94. Murashige T. (1980). Plant growth substances in commercial uses of tissue culture. In: Skoog F, editor. *Plant Growth Substances*. Berlin: Springer-Verlag, pp. 426–34.
95. Nishikawa K., Furukawa H., Fujioka T., Fujii H., Mihashi K., Shimomura K. et Ishimaru K. (1999). Flavone production in transformed root cultures of *Scutellaria baicalensis* Georgi. *Phytochemistry*, 52(5), 885-890.
96. Nowbuth L. et Lê C. L. (2005). Teneur non conforme en ADN comme indicateur de variation somaciale chez la pomme de terre. *Revue suisse d'agriculture*, 37(6), 257-266.
97. Obied H. K., Allen M. S., Bedgood D. R., Prenzler P. D., Robards K. et Stockmann R. (2005). Bioactivity and analysis of biophenols recovered from olive mill waste. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(4), 823-837.
98. Ochiai T., Ohno S., Soeda S., Tanaka H., Shoyama Y. et Shimeno H. (2004). Crocin prevents the death of rat pheochromyctoma (PC-12) cells by its antioxidant effects stronger than those of  $\alpha$ -tocopherol. *Neuroscience letters*, 362(1), 61-64.
99. Orihara Y., Yang J. W., Komiya N., Koge K. et Yoshikawa T. (2002). Abietane diterpenoids from suspension cultured cells of *Torreya nucifera* var. *radicans*. *Phytochemistry*, 59(4), 385-389.
100. Ovesna Z. et Horvathova-Kozics K. (2005). Structure-activity relationship of trans-resveratrol and its analogues. *Neoplasma*, 52(6), 450.
101. Palmer J. D. et Shields C. R. (1984). Tripartite structure of the *Brassica campestris* mitochondrial genome. *Nature*, 307(5950), 437-440.
102. Park J. A., Park B. J., Kim A. H., Park S. Y. et Paek K. Y. (2015). Airlift bioreactor system and nitrogen sources for biomass and antioxidant compound production from in vitro culture of *Vitis flexuosa* plantlets. *Horticulture, Environment, and Biotechnology*, 56(3), 358-365.
103. Parrot W.A., Bailey M.A., Durhan R. E., Marthew A.V. (1992). Tissue culture and regeneration in legumes, II. *Biotechnology and crop improvement in Asia*, Ed. I.C.R.I.A.T., India, Pp115-151.
104. Piątczak E., Grzegorzczak-Karolak I. et Wysokińska H. (2014). Micropropagation of *Rehmanniaglutinosa* Libosch.: production of phenolics and flavonoids and evaluation of antioxidant activity. *Actaphysiologiaeplantarum*, 36(7), 1693-1702.

105. Razdan M. K. (2003). Introduction to plant tissue culture, science publishers, 375p.
106. Re R., Pellegrini N., Proteggente A., Pannala A., Yang M. et Rice-Evans C. (1999). Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free radical biology and medicine*, 26(9-10), 1231-1237.
107. Richard E.V. (2005). Genetic Improvement of Solanaceous Crops Volume I: Potato. Editors. Maharaj K. Razdan. Autar K. Mattoo. 451p.
108. Roberst-Oehlschlager S.L. et Dunwell J.M. (1990). Barley anther culture: Pretreatment on mannitol stimulates production of microspore-derived embryos. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* 20: 235–240
109. Robert D., Dumas C., Bajon C. (1994). Biologie végétal caractéristique et stratégies évolutives des olantes, T iii: La production, Ed. Doin, Paris, 389p..
110. Rousselle P., Robert Y. et Crosnier J.C. (1996). La pomme de terre: Production, Amélioration, Ennemis et maladies, Utilisation. Ed. Inra, Itpt, Itcf, Paris. 607 p.
111. Roberts G. (1998). Competitive altruism: from reciprocity to the handicap principle. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences*, 265(1394), 427-431.
112. Rout, G. R., Samantaray, S., & Das, P. (2000). In vitro manipulation and propagation of medicinal plants. *Biotechnology advances*, 18(2), 91-120.
113. San Noeum L. H. (1976). Haploïdes d, *Hordeum vulgare* L. par culture in vitro non fécondes. *Ann. Amélior Plantes*, 26, 751-754.
114. Sánchez-Moreno C. (2002). Methods used to evaluate the free radical scavenging activity in foods and biological systems. *Food science and technology international*, 8(3), 121-137.
115. Sangwan R. S. et Sangwan-Norreel B. S. (1987). Biochemical cytology of pollen embryogenesis. In *International review of cytology* (Vol. 107, pp. 221-272). Academic Press.
116. Shimomura K, Yoshimatsu K, Jaziri M, Ishimaru K. (1997). Traditional medicinal plant genetic resources and biotechnology applications. *Plant Biotechnology and Plant Genetic resources for Sustainability and Productivity*. (Series:Biotechnology Intelligence Unit), pp. 209–25.
117. Sibi M. (1971). Création de variabilité par culture de tissus in vitro chez *Lactuca sativa* DEA. *Amélior Pl Unir Paris, Sud, Orsay*.
118. Skirvin R. M., McPheeters K. D. et Norton, M. (1994). Sources and frequency of somaclonal variation. *HortScience*, 29(11), 1232-1237.

119. Smith M. A. L. (2000). Secondary product expression in vitro. In: Trigiano RN, Grey DJ, editors. *Plant tissue culture concepts and laboratory exercises*. Boca Raton, FL: CRC Press. p. 355–60.
120. Sokkar N., El-Gindi O., Sayed S., Mohamed S., Ali Z. et Alfshawy I. (2013). Antioxidant, anticancer and hepatoprotective activities of *Cotoneaster horizontalis* Decne extract as well as  $\alpha$ -tocopherol and amygdalin production from in vitro culture. *Actaphysiologiaeplantarum*, 35(8), 2421-2428.
121. Soobrattee M. A., Neergheen V. S., Luximon-Ramma A., Aruoma O. I. et Bahorun, T. (2005). Phenolics as potential antioxidant therapeutic agents: mechanism and actions. *Mutation Research/Fundamental and Molecular mechanisms of mutagenesis*, 579(1-2), 200-213.
122. Stintzing F. C. et Carle R. (2004). Functional properties of anthocyanins and betalains in plants, food, and in human nutrition. *Trends in food science & technology*, 15(1), 19-38.
123. Su W. W. et Humphrey A. E. (1990). Production of rosmarinic acid in high density perfusion cultures of *Anchusa officinalis* using a high sugar medium. *Biotechnology letters*, 12(11), 793-798.
124. Su W. W., Lei F. et Su L. Y. (1993). Perfusion strategy for rosmarinic acid production by *Anchusa officinalis*. *Biotechnology and bioengineering*, 42(7), 884-890.
125. Sugisawa H. et Ohnishi Y. (1976). Isolation and identification of monoterpenes from cultured cells of *Perilla* plant. *Agricultural and Biological Chemistry*, 40(1), 231-232.
126. Tabti D. (2009). Regeneration *in vitro* de plants sains a partir d'apex caulinaired'olivier *Olea europea* L. Var. CHEMLAL. Thèse de Magister en Sciences agronomiques. EL HARRACH – ALGER (ENSA), P.35.
127. Tadhani M. B., Patel V. H. et Subhash R. (2007). In vitro antioxidant activities of *Stevia rebaudiana* leaves and callus. *Journal of Food Composition and Analysis*, 20(3-4), 323-329.
128. Tague R. E. (1986). Protoplasts isolation and culture. *Plant protoplasts*, 2ème édition. CRC press, pp 1-20.
129. Takebe I., OTSUKI Y. et AOKI S. (1968). Isolation of tobacco mesophyll cells in intact and active state. *Plant and cell physiology*, 9(1), 115-124.
130. Takeda R. et Katoh K. (1981). Growth and sesquiterpenoid production by *Calypogeia granulata* Inoue cells in suspension culture. *Planta*, 151(6), 525-530.

131. Tassoni A., Fornalè S., Franceschetti M., Musiani F., Michael A. J., Perry B. et Bagni N. (2005). Jasmonates and Na-orthovanadate promote resveratrol production in *Vitis vinifera* cv. Barbera cell cultures. *New Phytologist*, 166(3), 895-906.
132. Tholl D. (2006). Terpene synthases and the regulation, diversity and biological roles of terpene metabolism. *Current opinion in plant biology*, 9(3), 297-304.
133. Ullah M. A., Tungmunnithum D., Garros L., Hano C. et Abbasi B. H. (2019). Monochromatic lights-induced trends in antioxidant and antidiabetic polyphenol accumulation in in vitro callus cultures of *Lepidium sativum* L. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 196, 111505.
134. Vaibhav T., Tiwari K. N. et Singh B. D. (2000). Suitability of liquid cultures for in vitro multiplication of *Bacopa Monniera* (L.) Wettst. *Phytomorphology*, 50(3/4), 337-342.
135. Verpoorte R., Contin A. et Memelink J. (2002). Biotechnology for the production of plant secondary metabolites. *Phytochemistry reviews*, 1(1), 13-25.
136. Violon C., Sonck W. et Vercruyse A. (1984). Comparative study of the essential oils of in vivo and in vitro grown *Valeriana officinalis* L. and *Centranthus macrosiphon* Boiss. by coupled gas chromatography—mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 288, 474-478.
137. Wang B.S.P., Charest J.P., Downie B. (1994). Conservation en situ de pollen et de graines et de culture in vitro de plantes ligneuses pérennes. Ed. FAO., Forêts, Rome. 113 p.
138. Wernicke W., Potrykus I. et Thomas E. (1982). Morphogenesis from cultured leaf tissue of *Sorghum bicolor*—The morphogenetic pathways. *Protoplasma*, 111(1), 53-62.
139. Wijeratne S. S. et Cuppett S. L. (2007). Potential of rosemary (*Rosemarinus officinalis* L.) diterpenes in preventing lipid hydroperoxide-mediated oxidative stress in Caco-2 cells. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55(4), 1193-1199.
140. Yeoman M. (1986). Plant cell culture technology, Botanical monograph. 23, Er. Black well scientific publications, Pp. 1-51.
141. Zabetakis I. et Holden M. A. (1997). Strawberry flavour: analysis and biosynthesis. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 74(4), 421-434.

## **Résumé :**

Les plantes médicinales sont des espèces très importantes sur socio-économique, elle est utilisée pour ses propriétés thérapeutique particulières bénéfiques pour la santé humaine, voire animale. Où La biotechnologie impliquant la culture tissulaire moderne, la biologie cellulaire et la biologie moléculaire offre l'opportunité de développer de nouveaux germoplasmes bien adaptés à l'évolution des demandes, d'où l'étude porte sur les différentes techniques de la biotechnologie de la culture in vitro employées pour la propagation et l'amélioration des plantes médicinales ainsi que pour la conservation des ressources phytogénétiques. Il met également en évidence certaines des applications de la culture de tissus végétaux aux plantes médicinales, les réalisations et les limites de la culture de tissus et quelques aperçus sur les développements actuels et futurs possibles.

**Mots Clés :** Les plantes médicinales, Applications de La biotechnologie, la culture in vitro

## **Abstract :**

Medicinal plants are species very important socio-economic, they are used for their particular therapeutic properties beneficial to human health, even animal. Where Biotechnology involving modern tissue culture, cell biology and molecular biology offers the opportunity to develop new germplasms well adapted to changing demands, hence the study focuses on the various techniques of in vitro culture biotechnology employed for the propagation and improvement of medicinal plants as well as for the conservation of plant genetic resources. It also highlights some of the applications of plant tissue culture to medicinal plants, the achievements and limitations of tissue culture, and some insights into possible current and future developments.

**Key words:** Medicinal plants, Biotechnology Applications, in vitro culture

## **الملخص :**

النباتات الطبية التي تعتبر من الأنواع المهمة جداً على المستوى الاجتماعي والاقتصادي، فهي تستخدم لخصائصها العلاجية الخاصة المفيدة لصحة الإنسان، حتى الحيوان. حيث توفر التكنولوجيا الحيوية التي تشمل زراعة الأنسجة الحديثة وبيولوجيا الخلية والبيولوجيا الجزيئية الفرصة لتطوير بلازما جرثومية جديدة تتكيف جيداً مع المتطلبات المتغيرة. ومن هنا تركز الدراسة على التقنيات المختلفة للتكنولوجيا الحيوية في المختبر المستخدمة لإكثار وتحسين النباتات الطبية وكذلك للحفاظ على الموارد الوراثية النباتية. كما يسلط الضوء على بعض تطبيقات زراعة الأنسجة النباتية على النباتات الطبية، وإنجازات وقيود زراعة الأنسجة، وبعض الأفكار عن التطورات الحالية والمستقبلية المحتملة

**الكلمات المفتاحية :** النباتات الطبية، تطبيقات التكنولوجيا الحيوية، الزراعة في المختبر