

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE  
MINISTERE 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  
VEGETALE

**Mémoire présenté pour l'obtention  
Du diplôme de Master Académique**

**Par :**

**CHENANE Nada et TAYOUB Fatima Zohra**

**Intitulé**

**La culture *in vitro* au service de la  
conservation des phytoressources  
(ex. plantes médicinales)**

*Soutenu le 20 .06.2021 devant le jury composé de :*

Dr. YAHIAOUI Merzouk	MCA	Université de M'Sila	Président
Mme. KHALFA Hanane	MAA	Université de M'Sila	Examinatrice
Dr. BENDIF Hamdi	MCA	Université de M'Sila	Rapporteur.

**Année universitaire : 2020 /2021**

## Remerciements

En premier lieu, je remercie **ALLAH** le tout puissant pour toute la volonté et le courage qu'il m'a donné pour l'achèvement de cette thèse,

Ce travail s'inscrit dans le cadre de l'obtention de diplôme de Master académique en Biotechnologie végétale.

Nos respects et reconnaissances, nos remerciements sont adressés à **Dr. BENDIF Hamdi** Maître de conférences à L'université de Msila, qui a accepté de diriger ce mémoire, Sa rigueur et ses qualités scientifiques, vos conseils et orientations nous ont permis de mener à bien cette passionnante étude à vos côtés. Nous voudrions que vous acceptiez nos remerciements les plus sincères que nous voudrions formuler à votre endroit.

Nous voudrions particulièrement remercier **Dr. YAHIAOUI MERZOUK** Maître de Conférences à L'université de Msila. Toute nos reconnaissances en acceptant la présidence de jury de notre mémoire.

**Mme. KHALFA Hanane**, Maître-assistante à L'université de Msila, veuillez accepter, nos sincères remerciements, en acceptant l'examen de notre travail, c'est un honneur et un immense plaisir que de présenter ce travail devant vous.

En fin, à tous ceux et celles qui ont contribué de près et de loin à la réalisation de ce Mémoire qu'ils trouvent ici l'expression de nos profondes gratitude et nos remerciements.

## Dédicace

*Je dédie ce modeste travail*

*A ma très chère mère source de tendresse*

*A mon très cher père, qui m'encourage*

*Dans les instants délicats*

*A mes chers frères*

*pour Fatima : Aissa, Samia, Salah, Chouaib et hamza baadji*

*Pour Nada : Nawal, Selma, Amel, Houssam et Yakoub*

*A mes tantes et oncles*

*A toute ma famille*

*A tous mes amis surtout Souhaib Belfar*

---

## Résumé

Les plantes médicinales sont très importantes sur le plan socio-économique, elles sont utilisées pour leurs propriétés thérapeutiques particulières bénéfiques pour la santé humaine. La biotechnologie impliquant la culture *in vitro* offre l'opportunité pour la conservation des ressources phylogénétiques (plantes médicinales) rares ou en voie de disparition, elle met également en évidence certaines des applications de la culture de tissus végétaux aux plantes médicinales. La conservation *in vitro* semble une pratique pour la conservation de plantes médicinales à court et à moyen terme (Diminution de la température de stockage, Abaissement de la teneur en oxygène et Modifications au milieu de culture) et à long terme (Cryopréservation).

**Mots Clés :** plantes médicinales, *in vitro*, conservation, ex situ

---

## ملخص

تعتبر النباتات الطبية مهمة جدًا من الناحية الاجتماعية والاقتصادية ، فهي تستخدم لخصائصها العلاجية الخاصة المفيدة لصحة الإنسان. توفر التكنولوجيا الحيوية التي تعتمد على الاستنبات في المختبر طريقة مهمة للحفاظ على الموارد الوراثية النباتية النادرة أو المهددة بالانقراض (النباتات الطبية) ، كما أنها تسلط الضوء على بعض تطبيقات زراعة الأنسجة النباتية على النباتات الطبية. يبدو أن الحفظ في المختبر هو طريقة للحفاظ على النباتات الطبية على المدى القصير والمتوسط (خفض درجة حرارة التخزين ، خفض محتوى الأكسجين والتغيرات في وسط الاستزراع) وعلى المدى الطويل (الحفظ بالتبريد).

**الكلمات المفتاحية:** نباتات طبية، في المختبر ، حفظ ، خارج الموقع

---

## Abstract

Medicinal plants are very important from a socio-economic point of view, they are used for their particular therapeutic properties beneficial to human health. Biotechnology involving *in vitro* culture offers the opportunity for the conservation of rare or endangered plant genetic resources (medicinal plants). It also highlights some of the applications of plant tissue culture to medicinal plants. *In vitro* preservation seems to be a practice for the preservation of medicinal plants in the short and medium term (Decrease in storage temperature, Lowering of the oxygen content and Changes in the culture medium) and long term (Cryopreservation).

**Keywords:** medicinal plants, *in vitro*, conservation, ex situ

---

## Liste des figures

<b>Figure 1:</b> Quelques application de la culture <i>in vitro</i> (Culture- <i>in-vitro</i> -tpe.e-monsite.com).....	<b>11</b>
<b>Figure 2:</b> Micro propagaton de la pomme de terre par culture <i>in vitro</i> .....	<b>12</b>
<b>Figure 3:</b> Régénération des plantes à partir la culture de méristème .....	<b>13</b>
<b>Figure 4 :</b> L'embryogénèse somatique.....	<b>15</b>
<b>Figure 5:</b> Principe de l'haplo-diploïdisation.....	<b>16</b>
<b>Figure 6 :</b> Principe de la variation soma clonal.....	<b>17</b>
<b>Figure 7 :</b> Obtention des protoplastes.....	<b>18</b>

## Liste des Abréviations

**OMS** : Organisation mondiale de santé

**N** : Azote

**K**: Phosphor

**S**: Soufre

**Mg**: Magnésium

**Ca**: Calcium

**B** : Bore

**Mn** : Manganèse

**Zn** : Zinc

**Cu** : Cuivre

**Mo** : moly

**Ni** : Nickel

**Co**: Cobalt

**Al**: Aluminium

**Cm**: centimeter

**W.M** : watte par mètre

**BAP** : 6-benzyladénine

**PH**: potentiel hydrogène

**FAO**: Food and Agriculture Organization

**CIMMYT** : Centre internationale d'amélioration du maïs et du blé

**CIP** : contrat d'insertion professionnelle

**CIRP** : Collège International pour la Recherche en Productique

## SOMMAIRE

Liste des figures	
Liste des abréviations	
Introduction.....	1
<b>Chapitre I. la culture <i>in vitro</i></b>	
1. Généralités sur la culture <i>in vitro</i> .....	2
1.1. Définition.....	2
1.2. Historique.....	2
1.3. Totipotence.....	4
1.4. Facteur influents la culture <i>in vitro</i> .....	4
1.5. Croissance des végétaux.....	7
1.6. L'organogénèse <i>in vitro</i> .....	8
1.7. Avantage de la culture <i>in vitro</i> .....	9
1.8. Inconvénients de la culture <i>in vitro</i> .....	10
1.9. Catégorie de la culture <i>in vitro</i> .....	10
2. Différentes applications de la culture <i>in vitro</i> .....	10
2.1. La micro propagation.....	11
2.2. La culture de méristèmes.....	13
2.3. L'embryogénèse somatique.....	14
2.4. L'haplo diploïdisation.....	15
2.5. Variation soma clonale.....	16
2.6. Culture de protoplaste.....	17
<b>Chapitre II. Conservation des phytoressources</b>	
1. Généralité.....	20
2. Types de conservation.....	21
2.1. Conservation in situ.....	21
2.2. Conservation ex situ.....	22
2.2.1. Collections de base (conservation des graines).....	22
2.2.2. Collections actives (collection en champ).....	23
2.2.3. Collections de travail.....	23
2.2.4. Conservation <i>in vitro</i> .....	23
3. La conservation à court et moyen terme.....	24
3.1. Diminution de la température de stockage.....	24
3.2. Abaissement de la teneur en oxygène.....	25
3.3. Modification au milieu de culture.....	25
4. La conservation à long terme (cryopréservations).....	26
5. Maturation précoce des cultures <i>in vitro</i> .....	26
6. Atmosphère de conservation.....	27

---

## **Introduction :**

Les plantes médicinales continuent d'être une source importante de médicaments vitaux pour l'humanité, en particulier dans les pays en développement. L'Organisation mondiale de la santé a estimé que plus de 80% de la population mondiale des pays en développement dépend principalement de la phytothérapie pour les soins de santé de base (**Vines, 2004**). Elles constituent des ressources précieuses pour la majorité des populations rurale et urbaine en Algérie et représentent le principal moyen par lequel les individus se soignent (**Badiaga, 2011**). Malgré les progrès de la pharmacologie, l'usage thérapeutique des plantes médicinales est très présent dans certains pays du monde et surtout les pays en voie de développement (**Tabuti et al., 2003**).

L'Algérie, par la richesse et la diversité de sa flore, constitue un véritable réservoir phylogénétique, avec environ 4000 espèces et sous-espèces de plantes vasculaires (**Dobignard et Chatelain, 2010-2013**). Devant l'importance du secteur des plantes en Algérie (particulièrement de la filière des plantes médicinales), on trouve de nombreux problèmes pour conserver cette filière.

La méthode *in vitro* est parfaitement appropriée au stockage du matériel végétal qui peut ainsi être conservé indemne de toute maladie, dans un espace réduit, en conditions stériles (**Henshaw, 1982**). Le matériel peut être maintenu dans des conditions de croissance limitée, pour faciliter la gestion des collections *in vitro* de grande taille, et limiter les problèmes de repiquages répétés (main d'œuvre, risque de contamination ou d'erreur d'étiquetage) (**Ibpr, 1986a**).

L'objectif de conservation des plantes médicinales dépend du maintien de la stabilité de leurs écosystèmes et de l'utilisation des composés phytochimiques inhérents au développement de produits de grande valeur (**Ratnam et Teik 1999**). Les pratiques de conservation *in situ* à travers les réserves de biosphère, les sanctuaires et les parcs nationaux peuvent préserver le système de reproduction, mais cela seul est insuffisant pour leur utilisation durable.

Méthodologiquement, ce travail est subdivisé en deux grandes parties théorique commençant par une introduction : une partie qui rassemble une description de la technique de la culture *in vitro* et ses applications, la deuxième partie est consacrée à l'étude des différentes techniques de conservations des ressources végétales (les plantes médicinales). Et enfin une conclusion.

---

## CHAPITRE I. LA CULTURE *IN VITRO*

### 1. Généralité sur la culture *in vitro* :

#### 1.1 Définition :

La culture *in vitro* de plantes sont des cultures d'explants de plantes, de cellules sur un milieu nutritif artificiel, en conditions stériles, dans un environnement contrôlé et dans un espace réduit. C'est donc une méthode pour maintenir et cultiver indéfiniment des plantes sur des milieux nutritifs artificiels (**zryd, 1988**). Les techniques de culture *in vitro* doivent toutes leur extension au premier principe de la propagation des végétaux : la totipotence, dont les cellules indifférenciées sont capables de se développer en plante entière. Concept énoncé par **Haberland** en **1902**, est à l'origine même du fondement de la culture *in vitro* (**Auge et al., 1989**).

Cette technique englobe deux modes de multiplication (conforme et non conforme), Seuls sont développés actuellement pour les essences forestières le bourgeonnement axillaire (départ des méristèmes situés à l'aisselle des feuilles) et le bourgeonnement adventif (induction de méristèmes de tiges sur des organes n'en possédant pas) chez *Pinusradiata* en particulier, l'expérimentation n'en étant qu'à ses débuts pour les autres méthodes.

Plusieurs étapes sont incluses dans la micropropagation *in vitro*. Certaines s'apparentent à la multiplication classique (Prétraite ent du pied mère, rhizogénèse, acclimatation), d'autres sont propres à la culture *in vitro* (Choix de l'explant le plus réactif, stérilisation de l'organe végétal, choix de la technique de propagation).

#### 1.2. Historique :

Le botaniste autrichien **G. Haberland** a proposé pour la première fois la base idéologique de la culture tissulaire en 1902 (**Haberland, 2009**). Il voulait savoir si les cellules somatiques étaient vraiment destinées à mourir ou si cela n'était pas causé par une sorte d'empoisonnement cellulaire dans le corps. Par conséquent, il est nécessaire d'isoler les cellules et de savoir si elles peuvent survivre ou même se reproduire. Le concept de pluri potence cellulaire proposé par **Haberland** a trouvé la base de la reproduction *in vitro* : les cellules, la morphologie biologique et les unités physiologiques ont une autonomie. Il possède toutes les informations génétiques nécessaires à la régénération de la plante entière, à condition que les conditions créées soient propices à la croissance de la plante. En **1902**, **Haberland** a cultivé des cellules végétales (quelques petites amas) mais n'a pas réussi à les diviser. Jusqu'en 1935, grâce aux travaux de **Went** et **Thiman** sur les auxines, Gautheret

---

obtint la prolifération des cellules glandulaires du saule en France, qui dura plusieurs mois : **(Went, Thyman, 2009)**. En 1939, White aux États-Unis obtient d'une part la culture du tabac incertaine (**White P.R, 1941**), et d'autre part la reconnaissance de **Gautheret (Gautheret R.J., 1945)** et **(Nobecourtp, 1943)**. Ils publient en France sur la culture organisationnelle incertaine. Travail, c'est-à-dire des callosités qui ne se sont pas différenciées en organes sur le tissu de la carotte. Une nouvelle étape très importante de la multiplication végétative *in vitro* comprendra la régénération des plantules à partir de la pointe de croissance. En commençant par les bulbes en 1946, American Ball (**Ball E, 1949**) a acquis des plantes de lupin et de capucine, tandis que **(Morel G. and Wetmore R. H., 1951)** ont régénéré des fougères en 1949. Dans le même temps, **(Limasset P. et Cornuet P, 1949)** en France ont confirmé qu'il n'y avait pas de particules virales dans le méristème le plus élevé du tabac viral. En 1952, **(Morel G, Martin C, 1952)** ont réussi à cultiver des méristèmes apicaux de tiges afin de pouvoir régénérer des plantes entières saines. Ils travaillent sur le dahlia. En 1955, Morel a confirmé la pomme de terre pour la première fois **(Morel G, Martin C, 1955)**, ce fut le premier succès. En 1958, **Steward** et ses collaborateurs ont obtenu des plantes entières à partir de suspensions de cellules de carottes et ont rapporté la germination et le développement d'embryons somatiques à partir de cellules de carottes cultivées *in vitro* **(Steward F.C. and Reinert J., 1958)** qui est la troisième étape de la propagation *in vitro*. Une meilleure compréhension du rôle de l'hormone de croissance dans les phénomènes tissulaires de culture cellulaire permettra des avancées importantes dans les techniques de prolifération *in vitro* **(Went. F. W., 1927 ; Sussex I. M., 2008)**. En raison de l'adaptation à l'équilibre hormonal, il est possible d'induire une organogenèse définie à partir d'explants très différents. Il ne fait aucun doute que la preuve de la possibilité de régénération à partir de cellules somatiques est sans aucun doute que **Vasil et Hildebrandt** ont obtenu des plantes entières à partir de cellules isolées en culture tissulaire en 1965 **(Vasil V. and Hildebrandt A. C, 1965)**. En 1971, **Takebe, Labib et Melchers** ont obtenu des plantes entières à partir de protoplastes isolés de bactéries mésophiles des feuilles **(Takebe I, Labib, G. and Melchers G, 1971)**. Depuis, toutes les données de base sont connues, ou du moins maîtrisées, augmentant ainsi à l'infini toute usine. Peu avant 1970, les premiers laboratoires commerciaux ont été créés aux États-Unis et en Europe. Chaque année, ils ont des dizaines de milliers de plantes capables de répondre aux besoins du jardinage. Ces premiers laboratoires manuels sont dédiés aux usines à forte valeur ajoutée et deviendront dans quelques années des usines de fabrication d'usines à faible valeur ajoutée. Le rôle de l'Europe

---

dans ce développement était nécessaire. Actuellement, de nombreux laboratoires privés de micro propagation existent principalement dans les pays d'Amérique latine et d'Asie.

### **1.3. La totipotence :**

La théorie omnipotente d'**Haberland** mise en avant en **1902** a été valorisée et renversée **Steward (1967)**. La théorie est basée sur le fait que toutes les informations génétiques et donc le processus d'embryogenèse sont présents dans le noyau de chaque cellule vivante (**Norrel, 1973**). Les tissus ou cellules dédifférenciés peuvent évoluer dans n'importe quelle direction qui peut montrer la pluri potence des cellules végétales. Cette totipotence des cellules végétales se retrouve également au niveau des cellules germinales : grains de pollen ou ovules. Il connaît un succès depuis 1966 et a été bien utilisé pour obtenir des haploïdes dont les chromosomes peuvent être doublés par la cholinase. Cette caractéristique est également le point de départ d'un isolement et d'une culture réussis de protoplastes.

Théoriquement, chaque protoplaste peut reproduire exactement les mêmes plantes que le parent femelle. Même les cellules végétales hautement différenciées peuvent généralement être restaurées dans cet état La larve se différencie et peut alors se diviser en une organisation ou une autre Cela dépend de la situation (**Djennane et Klifatti, 1996**). Tout-puissant est une dédifférenciation expérimentale qui peut être déclenchée par le traumatisme, l'action des phytohormones ou leur inhibition pour détruire la corrélation organique (**Demarly et Sibi, 1996**). Tout-puissant est la caractéristique de chaque cellule végétale avec vitalité, Si elle est placée dans des conditions appropriées, la plante entière peut être régénérée.

### **1.4. Facteurs influents la culture *in vitro* :**

Les facteurs influant sur la régénération *in vitro* peuvent être répartis en deux groupes :

1- Les facteurs internes, liés à la plante : concerne d'une part le génotype, la nature et l'âge ontogénique de l'explant et d'autre part l'état physiologique de la plante mère sur laquelle, l'explant a été prélevé.

2- Les facteurs externes qui englobent, les milieux de cultures (notamment leur composition en régulateurs de croissance et les sucres) et les conditions de la mise en culture.

---

#### **1.4.1. Effet de l'explant :**

L'un des principaux avantages de la culture *in vitro* est de montrer que le cal peut produire des embryons ou des bourgeons somatiques dont le développement permet de régénérer des plantes cohérentes avec la plante mère. En fait, il est possible de séparer la culture de quel organe (bourgeons, racines, feuilles, anthères, etc.) ou fragments d'organes (explants) du milieu nutritif synthétique, mais ce n'est pas important. Cependant, il convient de noter que la réponse *in vitro* dépend de nombreux facteurs (Saadi et Hamdani, 2007).

##### **1.4.1.1. L'âge physiologique et ontogénique de l'organe :**

Généralement, en culture *in vitro*, il est tout à fait préférable que les explants soient les plus jeunes (embryons immatures, jeunes feuilles, méristèmes, etc.). Leur état juvénile est propice à plus de possibilités de régénération. (Vidalis et al., 1989). En général, la capacité de régénération des tissus à partir d'embryons est le plus souvent exprimée de manière claire et reproductible, suivie des cotylédons (Saadi et Hamdani, 2007).

##### **1.4.1.2. L'époque du prélèvement :**

Ce problème concerne surtout l'émergence d'espèces biologiques pluriannuelles, on peut distinguer le stade de vie actif et le stade de vie lent des plantes, ce qui conduit au développement de différentes réponses d'explants *in vitro*. Cette différence peut s'expliquer par la modification de l'équilibre interne des régulateurs de croissance (auxine, cytokinine, gibbérelline, etc.) à différentes saisons (Vidalis et al., 1989).

##### **1.4.1.3. La taille de l'explant**

Plus la taille est grande, plus l'équilibre endogène est déterminé, Les conditions extérieures auront un impact. La taille choisie dépendra des Implants. Si l'implant a des propriétés reproductives, l'échantillon doit produire Organe entier (nœud, apex ou bourgeon entier). Mais si c'est Fragments de 5 à 10 mm de tissu différencié (feuille, tige, racine, inflorescence ...) (Vidalis et al., 1989 ; Saadi et Hamdani, 2007).

De manière générale, il existe des organisations privilégiées appelées " Organisation cible OMS Répondre aux stimuli indicatifs et diriger son programme de morphogénèse Chemin de développement spécifique, différent de certaines organisations qui ne sont pas disposées à accepter Opérations *in vitro*, principalement en raison d'un manque de capacité cellulaire (Webb et al., 1989 ; Wheeler et al., 1985).

---

#### 1.4.2. Effet du génotype :

La plupart des plantes présentent une régénération génotypique spécifique et Les espèces. Au sein de la même espèce, un génotype produira des bourgeons, et L'autre ne peut fournir que des embryons (**Boxus, 1995**). Cependant, il y a quelques L'auteur mentionne que seuls certains génotypes semblent avoir cette capacité Induire l'embryogenèse somatique. Dans de nombreuses espèces, cette capacité semble Effectuer un contrôle génotypique (**Vidalis et al., 1985 ; Isac et al., 1994 ; Caraglio, 2012**).

#### 1.4.3. Milieu de culture :

Il existe pour chaque espèce végétale 3 milieux :

- Un milieu d'activation, Un milieu de multiplication et un milieu d'enracinement.

Tous ces milieux sont constitués de sels minéraux, de substances organiques de phytohormones et d'extraits naturels (lait de coco, jus de fruit, hydrolysât de caséine).

Pour la plupart des plantes supérieures les sels minéraux sont de 2 types :

- les macro éléments (N, P, K, S, Mg et Ca),

- les micro éléments ou oligo-éléments (B, Mn, Zn, Cu, Ni, Co, Mo, Al, I, Fe). Ces derniers n'en sont pas moins indispensables, c'est par exemple le cas de fer sans lequel on n'obtient pas de croissance.

De nombreuses formulations ont été proposées et les plus utilisées sont celles de Murashige et Skoog, Gamborg, Knop, White et Gautheret. L'équilibre minéral mis au point en 1962 par MURASHIGE et SKOOG est largement répandu. Défini pour des travaux sur la croissance de cals de tabac, il donne de bons résultats pour beaucoup de cultures mais il n'est pas universel.

#### 1.4.4. La lumière :

Chez les plantes cultivées *in vitro*, la photosynthèse n'est pas une activité nécessaire puisque l'énergie est fournie par les glucides du milieu. Cependant, même réduite la photosynthèse persiste dans les tissus. De plus la lumière est indispensable au déclenchement et au bon déroulement de certains processus morphogénétiques : nécessité de jours longs pour obtenir des boutons floraux par ex. La puissance lumineuse à fournir dépend de la durée de l'éclairement et de la qualité spectrale de la lumière reçue par la culture. On exprime l'intensité lumineuse en  $W.m^{-2}$ , intensité mesurée au niveau de la culture. On obtient

---

généralement 100 à 150 W.m<sup>-2</sup> pour des tubes fluorescents placés à 20cm au-dessus des récipients de culture.

#### **1.4.5. La température :**

La température est généralement régulée à 20/25°C en continu. Il ne faut pas négliger que la température dans les flacons de cultures peut être supérieure de 2 à 4°C à la température de la pièce à cause de l'éclairage.

#### **1.4.6. L'hygrométrie :**

Elle doit atteindre les 100% d'humidité relative dans les flacons. Cependant, il faut veiller à ne pas noyer les explants par un excès de condensation à la surface du milieu.

### **1.5. Croissance des végétaux :**

#### **1.5.1. La multiplication :**

La croissance des plantes se fait en plusieurs étapes qui permettent le développement d'une graine en une plante capable de se reproduire. Pour cela, il faut d'abord une prolifération cellulaire par mitose qui se réalise au niveau de tissus spécialisés : les méristèmes (= zone de prolifération cellulaire). Ils sont situés :

- Méristèmes primaires : apex des racines, extrémité des tiges, bourgeons apicaux,
- Méristèmes secondaires : dans les tissus plus anciens responsables de l'épaississement des tissus.

Une fois la croissance réalisée, il y a différenciation de cellules qui serviront les unes à la circulation des sèves (phloème, xylème), les autres à la photosynthèse (feuilles), à la nutrition (racines). C'est donc un phénomène complexe qui dépend de facteurs externes et internes.

#### **1.5.2. Les substances de croissance :**

Le développement végétal est régulé par des facteurs de croissance qui, par leur action à distance du lieu de production sont appelés PHYTOHORMONES. Ces substances peuvent agir en synergie ou en antagonisme. Les principales hormones végétales sont :

- les auxines
- les gibbérellines : elles sont constituées par un ensemble de composés dérivés des terpènes. Elles activent l'allongement des entre-nœuds par élongation et prolifération cellulaire. Elles favorisent la croissance des feuilles et lèvent la dormance.

---

- les cytokinines : elles dérivent de l'adénine et sont synthétisées par l'apex et les racines. Elles favorisent les divisions cellulaires.

### **1.5.3. Effets biologiques des doses hormonales :**

Au cours des cultures *in vitro*, deux hormones sont utilisées : l'auxine et la BAP (cytokinine).

- si auxine / BAP  $\approx 1$  : croissance importante du cal cellulaire.
- si auxine / BAP  $\gg 1$  : croissance plutôt des racines.
- si auxine / BAP  $\ll 1$  : croissance plutôt des bourgeons et des feuilles.

### **1.6. L'organogénèse *in vitro* :**

La base fondamentale de la multiplication végétative, laquelle s'appuie toujours sur la formation de bourgeons (méristèmes) (Caulogénèse) et de racine (Rhizogénèse).

#### **1.6.1. La caulogénèse :**

Étymologiquement, le terme signifie la formation d'une tige. Mais c'est universel Utilisé pour indiquer la formation des bourgeons à l'origine des tiges feuillues. Dans ces circonstances Dans l'organogénèse *in vitro*, il est couramment utilisé comme bourgeon. La certitude de la caulogénèse (ou de la nouvelle formation de bourgeons) est toujours La question centrale de la reproduction végétative. Toute reproduction végétative nécessite en fait L'existence de points nutritifs et leur reproduction.

#### **1.6.2. La rhizogénèse :**

Est le phénomène d'organogénèse le plus courant Reproduction végétative. La recherche sur les racines des cheveux prend de plus en plus en compte Les facteurs complexes interagissent mais sont toujours régis par des problèmes de réglementation Le rôle des hormones, en particulier de l'auxine, dans l'organogénèse. en plan Fonction de base de la racine des cheveux, plus facile à expérimenter que la cause Un bon moyen de déterminer l'organogénèse liée au mécanisme de l'organogénèse Différenciation cellulaire et dédifférenciation (**Margara, 1984**).

---

### 1.7. Avantages de culture *in vitro* :

**L'assainissement des végétaux :** La culture *in vitro* permet l'élimination des virus et des bactéries.

**La multiplication de masse :** obtenir, rapidement et indépendamment des conditions climatiques, un grand nombre de plantes qui sont stockées dans un espace réduit.

**L'accroissement de la diversité :** Des plantes rares, en voie de disparition, peuvent être conservées et multipliées en culture *in vitro*. De même, des plantes qui font peu de semences et qui sont difficiles à bouturer et/ou à greffer bénéficient aussi de cette technique. On peut ainsi obtenir des rosiers ou des vignes sur leurs propres racines.

**La production de nouvelles espèces/variétés ou de plantes stériles :** plantes résultant de croisement (hybrides) qui sont souvent stériles, Plantes transgéniques, plantes à fruits sans pépins, plante présentant une caractéristique intéressante come par exemple la couleur particulière de ses fleurs —> nouveau cultivar.

**La multiplication de plantes sélectionnées pour :** leur résistance aux maladies, leur production plus importante, leur tolérance à divers facteurs (sécheresse, excès d'eau, trop ou trop peu de sels, froid/chaud, herbicide), Leur vigueur

**La sélection de plantes résistantes :** On peut exercer une pression de sélection en cultivant les plantes sur des milieux contenant des concentrations croissantes en sels ou en herbicides. Les plus résistantes sont repiquées sur du milieu de plus en plus concentré. Sélectionner des plantes capables de vivre sur des milieux pauvres ou des plantes résistantes à certains pathogènes ([labos.ulg.ac.be/cedevit](http://labos.ulg.ac.be/cedevit)).

#### **Conservation des ressources végétales :**

- La méthode *in vitro* est parfaitement appropriée au stockage du matériel végétal qui peut ainsi être conservé indemne de toute maladie, dans une espace réduite, en conditions stériles (**Henshaw, 1982**).
- Le matériel peut être maintenu dans des conditions de croissance limitée, pour faciliter la gestion des collections *in vitro* de grande taille, et limiter les problèmes de repiquages répétés (main d'œuvre, risque de contamination ou d'erreur d'étiquetage) (**IBPGR, 1986a**).

---

## **1.8. Inconvénients de la culture *in vitro* :**

- Le problème de contamination **Casselle, (1987)**.
- L'exigence de main d'œuvre qualifiée.
- La difficulté d'installation des cultures *in vitro* qui nécessite pour certaines plantes de longues recherches, comme le besoin de rejuvénissements pour les arbres adultes (**Francllet, 1981**), la stérilisation et désinfection des plantes tropicales (**Duhem et al., 1988**). L'entretien et la multiplication des apex (**Lardet et al., 1990**).

## **1.9. Catégorie de la culture *in vitro* :**

### **1.9.1.C atégorie de la culture *in vitro* Conforme :**

C'est une façon d'augmenter le nombre des individus, ce qui permet aux individus d'obtenir la même base de données d'informations génétiques que leurs plantes d'origine (**NozeranetBancilhon, 1972**).

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

### **1.9.2. Catégorie de la culture *in vitro* non conforme :**

Ce procédé utilise des matières végétales mal régulées et les mettre dans de bonnes conditions ; puis, nous voyons une variabilité évidente (**Demarly, 1985**).

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

## 2. Différentes applications de la culture *in vitro*

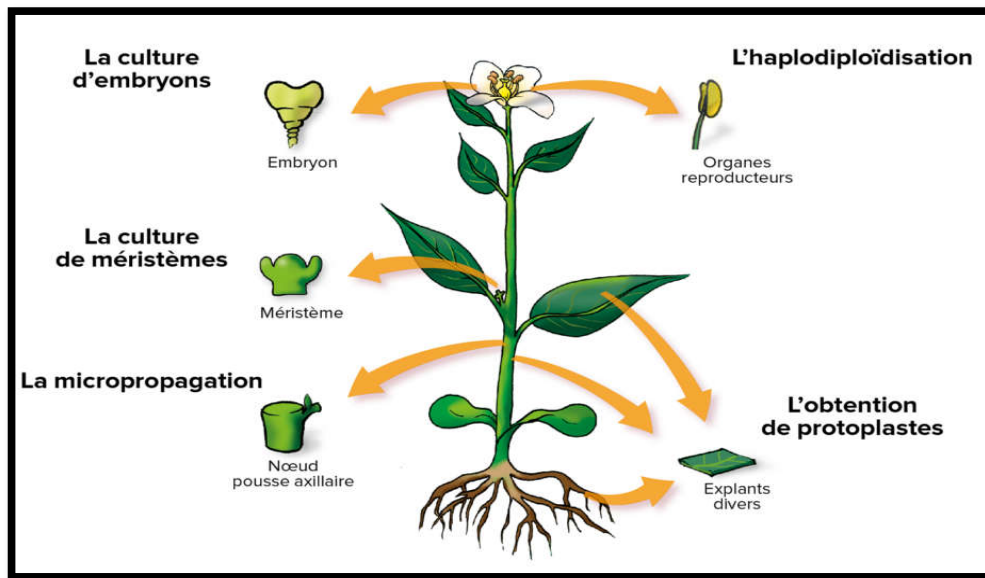


Figure 1 : Quelques applications de la culture *in vitro* (Culture-in-vitro-tpe.e-monsite.com)

### 2.1. La micro-propagation :

Elle permet de reproduire un individu et le multiplier en très grand nombre, à partir de cellules ou d'un fragment d'organe. Elle se réalise par exemple à partir de nœuds, de pousses axillaires et s'apparente au bouturage des jardiniers. Mis en culture, ces tissus se développent et donnent une plante entière grâce à l'usage séquentiel de milieux nutritifs adaptés(gnis-pedagogie.org).

#### 2.1.1. Avantages de la micro-propagation :

- Les plantes obtenues sont génétiquement identiques à la plante ou variété de départ
- La puissance de multiplication du clonage *in vitro* permet une production d'un grand nombre de plantes génétiquement homogènes en un laps de temps court. En 1 an, on peut produire en théorie plus de 4 millions de plants d'œillets à partir d'un seul apex, ou encore 50 000 plants de framboisiers alors que traditionnellement on en obtient 50.
- Les plantes obtenues sont de qualité car en très bon état sanitaire, avec un enracinement régulier, des ramifications nombreuses, donc une vigueur accrue.
- Le volume de plantes nécessaire à la mise sur le marché des nouvelles variétés est plus rapidement atteint.
- La production de plantes *in vitro* permet de s'affranchir des saisons. Les cultures peuvent être ainsi programmées afin d'utiliser rationnellement les surfaces de serres.

- 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.
- Pour les espèces fruitières ou ornementales, en multipliant *in vitro*, il est possible de s'affranchir des porte-greffes. Ainsi les arbres ou arbustes obtenus ne présenteront pas de problème de rejet de "sauvageon".
- 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.
- La culture *in vitro* permet de multiplier des plantes stériles
- Il est possible de conserver des variétés anciennes à l'abri des parasites et pathogènes, dans un espace réduit dû à la miniaturisation des vitroplants: plus de 1 000 plants/m<sup>2</sup>.
- On peut reboiser très rapidement des plantations qui pourraient être ravagées par des parasites ou des catastrophes naturelles.
- Les vitroplants sont très facilement transportables d'un pays à l'autre sans risques sanitaires

### 2.1.2. Inconvénients de la micro-propagation :

Le coût du plant *in vitro* est plus élevé que celui d'une bouture obtenue classiquement, il demande une main-d'œuvre spécialisée qui représente environ 60% à 70 % du prix de revient car l'automatisation est limitée ([technivit.pagesperso-orange.fr](http://technivit.pagesperso-orange.fr)).

### Exemple de micro propagation de la pomme de terre

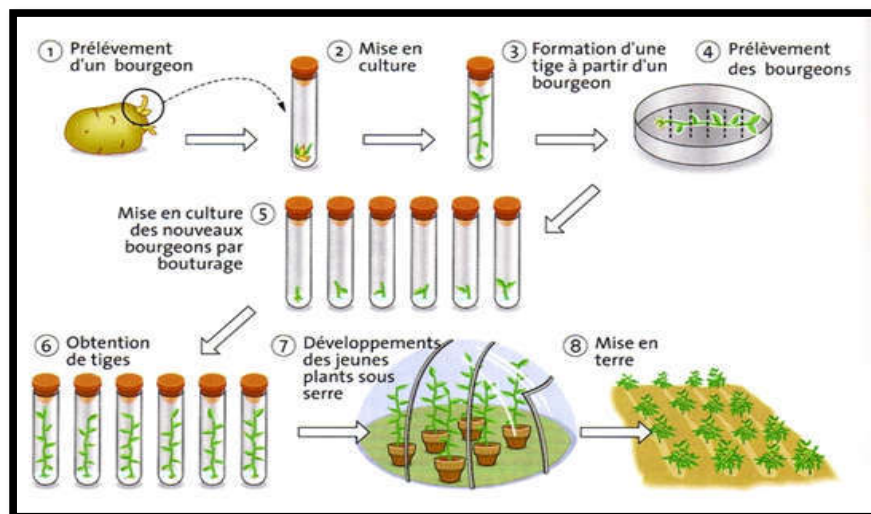


Figure 2 : Micro propagation de la pomme de terre par culture *in vitro*

---

## 2.2. La culture de méristèmes :

Les méristèmes sont formés de cellules non différenciées, à l'origine de tous les tissus de la plante. L'intérêt des méristèmes réside dans le fait que ce sont des structures indemnes de virus. Leur culture va permettre de régénérer des plantes saines.

### 2.2.1. Avantages de la culture de méristèmes :

- La culture de méristèmes permet le sauvetage des variétés menacées de disparition car très viroses. Elle concerne essentiellement les plantes à reproduction par voie végétative bouturage, marcottage, etc. tels le Pélargonium, le dahlia, le chrysanthème, la pomme de terre, l'artichaut, le fraisier, framboisier, etc. car cette voie favorise la transmission des virus à la descendance.
- 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.
- On obtient des variétés conformes à la variété d'origine et que l'on peut multiplier en grande quantité, la production est homogène.

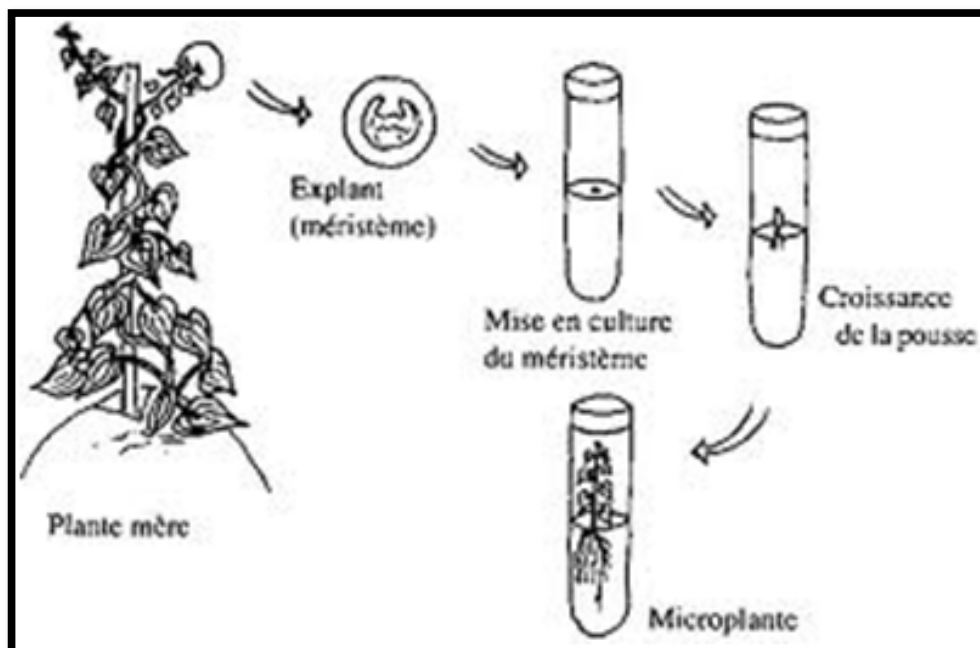


Figure3 : Régénération des plantes à partir la culture de méristème

---

### 2.3. L'embryogénèse somatique :

L'embryogénèse somatique est la production d'embryons à partir de cellules non germinales (par exemple cellules méristématiques) soumises à un traitement hormonal. Après cette induction, il se produit une multiplication des cellules suivie d'une différenciation progressive des embryons en culture. La phase de l'induction de l'embryogénèse nécessite un stimulant externe tels que des régulateurs de croissance spécifiques ou bien l'application de différents stress. Sous ces conditions les cellules compétentes deviennent déterminées à former un embryon, d'où l'appellation de cellules embryogénèse. Ces dernières ont réussi et fini le passage de l'état somatique à l'état embryogène, cependant sur le même amas cellulaire, on peut trouver des cellules compétentes qui n'ont pas encore acquis la capacité embryogène. Dans ce cas, l'addition de stimulant externe est encore nécessaire. La formation d'embryons somatiques est assurée par l'initiation d'un nouveau programme de différenciation. Il est important de citer que l'initiation du programme d'embryogénèse somatique est contrôlée par le génotype et la nature de l'explant, et le choix du stimulant externe se fait suivant ces derniers.

L'embryogénèse somatique peut être directe ou bien indirecte ; quand les embryons somatiques sont obtenus à partir de cellules somatiques qui ont subi une dédifférenciation puis une redifférenciation au sein du tissu dont elle est issue sans le passage par la phase de la callogénèse, on parle alors d'une embryogénèse somatique directe.

L'embryogénèse somatique indirecte nécessite le passage par l'état cal qui est caractérisé par un ensemble d'amas cellulaire indifférencié dont certains vont se développer en embryons somatiques (*gnis-pedagogie.org*).

#### 2.3.1. Avantages de l'embryogénèse somatique :

- Cette 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
- L'embryogénèse somatique permet la réjuvenation des tissus ainsi qu'un accès aux transformations génétiques.
- C'est un bon moyen pour produire des clones d'individus élites chez les ligneux. Par contre ; Le passage par cal peut amener des risques de dérive génétique, c'est à dire d'obtention de variant qui seraient différents de la plante de départ (*biotechnologies. Education*).

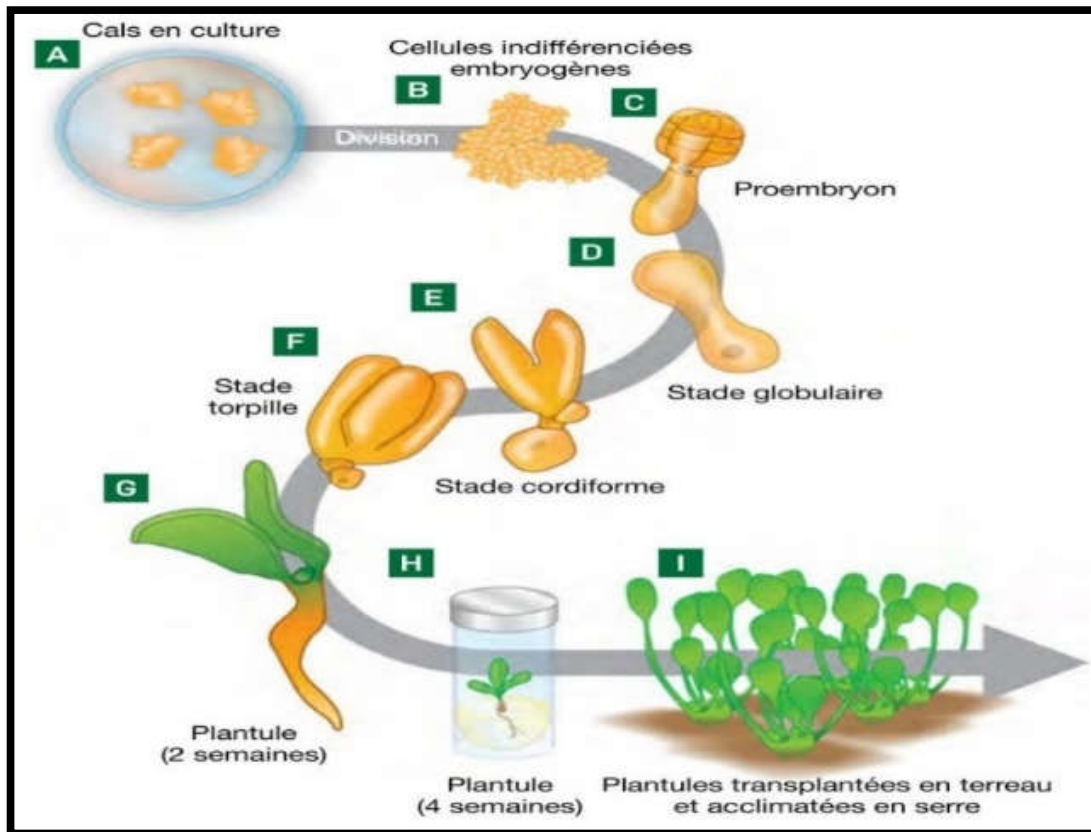


Figure4 : L'embryogénèse somatique

## 2.4. L'haplo-diploïdisation :

L'haplo-diploïdisation consiste à obtenir des individus haploïdes doublés à partir de cellules reproductrices. Ces cellules germinales contiennent une seule copie du génome (cellules haploïdes) au lieu des deux présentes dans les cellules somatiques (cellules diploïdes). Au cours de la régénération de la plante, on obtient le doublement à l'identique du génome haploïde par application d'un composé chimique, la colchicine, extrait du colchique.

### 2.4.1. Avantages de l'haplo-diploïdisation :

- 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.
- Le rendement est souvent dépendant du cultivar. Certaines variétés de céréales produisent un grand nombre de plantes albinos, donc non viables (*Gnis-pedagogie.org*).

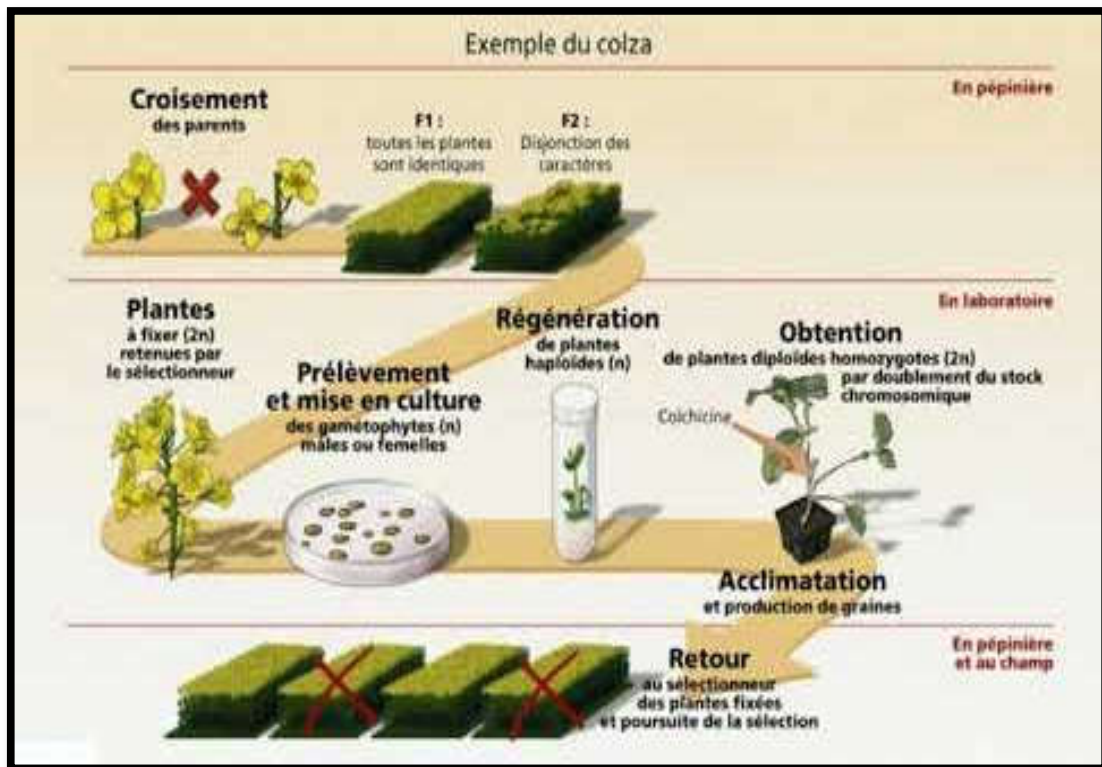


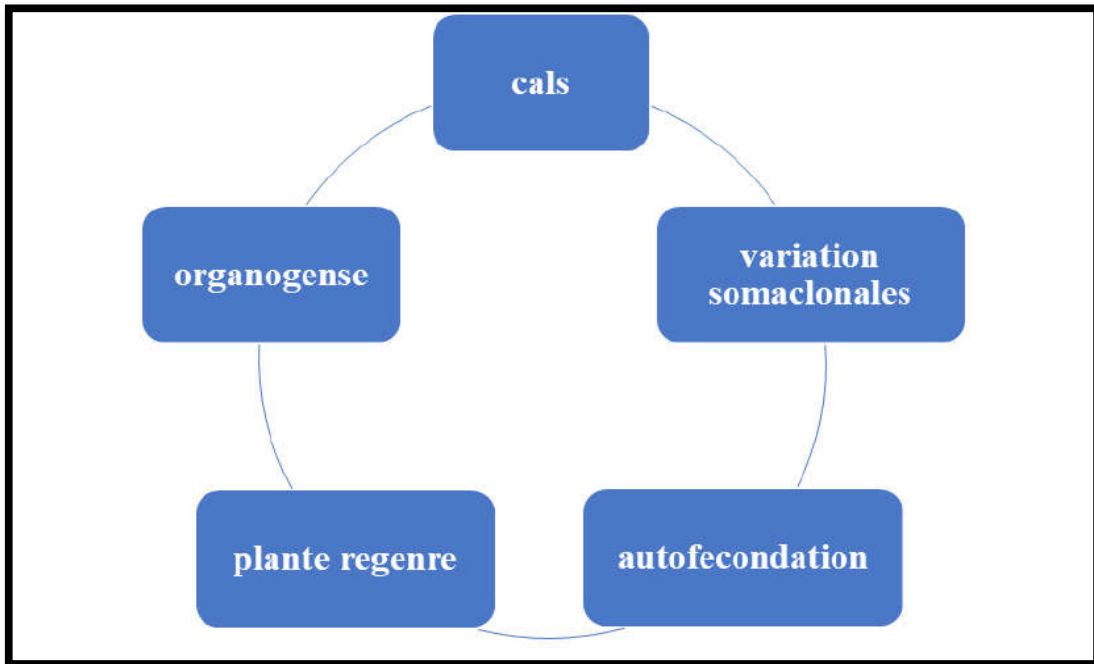
Figure5 : Principe de l'haplo-diploïdisation

## 2.5. Variation soma clonale :

Selon (Nowbuth et al. 2005), Phénotypes végétaux qui apparaissent le plus fréquemment lors de la régénération de nouvelles plantes Les semis de tissus qui se sont différenciés. (Larkin et Scowcroft1981) ont montré par la recherche qu'il peut L'utilisation de la variabilité génétique induite par certaines cultures *in vitro* est très intéressante Le but de la création de variétés. Ils sont basés sur quelques exemples de modèles, tels que Les pommes de terre et la canne à sucre les ont aidés à adopter le terme La variation asexuée somatique fait référence à toute variation génétique causée uniquement par la culture Un tissu, une cellule ou un organe conçu pour construire des cellules Différencier dans certaines conditions de culture *in vitro* (Wenzel, 1994 ; Belknap, 1993)Il a été observé que les plants de pomme de terre régénérés présentaient Par rapport aux protoplastes, les taux de mutation clonale des cellules somatiques sont faibles.

Dans le processus de régénération des plantes à partir de tissus *in vitro*, de nouveaux phénotypes sont apparus. Ce phénomène est appelé mutation clonale somatique. Si la

nouvelle caractéristique est héréditaire, elle convient aux programmes d'amélioration génétique. Dans le cas de Les pommes de terre peuvent être étalées et stabilisées grâce à la reproduction végétative Cette Si le tri est possible *in vitro*, le parasite peut être intéressé par cette méthode Filtre cellulaire avec champignon Phytophthora ou champignon Fusarium A Actuellement, seuls des résultats préliminaires ont été réalisés (Cassells et al. , 1991; 1991. Tompson et al., 1986). Les problèmes rencontrés sont généralement ciblés car L'apparition de fonctionnalités utiles est un événement rare, Caractère défavorable.

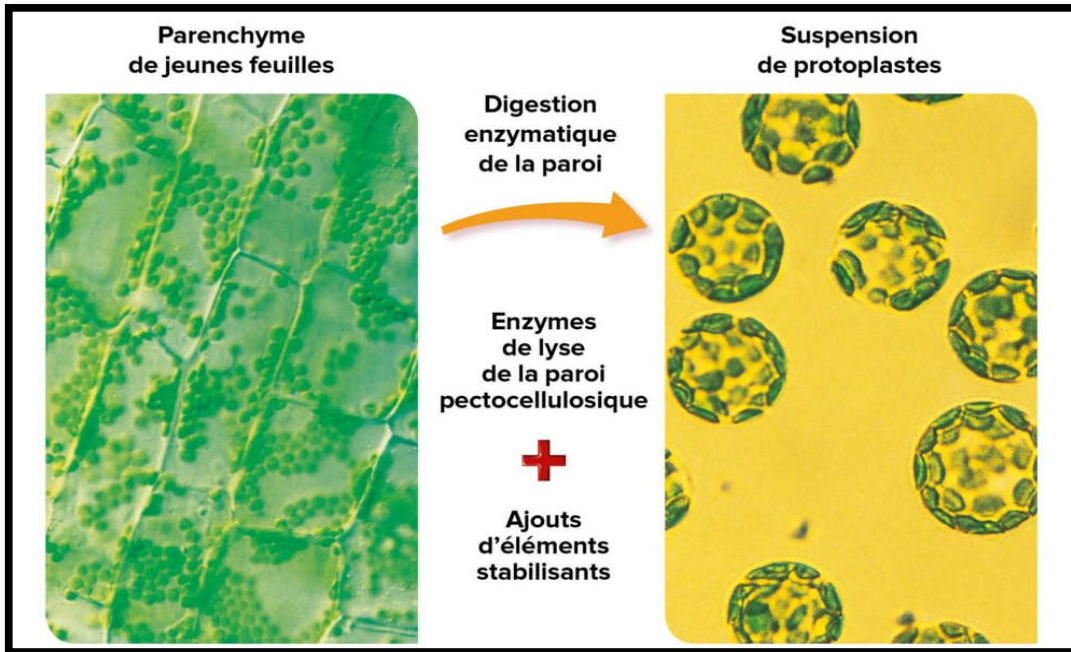


**Figure 6 :** Principe de la variation soma-clonale

## 2.6. Culture de protoplastes :

La fusion de protoplaste permet de créer de nouvelles combinaisons noyau-cytoplasme soit par fusion de cellules somatiques soit en créant et en fusionnant des sous-protoplastes sans noyau (Bracha et Sher, 1981), ou avec noyau mais une quantité réduite de cytoplasme (Bengochea et Dodds, 1986). Les fusions permettent aussi de créer de nouveaux cytoplasmes comme ce fut le cas pour le colza (Pelletier et al, 1983) ou le tabac (Belliard et Pelletier, 1978). Cette création de nouveaux cytoplasmes peut être intéressante dans les schémas classiques d'amélioration des plantes pour le transfert, voire l'amélioration de caractères à hérédité cytoplasmique comme la stérilité mâle. C'est par exemple le cas pour la féverole. L'utilisation des techniques de fusion de protoplaste n'a pas permis de progrès significatif dans l'amélioration des plantes, en particulier des légumineuses à grosses

graines. La principale raison est que l'obtention d'hybrides somatiques est conditionnée par la culture des protoplastes et le développement de plantes à partir de ceux-ci. La condition préalable à l'obtention d'hybrides somatiques est donc le développement de techniques permettant la régénération de plantes entières à partir de protoplaste.



**Figure7** : Obtention des protoplastes

La fusion de protoplaste est un processus physique et les techniques développées sur n'importe quelle espèce peuvent être appliquées aux légumineuses à grosses graines. Les méthodes employées sont brièvement résumées ici. La fusion comporte 2 étapes : la mise en contact très intime des plasmalemmes des protoplastes qui ne peut se produire que si les répulsions électrostatiques naturelles ont été dépassées, puis la rupture localisée des membranes pour que la fusion se produise. La méthode peut utiliser des agents chimiques, soit une haute teneur en  $\text{Ca}^{2+}$  et un pH élevé (**Keller et Melchers, 1973**) soit, plus couramment, l'utilisation de polyéthylène glycol (**Kao et Michayluk, 1974**). Plus récemment, des techniques d'électrofusion ont été mises au point. Un champ alternatif à haute fréquence met les protoplastes en contact intime puis un choc électrique à haut voltage de très courte durée amorce la fusion (**Tempelaar et Jones, 1985**). Des essais ont montré que ces techniques fonctionnent très bien sur les protoplastes de Cicer. Après fusion, il peut être souhaitable de trier les hybrides somatiques. Des méthodes reposant sur des phénomènes de complémentarité génétique ont été développées (**Power et Cocking, 1977**), mais elles

---

nécessitent des systèmes génétiques complexes et ne sont donc pas généralisables. Des méthodes de tri manuel à l'aide de micromanipulations ont été utilisées avec succès (**Hein et Schieder, 1986**) ou de tri automatique à l'aide de trieur de cellules. L'enrichissement en hétérocaryons est également possible par l'utilisation de gradients de centrifugation (**Harms et Potrykus, 1986**). L'enrichissement a comme conséquence de diminuer le volume traité. Il faut donc parallèlement développer des techniques permettant la culture de volumes réduits, voire de protoplaste isolés (**Koop et Schweiger, 1985**), et disposer de méthodes très efficaces de régénération. Cependant, à ce jour, les résultats de régénération d'hybrides somatiques chez les légumineuses sont maigres puisque seuls ont été obtenus des hybrides de *Medicago sativa* et de *M. falcata* (**Teoule, 1983**), ces espèces étant par ailleurs proches et interfertiles sexuellement, et des hybrides entre *Lotus corniculatus* et *L. conimbricensis* (**Wright et al, 1987**). Aucun résultat positif n'a été publié.

- Fusion par méthodes chimiques
- Fusion par méthodes électriques
- Diversité des produits de fusion des protoplastes

---

## CHAPITRE II. CONSERVATION DES PHYTORESSOURCES

### 1. Généralités

La méthode de conservation la plus ancienne consiste à maintenir d'une part des stocks de graines et d'autre part des plantes entières vivantes en culture. Aujourd'hui, les efforts portent aussi sur la conservation des semences par le froid et la lyophilisation, les cultures *in vitro* et le stockage du pollen. La constitution de collections en culture et la conservation des semences restent les seuls moyens à la portée des responsables de petites unités de conservation et même des amateurs. Il suffit, à la rigueur, de posséder un terrain, un réfrigérateur ou un congélateur. Culture et stockage de semences sont deux activités complémentaires : si l'on conserve des graines, il faut pouvoir les remettre en culture régulièrement et dans les meilleures conditions. Cela demande beaucoup de soins et un minimum de connaissances sur la reproduction des plantes et leur multiplication. Il est préférable, même si l'on désire conserver à titre personnel, d'adresser systématiquement les doubles des plantes aux centres de conservation (*FAO*).

De nombreux facteurs influent sur la conservation du stock dans une officine. Les principaux à prendre en compte sont la lumière, la température, le degré d'humidité, l'importance de la fragmentation et le type de récipient utilisé pour le stockage.

La protection de toute source de lumière est indispensable pour la majorité des drogues puisque feuilles et fleurs se décolorent rapidement des constituants présents.

La température joue aussi un rôle important car une hausse de 10°C double la vitesse de dégradation des plantes médicinales en stock.

Le taux d'humidité relative doit être maintenu inférieur à 60%. Au-delà la dégradation. Il est donc préférable de ne la pratiquer qu'au dernier moment avant une délivrance.

Pour toutes ces raisons, le stockage doit donc privilégier un endroit sec bénéficiant d'une température et d'une humidité plus ou moins constante. A l'officine, les drogues sont conservées dans des récipients fermés hermétiquement, éventuellement munis d'un moyen de dessiccation adapté. On utilise en général le gel de silice. Il faudra surveiller l'apparition de charançons et autres insectes et se débarrasser rapidement des lots infestés. L'usage de boîtes en carton est préférable à celui de récipients en matières plastiques qui absorbent les substances volatiles comme les huiles essentielles.

Le local destiné à stocker les plantes médicinales est de préférence désinfecté, aéré et sans poussière. Toute source de chaleur est à éloigner afin de garder une humidité favorable.

---

Deux autres conditions à respecter sont l'obscurité et la température qui sera comprise entre 15 et 18°C. Un traitement contre les parasites est recommandé, par exemple grâce à l'utilisation d'une peinture antiparasitaire pour le local de stockage. Enfin ne pas entasser trop de plantes au même endroit réduira aussi les risques de destruction des principes actifs.

Notons également que les emballages servant à la conservation des drogues doivent être opaques et non réactifs envers la plante. Les sacs en papier kraft sont une bonne solution. Mais il est aussi possible d'utiliser des pots en verre, en porcelaine, malgré leurs poids importants. L'ajout d'azote dans les récipients permet une bonne conservation des plantes médicinales car il chasse l'air en évitant ainsi toute réaction de ce dernier avec les drogues (Zahalkaj, 2005)

## **2.Types de conservation :**

Il existe deux types de conservation :

### **2.1.Conservation *in situ*:**

La méthode, est sans aucun doute intéressante mais aussi très délicate à mettre en œuvre. Tout simplement parce que les cultivars traditionnels n'ont plus leur place dans les exploitations modernes. Préserver des systèmes agraires dans leur ensemble semble relever de l'utopie dans l'état actuel des choses. La question préoccupe en effet peu de gens, et il est urgent que les politiciens et les élus locaux de toutes nos régions deviennent sensibles au problème. Or, le nœud des difficultés est là précisément. Maintenir des plantes dans leur aire de culture suppose que l'on continue de les entretenir ; cette lapalissade fait poser une question capitale : par qui et par quels moyens ? Il faut absolument entreprendre des recherches dans ce domaine afin de trouver une solution de compromis.

Perpétuer la culture des annuelles et des bisannuelles est un tout autre problème. Façons culturales, traitements, récolte doivent être assurés d'une manière beaucoup plus suivie. Par ailleurs, des précautions d'isolement sont nécessaires pour les plantes allogames : elles risquent en effet de perdre leurs caractères propres si elles sont polluées par des apports de pollen extérieur (cas de plusieurs cultivars différents maintenus ensemble ou d'une culture de la même espèce à proximité). Cela suppose donc un suivi attentif des parcelles de conservation. Parmi ceux-ci, nous trouvons deux tendances :

---

## 2.2. Conservation ex situ :

La conservation ex situ est beaucoup plus largement développée. On parle habituellement de « banques de gènes ». Ce terme est utilisé pour désigner les grands centres de conservation. Il est toutefois assez ambigu. En effet, si un utilisateur, prenons le cas d'un sélectionneur, s'adresse à l'un de ces organismes, il ne commandera pas le gène « x », résistant par exemple à tel parasite, mais la variété ou population « X », porteuse de ce fameux gène. A lui ensuite de jouer pour introduire le gène recherché, par croisement ou par manipulation génétique, dans son propre matériel. Actuellement, les grandes banques dites « de gènes » sont plutôt, dans l'ensemble, des banques de semences ou des collections vivantes. Mais les recherches avancent vite et l'on s'achemine à grands pas vers la constitution de véritables banques de gènes, au sens propre du terme. Ce type de maintien a pour cadre les centres internationaux, nationaux, les jardins botaniques, l'arboretum, certains instituts de recherche agronomique publics et privés, les établissements d'enseignement agricole, etc. ; en résumé, tous les endroits où sont regroupées des collections végétales. Ces organismes ont des missions très diverses. Ils possèdent des collections de nature et d'importance différentes, que l'on a l'habitude de classer en plusieurs catégories :

### 2.2.1. Collections de base : Conservation de graines

Assurent la conservation à long terme (jusqu'à 50 ou 100 ans selon les espèces). L'utilisation de techniques spécifiques comme la congélation ou la lyophilisation des semences, la conservation de grains de pollen permet de maintenir les plantes en condition de vie latente. Plus complexe à mettre en œuvre, la culture *in vitro* offre aussi des possibilités intéressantes. En 1984, 33 centres sont dépositaires, au niveau mondial ou régional, des collections de base des plantes alimentaires majeures (les « régions » délimitées par le Conseil international des ressources phytogénétiques peuvent recouvrir plusieurs pays entiers). Parmi les plus importants, citons par exemple les centres internationaux de conservation génétique comme le CIMMYT pour le maïs et le blé (plus de 15 000 populations de maïs en chambre froide), situé au Mexique, l'IRRI pour le riz aux Philippines (70 000 entrées conservées) ou le CIP pour la pomme de terre au Pérou 55 Le CIRP continue d'encourager et de soutenir la création de nouveaux centres, l'objectif étant d'en équiper au moins 300 dans les décennies à venir pour assurer avec un maximum de sécurité le maintien des collections de base et des collections actives. Pour prévenir toute

---

perte de matériel qui pourrait être occasionnée par des défaillances techniques ou autres dans un de ces centres, les collections importantes sont dupliquées en trois exemplaires : ce sont des collections de sauvegarde.

### **2.2.2. Collections actives : Collections en champ**

Ont pour objectif la conservation à moyen terme (5 à 20 ans); elles sont gérées à l'échelon national. Les graines, lorsqu'elles sont conservées au froid, ne sont pas, en principe, congelées, mais stockées à des températures basses positives. Les espèces pérennes comme les fruitiers sont plantées en plein-champ. Les centres qui ont la charge de ces collections en assurent la multiplication, la distribution, l'évaluation et réunissent la documentation qui s'y rattache. Les collections maintenues par les trois conservatoires botaniques français entrent dans cette catégorie. Brest s'occupe des plantes menacées de la zone atlantique européenne et des régions à climat océanique. Nancy a regroupé de nombreuses espèces sauvages, ornementales et légumières. Porquerolles possède des collections importantes de fruitiers et de plantes utiles de la zone périméditerranéenne.

### **2.2.3. Collections de travail :**

Réunissent des cultivars qui répondent aux besoins des sélectionneurs, des botanistes, des chercheurs en général. Constituées en fonction d'objectifs précis, elles sont gérées en tenant compte de contraintes à court terme. Aussi sont-elles quelquefois dispersées ou abandonnées lorsqu'elles ne servent plus de support aux travaux de recherche. Les stations d'amélioration des plantes de l'Institut national de la recherche agronomique, les universités, les établissements d'enseignement agricole, les maisons grainières, les sélectionneurs et les pépiniéristes privés comptent parmi les principaux détenteurs de ce type de collection. Ils n'ont pas à proprement parler une vocation de conservation, mais ont bien souvent assumé ce rôle jusqu'à nos jours.

### **2.2.4. Conservation *in vitro* :**

Les techniques de stockage *in vitro* en croissance ralentie sont utilisées en routine pour la conservation à moyen terme de nombreuses espèces tropicales et tempérées, comme la pomme de terre, les bananiers, l'igname et le manioc (Engelmann, 1999). Cependant, si la conservation *in vitro* semble une option simple et pratique pour la conservation à moyen terme de nombreuses espèces, son utilisation nécessite une adaptation à chaque nouveau matériel ainsi que des intrants continus, et des questions se posent quant à la stabilité

---

génétique du matériel stocké pour certaines espèces. Des directives techniques ont été publiées (Reed et al., 2004a), qui peuvent servir de guide pour les chercheurs et les gestionnaires des banques de gènes pour l'établissement et la gestion des collections *in vitro* de ressources génétiques.

Différentes techniques de conservation *in vitro* sont utilisées selon la durée de stockage (Engelmann, 1991, 1997).

### **3. La conservation à court et moyen terme :**

La conservation est réalisée en réduisant la croissance du matériel végétal, ce qui permet d'espacer les repiquages. Des protocoles de stockage en croissance ralentie sont employés.

Pour le stockage à court et moyen terme, des stratégies basées sur le ralentissement de la croissance des explants ont été développées. Le principe est de ralentir la croissance du matériel végétal pour pouvoir le conserver pour des durées de quelques mois à quelques années.

Afin de réaliser cet objectif, la technique la plus largement utilisée est la réduction de la température (Lynch, 1999) qui peut être combinée avec une diminution de l'intensité lumineuse (Banerjee & Langhe, 1985) ou même une culture à l'obscurité.

#### **3.1. Diminution de la température de stockage :**

Généralement, la réduction du taux de croissance en diminuant la température de stockage de l'ordre de 0-5°C est employée en tenant compte de la sensibilité au froid de l'espèce considérée. Alors que des vitro plants *d'Actinidiasine* sis peuvent être conservés à une température de +8°C (Monette, 1987), des plantules et des embryons somatiques *d'Elaeis guineensis* (palmier à huile) ne peuvent supporter que des températures supérieures à +18°C (Corbineau et al., 1990). Des plantules de *Malus domestica* (pommier) survivent à 100 % après un an à +1°C (Druart, 1985).

D'une manière générale, la température de conservation des espèces tropicales ou subtropicales doit être plus élevée que celle des espèces tempérées. Des vitro plants de bananier pourront être conservés en abaissant l'intensité lumineuse (1000 lux) en parallèle à la réduction de température à +15°C (Banerjee & Langhe, 1985).

---

### 3.2. Abaissement de la teneur en oxygène :

Une autre technique pour ralentir la croissance est d'abaisser la teneur en oxygène dans la salle de culture. Par exemple, la réduction de la concentration en oxygène des enceintes de culture jusqu'à 1,3% a permis de conserver durant 6 semaines des plantules de tabac et de chrysanthème sans altérer leur taux de croissance ultérieur lorsqu'elles sont replacées dans une atmosphère normale (**Bridgen & Staby, 1981**). De même, une concentration en oxygène de 1% a permis de conserver des embryons somatiques de palmier à huile pendant 4 mois à 27°C sans repiquage (**Espinoza et al., 1989**).

### 3.3. Modifications au milieu de culture :

Plusieurs modifications peuvent également être apportées au milieu de culture afin de ralentir la croissance (**Withers & Engelmann, 1998**). Un ralentissement de la croissance des vitroplants de pomme de terre cultivés à 25°C a été obtenu en ajoutant 4% de mannitol au milieu de culture (**Espinoza et al., 1989**). Une concentration en mannitol égale à 6 % s'est révélée positive pour le stockage de protocormes de *Vanda hookeriana* (**Kadzimin, 1988**). Des concentrations élevées en saccharose permettent aussi la conservation à basse température de protocormes de *Cymbidium* sp et de *Dendrobium* sp. (**Homes et al., 1982 ; Tandon & Sharma, 1986**). La nature, solide ou liquide, du milieu de culture intervient sur les possibilités de conservation. Des plantules de *Prunus insititia* seront conservées de préférence en milieu liquide, des brunissements apparaissant en milieu gélosé (**Wilkins et al., 1988**).

Des collections *in vitro* ont été mises en place dans plusieurs pays, par exemple en Australie pour la préservation de 17 espèces de *Grevillea* (**Sarasan et al., 2006**), pour la conservation de l'arbre à pain *Artocarpus altilis* (**Murch et al., 2008**), L'ITC (INIBAP Transit Centre, **Leuven**, Belgique) conserve *in vitro* la collection mondiale de bananier qui comporte plus de 1000 accessions (**Swennen, 1998**), le CIP (**Lima, Pérou**) la collection mondiale de pomme de terre qui comprend plus de 1500 accessions ou encore le CIAT (**Cali, Colombie**) la collection mondiale de manioc, riche de 6592 accessions (**Engelmann;F.;2011**).

---

#### **4. La conservation à long terme : Cryopréservation :**

Pour la conservation à long terme, la cryoconservation (azote liquide, -196 °C) permet de stocker le matériel végétal sans modifications ni altérations pendant des durées prolongées, à l'abri des contaminations et avec un entretien réduit.

La cryopréservation désigne généralement le recours à des températures extrêmement basses (-80° à -196°C) pour préserver des matières biologiques (**Towill, 1985**) dans le présent texte, le terme s'applique à la préservation des graines. Comme l'a signalé (**Stanwood1985**), il n'a pas été démontré que la préservation physiologique de semences à des températures allant de -40° à -196°C était notablement supérieure à celle qui était obtenue à -20°C. Cependant, des estimations de la longévité à partir de l'équation sur la viabilité (**Ellis et Roberts, 1980**) donnent à croire que plus la température de stockage est basse, plus la durée potentielle du stockage est longue (**Stanwood, 1985 ; Dickie et al., 1990**). Les avantages potentiels de la cryopréservation par rapport aux techniques conventionnelles sont l'absence de contrôles compliqués de la température et de l'humidité, l'absence de dommages dus aux insectes et aux maladies, et une longévité indéfinie à peu près sans dommage génétique (**Stylesetal.,1982**).

La cryopréservation a été reconnue comme l'approche la plus prometteuse de conservation de semences du type récalcitrant (**Robertset al., 1984 ; King et Roberts, 1979, 1980 ; Bonner, 1990**) et d'importants progrès ont été réalisés dans l'élaboration de techniques de conservation nouvelles et améliorées (**Chin, 1988a ; King et Roberts, 1979, 1980a ; Farrantetal. ,1988**). Dans le rapport d'étape le plus récent sur les semences à comportement récalcitrant, **Chin (1988a)** affirmait que jusqu'ici il n'a pas eu de succès avec les semences du type récalcitrant véritable et soulignait l'importance de la mise au point de techniques de cryostockage pour les embryons excisés d'essences du type récalcitrant.

#### **5. Maturation précoce des cultures *in vitro* :**

On observe souvent le phénomène de maturation précoce chez les plantes ligneuses produites à partir de cultures de tissus. La maturation précoce retarde la croissance des arbres plantés et a pour conséquences une diminution de leur taux de croissance, une diminution ou un arrêt total de l'enracinement, la floraison précoce, et le plagiotropisme (**Pierik, 1990 ; Bonga et von Aderkas, 1993**).

---

Dans le cas des espèces d'arbres ou d'arbustes, il est essentiel que la méthode de culture de tissus engendre un rajeunissement afin d'éviter les problèmes de maturation précoce. L'embryogenèse somatique utilisée comme méthode de culture de tissus a cet effet positif. Néanmoins, on n'a pas encore réussi à appliquer l'embryogenèse somatique à des tissus provenant de conifères matures. La culture de méristèmes, bien que difficile, est une excellente technique de rajeunissement et a été utilisée pour de nombreuses espèces ligneuses (**Pierik, 1990**) Le développement de méristèmes adventifs *in vitro* a été utilisé comme procédé de rajeunissement, mais le succès de cette méthode semble dépendre du nombre de cycles de subculture toléré par le tissu cultivé *in vitro*. Les méristèmes adventifs ont probablement une forte tendance à la maturation précoce. Il est intéressant de noter que la technique de la micro greffe, qui consiste à greffer un méristème adulte sur de jeunes porte-greffes *in vitro*, a été utilisée avec succès pour rajeunir des tissus mars et constitue une autre voie possible pour la conservation *in vitro* d'arbres et d'arbustes partir de tissus mars (**Misson et Giot-Wirgot, 1984 ; Tranvan et David, 1985 ; Monteuis, 1986**).

## **6. Atmosphère de conservation :**

La conservation dans le vide ou dans une atmosphère d'azote a accru la longévité du pollen de maïs par rapport à celle observée lorsqu'il était stocké dans de l'air dans les mêmes conditions de température et d'humidité (**Nath et Anderson, 1975**) Selon l'hypothèse actuelle expliquant pourquoi la conservation dans des atmosphères contenant de l'oxygène est plus nuisible que dans des atmosphères anoxiques, l'oxygène provoque la formation de radicaux libres dans les tissus séchés (**Heckly, 1978**) Ces radicaux libres peuvent attaquer les liaisons non saturées des lipides, particulièrement de ceux des membranes (**Lehninger, 1982; Niehaus, 1978**) et hydrolyser le lien ester des têtes polaires. La conservation dans l'azote liquide ou dans la vapeur d'azote devrait prévenir une telle dégradation.

---

## Conclusion

La culture de tissus est une alternative au maintien des collections en serre ou au champ. Elle offre la possibilité de réaliser à la fois la multiplication et la conservation des espèces rares ou en voie de disparition, des espèces à semences récalcitrantes et de celles se reproduisant par voie asexuée. Ce type de conservation présente plusieurs avantages :

La propagation du matériel végétal avec des taux de multiplication élevés.

La culture en conditions stériles permettant la propagation de plantes indemnes de maladies.

La réduction de l'espace de conservation et du personnel d'entretien.

La possibilité de conservation de plantes haploïdes utilisées pour la sélection de caractères récessifs.

La possibilité d'obtenir des plantes exemptes de virus grâce à la culture de méristèmes en combinaison avec la thermothérapie.

L'exploration, la collecte, la caractérisation, l'évaluation, la domestication / culture et la conservation ex situ dans les banques de gènes finissent par soutenir leur utilisation soutenue en fournissant du matériel végétal de qualité et des médicaments bruts certifiés.

Les outils biotechnologiques modernes, y compris les techniques *in vitro* est principalement pertinents dans ce contexte.

---

## Références :

(scholar) =

14. Sussex I. M., 2008. The Scientific Roots of Modern Plant Biotechnology. *Plant Cell* 20: 1189- 1198.
15. VASIL V. and HILDEBRANDT A. C., 1965. Growth and Tissue Formation from Single, Isolated Tobacco Cells in Microculture. *Science*, 147: 1454-1455.
16. TAKEBE I., LABIB, G. and MELCHERS G., 1971. Regeneration of whole plants from isolated mesophyll protoplasts of tobacco. *Naturwissenschaften*. 58: 318-320.
- Baksha, R., M.A.A. Jahan, R. Khatum and J.L. Munshi. 2005. Micropropagation of *Aloe barbadensis* Mill. through In vitro Culture of Shoottip Explants. *Plant tissue Culture and Biotechnology*. 15, 121-126.
- Ball E., 1949. The Shoot Apex and Normal Plant of *Lupinus albus* L., Bases for Experimental Morphology. *Am. J. Bot.*, 36: 440- 454.
- Barna, K. S. and Wakhlu, A. K. 1998. Axillary shoot induction and plant regeneration in *Plantago ovata* Forssk. *Pl. Cell Tissue Organ Cult.*, 15: 169-73.
- Belliard G, Pelletier G (1978) Cytoplasmic Hybridization by Protoplast Fusion In *Nicotiana Tabacum*. *Physiolvég* 16, 441-448.
- Bengochea T, Dodds JH (1986) Plant protoplasts. In: A biological tool for plant improvement. Chapman and Hall, London.
- Bhavisha, B.W. and Y.T. Jasrai, 2003. Micropropagation of an Endangered Medicinal Plant: *Curculigoor chioides* Gaertn. *Plant tissue Culture*, 13, 13-19.
- Bhojwani, S.S. and M.K. Razdan, 1996. *Plant tissue culture: Theory and Practice: developments in crop science* Vol. 5. Elsevier, Amsterdam.
35. Fowler, M.R., F.W. Rayns and C.F. Hunter (Editor) 1993. The language and aims of plant cell and tissue culture. *In Vitro Cultivation of Plant Cells*, Butterworth-Heinemann Ltd, Oxford, Page 1-18.
- Bhojwani, S.S. and Razdan, M.K. 1983. *Plant Tissue Culture: Theory and Practice*. Elsevier Science Pub., Amsterdam.
- Bonga, J.M.; VonAderkas, P. 1993. Rejuvenation of tissues from mature conifers for clonal propagation in vitro. Pages 1 82-1 99 in Ahuja, MR.; Libby, W.Y., eds. *Clonal forestry I. Genetics and biotechnology*. S.
- Bonner, F.T. 1990. Storage of seeds: potential and limitations for germplasm conservation. *For. Ecol. Manage.* 35:35-43.
- Bouza, L., M. Jacques, and E. Miginiac, 1994. In vitro propagation of *Paeonia suffruticosa* Andr. cv. 'Mme de Vetry': developmental effects of exogenous hormones during the multiplication phase. *Scientia Horticulturae*, 57, 241-251.
- Boxus P. 1995 : multiplication végétative: micropropagation et embryogenèse somatique dans les biotechnologies Végétales. BV 93, Ed CNED.AUPELF-UREF 191p.
- Bracha M, Sher N (1981) Fusion of Enucleated Protoplasts with Nucleated Miniprotoplasts In Onion (*Allium Cepa* L). *Plant Sci Lett* 23, 95-101.
- Caraglio Y. 2012. L'organogénèse. UMR Cirad/Inra de Modélisation des plantes (AMAP. Programme modélisation des plantes du Cirad-amis <http://amap.cirad.fr/architecture/organo/organo.html#introduction>)
- Benabdelhafid, Z. Embryogénèse somatique, variations somaclonales et tolérance à la salinité chez le blé dur (*Triticum durum* Desf.).
- Chang, W.D., Huang, W.W., Chen, C.C., Chang, Y.S and Tsay, H.S. 1994. The production of secondary metabolites from Chinese medicinal herbs by suspension cell and tissue

- 
- culture. In. Proc. 7th Int. Cong. SABRAO WASS, Taipei, Taiwan: Academia Sinica, pp. 535-40.
- Chen, S. L., Yu, H., Luo, H. M., Wu, Q., Li, C. F., & Steinmetz, A. (2016). Conservation and sustainable use of medicinal plants: problems, progress, and prospects. *Chinese medicine*, 11(1), 1-10.
- Cornu, D., & Boulay, M. (1986). La multiplication végétative : techniques horticoles et culture *in vitro*. *Revue Forestière Française*.
- Demarly Y., 1985.** L'épigénétique. *Bull. Soc. Bot. Fr.* 132. Actual. Bot (314), pp 79- 94.
- Demarly, Y., et Sibi, M. (1996). Amélioration des plantes et biotechnologie. Ed. John Libbey Eurotext. Paris. pp 99-111.
- Djennane, S., et Klifatti, A. (1996). Etude de quelque facteur influençant la tubérisation *in vitro* de trois variétés de pomme de terre. Mémoire en vue d'obtention du diplôme d'ingénieur d'état en Agronomie. Institut national d'Agronomie (INA) Alger. pp 26-37.
- Duhem K., Le Mercier N. Et Boxus Ph., 1988 : Difficulties in the establishment of axenic *in vitro* cultures of field collected coffee and cacao germplasm, Proc. Symp. Bacterial contamination *in vitro*, *Acta Horticulturae*, 225 : 67-75.
- Engelmann; F.; 2011. Use of Biotechnologie for the conservation of plante biodiversity. *In Vitro Cell. Dev. Biol.-plant*.
- Faria, R.T. and Illg, R.D. 1995. Micropropagation of *Zingiber spectabile* Griff. *Hort. Sci.*, 62: 135-37.
- Farrant, J.M.; Pammenter, N.W.; Berjak, P. 1988. Recalcitrance - a current assessment. *Seed Sci. Technol.* 16:155-166.
- Francllet A., 1981 : Rajeunissement et micropropagation des ligneux in : Colloque international sur la culture *in vitro* des essences forestières, pp. 55-65, IUFRO, AFOCEL.
- Gamborg, O.L., T. Murashige, T.A. Thorpe and I.K. Vasil. 1976. Plant-tissue culture media. *Journal of the Tissue Culture Association*, 12, 473-478.
- Garro-Monge, G., A.M. Gatica-Arias, and Valdez-Melara, 2008. Somatic embryogenesis, Plant regeneration and Acemannan detection in *Aloe (Aloe barbadensis MILL.)*. *Agronomia Costarricense*, 32, 41-52.
- Gautheret R.J., 1945. La culture des tissus ; Gallimard. Paris.
- Guha, S. and Maheshwari, S.C. (1964) *In vitro* production of embryos from anthers of *Datura*. *Nature*. 204: 497.
- Haberlandt, G. 1902. Plant cell culture experiment with isolated cells. *S.B. Vienna Wiss. Anz.*, 111: 69-92.
- Haccius, B. (1978) Question of unicellular origin of zygotic embryos in callus cultures. *Phytomorphology*. 28: 74- 81.
- Harms CT, Potrykus I (1986) Enrichment for Heterokaryocytes by The Use of Iso-Osmotic Density Gradients After Plant Protoplast Fusion. *Theor Appl Genet* 53, 49-55
- Heckly, R.J. 1978. Effects of oxygen on dried organisms. Page 257 in Crowe, J.H.; Clegg, J.S., eds. *Dry Biological Systems*. Academic Press, New York.
- Hein T, Schieder O (1986) An Improved Culture Method of Mechanically Isolated Heterokaryons of Potato. *Plant Breeding* 97, 255-260.
- Henshaw G.G., 1982 : Genetic stability and deterioration of stored material, in : Crop genetic resources - The conservation of difficult material, pp. 97-100, Withers L.A. & Williams J.T. (Ed.), IUBS -s&ie B 42, IUBS/IGF/IBPGR.
- <http://culture-in-vitro-tpe.e-monsite.com/pages/conclusion-generale.html>
- <http://fdanieau.free.fr/cours/bts/A2/bcm/TP/CultureInVitroDesVegetaux.pdf>
- <http://users.ugent.be> HISTORIQUE : WENT, THYMAN, consulté le 30 décembre 2009.
-

- 
- Hu, C. Y. and Wang, P.J. (1983) Meristem shoot tip and bud cultures. In: Evans, D.A., Sharp, W.R., Ammirato, P.V. and Yamada, Y. (Eds.). *Handbook of Plant Cell Culture*, Vol. 1. Macmillan, New York. Pp 177-227.
- Hu, C. Y. and Wang, P.J. 1983. Meristem shoot tip and bud cultures. In. *Evans, D.A., Sharp, W.R., Ammirato, P.V. and Yamada, Y. (Eds.). Handbook of Pl. Cell Culture*, 1: 177-27.
- Huang, L. and T. Murashige. 1977. Plant tissue culture media: major constituents; their preparation and some applications. *Tissue Culture Assoc*, 3,539-548.
- Hunter, C.F., 1993. Protoplast and haploid cultures. In *Vitro Cultivation of Plant Cells*, Butterworth-Heinemann Ltd. Oxford, Pages 82-112.
- Ibpg, 1986b : IBPGR advisory comitee on *in vitro* storage, International Board for Plant Genetic Resources, Rome, 33 p.
- Isac V., Popescu A.N. et M. Coman. 1994. Studies on plant regeneration from tissue-derived callus in *Fragaria X ananassa* Duch. In :Schmidts H. et M Kellerhals. *Progress in temperate fruit breeding*. Kluwer Academic Publishers, , p 395-398.
- Keller WA, Melchers G (1973) The Effect of High Ph and Calcium on Tobacco Leaf Protoplast Fusion. *Z Naturforsch* 28 C, 737-741.
- King, M.W.; Roberts, E.H. 1979. The storage of recalcitrant seeds achievements and possible approaches. Intl. Board for Plant Genet. Resources Secretariat, Rome.
- Lal, N. and Ahuja, P.S. 1996. Plantlet regeneration from callus in *Picrorhizakurroa Royleex Benth* . An endangered medicinal plant. *Pl. Tissue Cul.*, 6:127-34.
- Lardet L., Enjalric F. Et Carron M.-P., 1990 : *Hevea bmsiliensis* (Müii arg.) apex cultures. influence of the morphological stage and explant age. C, R AcadSd. Paris, série iii, 310 : 195-202.
- Larkin, P.J. 1987. Somaclonal variation: history, method and meaning. *Iowa State Journal of Research*, v.61, p.393-434 <https://www.gnis-pedagogie.org/>
- Lehninger, A.L. 1982. *Principles of biochemistry*. Worth Publishers Inc., New York, NY
- Leifert, C. and W.M. Waites, 1992. Bacterial growth in Plant tissue culture media. *Journal of Applied Bacteriology*, 72, 460-466.
- Leifert, C., J.Y. Ritchie, and W.M. Waites, 1991. Contaminants of Plant tissue and Cell cultures. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*, 7, 452-469.
- Limasset P. et Cornuet P., 1949. Recherche de la mosaïque du tabac (Marmor Tabaci Holmes) dans les méristèmes de plantes infectées. *C. R. Acad. Sci.*, 228 :1971-1972.
- Linsmaier, E.M. and F. Skoog, 1965. Organic growth factor requirement of tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant*, 18, 100-127.
- Lloyd, G.B. and B.H. McCown, 1980. Commercially feasible micropropagation of mountain laurel (*Kalmia latifolia*) by use of shoot tip culture. *Proc. Int. Plant Propagators Soc.* 30, 421-437.
- Lu, M.C., 2005. Micropropagation of *Vitis thunbergii* Sieb. et Zucc., a medicinal herb, through high-frequency shoot tip culture. *Scientia Horticulturae*, 107, 64-69.
- Mao, A. H., Wetten, A., Fay, M. and Caligari, P. D. S. 1995. *In vitro* propagation of *Ilex pedunculata* Walp: a potential natural anti hypertension medicinal plant. *Pl. Cell Report*, 14493-96.
- Margara J., 1984. Base de la multiplication végétatives. Les méristèmes et l'organogenèse. Institut National de la recherche Agronomique (INRA), 262p.
- Marie-Luce, Q. A., & Kouami, K. O. K. O. U. Culture *In Vitro* Et Herbarium *In Vitro* Culture And Herbarium. <http://users.ugent.be> HISTORIQUE : HABERLAND, consulté le 30 décembre 2009.
- Matkowski, A. 2000. Plant *in vitro* culture for the production of antioxidants --A review. *Biotechnology Advances*, 26, 548-560.
-

- 
- Miller, C.O., Skoog, F., Okumura, F.S., Von Saltza, M.H. and Strong, F.M. 1955. Structure and synthesis of kinetin. *J. American Chem Soc.*, 77: 2662.
- Misson, J.P. ; Giot-Wirgot, P. 1984. Rajeunissement d'un clone de Thuja en vue de sa multiplication in vitro. *Ann. Rech. Sylvioles AFOCEL* 187-197.
- Mitra, G.C. and Chaturvedi, H.C. 1970. Fruiting plants from in vitro grown leaf tissue of *Rauvolfia serpentina* Benth. *Curr. Sci.*, 39: 128.
- Monteuuis, O. 1986. Microgreffage de points vegetatifs de *Sequoiadendron giganteum* Buchholz seculaires sur de jeunes semis cultivés in vitro. *CR Acad. Sci. Paris* 302:223-225.
- Morel G. and Wetmore R. H., 1951.- Fern callus tissue culture. *Am. J. Bot.*, 38, 141-143.
- Morel G., Martin C., 1952. Guérison de dahlias atteints d'une maladie à virus. *C. R. Acad. Sci.* 235 :1324 -1325. 10. MOREL G., MARTIN C., 1955. Guérison de pommes de terre atteintes de maladies à virus. *C. R. Acad. Agric.*, 41: 472-475.
- Morgana, C., R. Di Lorenzo, and F. Carimi, 2004. Somatic embryogenesis of *Vitis vinifera* L. (cv. Sagraone) from stigma and style culture. *Vitis*, 43, 169-173.
- Murashige, T. (1974) Plant propagation through tissue cultures. *Ann. Rev. Plant Physiol.* 25: 135-166.
- Murashige, T. 1974. Plant propagation through tissue cultures. *Ann. Rev. Plant Physiol.* 25: 135-166. Pei Shengji. (2002) A brief review of ethnobotany and its curriculum development in China. In: Shinwari, Z.K., Hamilton, A. and Khan, A.A (Eds.). *Proc. Workshop on Curriculum Dev. In Appl. Ethnobotany, Nathiagali*, 2-4 May. W.W.F. Pakistan, Lahore, Pakistan. pp. 41.
- Murashige, T. and F. Skoog, 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol Plant*, 15, 473-497.
- Nath, J.; Anderson, J.O. 1975. Effect of freezing and freeze-drying on the viability and storage of *Lilium longiflorum* L. and *Zea mays* L. pollen. *Cryobiology* 12: 81
- Neihaus, W.G.J. 1978. A proposed role of superoxide anion as a biological nucleophile in the deesterification of phospholipids. *Bioorganic Chem.* 7: 77-84
- Nitsch, J.P. and C. Nitsch, 1969. Haploid plants from pollen grains. *Science*, 163, 85-87.
51. Bhat, S.R. and K.P.S. Chandel, 1991. A novel technique to overcome browning in tissue culture. *Plant Cell Reports*, 10, 358-361.
- Nobecourt P., 1943. La culture des tissus et organes végétaux. *Ren. Ann. Sci.*, 81: 161- 170.
- Norrel, B. (1973). Cultures de tissus végétaux et embryogenèse non zygotique. *Soc. Bot mémoire. coll Morphologie.* pp 71 - 98.
- Nowbuth L., C L LE., Agroscope RAC Changines., 2005.** Teneur Non- Conforme En ADN Comme Indicateur De Variation Soma Clonale Chez La Pomme De Terre. *Suisseagric* .37 (6): 257 266.
- Nozeran R., Bancillon L., 1972. Les cultures *in vitro* en tant que technique pour l'approche de problèmes posés par l'amélioration des plantes. In *Ann. Amélioration. Plantes* 22 (2), pp 167-185. <http://labos.ulg.ac.be/cedevit/plantes-in-vitro/culture-in-vitro/interets/>
- Organisation des nations unies pour l'agriculture et l'alimentation (FAO) ; 25 parcs naturels régionaux et nationaux
- Pan, Z.G., C.Z. Liu, S.J. Murch, M. El-Demerdash, and P.K. Saxena, 2003. Plant regeneration from mesophyll protoplasts of the Egyptian medicinal plants *Artemisia judaica* L. and *Echinops spinosissimus* Turra. *Plant Science*, 165, 681-687.
- Pelcher LE, Gamborg OL, Kao KL (1974) Bean Mesophyll Protoplasts: Production, Culture and Callus Formation. *Plant Sci Lett* 3, 107-111.
-

- 
- Pelletier G, Primard C, Vedel F, Chetrit P, Remy R, Rousselle P, Renard M (1983) Intergeneric cytoplasmic hybridization in Cruciferae by protoplast fusion. *Mol Gen Genet* 191, 244-250.
- Pierik, R. L. M. 1989. *In vitro Culture of Higher Plants*. MartinusNijhoff Pub. Dordrecht.
- Power JB, Cocking EC (1977) Selection Systems for Somatic Hybrids. In: *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* (Reinett J, Bajaj IPS Eds) Springer-Verlag, Berlin, Pp 497-505.
- Rayns, F.W., M.R. Fowler and C.F. Hunter. 1993. Media design and use. *In Vitro Cultivation of Plant Cells*, Butterworth-Heinemann Ltd. Oxford, Pages43-64.
- Razdan, M.K. 2003. *Introduction to Plant Tissue Culture*. 2nd Edition, Science Publishers, Inc., New Hampshire, Pages132.
- Reinert, J. (1958) Über die Kontrolle der Morphogenese and die Induktion Von Adventivembryonen and Gewebekulturen aus Korotten. *Planta*. 53: 318-333.
- Roberts, E.H.; King, M.W.; Ellis, R.H. 1984. Recalcitrant seeds, their recognition and storage. Pages 38-52 in Holden, J.H.W.; Williams, J.T. eds. *Crop genetic resources: conservation and evaluation*. Allen and Unwin, London, U.K.
- Rout, G.R., S. Samantaray, and P. Das, 2000. *In vitro* manipulation and propagation of medicinal plants. *Biotechnology Advances*, **18**, 91-120.
- Rout, G.R., S. Samantaray, and P. Das, 2000. *In vitro* somatic embryogenesis from callus cultures of *Cephaelis ipecacuanha* A. Richard. *Scientia Horticulturae*, **86**, 71-79.
- Saadi A. Et F. Hamdani. 2007. Régénération *in vitro* du *Scorpiurus muricatus* ssp. *subvillosus* via la caulogénèse. *Biotechnologie, Agronomie, Société et Environnement*, Volume 11 (2007) – numéro3.
- Samia, M. G. Recueil Des Travaux Pratiques De La Culture *In Vitro* Vegetale.
- Sasikumar, S., S. Raveendar, A. Premkumar, S. Ignacimuthu, P. Agastian. 2009. Micropropagation of *Baliospermum montanum* (Willd.) Muell. Ara. -A threatened medicinal plant. *Indian Journal of Biotechnology*, **8**, 223-226
- Schenk, R.V. and A.C. Hilderbrandt, 1972. Medium and techniques for induction and growth of monocotyledonous dicotyledonous plant cell cultures. *Canadian Journal of Botany*. **50**, 199-204.
- Schoolar = Sidhu, Y. (2011). *In vitro* micropropagation of medicinal plants by tissue culture.
- Schoolar= Sharma, S., & Thokchom, R. (2014). A review on endangered medicinal plants of India and their conservation. *J Crop Weed*, **10**(2), 205-218.
- Sears, R.G. and E.L. Deckard, 1982. Tissue culture variability in wheat- callus induction and plant regeneration. *Crop Science*, **22**, 546-550.
- Skirvin, R. M., Chu, M. C., Young, H. J., Rose. 1990. In: *Handbook of Plant Cell Cultures*, Ammirato P.V., Evans D.R., Sharp W.R. and Bajaj Y.P.S. Eds). New York: MacMillan, 5:716-43.
- Skoog, F. and Miller, C.O. 1957. Chemical regulation of growth and organ formation in the plant tissue cultured *in vitro*. *Symp Soc Exp Biol.*, **11**: 118.
- Soudani, S. (2016). *Culture in vitro et cytogénétique de l'olivier Olea europea L. chez la variété Chemlal* (Doctoral dissertation, Université Mouloud Mammeri).
- Srivastava, L.M., 2002. *Plant Growth and Development: Hormones and Environment* Academic Press, New York, Pages 140-143.
- Staba, E.J. and J.E.A. Seabrook. 1980. *Laboratory Culture. Plant Tissue Culture As a Source of Biochemicals*, CRC Press, Boca Raton, Pages 1-20.
- Stafford, A., P. Morris, and M.W. 1986. *Fowler Plant cell biotechnology: A perspective. Enzyme and Microbial Technology*, **8**, 578-587.
-

- 
- Stanwood, P.C. 1985. Cryopreservation of seed germplasm for genetic conservation. Pages 199-226 in Kartha, K.K. ed. Cryopreservation of plant cells and organs. CRC Press Inc., Boca Raton, FL
- Steward F.C. And Reinert J., 1958. Growth and division of freely suspended cells. Am. J. Bot., 45: 693-695.
- Steward, F. C., Mapes, M. O., Kent, A. E. and Holston, R. D. 1964. Growth and development of cultured plant cells- Biochemical and morphogenetic studies with cells yield new evidence on their metabolism and totipotency. Sci. 143: 20.
- Steward, F.C., Maper, M.O. and Smith, J. (1958). Growth and organized development of cultured cell 11. Organization in culture grown from freely suspended cells. Amer. J. Bot. 45: 705-708.
- Styles, E.D.; Burgess, J.M.; Mason, C.; Huber, B.M. 1982. Storage of seed in liquid nitrogen. Cryobiology 19:195-199.
- Tempelaar MJ, Jones MGK (1985) Fusion Characteristics of Plant Protoplasts in Electric Fields. Planta 165, 205-216.
- Teoule E (1983) Hybridationsomatique entre *Medicago sativa* L et *Medicago falcata* L. CR Acad Sci Paris, 297, ser III, 13-16.
- Towill, L.E. 1985. Low temperature and freeze/vacuum-drying preservation of pollen. Pages 171-198 in Kartha, K.K., ed. Cryopreservation of plant cells and organs. CRC Press Inc.,
- Tranvan, H.; David, A. 1985. Greffage *in vitro* du pin maritime (*Pinus pinaster*). Can. J. Bot. 63:1017-1020.
- Vidalis H., Augé R., Beauchesne G., et al. 1989. La culture *in vitro* et ses applications horticoles. Lavoisier, Tec et Doc (ed). 7- 24.
- Went. F. W., 1927. Growth, auxin, and tropisms in decapited *Avena coleoptiles*. Plant. Physiol. 17 : 230. 1942. 13. Gautheret, R. J., 1942. Hétéro-auxines et cultures de tissus végétaux. Bull. Soc. Chim. Biol. 24:13-41.
- White P.R., 1941. Plant tissue cultures. Biological Rev., 16: 34-38.
- Wright RL, Somers DA, Mc Graw RL (1987) Somatic hybridization between birdsfoot trefoil (*Lotus corniculatus* L) et *L. conimbricensis* Willd. Theor Appl Genet 75, 151-156.
- Zahalka j ; -p. Les plantes en pharmacie : propriétés et utilisation ; Ed. du Dauphin ; 14 octobre 2005 .
- Zimmerman, J.L. 1993. Somatic embryogenesis- A Model for early development in higher plants. Plant Cell, 5, 1411-1423.