



الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE

وزارة التعليم العالي والبحث العلمي

MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE

جامعة Hassiba بن بو علي - الشلف

UNIVERSITE HASSIBA BENBOUALI CHLEF

كلية علوم

FACULTE DES SCIENCES

قسم البيولوجيا

DEPARTEMENT DE BIOLOGIE

Mémoire de fin d'étude

*En Vue de l'obtention d'un diplôme de master en biotechnologie végétale et innovation
phytothérapeutique*

Thème

**Contribution à la régénération *in vitro* d'une
plante médicinale sauvage d'Algérie
« *Carthamus caeruleus L* ».**

Présentés par :

- *M^{elle} Djellouli Asma*
- *M^{elle} Bedrouni Hassiba*

Devant le jury :

- *Encadreur : Mr Saadi Abdelkader* *Professeur à l'UHBC*
- *Présidente : M^{me} Meziane Malika* *Maitre-assistant à l'UHBC*
- *Examineur : Mr Medjahed Hussein* *Maître-assistant à l'UHBC*

Année universitaire : 2015 / 2016

Résumé

L'objectif de la présente contribution visait à régénérer *in vitro* une plante sauvage qui fait partie des plantes médicinales que possède l'Algérie. La plante en question est *carthamus caeruleus L*, une espèce spontanée très utilisée en médecine traditionnelle Algérienne pour soigner les brûlures. La présente étude ambitionnait donc de régénérer *in vitro* de plantes entières de *carthamus caeruleus L* selon deux modes de multiplication : le microbouturage et l'organogenèse.

Concernant le microbouturage, deux types d'explants ont été testés : les apex de tiges et les segments de nœuds. Chez *Carthamus caeruleus L*, c'est l'adjonction de la KN seule dans le milieu, aux doses de 1 mg/L, que les meilleurs taux de reprise (pour les apex) et taux de débourrement des bourgeons (pour les segments de nœuds) ont été obtenus. De même pour l'élongation des tiges (2,01 cm avec les apex et 2,56 cm avec les segments de nœuds).

Sur les milieux dits d'enracinement, s'est plutôt la callogenèse qui s'est déclenché au niveau de la base des tiges transférées au lieu des racines.

Pour l'organogenèse, les meilleurs résultats obtenus sont ceux liés à la callogenèse. Nous avons relevé que les fragments de feuilles présentent de bonnes aptitudes callogènes comparativement aux explants de tiges. L'induction de la callogenèse se trouve fortement stimuler lorsque les cytokinines sont combinées aux auxines. Les meilleurs taux de callogenèse (100 %) sont obtenus avec les mélanges (ANA * BA).

Pour la caulogenèse et la rhizogenèse, aucun résultat n'a été décelé quel que soit l'explant ou le milieu de culture, utilisés.

Mots clés : *Carthamus caeruleus L*, Régénération *in vitro*, Microbouturage, Organogenèse, Callogenèse.

Abstract

The objective of this paper was to regenerate *in vitro* a wild plant that is part of medicinal plants in Algeria. The plant in question is *carthamus caeruleus*, a spontaneous species very used in Algerian traditional medicine to treat burns. Therefore, this study aspired to regenerate whole plants *in vitro* toothed *carthamus caeruleus L* multiplication in two modes : micropropagation and organogenesis.

Concerning the micropropagation, two types of explants have been tested : the apex of stem and the segment of nodes. In *carthamus caeruleus L* it is the addition of the KN only in the medium, at doses of 1 mg / L, than the best recovery rate (for apex) and rate of bud burst (for nodes segments) were obtained. Similarly to stem elongation (2.01 cm with the apex and 2.56 cm with the segments of nodes).

On the rooting media, it is rather the callogenesis that broke at the base of the stems transferred instead of roots.

For organogenesis, the best results are those related to the callogenesis. We found that the leaves of fragments have good skills callogènes compared to stem explants. Induction of callus formation is strongly stimulate when cytokinins are combined with auxins. Best callogenesis rate (100%) are obtained with the mixtures (NAA * BA).

For caulogenesis and rhizogenesis, no results were found regardless of the explant or culture medium used.

Keywords: *Carthamus caeruleus L*, Regeneration *in vitro*, Microbouturage, Organogenesis, Callogenesis.

ملخص

يتمحور هذا البحث حول تجديد نبتة برية في المختبر, و التي هي جزء من النباتات الطبية في الجزائر و هي *Carthamus caeruleus L*, تستخدم هذه النبتة على نطاق واسع في الطب التقليدي الجزائري, و بهذا الخصوص تتطلع هذه الدراسة لتجديد هذه النبتة كاملة في المختبر بطريقتين : التكاثر الدقيق و التكاثر العضوي.

بخصوص التكاثر الدقيق استعمل نوعين من الاجزاء النباتية : القمة النامية للساق و العقد النباتية. عند نبات *Carthamus caeruleus L* اضافة الكينيتين وحدها في المحلول الغذائي بجرعة 1 ملغ/لتر مكن من الحصول على افضل مردود بالنسبة للقمة النامية و ايضا افضل معدل لانطلاق البراعم, نفس الشيء بالنسبة لاستطالة الساق (2.01 سم بالنسبة للقمة النامية و 2.56 سم بالنسبة للعقد).

في اوساط عملية التجدير تم الحصول على الكالوسات بدل الجذور على مستوى قاعدة السيقان المنقولة

بالنسبة للتكاثر العضوي, افضل النتائج التي تم الحصول عليها متعلقة بالكالوسات, و قد تبين لنا ان اجزاء الاوراق اظهرت كفاءة عالية للكالوجان مقارنة مع الاجزاء الساقية. و لقد وجدنا ان تحفيز احداث الكالوسات يحدث عند وجود تمازج بين السيتوكنين و الاكسين. و لقد تحصلنا على افضل مردود عند مزج (BA* ANA).

لم نتحصل على اي نتيجة بالنسبة لعملية ظهور السيقان و عملية التجدير, مهما يكن نوع الجزء النباتي المستخدم او تركيبة المحلول الغذائي.

الكلمات المفتاحية : *Carthamus caeruleus L*, التجديد النباتي في المختبر, التكاثر الدقيق, التكاثر العضوي, الكالوسات.

Dédicaces

Je dédie ce modeste travail :

A mon père, mon premier encadrant, depuis ma naissance.

A ma chère mère : qu'elle trouve ici l'hommage de ma gratitude qui si grande qu'elle puisse être, ne sera à la hauteur de ses sacrifices, et ses prières pour moi.

A mon frère et mes sœurs : Imad, Hanane, Rafika, Soumia.

*Une spéciale dédicace à un personne qui ma toujours aidé, encouragé, et conseillé **Amine**.*

A tous mes amies qui me sont chers, à tous ceux que j'aime et qui m'aiment, qu'ils trouvent ici l'expression de mes sentiments les plus dévoués et mes vœux les plus sincères.

Hassiba

Dédicaces

**A celle qui m'a donné la vie, le symbole de tendresse, qui s'est sacrifiée pour mon bonheur et ma réussite, à ma mère...*

**A mon père, école de mon enfance, qui a été mon ombre durant toutes les années des études, et qui a veillé tout au long de ma vie, à m'encourager, à m'aider et à me protéger.*

Que dieu me les garde et me les protèges.

**A mon frère Miloud, mes sœurs Souad· Fatima·*

**A mes grands-parents, pour leurs soutiens moraux, et pour tous les sentiments d'affection et d'amour qui représentent pour moi le pilier de tous mes efforts.*

**A mes oncles et mes tantes, surtout Elarbi et Mounira·*

**A tous les membres de ma famille sans aucune exception·*

**A ma camarade collaboratrice : Hassiba·*

**A mes aimables belles amies : kheira, Touha, Imene, Fatiha, Djahida, Kaouther, Khadîdja, Faiza, Louiza, Nadjat, Aicha·*

**A toute la promotion de biotechnologie végétale et innovation phytothérapeutique 2015/2016·*

**A tous qui me sont chers, A tous ceux qui m'aiment, A tous ceux que j'aime·*

Asma

Remerciements

Nous tenons tous d'abord à remercier « Dieu » très clément et sa sainte miséricorde, qui nous avoir donné la force et la patience et de nous avoir aidé à réaliser et à accomplir ce travail.

Nous tenons à exprimer tous particulièrement notre gratitude à notre encadreur Monsieur Saadi AEK. Professeur à l'université Hassiba Benbouali, Chlef, pour l'orientation, la patience qui ont constitué un apport considérable sans lequel ce travail n'aurait pas pu être mené au bon port. Merci pour ses conseils, sa sollicitude et ses encouragements.

Nous tenons à remercier Madame Meziane M. d'avoir fait l'honneur de présider le jury de ce mémoire.

Nous remercions également Monsieur Mdjahed H. Maitre-assistant à l'université Hassiba Benbouali, Chlef, d'avoir accepté d'examiner ce travail.

Nous aimerions adresser un remerciement particulier à Melle Gaddouche L. Doctorante et responsable de laboratoire de biotechnologie végétale, pour sa sympathie, sa disponibilité, et ses encouragements.

Merci à tous ceux qui ont contribués de près ou de loin à la réalisation de ce travail.

Merci

Table de matière

Résumé

Abstract

ملخص

Dédicaces

Remerciements

Table de matière

Liste des figures

Liste des tableaux

Liste des abréviations

Introduction

Synthèse bibliographique

Chapitre I : Généralités sur <i>Carthamus caeruleus</i> L	6
I.1. Présentation des Astéracées	6
I.1.1. Classification botanique	6
I.1.2. Description botanique	7
I.1.3. Applications médicinales des Astéracées	7
I.2. Présentation de genre <i>Carthamus</i>	8
I.2.1. Description botanique	8
I.2.2. Les différentes espèces de <i>Carthamus</i> en Algérie	9
I.2.1.1. <i>Carthamus lanatus</i> L	9
I.2.1.2. <i>Carthamus arborescens</i> L	9
I.2.1.3. <i>Carthamus helenioides</i>	9
I.2.1.4. <i>Carthamus strictus</i>	10
I.2.1.5. <i>Carthamus multifidus</i>	10
I.2.1.6. <i>Carthamus pectinatus</i>	10
I.2.1.7. <i>Carthamus carthamoides</i>	11
I.2.1.8. <i>Carthamus calvus</i>	11
I.3. <i>Carthamus caeruleus</i> L (la carduncelle bleue)	13
I.3.1. Classification botanique	13
I.3.2. Description botanique	13
I.3.3. Distribution géographique	15
I.3.4. Composition phytochimique du rhizome	15
I.3.5. L'utilisations médicinales	17
Chapitre II : Généralités sur la culture <i>in vitro</i>	19
II.1. Généralités sur la biotechnologie végétale	19
II.2. La micropropagation	19

II.2.1. Historique	20
II.2.2. Fondement	22
A. La différenciation	22
B. La dédifférenciation	22
C. La totipotence	23
II.3. Les voies de la micropropagation	23
II.3.1. La propagation conforme	24
A. Microbouturage	25
B. Cultures de méristème	25
II.3.2. La propagation par organogenèse ou embryogenèse somatique	26
A. L'organogenèse	26
B. L'embryogenèse somatique	26
II.4. Autres voies de la culture <i>in vitro</i>	27
II.4.1. La culture de protoplaste	27
II.4.2. La variation somaclonale	28
II.4.3. La production des plantes haploïdes	28
II.5. Les avantages et les inconvénients de la micropropagation	29
II.5.1. Les avantages	29
II.5.2. Les inconvénients	30
II.6. Les facteurs influençant la régénération <i>in vitro</i> des plantes	30
II.6.1. Effet de l'explant	30
II.6.1.1. L'âge physiologique	30
II.6.1.2. L'époque de prélèvement	31
II.6.2. Effet de milieu de culture	31
II.6.2.1. Les éléments minéraux	31
A. Les macroéléments	31
B. Les microéléments	31
II.6.2.2. Les éléments organiques	31
A. Le saccharose	31
B. Les vitamines	32
II.6.3. Les conditions de cultures	32
II.6.3.1. La lumière et la photopériode	32
II.6.3.2. La température	32
A. Les auxines	32
B. Les cytokinines	33
C. Les gibbérellines	34

Etude expérimentale

Chapitre III : Matériel et méthodes	37
III.1. Matériel végétale	37
III.1.1. Préparation du matériel végétal	38
III.1.2. Prélèvement et stérilisation du matériel végétale	38
III.2. Présentation des techniques de culture	39
III.2.1. Choix de milieux de culture	39
III.2.1.1. Préparation de milieu de culture MS	39
III.2.1.2. Les substances hormonales employées	39
III.2.2. Techniques de cultures utilisées	39
III.2.2.1. Voie de multiplication par microbouturage	39
A. Développement des apex	40
B. développement des microboutures (segments de nœuds)	40
C. Phase d'enracinement des tiges régénérées	41
III.2.2.2. Voie de multiplication par organogénèse	41
A. Phase d'induction de la callogénèse	41
B. Phase d'induction de la caulogénèse et/ou de la rhizogénèse	42
III.3. Conditions de culture	43
III.4. Suivi des cultures et expression des résultats	44
Chapitre IV : Résultats et Discussion	46
IV.1. Voie de multiplication par microbouturage	46
IV.1.1. Développement des apex	47
IV.1.2. développement des microboutures (segments de nœuds)	51
IV.1.3. Phase d'enracinement des tiges régénérées	54
IV.2. Voie de multiplication par organogénèse	56
IV.2.1. Phase d'induction de la callogénèse	56
IV.2.2. Phase d'induction de la caulogénèse et/ou de la rhizogénèse	61

Conclusion

Références bibliographiques

Annexes

Résumé

Listes des figures

Figure 1. Quelques aspects des feuilles, des involucre et des akènes, des espèces de *Carthamus* (Quezel et Santa, 1963).

Figure 2. Planche botanique du *Carthamus caeruleus L* (a), l'état juvénile (b), tige feuillée (c), fleur (d), rhizome (e) et graine de la plante (f).

Figure 3. Photographies montrant les résultats d'un test sur un individu ayant appliqué la crème traditionnelle. A: zone de brûlure ; B: premier jour ; C: cinquième jour ; D: dixième jour (Hamadi *et al.*, 2014).

Figure 4. Les principales méthodes de la micropropagation (Lindsey et Jones, 1989).

Figure 5 : Effet de la balance hormonale sur l'orientation de l'organogenèse au cours de la micropropagation (Augé *et al.*, 1989).

Figure 6. L'aspect du *Carthamus caeruleus L* au terrain (1), au laboratoire (2) et la localisation de la région de récolte par photo satellite (3) (Latitude : 36.514934 | Longitude : 1.526413) (Google Earth, 2016).

Figure 7. Les étapes de la stérilisation du matériel végétale.

Figure 8. Aspect d'un apex et leur ensemencement.

Figure 9. Aspect d'un nœud et leur ensemencement.

Figure 10. Les étapes d'ensemencement des boutures servent à l'organogenèse. (1) : Dissection des fragments des feuilles, (2) : leur ensemencement, (3) : Dissection des fragments des pétioles, (4) : leur ensemencement.

Figure 11. Cinétique de croissance des tiges obtenues à partir d'apex, en fonction des concentrations de KN (A) et BA (B) et du temps.

Figure 12. Cinétique de croissance des tiges, obtenues à partir d'apex, sur les milieux contenant 1mg/L de KN et de BA en fonction du temps.

Figure 13. L'effet de la KN (A) et la BA (B), apportée chacune à 1 mg/L, sur la reprise de croissance des apex, après 3 (1), 6 (2), 9 (3) et 21 jours (4).

Figure 14. L'aspect des pousses végétatives régénérées après : 1 (1), 3 (2), 10 (3) et 15 jours (4), sur un milieu à 1 mg/L de KN.

Figure 15: Aspect des pousses transférées sur milieu sans hormone (A et B) et des pousses ayant développées des cals (C et D, flèches) sur milieu à ANA 0,1 mg/L.

Figure 16 : Induction de la callogenèse sur les fragments des feuilles (A et B) et des pétioles (C et D) et aspect du phénomène du brunissement des cals formés (E et F).

Figure 17 : Aspect des cals produits sur le milieu ANA 0,1 mg/L (A, B) et le phénomène de brunissement des cals obtenu sur un milieu sans hormone (C, D).

Liste des tableaux

Tableau 1 : Quelques indices biochimiques du rhizome du *Carthamus caeruleus L* (Hamadi *et al.*, 2014).

Tableau 2 : Caractérisation phytochimique qualitative de l'extrait du rhizome de *Carthamus caeruleus L* (Hamadi *et al.*, 2014).

Tableau 3 : Composition hormonale des milieux de culture employés en organogénèse (ANA/ BA).

Tableau 4 : Composition hormonale des milieux de culture employés en organogénèse (2,4-D / BA).

Tableau 5 : Taux de reprise et élongation des pousses régénérées à partir d'apex de *Carthamus caeruleus L*. obtenus, après 21 jours de culture en fonction de plusieurs concentrations de KN et BA.

Tableau 6 : Taux de débourrement et l'élongation des pousses de *Carthamus caeruleus L*. obtenus, après 15 jours de culture, sur milieu contenant 1 mg/L de kinétine.

Tableau 7 : Aptitude à la callogenèse des feuilles et des pétioles de l'espèce *Carthamus caeruleus* en fonction de plusieurs combinaisons hormonales auxines/ cytokinines (ANA/ BA) et (2,4-D/BA).

Liste des abréviations

2,4-D	2,4-Dichlorophenoxyacetic acide.
AIA	Acide indole acétique.
AIB	Acide b-indole butyrique.
ANA	Acide Naphtalène -1- Acétique.
APG	Angiosperms Phylogeny Group.
BA	6- benzyladénine.
CGMS	chromatographie en phase gazeuse- spectrométrie de masse.
EDTA	Ethylène Diamine Tétra-Acétate.
HCL	Chlorure d'hydrogène.
KN	Kinétine (6-furfuryl-aminopurine).
MS	Muraschige et skoog, (1962).
MT	Médecine traditionnelle.
NaOH	Hydroxyde de sodium.
OMS	Organisation mondial de la santé.

Introduction

Une population bien nourrie et bien soignée est un facteur déterminant de la croissance économique d'un pays donné. La santé produit une amélioration des capacités individuelles de développement personnel, ceci tant au plan physique, qu'intellectuel et émotionnel (OMS, 2001).

Pour se soigner, les patients des pays développés où ceux en voie de développement font souvent recours à la médecine conventionnelle à cause de son efficacité. Néanmoins, malgré son efficacité, cette voie thérapeutique présente quelques inconvénients comme les effets indésirables, qu'elle peut engendrer et aussi son coût qui reste relativement élevé pour les usagers.

Actuellement, de nombreux patients font recours à la médecine traditionnelle (MT) pour satisfaire des besoins en soins de santé primaire. Elle est utilisée par l'homme depuis la nuit des temps et toutes les grandes civilisations anciennes (Chinoise, Indienne, Egyptienne, Grec, Romaine, etc.) ont eu recours à ce savoir-faire traditionnel pour se soigner (Viguiet, 2006).

D'après une estimation de l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS), plus de 80 % de la population en Afrique utilise la médecine traditionnelle (MT) comme principale source de soins et de santé primaires (OMS, 2013). Cette tendance à aller vers la médecine traditionnelle connaît un grand succès même dans certains pays émergents, tels l'Inde et la Chine. En effet, environ 65 % de la population rurale Indienne et 40 % de la population chinoise, utilisent la médecine traditionnelle à des fins thérapeutiques (OMS, 2003). Compte tenu de l'efficacité de la MT, l'OMS fait des efforts considérables pour convaincre les pays membres à l'intégrer dans leurs politiques de soins de santé.

Comme la MT repose à hauteur de 80 % sur l'utilisation de plantes médicinales, de nombreux pays, planchent actuellement en collaboration avec les experts de l'OMS pour mettre au point des techniques, pour contrôler et garantir une bonne qualité, une efficacité et une innocuité des produits faits à base de plantes.

Il existe dans le monde environ 20 000 espèces végétales utilisées à des fins thérapeutiques. Selon l'OMS, près de 6 377 espèces de plantes sont utilisées en Afrique, dont plus de 400 sont des plantes médicinales (représentant 90 % des plantes utilisées en médecine traditionnelle) (Diallo, 2005).

L'Algérie compte parmi les pays riches en ressources phytogénétiques à intérêt médicinales et aromatiques dans le bassin méditerranéen. On dénombre à plus de 300 espèces à usage aromatique et médicinal, existant parmi les 3150 espèces végétales que compte notre pays (Tetenyl, 1985).

Carthamus caeruleus L fait partie de ces ressources phytogénétiques Algériennes à intérêt médicinal, qui poussent à l'état sauvage. Elle est connue dans le Nord algérien sous son nom vernaculaire Berbéro- Arabe « Maghress guerss ».

L'extrait de rhizome du *Carthamus caeruleus L* est utilisée en Algérie, en médecine traditionnelle comme cicatrisant. Il contribue à soigner les brûlures (anti brûlure). La richesse de cette plante en polyphénols lui confère une grande activité antioxydante. Les graines sont riches en amidon et en huile. Il présente aussi un pouvoir réducteur équivalent à 85 mg de vitamine C/100g de masse fraîche mais il ne présente pas de propriétés antibactériennes (Hamadi *et al.*, 2014).

C'est dans le cadre d'un projet de recherche visant la promotion et la préservation des plantes médicinales spontanées de notre pays que s'inscrit la présente étude. C'est une première contribution qui ambitionne de régénérer *in vitro* l'espèce *Carthamus caeruleus L*. Nous comptons arriver à régénérer cette espèce via deux voies de micropropagation à savoir : le microbouturage et l'organogenèse.

I.1.Présentation des Astéracées

La famille des astéracées (anciennement appelées Composées ou Synanthérées) comprend près de 1500 genres et pas loin de 26 000 espèces dont 750 endémiques.

C'est une famille très importante dans le règne végétal. Elle est présente dans toutes les régions du monde principalement dans les régions tempérées et à l'exception des pôles, dans notre territoire elle renferme 408 espèces réparties en 109 genres (Quezel et Santa, 1963 ; Barkely *et al.*, 2006).

Les astéracées peuvent être annuelles, bisannuelles ou vivaces. On y trouve surtout des plantes vivaces et à feuilles alternes. Dans la grande majorité des cas, les astéracées sont des plantes herbacées mais elles sont également représentées par des arbres, des arbustes ou des lianes, certaines sont également succulentes (Barkely *et al.*, 2006).

I.1.1.Classification botanique

Selon la classification APG III, (2009) :

** Règne : Plantae.

** Embranchement : Spermatophyta.

** Sous-embranchement : Angiospermes.

** Classe : Dicotylédones.

** Sous classe : Gamopétales.

** Ordre : Astérales.

** Famille : Astéracées.

** Sous familles : les tubuliflores ou carduacées, les liguliflores ou chicoracées, les labiatiflores et les radiées ou corymbifères.

I.1.2. Description botanique

Les astéracées ont la caractéristique d'avoir des fleurs regroupées en capitules, c'est-à-dire serrées les unes à côté des autres, sans pédoncule, sur l'extrémité élargie d'un rameau ou d'une tige et entourées d'une structure formée par des bractées florales appelée involucre. Les fleurs, appelées aussi fleurons, sont caractérisées par leurs anthères soudées.

Les pétales sont soudés et forment un tube court suivi d'une languette allongée dans le cas de fleurs ligulées, ou un long tube entourant les anthères et le style dans le cas des fleurs tubulées, l'extrémité des pétales pouvant alors être libre. Le capitule peut être formé uniquement de fleurs tubulées (artichaut), uniquement de fleurs ligulées (pissenlit), ou de fleurons périphériques ligulés entourant un disque de fleurons tubulés (marguerite) (Barkely *et al.*, 2006).

Le fruit des Astéracées est un akène, généralement surmonté d'un Pappus (une aigrette de soies correspondant au calice persistant). Le but du Pappus est de favoriser la dispersion des graines par le vent (anémochorie). Les feuilles des astéracées sont généralement alternes, simples, mais chez certaines espèces elles peuvent être divisées.

De très nombreuses astéracées sont cultivées dans les jardins pour leurs fleurs, soit comme plantes ornementales, soit pour être destinées à l'industrie des fleurs coupées: achillées, bleuets, dahlias, gaillardes.... D'autres astéracées sont consommées comme l'artichaut, la laitue, le tournesol... Certaines astéracées sont toxiques ou hallucinogènes comme par exemple *Artemisia mexicana*. Cependant, d'autres astéracées possèdent des vertus médicinales remarquables : armoise, camomille... (Barkely *et al.*, 2006).

I.1.3. Applications médicinales des Astéracées

La famille des astéracées est couramment en vedette dans des revues médicales grâce surtout aux lactones sesquiterpéniques qu'elle contient. Ces composés phytochimiques sont une cause importante de la dermatite de contact (Bellakhdar, 1997).

La famille des Astéracées est largement utilisée en médecine populaire pour guérir bon nombre de maladies :

- *Arnica montana*: Arnica → vulnéraire.
- *Artemisia annua*: Armoise (artémisine) → antimalarique.

- *Chamaemelum nobile*: Camomille romaine → antispasmodique, digestif.
- *Matricaria recutita*: Camomille vraie → dermatologie (externe).
- *Silybum marianum* : Chardon Marie → hépatoprotecteur.
- *Tanacetum sp*: Pyrèthre → insecticide.
- *Tussilago* : Tussilage → pectoral.

L'utilisation thérapeutique majeure des astéracées est due essentiellement à leurs activités anti inflammatoires et antimicrobiennes.

I.2. Présentation de genre *Carthamus*

Le genre botanique *Carthamus* regroupe des plantes de la famille des Astéracées (ou Composées) et comprend environ 29 espèces qui se rencontrent en région méditerranéenne, jusqu'en Asie. Ce sont des plantes annuelles ou vivaces, le plus souvent très épineuses (Mioulane, 2004).

I.2.1. Description botanique

Les fleurs se regroupant en inflorescences de type capitules. Elles sont tubuleuses, égales, tous hermaphrodites. Involucre globuleux ou ovoïde, constitué par des bractées foliacées et très épineuses, imbriquées sur plusieurs rangs, acuminées et inermes, ou les intérieures comportant un appendice finement découpé ou entier et les extérieurs pectinées-ciliées (voir fig.1 : (1)). Le réceptacle est élargi en plateau, très paléacé. Les fruits sont des akènes quadrangulaires ou rarement trigones, à angles saillants ou non (fig.1 : (6)). Aigrette nulle ou constituée par des paillettes ou des soies non plumeuses, simple ou double (Quezel et Santa, 1963).

I.2.2. Les différentes espèces de *Carthamus* en Algérie

Selon Quezel et Santa, (1963), le genre *Carthamus* en Algérie comprend 09 espèces :

I.2.2.1. *Carthamus lanatus L.*

Plante annuelle ou bisannuelle, de 10-60 cm ou plus, odorante, pubescente, aranéuse et un peu visqueuse.

Tige dressée, rameuse au sommet et à rameaux étalés. Feuilles coriaces, glanduleuses-visqueuses, épineuses sur les bords, fortement nerviées, pennatipartites à divisions incisées ou dentées. Capitules solitaires au sommet de la tige et des rameaux, aranéux. Involucre supplémentaire à bractées étalées, épineuses et très vulnérantes, linéaires acuminées. Corolles jaunes. Akènes très gros, quadrangulaires, à 4 côtes saillantes et à faces rugueuses, les périphériques chauves et les intérieurs à longue aigrette; tous à bord du disque denticulé (fig.1 : (6)) (Quezel et Santa, 1963).

I.2.2.2. *Carthamus arborescens L.*

Plantes vivaces ou suffrutescentes, puissante (60-150 cm), pubescente-glanduleuse et fétide. Tiges rameuses, dressées. Feuilles vert, coriaces, sinuées-pinnatifides, inégalement dentées. Épineuses et fortement nerviées; les caulinaires sessiles et amplexicaules. Capitules gros (3 cm de large sur 4 de long), solitaires au sommet des rameaux. Involucre supplémentaire à bractées épineuses, inermes et acuminées. Corolles jaune safran. Akènes bruns, très rugueux, à rebord du disque denticulé, à angles très saillants (fig.1 : (7)), les extérieurs trigones, les intérieures tétragones. Aigrette fragile et caduque. On les trouve dans les collines du littoral (Quezel et Santa, 1963).

I.2.2.3. *Carthamus helenioides*

Plantes vivaces, puissante ± élevée (30-100 cm). Tige dressée, simple ou rameuse et striée. Feuilles glabres et coriaces, ovales lancéolées et fortement nerviées, entières ou à peine denticulées à l'exception parfois des toutes dernières; les inférieures pétiolées et les supérieures amplexicaules. Fleurs jaunes. Gros capitules de 4-5 cm de diamètre, ombiliqués et portés par un pédoncule épaissi. Involucre supplémentaire très grand, foliacé à bractées ovales-lancéolées et finement denticulées (Quezel et Santa, 1963).

Involucre proprement dit à bractées pectinées-ciliées, avec ou sans mucron, les dernières entières se terminant en appendice cilié et scarieux (fig.1 : (1)), akènes très lisses dans le bas et arrondis au sommet (où ils sont parfois \pm rugueux) (fig.1 : (5)). Elle est trouvée dans les lieux argileux (Quezel et Santa, 1963).

1.2.2.4. Carthamus strictus

Plante en touffes à tiges grêles, simples ou peu rameuses. Les feuilles caulinaires, très caractéristiques, conduplicquées, étalées, fortement épineuses et toutes pennatipartites, à rachis étroit et segments très distants (fig.1 : (3)). Les capitules sont cylindriques, médiocres. Les Corolles sont bleu-pâle ou blanchâtres. Les fleurs peuvent être de coloration bleuâtre, blanchâtres ou purpurines. Les akènes sont blancs, tétragones, de 5 mm, tous à aigrette rudimentaire. On les trouve dans les montagnes élevées (Quezel et Santa, 1963).

1.2.2.5. Carthamus multifidus

Plante plus puissante (40-100 cm). Les feuilles sont radicales en rosette, grandes (15-30 cm), pétiolées, entières ou (le plus souvent), pennatipartites, spinescentes; les supérieures sessiles, ovales-lancéolées, fortement dentées-épineuses. Bractées extérieures et moyennes, de l'involucre proprement dit à très long mucron spinescent. Corolles bleues. Capitules plus petits (1,5-2 cm de large sur 2 cm de long), disposés en corymbe ovoïde. Akènes égalant environ l'aigrette, grands (7 X 4 mm), à côtes peu marquées, luisants (fig.1 : (5)). On les trouve dans les steppes, pâturages pierreux des montagnes arides (Quezel et Santa, 1963).

1.2.2.6. Carthamus pectinatus

Les feuilles sont toutes indivises, dentées-épineuses, pétiolées, pectinées et acuminées en épine vulnérante, régulièrement décroissante (fig.1 : (4)). Les tiges sont rameuses dans le haut, rigides et dressées. L'involucre supplémentaire est à bractées inégales et sur plusieurs rangs, atténuées en pointe foliacée épineuse au sommet et bordée de cils épineux pectinés. Les corolles sont bleuâtres. Les graines sont des Akènes périphériques chauves; ceux du centre à aigrette normale. On les trouve dans les forêts claires, pâturages pierreux (Quezel et Santa, 1963).

I.2.2.7. Carthamus carthamoides

Plante pubescente-aranéuse dans le haut, à tiges ascendantes et peu élevées. Feuilles radicales pétiolées et pennatiséquées; les moyennes pinnatilobées, les supérieures ovales-lancéolées et sessiles. Involucre supplémentaire à bractées disposées sur plusieurs rangs, inégales, à base coriace, s'atténuant en pointe foliacée-épineuse au sommet, bordées de forts cils épineux et pectinés (dans les toutes intérieures) (fig.1 : (2)). Corolles bleues. Akènes périphériques chauves; ceux du centre soit chauves, soit à aigrette réduite à quelques soies (Quezel et Santa, 1963).

I.2.2.8. Carthamus calvus

Plante variable à feuilles soit pinnatifides, soit entières (mais dans ce cas inermes ou à peine denticulées). Involucre supplémentaire à bractées foliacées, dentées-épineuses, fortement pliées en gouttière suivant la nervure dorsale. Akènes centraux à aigrette soit marquée, soit totalement ou presque totalement absente. On les trouve dans les champs et rocailles calcaires (Quezel et Santa, 1963).

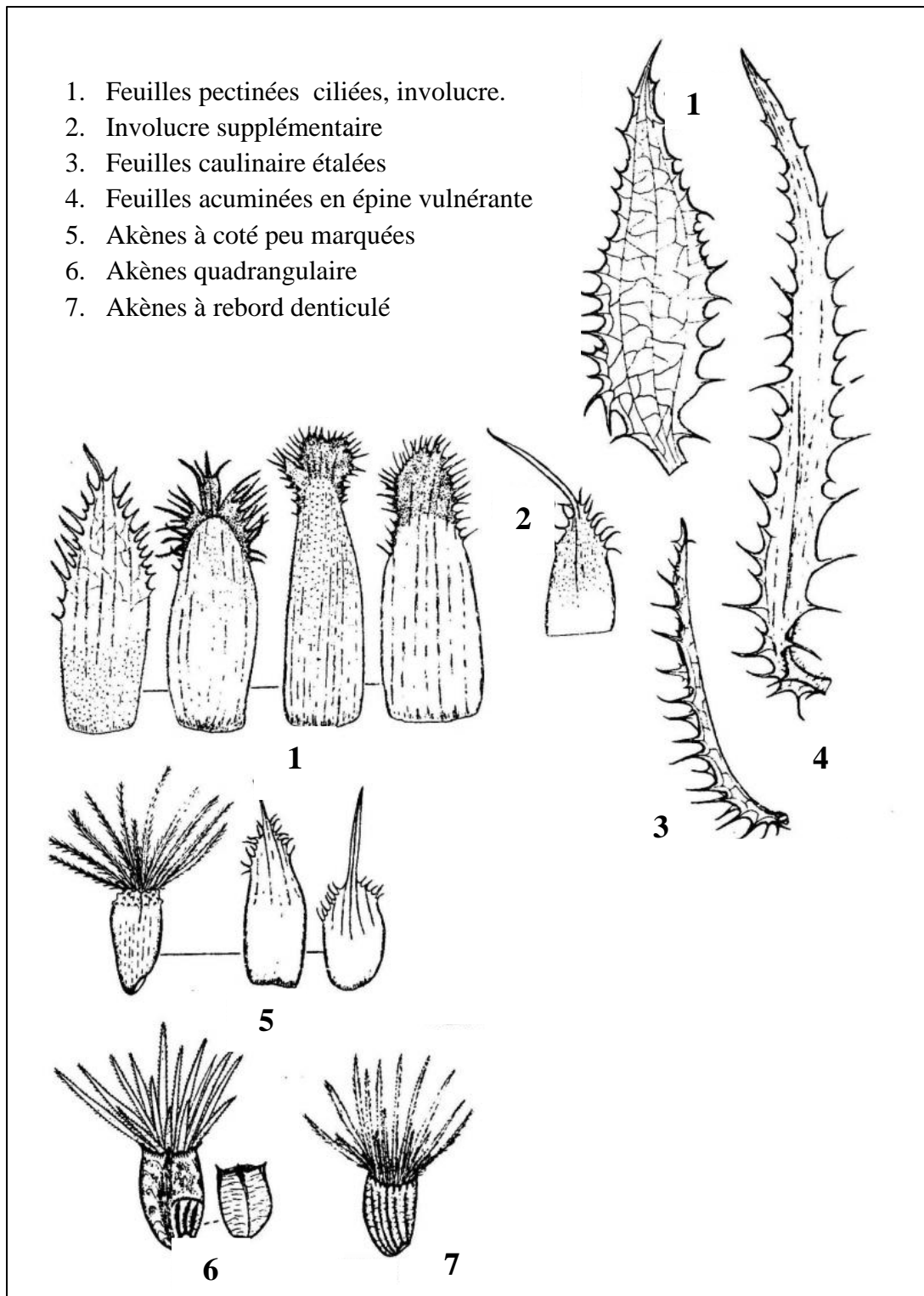


Figure 1 : Quelques aspects des feuilles, des involucre et des akènes, des espèces de *Carthamus* (Quezel et Santa, 1963).

I.3. *Carthamus caeruleus L* (La carduncelle bleue).**I.3.1. classification botanique**

Selon Quezel et Santa, (1963) :

- ** Règne : Plantae
- ** Famille : Asteraceae
- ** Sous famille : Carduoideae
- ** Classe : Cardueae
- ** Sous classe : Centaureinae
- ** Ordre : Asterales
- ** Genre : *Carthamus*
- ** Espèce: *Carthamus caeruleus L*
- ** Synonyme : *Carthamus caeruleus L /Carduncellus caeruleus L/ Kentrophyllum caeruleum/ Onobroma cearuleus L*
- ** Nom arabe : Merghres Ghers, Kenjdar, Gergaa, Qartum
- ** Nom berbère : Amegresdes

I.3.2. Description botanique

La carduncelle bleue est une plante vivace, de 20-60 cm. Tige ascendante simple ou très peu rameuse. Feuilles glabres ou pubescentes, fortement nerviées, à contour ovale ou lancéolé ; les inférieures pétiolées, dentées ou lyrées-pinnatifides, les supérieures sessiles-amplexicaules ou dentées-épineuses. Involucre proprement dit à bractées externes ciliées-pectinées, inermes; les internes à appendice fimbrié. Avec des capitules bleus violets, gros (3 cm de large sur 3-4 de long), solitaires au sommet de la tige et des rameaux, globuleux ou ovoïdes. Akènes nettement plus courts que l'aigrette (environ 2 fois), subglobuleux ou obscurément tétragones, glabres et blanchâtres. Corolles bleues. On les trouve dans les champs et les lieux incultes (Quezel et Santa, 1963 ; Balme et Grey-Wilson, 2000).

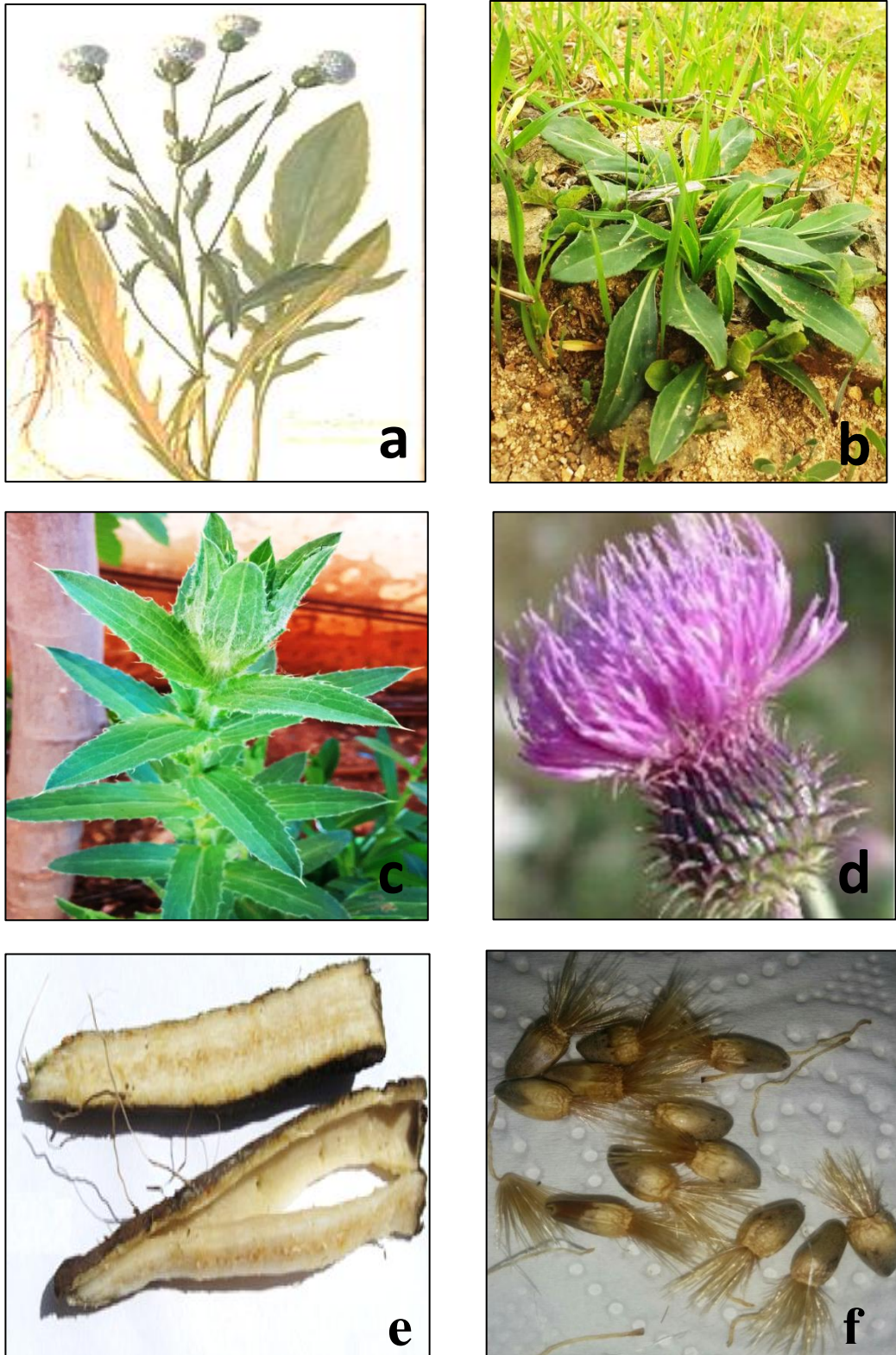


Figure 2 : Planche botanique de *Carthamus caeruleus L* (a), l'état juvénile (b), tige feuillée (c), fleur (d), rhizome (e) et graine de la plante (f).

I.3.3. Distribution géographique

C'est une espèce peu commune qu'on peut rencontrer dans les terrains maigres de Provence et de Corse. Elle préfère les lieux secs et ensoleillés du bassin méditerranéen, elle est originaire du Sud-Ouest d'Asie, d'Orient, mais répandues depuis dans le reste de l'Asie, en Afrique du Nord, en Australie même dans les deux Amériques, ainsi qu'en Europe (Boullard, 2001 ; Mioulane, 2004).

I.3.4. Composition phytochimique du rhizome

Le rhizome de *Carthamus caeruleus L* est largement utilisé sous forme de pommade pour le traitement de brûlures cutanées. Le rhizome est particulièrement riche en amidon ($0,23 \pm 0,01$ g de masse humide) et en matière grasse ($8,0 \pm 0,9$ g) dont des stérols révélés par CGMS (Hamadi *et al.*, 2014).

De plus, la teneur en saponine, substance à activité hormonale reconnue, est de $0,041$ g de masse humide, dépassant de loin celle de certaines plantes médicinales usuelles dont le ginseng. Concernant l'activité antioxydante, l'extrait aqueux de Maghress guerss présente un pouvoir réducteur équivalent à $0,85$ mg de vitamine C/g de masse humide (tableau 1 et 2) (Hamadi *et al.*, 2014).

Les crèmes élaborées selon deux formules traditionnelles (à chaud et à froid) présentent des effets similaires à celui de Biafine® (pommade de pharmacie). Un test réalisé sur un volontaire a confirmé l'efficacité de la crème élaborée pour le traitement de brûlures cutanées pour lesquelles la plante est destinée dans la médecine traditionnelle (fig. 3) (Hamadi *et al.*, 2014).

Tableau 1 : Quelques indices biochimiques du rhizome du *Carthamus caeruleus L* (Hamadi *et al.*, 2014).

Paramètres	Teneur moyenne
Humidité (%)	Rhizome conservé : $18 \pm 1,52$ Rhizome frais : $60 \pm 0,80$
PH	$5,38 \pm 0,07$
Lipides (%)	$8 \pm 0,9$
Amidon (%)	$22,82 \pm 1,33$
Polyphénols totaux (mg/ml)	2,85
Saponines (%)	$4,06 \pm 0,71$
Pouvoir réducteur (mg vit. C/100 g)	85

Tableau 2 : Caractérisation phytochimique qualitative de l'extrait du rhizome de *Carthamus caeruleus L* (Hamadi *et al.*, 2014).

Principes actifs	Tanins		Flavonoïdes			Anthraquinones	Mucilage
	Catéchiques	Galliques	Anthocyane	Flavones	flavonone		
Observation							
	+	+	-	++	-	+	+

«+++ » : présence forte ; « ++ » : présence moyenne ; «+ » : présence faible ; «_ » : absence.

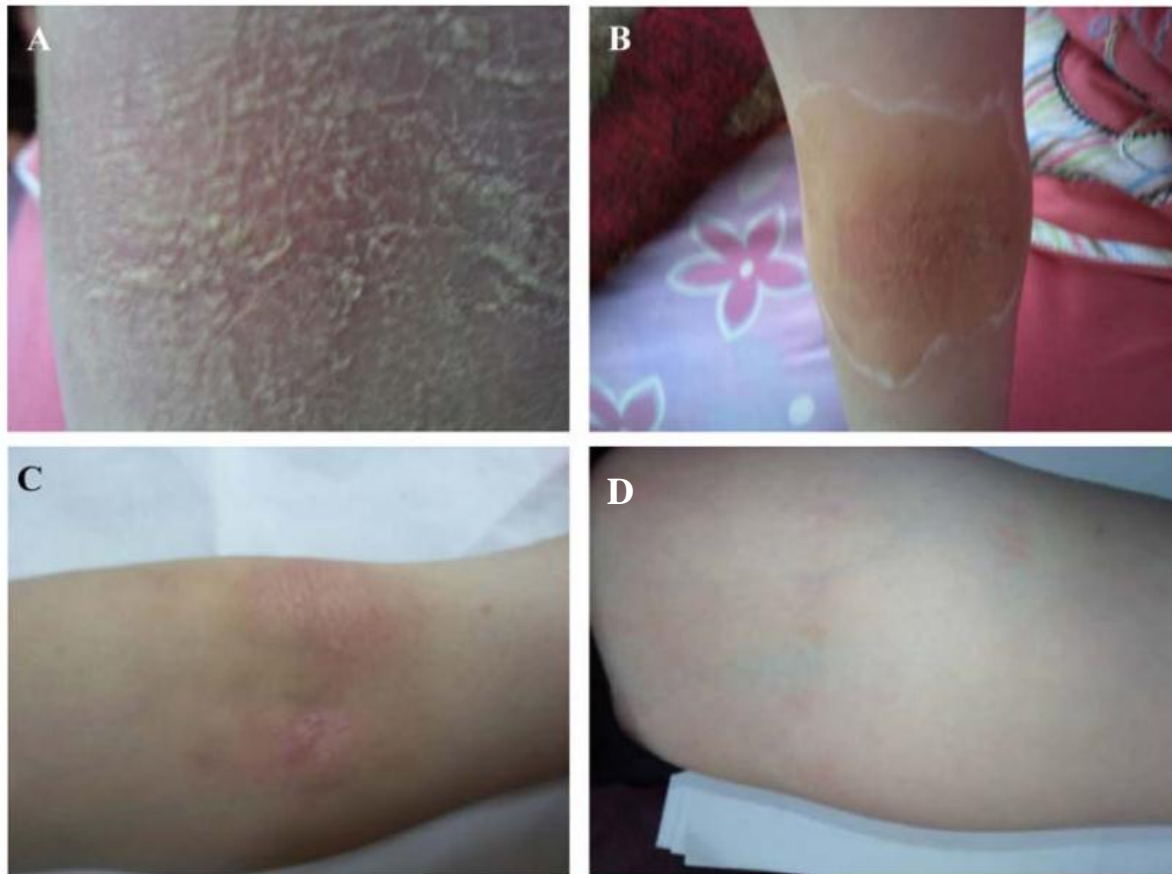


Figure 3 : Photographies montrant les résultats d'un test sur un individu ayant appliqué la crème traditionnelle. A: zone de brûlure ; B: premier jour ; C: cinquième jour ; D: dixième jour (Hamadi *et al*, 2014).

I.3.5. Utilisations médicinales

Le rhizome du *Carthamus caeruleus L* est utilisée en Algérie, en médecine traditionnelle comme cicatrisant. Il contribue à soigner les brûlures (anti brûlure). La richesse de cette plante en polyphénols lui confère une grande activité antioxydante. Les graines sont riches en amidon et en huile. Il présente aussi un pouvoir réducteur équivalent à 85 mg de vitamine C/100g de masse fraîche mais il ne présente pas de propriétés antibactériennes (Hamadi *et al.*, 2014).

II.1. Généralités sur la biotechnologie végétale

« Biotechnologie » est un terme relativement récent puisqu'il est apparu pour la première fois vers 1960. Il est composé de bios (« vie » en grec) et de technologie (entré dans la langue française en 1656, au sens d'étude des outils, machines et matières premières. Bien que son étymologie soit assez précise, sa définition est un peu plus vague, voire parfois subjective (Bhojwani, 1990).

Un sens plus restreint du terme « biotechnologie » l'associe aux réalisations des soixante dernières années comprenant toutes les techniques de culture *in vitro*, ainsi que les différents aspects de la génétique moléculaire, tels que le clonage de gènes, le séquençage et le génie génétique.

De même, il existe deux définitions possibles du terme « biotechnologie végétale ». La première est une définition au sens large et traditionnel, selon laquelle la biotechnologie végétale est l'intervention humaine sur du matériel végétal, au moyen d'instruments technologiques afin de produire des effets temporaires. La seconde définition, au sens strict et moderne, décrit la biotechnologie végétale comme l'intervention humaine sur du matériel végétal au moyen d'instruments technologiques, afin de produire des effets permanents (transmissibles à la descendance), incluant le génie génétique, ou manipulation génétique, pour obtenir des plantes transgéniques (Alvaro, 2013).

La biotechnologie végétale utilise une technique majeure, appelée « culture de tissus végétaux », associée à la culture *in vitro* de protoplastes, cellules, tissus et organes et qui consiste à cultiver des tissus ou des cellules en milieu totalement artificiel (Anonyme, 2003).

II.2. La micropropagation

La technique de culture *in vitro* (appelée aussi micropropagation) est un mode de multiplication végétative artificielle des plantes. Il s'agit d'un ensemble de méthodes faisant intervenir d'une part l'asepsie (stérilisation du matériel, désinfection des explants) et d'autre part des conditions de culture parfaitement contrôlées (milieux de culture définis pour chaque type de plante, température, lumière, humidité, etc.).

Elle est utilisée dans un but de multiplication en masse, puisqu'elle permet, en partant d'un seul individu (plante), l'obtention d'un nombre considérables de plantes génétiquement identique à la plante mère. Les plantes reproduites ne sont pas seulement conformes mais présents aussi une grande uniformité (Ferry et *al.*, 1998).

Théoriquement, n'importe quel type d'organe (bourgeon, feuille, racine...) ou fragment d'organe, prélevé sur une plante, peut être cultivé isolement sur un milieu nutritif synthétique, approprié et produire une plante identique à la plante mère (celle du départ) (Gaspar, 1976).

II.2.1. Historique

Les premiers pas de culture *in vitro* sont dus à un botaniste allemand Haberlandt en 1902, qui formule les idées sur lesquelles reposent les cultures de tissus par le concept de totipotence cellulaire. Il obtient ainsi, sur un milieu nutritif de KNOP amélioré, la survie durant plusieurs mois de petits amas cellulaires, sans qu'il y ait de multiplication cellulaire (Augé et *al.*, 1989).

En 1922, Robbins aux Etats-Unis et Kotte en Allemagne, obtiennent la croissance de pointes de racines pendant presque six mois, mais cessèrent de croître et les cultures furent perdues. Mais la date qui marque réellement le début de culture *in vitro* est 1932, avec les travaux de White aux USA sur la croissance indéfinie de racines de tomates en milieu liquide, contenant les sels minéraux, un extrait de levure et du sucre.

Dès 1934 Gautheret, obtient à partir de prélèvement de tissus cambiaux de saule (tissu méristématique) en introduisant des auxines dans le milieu, des proliférations de tissu qui malheureusement ne dépassèrent pas huit mois.

En 1939, Nobecourt et White aux USA, publient leurs premiers résultats sur la culture indéfinie de tissu, respectivement sur la carotte et le tabac.

En 1944, Skoog et ses collaborateurs, travaillant sur le tabac, mettent à profit les techniques de culture *in vitro* pour tenter d'analyser le phénomène du bourgeonnement.

Une nouvelle étape, très importante a été la guérison de plantes atteintes de maladies à virus, à l'aide de culture *in vitro* de méristème. En 1949, les travaux de Limasset et Cornueten démontrent l'absence de particules virales dans les méristèmes d'apex de tabac virosé.

Morel et Martin, en 1951 mirent à profit ces observations et entreprirent de mettre en culture *in vitro* des méristèmes de Dahlia et de pomme de terre atteints des maladies à virus, à partir de ces méristèmes, ils obtinrent *in vitro* des plantes entières qui furent remise en culture normale et se révélèrent saines au contrôle.

En 1952, Gautheret, Nobecourt et White développent une technique universellement employée actuellement pour assainir toutes sortes de plantes virosées.

En 1957, Torrey réussit à suivre au microscope, l'évolution de cellules isolées de tissus de pois, mises en culture à proximité d'un tissu "nourricier".

En 1958, Stewart et Reinert obtiennent des embryons somatiques de carottes à partir de culture de racines et mettent ainsi en évidence le principe de totipotence cellulaire énoncé par Haberlandt en 1906.

En 1962, Murashige et Skoog mettent au point pour des cultures de tissus de tabac le fameux milieu de culture MS utilisé largement en culture *in vitro*.

En 1964, Guha et Maheshwar, en Inde, obtiennent des plantes haploïdes de *Datura innoxia*, à partir de culture d'anthères.

En 1971, Take be et col au Japon réussissent à régénérer des plantes entières de *Nicotiana tabacum* à partir de protoplastes.

En 1972, Carlson obtient le premier hybride somatique interspécifique par fusion de protoplaste entre différentes espèces de tabac. La même année Sharp obtient des plantes haploïdes de tomates par culture de pollen isolé.

En 1975, Pandey utilise du pollen irradié de tabac pour réaliser des croisements interspécifiques.

En 1976, San Noeum dans le laboratoire du Pr. Demarly à Orsay, réussissent la première culture d'ovaires d'orge non fécondés. Cette même année, Seibert réussit à initier des pousses d'œillets à partir d'apex conservés à -196°C, c'est le début de la cryoconservation pouvant être utilisée pour la constitution de banque de gènes.

En 1983, Van Montagu et ses collaborateurs, créent en Belgique les premières plantes transgéniques transformées par *Agrobacterium tumefaciens*. Il s'agit d'un plant de tabac résistant à la kanamycine.

II. 2. 2. Fondements

Les fondements de la micropropagation reposent sur un concept appelé totipotence cellulaire. Ce concept est défini comme suit : « Toute cellule végétale vivante, quelle que soit sa spécialisation, du moment qu'elle est vivante et possède un noyau, est capable de reproduire la plante entière d'où elle provient (Augé et *al.*, 1989). Autrement dit la totipotence des cellules végétales est l'aptitude des cellules à se diviser puis à se différencier de nouveau en fonction des conditions expérimentales (Larpent-Gourgaut et Sanglier, 1992).

C'est à cette remarquable capacité de la cellule végétale que la culture *in vitro* doit toute son extension, et peut-on dire son pouvoir. A cause de cela, tout individu du règne végétal peut ou pourra être cultivés *in vitro*, il n'y a pas d'exception. Cependant cela ne veut pas dire que le développement actuelle des milieux de culture et les connaissances que l'on peut avoir du comportement de différentes espèces sur ces milieux de cultures, permettent de réaliser immédiatement et sans problème la culture *in vitro* de toutes les plantes existant sur la terre (Augé et *al.*, 1989).

A. La différenciation

Comme toutes cellules eucaryotes, la cellule végétale se divise pour donner deux cellules identiques par mitose. Les cellules méristématiques (cellules souches) se divisent très rapidement et les cellules filles issues de la mitose se spécialisent pour remplir une fonction précise au sein de l'organisme, c'est le processus de différenciation cellulaires (Lydie, 2014).

B. La dédifférenciation

Il est bien évident que le passage d'un état différencié à l'état de cellules méristématiques proliférantes, ne se fait pas, sans que des modifications profonde n'apparaissent dans la structure de la cellule, c'est modifications ramènent la cellule adulte à l'état juvénile, capable de s'orienté vers la formation de n'importe qu'elle organe.

Pour expliquer le mécanisme de dédifférenciation cellulaire a mentionné des travaux très importants de Buvat en 1944 sur le parenchyme médullaire de tabac, on voit dans ce cas des grandes cellules perdre leurs vacuoles, leur noyau se diviser activement, et de nombreuses cellules méristématiques apparaissent.

Suivant la composition de milieux de culture, ces cellules dédifférenciées continueront à proliférer pour ainsi dire à l'infini, elles deviennent parfois capables de poursuivre leur prolifération même en l'absence de substances stimulantes, telle que les auxines et les cytokinines (Augé et *al.*, 1989).

C. La totipotence

La théorie de la totipotence énoncée en 1902 par Haberlandt qui mentionne que toute cellule végétale est capable de régénérer un autre individu identique à celui dont elle est issue.

Un tissu ou une cellule dédifférencié peut évoluer dans toute sorte de direction cela manifeste la totipotentialité de la cellule végétale.

La totipotence est une dédifférenciation expérimentale qui peut être déclenchée par des traumatismes de l'action des phytohormones, ou par leur suppression (Dymarly et Sibi, 1996).

II.3. Les voies de la micropropagation

La micropropagation *in vitro* des plantes peut emprunter deux principales voies (fig.4) :

La première utilisant des tissus méristématiques, est capable de donner suite à un développement normal d'individu. Cette voie permet d'obtenir des plantes dites conformes, identiques à la plante mère, puisqu'elle part de méristème préexistant, dans lesquelles les cellules sont génétiquement très stables (Saadi, 1991 ; Amato, 1977 in Boxus, 1995).

La plante est généralement obtenue en deux étapes successives : la production des tiges et leurs enracinements. Le microbouturage et la culture de méristèmes sont deux procédés de multiplication qui appartiennent à cette voie.

Le seconde, emploie tous les tissus différenciés (fragments de tiges, de pétiole, de feuille, d'embryons matures ou immatures, d'hypocotyles, etc.) pour aboutir soit à l'organogenèse (néoformation de bourgeons ou de racines) soit la formation d'embryons somatiques (structures ressemblant aux embryons zygotiques). Cette voie qui induit la néoformation de bourgeons ou d'embryons somatiques est souvent source de viabilité génétique donc de propagation non conforme (Zryd, 1988 ; Margara, 1989).

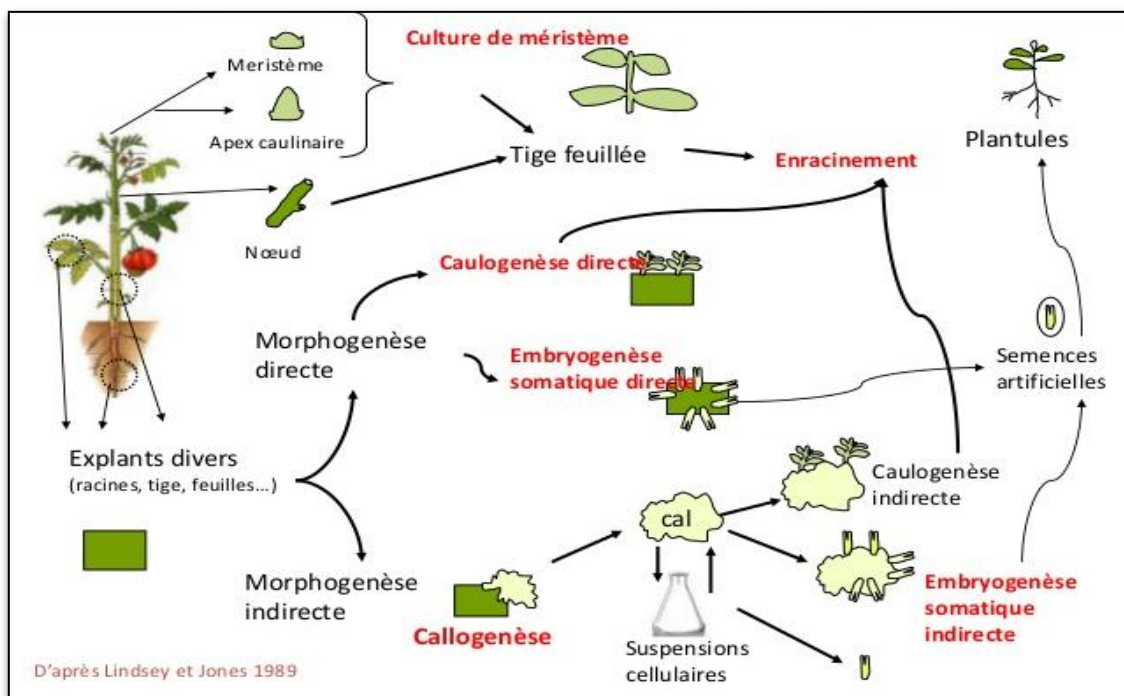


Figure 4 : Les principales méthodes de la micropropagation (Lindsey et Jones, 1989).

II.3.1. La propagation conforme

La micropropagation conforme consiste à multiplier des végétaux au laboratoire à partir d'organes, ou de tissus extrêmement petits, qui sont pourvus de méristèmes préétablis (nœuds, apex et méristème). Cette technique, très développée ces dernières années, est utilisée pour régénérer des populations génétiquement identiques (constitution de clones) (Augé *et al.*, 1989).

A. Microbouturage

Le microbouturage figure parmi les techniques de base, de la culture *in vitro*, les plus développées. Il permet à partir d'un matériel de départ souvent très restreint pondéralement, d'obtenir en un temps relativement court et dans un espace réduit, un rythme de multiplication extrêmement élevé et donc la formation rapide d'un clone. C'est une technique qui peut être programmée et appliquée indépendamment des saisons (Haicour, 2004).

Le microbouturage est un mode de multiplication conforme qui accélère le fonctionnement normal des bourgeons formés sur une plante (Montes, 2009).

La prolifération des méristèmes préexistants, peut être réalisée en utilisant trois types d'explants : méristème, apex et/ou nœuds (Goncalves et Romano, 2012). Ils sont cultivées pour régénérer des pousses multiples sans passer par une phase cal (Pati et *al.*, 2006).

B. Culture de méristème

C'est une autre voie de multiplication conforme des plantes. Elle permet, en partant d'explants de méristèmes d'obtenir des plantes saines indemnes de maladies (virus, bactéries, etc.). Cette découverte fut pressentie au début des années 1950 par deux chercheurs de l'Inra (P. Limasset et P. Cornuet) et confirmée par les travaux de deux autres chercheurs de l'Inra (G. Morel et C. Martin) qui aboutirent, après trois années de travail, à la régénération d'une plante saine (un dahlia) à partir de méristèmes d'une plante contaminée par trois virus (Zryd, 1988).

Les méristèmes employés, sont de minuscules massifs cellulaires indifférenciés que l'on rencontre à la pointe d'une racine ou d'une tige ou rameau, formés de petites cellules qui se divisent activement pendant la mitose. L'avantage est que les cellules de méristème sont indemnes de virus même chez un plant malade, ce qui permet d'obtenir une population de plantes saines (Tap et Novello, 2005).

La culture de méristèmes a ainsi été utilisée avec succès pour l'assainissement de nombreuses plantes, telles que la pomme de terre, la canne à sucre, la tomate, le manioc, etc.

II.3.2. La propagation par organogenèse ou embryogenèse somatique

A. L'organogenèse

L'organogenèse est la base fondamentale de la multiplication végétative *in vitro*, laquelle s'appuie toujours sur la néoformation de méristèmes (Margara, 1989). Elle est souvent obtenue en trois phases distinctes : la callogenèse, la caulogenèse et la rhizogenèse.

La callogenèse correspond à la fois à la reprise des divisions cellulaires (mitose) et à l'amorce de la différenciation aboutissant à la production d'un tissu relativement homogène et organisé qu'est le cal (Margara, 1989). Quant à la caulogenèse, elle désigne à la fois l'initiation et le développement des terminaux, bourgeons adventifs ou néoformés sur un cal ou directement sur le cal initial (Margara, 1989 ; Boxus, 1995). Pour la rhizogenèse, elle désigne la néoformation et la croissance de racines (Margara, 1989).

La néoformation des bourgeons adventifs est souvent la voie de régénération *in vitro* la plus importante pour la réussite des interventions basées sur la biotechnologie des plantes. Les cellules sont amenées à devenir dédifférenciées par les régulateurs de croissance (notamment en contrôlant le rapport entre les cytokinines et les auxines (Montes, 2009 ; Duclercq et *al.*, 2011).

Sous l'influence des substances de croissance et plus particulièrement des cytokinines, il peut soit y avoir la formation d'un bourgeon néoformé directement à partir de cellule de l'explant initial (ceci est un événement rare), soit les cellules de l'explant initial se divisent rapidement et forme un cal primaire qui peut donner des bourgeons néoformés. Ensuite, les pousses données par les bourgeons sont transférées dans un milieu contenant de l'auxine pour l'enracinement (Montes, 2009).

B. L'embryogenèse somatique

L'embryogenèse somatique est la voie de développement par laquelle les cellules somatiques des explants développent des structures qui ressemblent aux embryons zygotiques (Zryd, 1988 ; Jimnez, 2001).

Ces embryons peuvent se développer en plantes entières sans subir le processus de la fécondation sexuelle. L'embryogenèse somatique peut être lancée directement à partir des explants ou indirectement par la mise en place des cals (Altaf et *al.*, 2012).

Le principe de cette technique est de produire, généralement en milieu liquide ou solide, des embryons somatiques en grandes quantités, de les stabiliser à un stade déterminé afin qu'ils puissent supporter des durées de stockage compactables, avec une utilisation en agriculture à grande échelle, puis d'enrober ces embryons de manière à assurer leur protection et leur nutrition, c'est-à-dire simuler le rôle de la graine. Une fois semées, ces structures artificielles germeraient comme des graines naturelles (Scriban, 1999).

II.4. Autres voies de la culture *in vitro*

II.4.1. La culture de protoplaste

Le terme de protoplaste désigne une cellule végétale débarrassée de sa paroi squelettique ; elle apparaît alors sous forme d'une cellule sphérique, limitée par sa membrane plasmique (Zryd, 1988).

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 (Demarly et Sibi, 1996).

Les premiers protoplastes ont été obtenus, vers la fin du 19^{ème} siècle, en hachant des fragments végétaux dans une solution hypertonique de saccharose. Les protoplastes sont isolés le plus souvent à partir de feuilles, mais peuvent aussi être obtenus à partir de cals et suspension cellulaires ou d'autres organes végétaux (tige, racine, fleur, etc.)(Robert et *al.*, 1998).

Les exigences nutritionnelles des protoplastes nécessitent une composition minérale adaptée, notamment pour le calcium qui joue un rôle important par son influence sur les divisions (Karp et *al.*, 1982).

Les protoplastes peuvent être utilisées à des fins diverses comme : la mutagenèse, la fusion de protoplastes, la transformation génétique, production de métabolites secondaires et l'haplodiploïdisation (Zryd, 1988).

Actuellement, la culture de protoplaste est appliquée à plusieurs plantes comme la pomme de terre, le datura, la tomate, etc. (Sihachakr, 2002).

II.4.2. La variation somaclonale

Larkin et Scowcroft, (1981) ont montré, à l'issue d'un travail de recherche, qu'il pouvait être très intéressant d'exploiter la variabilité génétique induite par certaines cultures *in vitro*, dans le but de création variétale. Ils s'appuyaient sur quelques exemples modèles comme celui de la pomme de terre et de la canne à sucre, où ils ont contribué à faire adopter le terme de variation somaclonale, désignant toute variation génétique induite par le seul fait de cultiver des tissus, des cellules, ou des organes qui ont pour objectif l'établissement de cellules dédifférenciées, sous des conditions de cultures *in vitro* définies (Wenzel, 1994).

Donc, 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 (Nowbuth et *al.*, 2005).

II.4.3. La production des plantes haploïdes

Les cultures *in vitro* offrent une nouvelle possibilité d'obtenir immédiatement des plantes strictement homozygotes (lignées pures). Elle consiste à mettre en culture des cellules haploïdes mâles ou femelles capables de régénérer des plantes à génome haploïde. Ces plantes, grâce à l'emploi de la colchicine retrouvent l'état diploïde (plantes à $2n$ chromosomes ou plus).

Cette technique a été expérimentée pour la première fois sur le tabac en cultivant *in vitro* des microspore (à n chromosome) afin de régénérées de plantes haploïdes (Bourgin et *al.*, 1967).

Plusieurs méthodes existent pour produire des plantes haploïdes. Parmi ces méthodes nous pouvons citer le croisement interspécifique ou intergénérique, qui implique le phénomène de l'élimination chromosomique (Thom, 1992 ; Pickering et Devaux, 1992).

L'androgenèse *in vitro* impliquant la culture des anthères ou des microspores (gamètes mâles) (Ziauddin et *al.*, 1992). Aussi la gynogenèse *in vitro* dans laquelle on emploie la culture d'ovaires non fécondés de sacs embryonnaires et des gamètes femelles (Prakash et Giles, 1987).

Cette technique représente un grand intérêt pour l'amélioration des plantes, elle permet d'accélérer les cycles de sélection et l'obtention des lignés pures qui sont produites en quelques mois.

II.5. Les avantages et les inconvénients de la micropropagation

II.5.1. Les avantages

Les avantages que peut procurer la micropropagation sont nombreux. Nous pouvons en citer quelques uns comme :

- l'obtention d'un grand nombre de plantes (un bourgeon de rosier par exemple, peut produire entre 200 000 et 400 000 descendants en une année contre 40 pieds produits par les méthodes classiques).
- Acquisition d'une très grande vitesse de multiplication, et de propagation de plante identique à la plante de départ surtout pour les espèces à multiplication naturelle lente (Augé et *al.*, 1989).
- Avec cette technique on peut programmer les cultures tout au long de l'année (Augé et *al.*, 1989).
- La possibilité de la conservation de ressources végétales, faire une banque de génotypes et réaliser ainsi des plantations hors la période de croissance (Le et *al.*, 2002).
- L'amélioration des conditions sanitaires par les techniques de cultures *in vitro*, souvent associées à l'éradication des viroses (Sibi, 1981).
- La propagation végétative des espèces qui ne présentent pas ces capacités en conditions classiques (Sibi, 1981).
- L'obtention de plantes saines, indemnes de maladies.
- L'intérêt économique : coût d'entretien du pied mère moins important, durée de récolte courte.

II.5.2. Les inconvénients

- l'asepsie des explants : la présence de micro-organismes, bactéries, champignons, virus, qui, s'ils ne sont pas totalement éliminés, contaminent la culture et tuent les jeunes plantules.
- L'acclimatation : la phase d'acclimatation est l'un des facteurs limitant de la culture *in vitro*. Au cours de cette étape le taux de mortalité des plantes issue de conditions *in vitro* peut être élevé (Abdoulaye et Robin, 2010).
- L'apparition d'anomalies génétiques (certains cas d'hyperfloraison, perte de sexualité chez certaines espèces, apparition d'organes anormaux) : c'est la variation somaclonale.
- Le problème de vitrification (anomalie physiologique) qui peut affecter les plants régénérés.
- La production répétée de grands nombres de plants uniformes (clones) peut entraîner la perte des gènes nécessaires, par exemple, à la résistance aux maladies nouvelles.

II.6. Les facteurs influençant la régénération *in vitro* des plantes

Les facteurs influents sur la régénéralité *in vitro* des plantes peuvent être schématiquement répartis en deux groupes. Le premier représente les facteurs internes (ceux liés à la plante) telle que la nature et l'âge physiologique de la plante mère, sur laquelle l'explant a été prélevé. La seconde réunit les différents facteurs externes, qui englobent la composition de milieu et les conditions de cultures.

II.6.1. Effet de l'explant

II.6.1.1. L'âge physiologique

Généralement en culture *in vitro*, on favorise l'emploi des explants jeunes (embryons immatures, jeunes feuilles, méristèmes, etc.), car c'est l'état juvénile qui semble offrir le plus de possibilités de régénération (Saadi, 1991). Ce genre de tissu est qualifié de compétent à cause de ses bonnes performances ou aptitudes pour se régénérer.

II.6.1.2. L'époque de prélèvement

Ce problème se pose surtout pour les espèces vivaces, on peut distinguer un stade de vie active et un stade de vie ralentie de la plante, ce qui conduit les explants à développer des réactions différentes en culture *in vitro*, cette différence peu être expliquée par la modification des équilibres internes des régulateurs de croissances lors des différentes saisons (Augé et *al.*, 1989).

II.6.2. Effet de milieu de culture

Avec le développement des cultures des tissus, divers milieux de base comprenant des sels inorganiques, des composés organiques (sucres, vitamines et régulateurs de croissance) ont été progressivement utilisés. Dans 70 % des cas, des milieux de culture de base de type Murashige et skoog (MS) ont été utilisés.

II.6.2.1. Les éléments minéraux

A. Les macroéléments

Il s'agit de 6 éléments présents à des concentrations élevées tels que l'azote (N), le calcium (Ca), le potassium (K), le soufre (S), le magnésium (Mg), et le phosphore (p), ils sont absorbés sous forme d'ions (Margara ,1989).

B. Les microéléments

Appelés aussi oligo-éléments, et bien qu'ils ne soient nécessaires à la plante qu'en faibles concentrations, leur rôle est essentiel. Les principaux d'entre eux sont le fer (Fe), le cuivre (Cu), le zinc (Zn), le manganèse (Mn), le molybdène (Mo), le bore (B) et le chlore (Cl), le cobalt (Co), le nickel (Ni), etc...(Augé, 1992).

II.6.2.2. Les éléments organiques

A. Le saccharose

Pour la culture *in vitro*, le saccharose constitue une source d'énergie car la plante n'est pas encore arrivée à satisfaire ses besoins énergétiques, on peut dans un cas particulier utiliser d'autres sources, tels, le galactose et le lactose (Teoule, 1999).

B. Les vitamines

En culture *in vitro* certaines vitamines sont favorables aux croissances des tissus, parmi les principales, citons : la thiamine, l'acide nicotinique, la pyridoxine, leurs concentrations sont fréquemment de l'ordre de 1mg/L (Teoule, 1999).

II.6.3. Les conditions de culture

II.6.3.1. La lumière et la photopériode

La lumière est un facteur déterminant pour la culture *in vitro* des plantes. Elle agit par sa qualité et aussi par sa quantité (intensité et photopériode).

La photopériode semble avoir le plus d'effet sur les cultures *in vitro*, particulièrement sur la croissance et le développement des plantes régénérées, des cals, etc. (Hussey et Stacey, 1981). De façon générale, le début de croissance nécessite une faible intensité lumineuse (500 à 1000 lux) avec 12 à 16 heures de photopériodes (Bommeneni et Jauhar, 2003). Lorsqu'il s'agit de préparer la plantule au repotage en serre, il apparaît souvent préférable d'augmenter l'intensité de l'éclairage (par exemple 10000 lux) (Margara, 1989).

II.6.3.2. La température

La température est un paramètre très important pouvant influencer fortement le processus de croissance et de développement des plantes cultivées *in vitro*. Généralement, elle est souvent réglée dans la plus part du temps entre 22 et 25° C (Margara, 1989).

II.6.4. Les régulateurs de croissances

Chez les végétaux les processus de croissances et le développement sont contrôlés par des substances synthétisés par le végétal et efficace à faible dose.

Dans ce chapitre, nous nous sommes limités à citer brièvement uniquement trois grandes classes de régulateurs de croissances qui sont bien connues : les auxines, les cytokinines et les gibbérellines

A. Les auxines

Les auxines sont les premières hormones végétales à avoir été découvertes. Elles sont synthétisées dans les apex caulinaires et racinaires et transportées dans l'axe de la plante.

Leur principale caractéristique est de provoquer l'élongation cellulaire. Elles sont aussi impliquées dans la régulation de la différenciation cellulaire. A titre d'exemple, l'induction de la différenciation des vaisseaux dans les tiges est placée sous le contrôle de l'auxine produite dans les jeunes feuilles. Elles provoquent également la formation des racines adventives sur les tiges (William, 2003). Les auxines sont aussi impliquées dans la différenciation et l'induction de racines en culture *in vitro* (Augé et *al.*, 1989).

B. Les cytokinines

Les cytokinines ont été originellement découvertes dans les années 1950 par Carlos Miller, il est connu par leur capacité à promouvoir la division cellulaire. Depuis, de nombreuses études ont montré que les cytokinines sont impliquées dans divers processus cellulaires, la germination, le fonctionnement des méristèmes apical et racinaire (To et Kieber, 2008).

La balance hormonale entre les auxines et les cytokinines est une des principales clés de qui conditionne la réussite d'une culture donnée. L'orientation du programme morphogénétique (aller vers la production d'une organogénèse et/ou d'une embryogénèse somatique), des tissus ou des cellules mises en culture et repose en grande partie, sur le rapport auxine/cytokinine du milieu de culture testé, comme l'indique le schéma (fig. 5).



Figure 5 : Effet de la balance hormonale sur l'orientation de l'organogénèse au cours de la micropropagation (Augé et *al.*, 1989)

C. Les gibbérellines

Cette classe de phytohormones a été découverte en 1938 lors de l'isolement d'un champignon pathogène, *Gibberella fujikuroi*, qui provoque sur des plants de riz, une élongation de la tige conduisant à la verse des cultures. Les gibbérellines sont des diterpènes (molécules à 20 carbones), formées à partir de l'isoprène. Il existe plus de cent gibbérellines désignées par GAn, ou ont pouvant varier de 1 à 130 environ. Elles ont toutes un noyau commun qui est le noyau gibbane (C₁₅H₂₄) (Hopkins, 2003).

Les gibbérellines ont une action sur la croissance des tiges (et non des racines contrairement à l'auxine), des fruits comme le fait l'auxine, mais aussi pour des espèces (pommes, pêches, raisins) pour lesquelles l'auxine n'a pas d'action. Elles ont une influence sur la levée ou interruption de la dormance (la dormance étant la période pendant laquelle la végétation est au repos) et s'opposent donc aux effets de l'acide abscissique ; elles interviennent également sur l'initiation de la floraison et le débourrement des bourgeons (Hopkins, 2003).

La synthèse de ces molécules est effectuée dans des sites divers mais toujours dans des lieux de division active (à l'apex de tiges et de racines). Leur migration est polarisée. Elle se déroule dans le xylème et dans le phloème, toujours liée à des sucres (Hopkins, 2003).

La présente étude a été menée dans le laboratoire de biotechnologie végétale de l'université Hassiba Benbouali de Chlef au cours de la période Janvier-Mai 2016.

III.1. Matériel végétal

III.1.1. Préparation du matériel végétal

La plante *Carthamus caeruleus* L, pousse à l'état sauvage dans plusieurs régions d'Algérie. Les échantillons de plantes ayant fait l'objet de la présente étude, ont été récoltés de la région de Traghnia-Ténès (wilaya de Chlef) (fig.6).



Figure 6 : l'aspect du *Carthamus caeruleus* L au terrain (1), au laboratoire (2) et la localisation de la région de récolte par photo satellite (3) (Latitude : 36.514934 | Longitude : 1.526413) (Google Earth, 2016).

III.1.2. Prélèvement et stérilisation du matériel végétale

Des jeunes plantes entières (avec les racines) de *Carthamus caeruleus L* ont été récoltées, durant les mois de Février - Mars 2016, de la région précédemment indiquée, puis mises dans des sachets en papier afin d'éviter leurs flétrissement. Une fois au laboratoire, une partie de matériel végétal est utilisée pour lancer nos manipulations.

Le reste des plantes sont transplantées dans des pots en plastique, contenant un mélange (sable + terre) pour poursuivre leur développement et serviront pour les manipulations antérieures (fig.6 : 2).

La stérilisation des boutures a été effectuée avant la dissection. Elle est réalisée en procédant d'abord à un lavage préliminaire, du matériel végétal, avec de l'eau courante du robinet, additionnée de quelques gouttes du savon liquide (ISIS), afin d'éliminer la poussière et les différentes impuretés qui s'y collent au végétal (fig.7 : (1)). Puis, sous la hotte stérile à flux lumineuse, les boutures feuillées sont trempées, pendant 5 à 10 minutes, dans une solution contenant de l'eau distillée stérile, un savon liquide (MilMil) additionné d'antibiotiques et de quelques gouttes de Tween 20 (fig.7 : (2)). Plusieurs rinçage à l'eau distillée stérile suivent cette opération. Les boutures obtenues sont ensuite trempées dans une solution d'alcool (éthanol à 70 °) pendant 30 seconde (fig.7 : (3)). Un dernier rinçage des boutures est effectué dans une solution de chlorure mercurique à 0.1 % pendant 1 minute. Après plusieurs rinçages à l'eau distillée stérile pour éliminer toute trace du chlorure mercurique, les boutures sont prêtes pour la dissection et la mise en culture (fig.7 : (4)).



Figure 7 : les étapes de la stérilisation du matériel végétale.

III.2. Présentation des techniques de culture

III.2.1. Choix de milieu de culture

Un milieu de culture est une solution aqueuse comprenant des sels minéraux, des éléments organiques et éventuellement des phytohormones ou régulateurs de croissance.

Le milieu de culture le plus utilisé est celui de Murashige et Skoog (MS), (1962) enrichi des hormones de croissance (Annexe 1).

III.2.1.1. Préparation du milieu de culture MS

Pour préparer 1L de milieu de culture, on prélève les volumes suivants des solutions mères de composants MS :

- 100 ml de macroéléments (×10).
- 20 ml de microéléments (× 50).
- 20 ml de Fer EDTA (Annexe 2) (× 50).
- 10 ml de vitamines (×100).
- 7 g d'agar agar.
- 30 g de saccharose.

Un à la fois, les composés (macro-micro-fer-vitamines) mis dans un bécher de 1L, on ajoute l'eau distillée jusqu'au volume désiré, puis on ajuste le pH à 5,8. Ensuite, on procède à l'ajout du sucre et de l'agar et on chauffe jusqu'à ébullition.

III.2.1.2. Les substances hormonales employées

Dans nos manipulations, deux types d'hormones de croissance ont été testés :

- Les auxines : Acide α -Naphthalène Acétique (ANA), Acide 2,4 Dichloro-phénoxyacétique (2.4.D).
- Les cytokinines : 6 - benzyladénine (BA), kinétine (KN).

III.2.2. Techniques de cultures utilisées

III.2.2.1. Voie de multiplication par microbouturage

Les apex, utilisées lors de cet essai, ont été prélevés directement de plantes spontanées (sauvage) qui ont été déterrées et transplantées dans des pots en plastique contenant un

mélange de sable ($\frac{1}{2}$) et de terre ($\frac{1}{2}$). Ces plantes, régulièrement arrosées à l'eau du robinet, sont maintenues dans un endroit éclairé du laboratoire (fig.6 : 2).

Les plantes que nous venons de décrire, ne servent pas uniquement à prélever les apex mais aussi les segments de tiges (particulièrement les nœuds) avec leurs bourgeons axillaires.

A. Développement des apex

Les apex (de 0,5 à 1 cm de long) précédemment stérilisées, sont disposés verticalement à la surface des milieux nutritifs, à côté d'une flamme de bec Bunsen, contenus dans des tubes à essais renfermant environ 15 ml de milieu (fig.7).

Lors de cette étude, nos milieux sont enrichis en deux cytokinines à savoir : la Kinétine (6-furfuryl-aminopurine) (KN) et la BA (6 - benzyladénine), apportées dans nos milieux de culture, seules et à différentes doses : 0,1- 0,5 - 1- 2 et 4 mg/L.

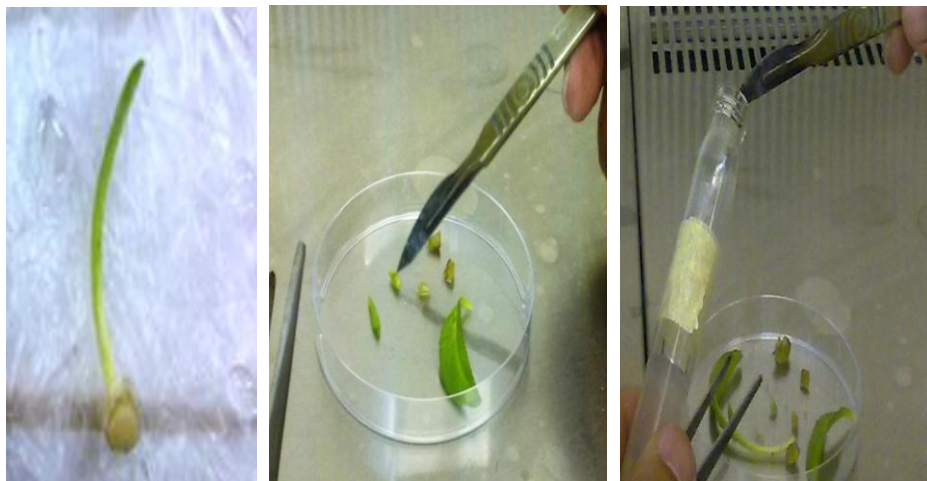


Figure 8 : Aspect d'un apex et leur ensemencement.

B. Développement des microboutures (segments de nœuds)

C'est au niveau des nœuds des tiges, que nous procédons à la section des petites boutures (d'environ 0,5 cm de long). Chaque petite bouture représente en fait un seul bourgeon axillaire (fig.8). Une fois sectionnées, les nœuds sont mis en culture dans des tubes à essais contenant 15 ml de milieu de culture.

Lors de cette étude, les milieux ayant servi au débourrement des nœuds ne contenaient que de la Kinétine à 1 mg/L.



Figure 9 : Aspect d'un segment du nœud et leur ensemencement.

C. Phase d'enracinement des tiges régénérées

Pour l'induction des racines, le milieu de base est le même que celui ayant servi utilisé au développement des apex et des nœuds. Seule la composition hormonale du milieu a changé.

Deux milieux MS d'enracinement sont utilisés : un sans hormone et l'autre contenant de l'ANA (acide α -naphtalène acétique) à 0,1 mg/L.

III.2.2.2. Voie de multiplication par organogénèse

A. Phase d'induction de la callogenèse

Les feuilles et les pétioles provenant de plantes adultes qui précédemment stérilisées sont découpées en petits fragments de 0,5 de longueur. Les petites portions de feuilles et des pétioles sont ensemencés dans des boîtes de Pétri, renfermant le milieu de base et les régulateurs de croissance, à raison de 4-5 fragments par boîte (fig.9).

Une fois la mise en culture réalisée, les boîtes de Pétri sont scellées avec le parafilm, et chaque boîte porte des indications relatives à la date de la mise en culture, le nom de l'espèce et la concentration des régulateurs de croissance, dans nos expérience en utilisés des auxines et des cytokinines. Ils sont apportés en combinaison à différentes concentrations dans les milieux de culture. Les auxines utilisées sont : l'acide α -naphtalène acétique (ANA) et 2,4-Dichlorophenoxyacetic acide (2,4-D). Les cytokinines sont représentées par la 6-benzyladénine (BA) (voir tableau 3 et 4).



Figure 10 : Les étapes d'ensemencement des boutures servent à l'organogénèse. (1) : Dissection des fragments des feuilles, (2) : leur ensemencement, (3) : Dissection des fragments des pétioles, (4) : leur ensemencement.

B. Phase d'induction de la caulogénèse et/ou de la rhizogénèse

Pour l'induction des tiges ou des racines, le milieu de base est le même que celui utilisé pour le microbuturage. Seule la composition hormonale du milieu a changé qui comprend une seule concentration d'auxine : ANA (acide α -naphtalène acétique) à 0,1 mg/L. On a réalisé aussi des traitements sans hormones.

Tableau 3 : Composition hormonale des milieux de culture employés en organogenèse (ANA/ BA).

ANA mg/L \ BA mg/L	0	0.1	0.5	1	2	4
0	0	0	0.5	1	2	4
0.1	0.1	0.1/0.1	0.1/0.5	0.1/1	0.1/2	0.1/4
0.5	0.5	0.5/0.1	0.5/0.5	0.5/1	0.5/2	0.5/4
1	1	1/0.1	1/0.5	1/1	1/2	1/4
2	2	2/0.1	2/0.5	2/1	2/2	2/4
4	4	4/0.1	4/0.5	4/1	4/2	4/4

Tableau 4 : Composition hormonale des milieux de culture employés en organogenèse (2,4-D / BA).

2,4-D mg/L \ BAP mg/L	0.1	0.5	1
0.1	0.1/0.1	0.1/0.5	0.1/1
0.5	0.5/0.1	0.5/0.5	0.5/1
1	1/0.1	1/0.5	1/1

III.3. Conditions de culture

- Avant toute manipulation, on se lave les mains avec du savon suivi de l'alcool à 70°. On prépare la hotte par stérilisation et la mise en marche de la ventilation. On prépare tout le nécessaire et on laisse la hotte fonctionner pendant 20 minutes avant de commencer l'ensemencement des explants.

- Avant la stérilisation des milieux de culture, leur pH est ajusté à 5,8 à l'aide d'une solution de NaOH (1N) et de HCL (1N), puis solidifié par 7g/L d'agar agar.
- Après la préparation des milieux de culture, il est réparti dans des tubes à essai puis stérilisé dans l'autoclavage à une température de 120°C pendant 20 minutes et sous une pression de 2 bar.
- Après stérilisation, les milieux sont répartis dans des boîtes de Pétri (90 mm de Ø) à raison de 20 ml par boîte. Puis les boîtes sont scellées par du parafilm.
- Les tubes et les boîtes de Pétriensemencés sont déposés dans une salle de culture, dans des conditions environnementales où la photopériode est de 16/8 et la température de 23±2°C.

III.4. Suivi des cultures et expression des résultats

Le microbouturage et la callogenèse des microboutures ensemencées, sont suivies périodiquement : Après 3, 6, 9 et 21 jours (pour le microbouturage), ce qui permet de calculer : Le nombre moyen des tiges par explant, le nombre moyen des feuilles par tige, la taille moyenne des pousses (cm), le taux de reprise(%) (Pour les apex) et le taux de débourrement (%) (Pour les segments de nœuds) et après 10, 20 et 30 jours (pour l'induction des cals), ce qui permet de calculer la callogenèse (%) pour les feuilles et pour les pétioles.

La présente étude s'inscrit dans le cadre d'un projet de recherche, la préservation et la valorisation de quelques espèces végétales, Algériennes spontanées à intérêt médicinal. C'est une première contribution qui ambitionne de régénérer *in vitro* l'espèce *Carthamus caeruleus L.*, une espèce très prisée en médecine traditionnelle Algérienne pour soigner les brûlures cutanées. Deux modes de multiplication seront recherchés à savoir : le microbouturage et l'organogénèse.

IV.1. Voie de multiplication par microbouturage

Par microbouturage, nous désignons la technique de multiplication végétative (voie asexuée), qui consiste à prélever des explants (fragments) d'une plante et à les cultiver dans des flacons stériles en verre, pour régénérer plusieurs individus. Les individus obtenus sont génétiquement identiques à la plante dont ils sont issus (individus conformes à la plante-mère).

Dans ce travail, la partie microbouturage a été conduite en se servant de deux types d'explants à savoir : les pousses terminales (apex) et les segments de nœuds (pourvus de bourgeons axillaires). Ces explants sont tous récoltés à partir de plantes spontanées (sauvage) qui ont été récoltés sur terrain puis transplantés dans des pots contenant un mélange de sable ($\frac{1}{2}$) et de terre ($\frac{1}{2}$) (voir chapitre matériel et méthode).

Les facteurs qui influencent le microbouturage sont très nombreux. Dans cette étude, nous nous sommes limités, à tester l'effet d'un seul facteur, connu pour son influence sur le microbouturage, qu'est la composition hormonale des milieux de culture. Pour cela, deux cytokinines : la 6-benzyladénine (BA) et de la Kinétine (6-furfuryl-aminopurine) (KN), ont été retenues afin d'évaluer leurs effets sur le taux de reprise des apex et le taux de débourrement des bourgeons axillaires ainsi que l'élongation des pousses régénérées.

IV.1.1. Développement des apex

Dans la plupart des milieux testés, les apex connaissent une reprise de croissance dès le 2^{ème} jour suivant l'ensemencement. Dès le 3^{ème} jour, les jeunes feuilles qui étaient, au moment de l'ensemencement, presque sous formes d'ébauches, commencent par s'allonger et croissent rapidement (fig.11 et fig.13). Au cours de cette croissance, on assiste d'abord à une augmentation de taille des jeunes feuilles qui dure jusqu'à une dizaine de jour puis sera suivie par un allongement de la tige principale.

Les résultats du tableau 5, montrent que les taux de reprise des apex varient selon la nature et la concentration des cytokinines employées. C'est avec la kinétine, appliquée à 1 mg/L, que les meilleurs taux de reprises ont été obtenus (100 %). Avec la BA ces taux ont atteint dans les meilleurs des cas les 80 %. Par ailleurs, nous constatons que l'application de doses inférieures ou supérieures à 1 mg/L de Kinétine, ont un effet négatif sur la reprise de croissance des apex.

De même pour l'élongation des pousses, la KN favorise mieux ce processus physiologique comparativement à la BA. En effet, l'emploi de 1 mg/L de KN a permis d'obtenir, après 21 jours de culture, une moyenne de croissance ou d'élongation de 2,01 cm contre 1,86 cm avec la BA (fig.12 et fig.13 : (A/B)).

La bonne performance de la Kinétine, apportée à 1 ml/L, ne s'est pas traduite uniquement sur le taux de reprise des apex ou sur l'élongation, mais aussi sur le nombre moyen de pousses produites par apex. C'est au niveau du nombre moyen de pousses produites par apex où nous avons noté de différences notables entre les deux cytokinines. Généralement, les meilleurs rendements ont atteint les 6 tiges par apex, en présence de 1 mg/L de KN contre 4,6 tiges par apex avec la BA (tableau 5).

On note par ailleurs, qu'en présence de kinétine, même la densité des feuilles paraissent plus importante qu'avec la BA.

L'effet favorable des cytokinines sur la stimulation de la croissance et le développement des apex et des bourgeons axillaires est très connu, puisqu'elles causent souvent la levée de dormances des bourgeons apicaux ou axillaires (Jouanneau, 1975 ; Zryd, 1988 ; Margara, 1989).

Aussi, l'efficacité de la KN ou de la BA sur le microbouturage des espèces appartenant au genre *Carthamus* est rapportée par plusieurs auteurs. A ce titre, nous pouvons citer les travaux de Sujatha et Dinesh Kumar, (2007) sur l'espèce *Carthamus tinctorius* et plusieurs autres espèces où la BA, contrairement à nos résultats, s'est montrée plus efficace que la KN.

Notons par ailleurs, que le développement des apex n'a été possible que sur les milieux pourvus de cytokinines. Dans les milieux qui en étaient dépourvus aucune croissance ou développement ne se sont manifestés.

Tableau 5 : Taux de reprise et élongation des pousses régénérées à partir d'apex de *Carthamus caeruleus L.* obtenus, après 21 jours de culture en fonction de plusieurs concentrations de KN et BA.

KN (mg/L)	BA (mg/L)	Nombre moyen de tiges/explant	Nombre moyen de feuilles /tige	Taux de reprise (%)
0	-	0	0	00
0.1	-	3.6	10.4	80
0.5	-	5.2	11.5	80
1	-	6	14.8	100
2	-	4.6	9.4	60
4	-	2.6	3.8	40
-	0	0	0	00
-	0.1	3	3.6	80
-	0.5	3.2	4.2	40
-	1	4.6	7.25	80
-	2	4.4	6.8	80
-	4	3.2	3.75	40

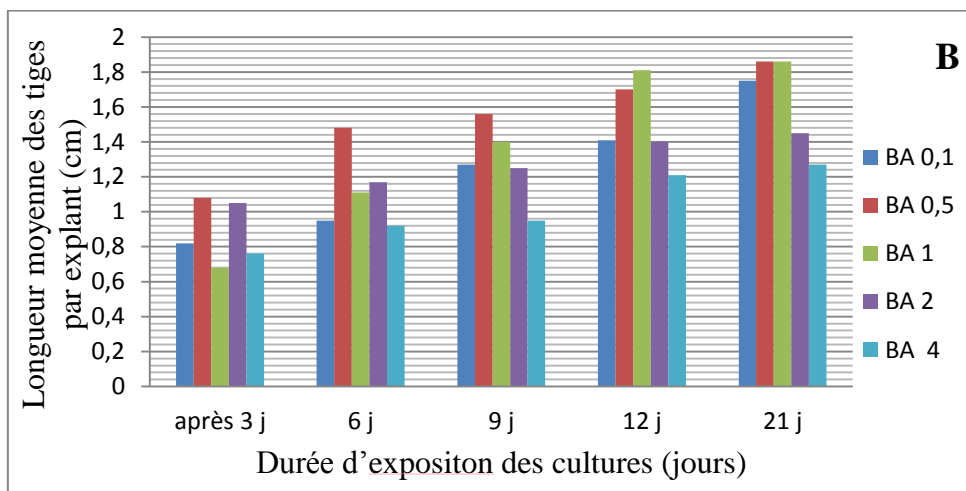
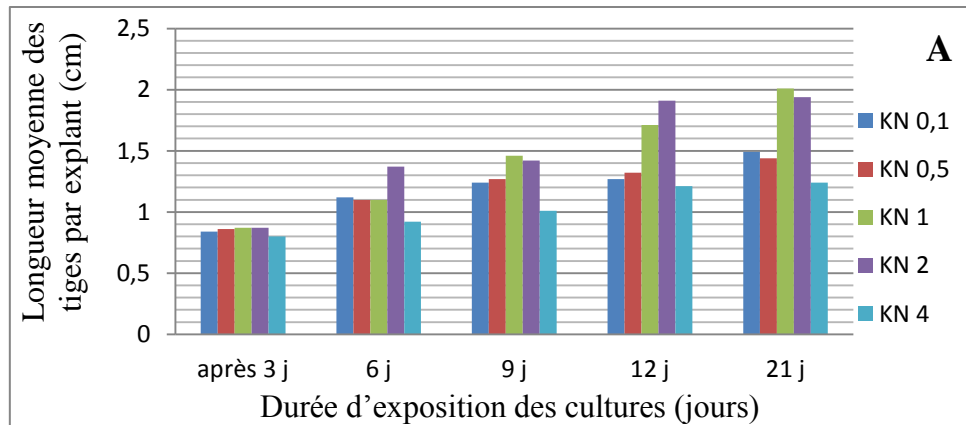


Figure 11 : Cinétique de croissance des tiges obtenues à partir d'apex, en fonction des concentrations de KN (A) et BA (B) et du temps.

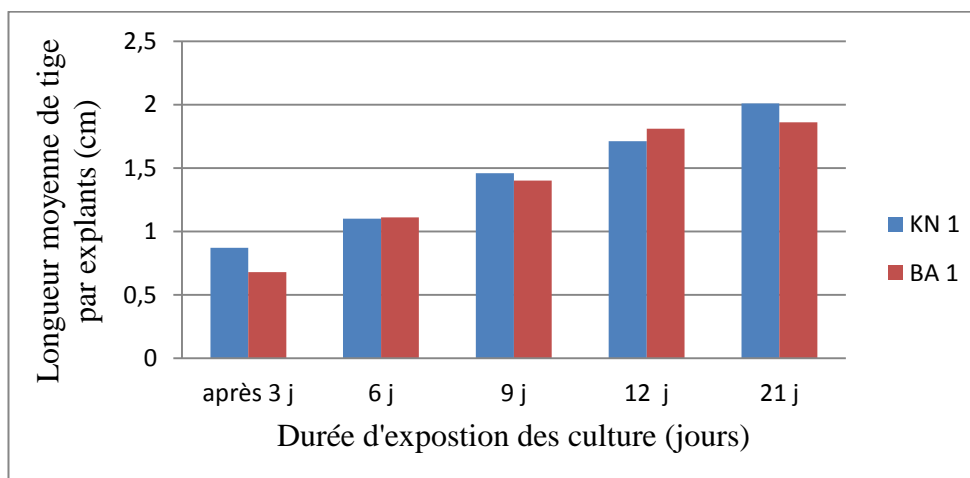


Figure 12 : Cinétique de croissance des tiges, obtenues à partir d'apex, sur les milieux contenant 1mg/L de KN et de BA en fonction du temps.

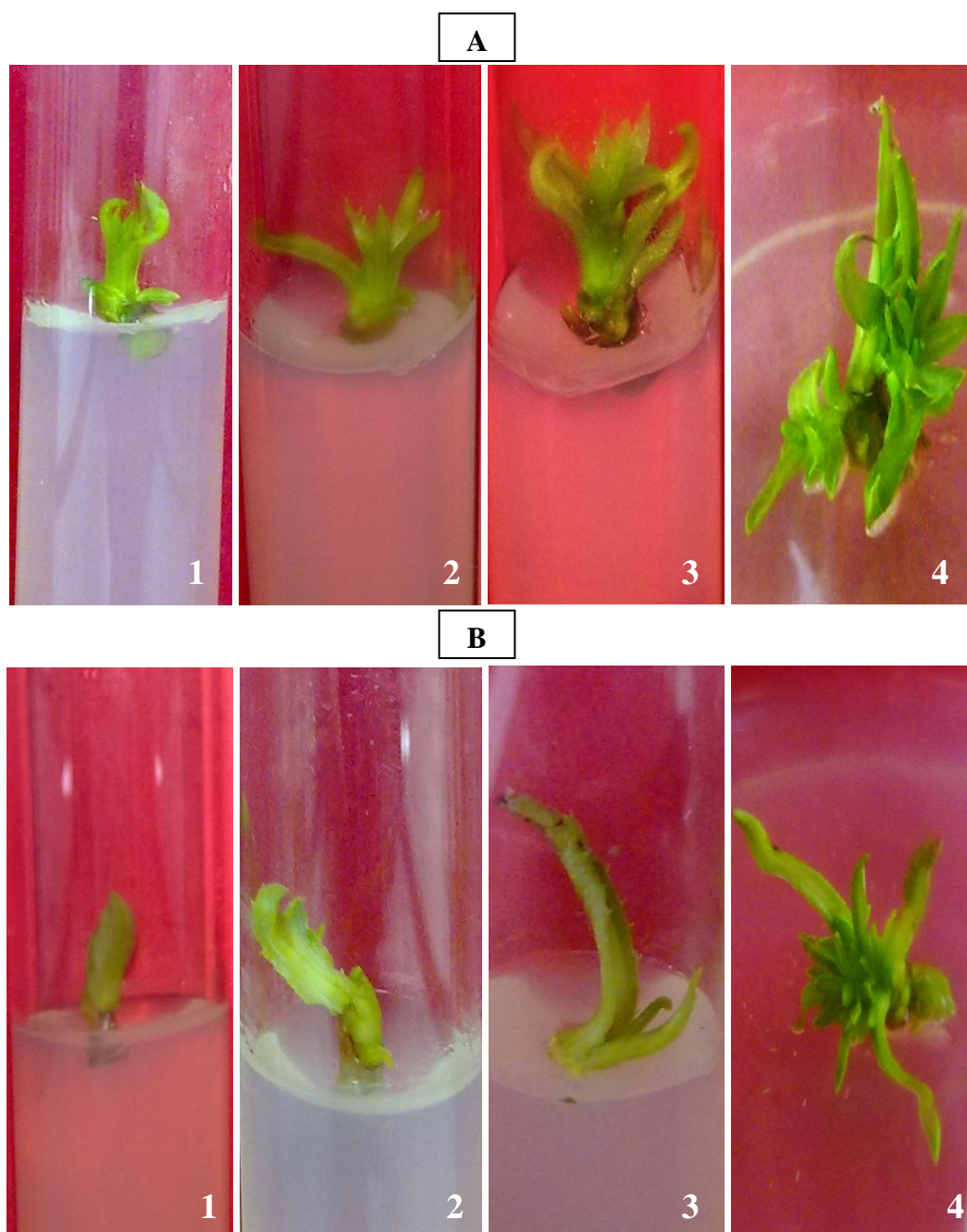


Figure 13 : L'effet de la KN (A) et la BA (B), apportée chacune à 1 mg/L, sur la reprise de croissance des apex, après 3 (1), 6 (2), 9 (3) et 21 jours (4).

IV.1.2. Développement des microboutures (segments de nœuds)

Deux principaux paramètres ont été quantifiés lors de cette étude : le taux de débourrement des bourgeons axillaires (contenus dans les segments de nœuds) et l'élongation des pousses (ou tige) régénérées.

Le débourrement est défini comme étant le moment où les bourgeons axillaires des microboutures (ou segments de nœuds) ensemencées se développent pour laisser apparaître leur bourre (c'est-à-dire le duvet, les primordiaux foliaires et les ébauches florales enfouies dans les bourgeons).

Quant à l'élongation, nous désignons la croissance des pousses qui démarrent juste après la phase de débourrement des bourgeons. Généralement, la phase de débourrement commence après une semaine de culture. La phase de développement des pousses végétatives feuillées (croissance ou élongation) s'installe elle au bout de la 3^{ème} semaine. Le taux de débourrement (qui représente le nombre de microboutures ayant débourrés par rapport au nombre total de microbouture mis en culture), ainsi que le développement des pousses feuillées restent tributaire de la composition hormonale des milieux de culture utilisés.

A cause du manque de matériel végétal, dont nous disposions au niveau du laboratoire, nous étions contraintes de limiter nos expériences, cette fois ci, en testant uniquement l'effet d'une seule cytokinines, la kinétine, sur le taux de débourrement et l'élongation des pousses. C'est en tenant compte de ses bonnes performances avec les apex, que cette hormone a été retenue et employée à 1mg/L.

Les résultats que nous avons obtenu, concernant le taux de débourrement étaient très favorables. Des taux de l'ordre 100 % ont été atteints après seulement 3 à 4 jours d'exposition sur milieu de débourrement (tableau 6).

Le suivi des cultures révèle aussi que le milieu à kinétine, est très efficace à la fois pour le débourrement et pour l'élongation des tiges (tableau 6) (fig. 14).

En effet, après seulement 15 jours de culture, le nombre moyen de tiges (pousses) régénérées par explant était de 1,2. La taille moyenne de ces tiges a pu atteindre les 2,56 cm, avec chacune une densité de feuilles moyenne de 11,6 par tige (tableau 6).

Nous avons constaté, lors de cet essai, que le rythme de développement des pousses peut diminuer avec le temps, à cause de l'épuisement des nutriments des milieux de culture. A ce moment, le transfert des pousses sur des milieux frais de même composition (kinétine à 1 mg/L), s'est avéré indispensable et semble stimuler davantage le développement des pousses régénérées.

Comme avec les apex, l'influence de cytokinines à la fois sur le débourrement des bourgeons axillaires et aussi sur l'élongation des pousses est très favorable. Elle agit sur la levée de dormance des bourgeons axillaires en stimulant la division cellulaire des méristèmes (Zryd, 1988 ; Margara, 1989).

Dans certains cas (l'exemple de l'olivier), pour obtenir de jeunes pousses à partir de bourgeons axillaires, deux étapes successives de culture sont nécessaires : un premier milieu pour le débourrement (composé d'un mélange auxine/cytokinine) puis un second pour l'élongation (contenant des cytokinines seule) (Yakoub-Bougdal et *al.*, 2003). Ça n'a pas été notre cas, puisque un même milieu a servi à la fois et pour le débourrement et pour l'élongation des pousses.

L'optimisation de certains paramètres comme l'augmentation du nombre de tiges par explant est très recherché en microbouturage. Dans le cas de l'espèce *Carthamus tinctorius*, il est possible de microbouturer la plante avec grand succès, en utilisant comme explant des nœuds cotylédonnaires au lieu de bourgeons axillaires de tige (George et Rao, 1982 ; Sujatha et Dinesh Kumar, 2007).

Les performances de la KN ou de la BA sur le microbouturage des espèces appartenant au genre *Carthamus* est rapportée par plusieurs auteurs (Orlikowska et Dyer, 1993; Sujatha et Dinesh Kumar, 2007).

Notons par ailleurs, que le développement des microboutures (segments de nœuds) n'a été possible que sur les milieux pourvus de cytokinines. Dans les milieux qui en étaient dépourvus aucune croissance ou développement ne se sont manifestés.

Tableau 6: Taux de débourrement et l'élongation des pousses de *Carthamus caeruleus L* obtenus, après 15 jours de culture, sur milieu contenant 1 mg/L de kinétine.

KN (mg/L)	Taux de débourrement (%)	Nombre moyen de tiges/explant	Taille moyenne des pousses (cm)	Nombre moyen de feuilles /tige
1	100	1,2	2,56	11,6

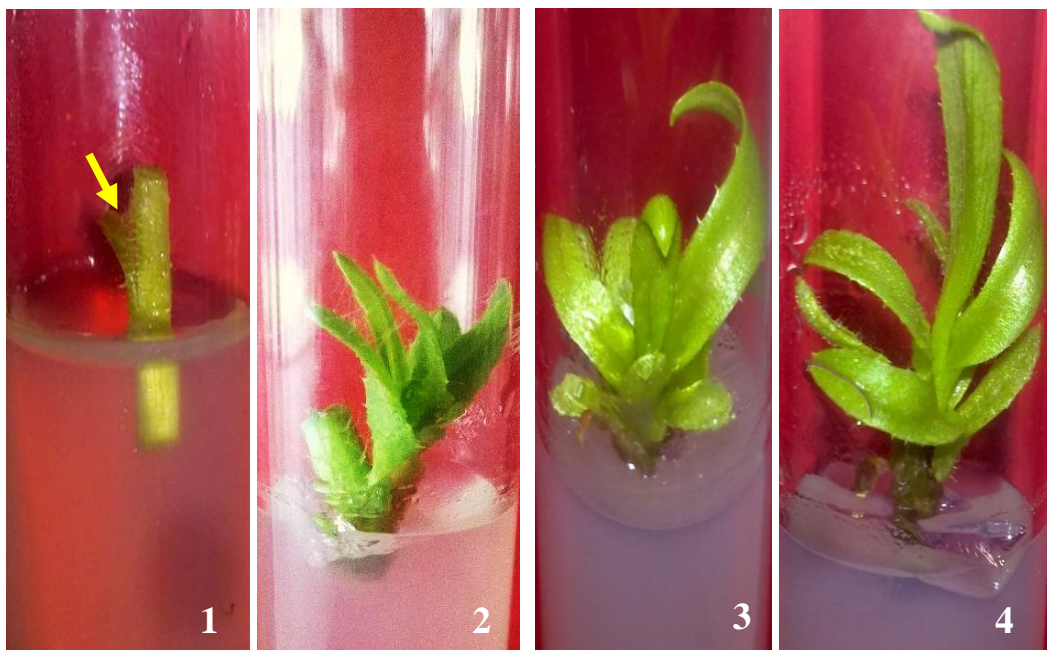


Figure 14 : L'aspect des pousses végétatives régénérées après : 1 (1), 3 (2), 10 (3) et 15 jours (4), sur un milieu à 1 mg/L de KN.

IV.1.3. Phase d'enracinement des tiges régénérées

Pour réussir un bon microbouturage, il ne suffit pas de remporter (ou maîtriser) la première phase qui consiste à régénérer des pousses végétatives à partir d'apex et de segments de nœuds. Mais il faut parvenir aussi et surtout à enraciner ces tiges afin d'obtenir des plantes entières capables d'être cultivées.

Pour réaliser cette phase, nous avons effectué des transferts des pousses végétatives (âgées de 4 semaines) régénérées à partir d'apex et de segments de nœuds, sur des milieux dits d'enracinement. Dans cette partie, compte tenu du manque de matériel végétal disponible, nous étions contraint de nous limiter à tester uniquement deux milieux MS d'enracinement : un sans hormone et l'autre contenant de l'ANA à 0,1 mg/L. Le choix de l'ANA a été fait sur la base des informations recueillies de la bibliographie. Ainsi, de nombreux auteurs rapportent l'efficacité de l'ANA quant à l'induction et au développement des racines (Zryd, 1988 ; Margara, 1989). Deux principales observations sont à relever après avoir effectué les transferts des pousses.

- La première concerne, le transfert des pousses (quelle que soit leur provenance) sur des milieux sans hormone ne conduit à aucune rhizogenèse. Les bases des tiges brunissent et ne produisent ni racines ni cals. On note cependant que les pousses végétatives continuent leur élongation et demeurent toujours chlorophylliennes (fig. 15 : (A et B)).
- La seconde concerne le transfert des pousses (quelle que soit leur provenance) sur des milieux contenant de l'ANA ne conduit à aucune rhizogenèse. C'est plutôt la callogenèse qui se déclenche au niveau de la base des pousses à partir de la troisième semaine (fig.15 : (C et D)). Les pousses demeurent cependant vivantes et parfois continuent sa croissance.

La non réussite de la phase d'enracinement au cours de cette étude peut être attribué en grande partie au nombre très insignifiant de milieu d'enracinement, que nous avons expérimenté.

Aussi, le manque de matériel végétal d'une part et le non disponibilité de moyens, matériels, produits chimiques et autres étaient en grande partie derrière cet échec. On ne peut malheureusement pas tirer de conclusion sur cet aspect qui reste à dégrossir.

Les auxines souvent utilisées par les auteurs pour induire l'enracinement des pousses régénérées *in vitro* chez un bon nombre d'espèces, appartenant au genre *Carthamus* sont : l'ANA ; AIB ; AIA (Orlikowska et Dyer, 1993; Mandal and Dutta; 2001; Sujatha et Dinesh Kumar, 2007).

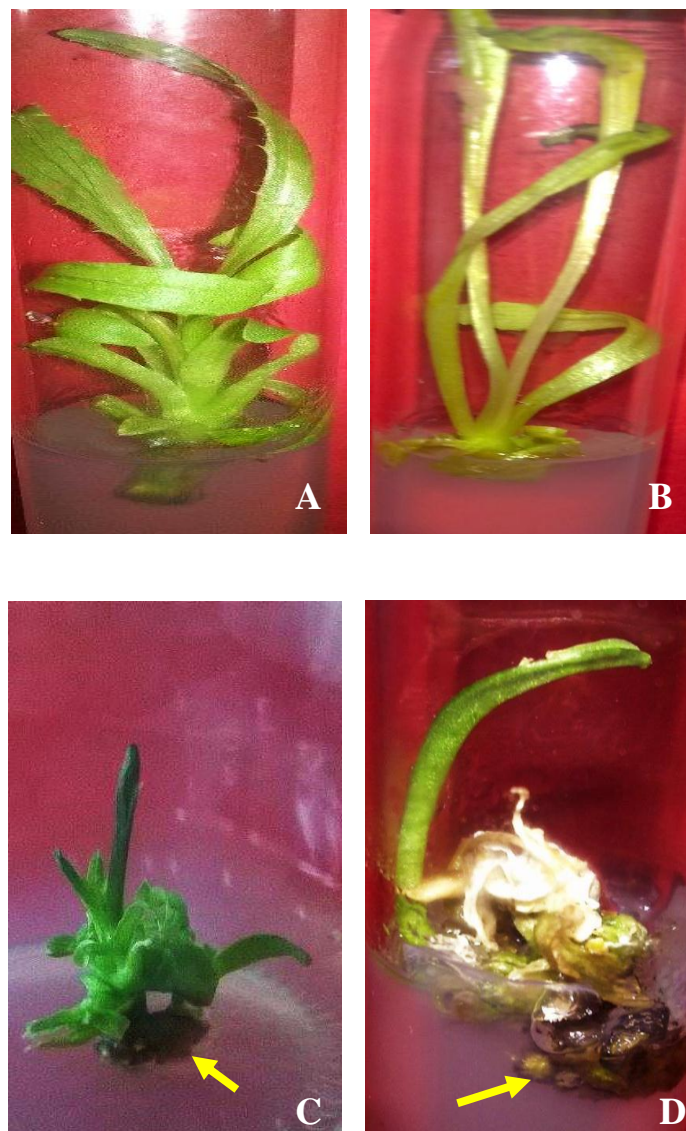


Figure 15 : Aspect des pousses transférées sur milieu sans hormone (A et B) et des pousses ayant développées des cals (C et D, flèches) sur milieu à ANA 0,1 mg/L.

IV.2. Voie de multiplication par organogénèse

L'organogénèse est une des voies de la micropropagation qui assure une régénération non conforme des plantes. Elle s'appuie toujours sur la néoformation de méristème (Margara, 1989) et se déroule généralement en 3 étapes : la callogénèse, la caulogénèse et la rhizogénèse.

Lors de ce travail, nous envisageons régénérer l'espèce *Carthamus caeruleus* par organogénèse. Deux principaux facteurs, connus pour leurs influences sur l'organogénèse, seront testés à savoir : la composition hormonale (combinaisons ANA* BA et 2,4-D * BA) et la nature de l'explant (feuilles et pétioles) (tableau 7).

IV.2.1. Phase d'induction de la callogénèse

Par callogénèse, nous désignons le processus de formation d'amas de cellules par l'assise génératrice des boutures placées dans les conditions de milieu favorable (Huglin, 1986). C'est un tissu cicatriciel parenchymateux, tendre et succulent qui apparaît principalement à la partie inférieure des boutures, mais également des zones de section des fragments de feuilles et des pétioles.

La callogénèse est quantifiée en déterminant le taux d'explants callogènes.

Le suivi des cultures, nous a permis de relever les constatations suivantes :

- La callogénèse s'est exprimée sur l'ensemble des explants testés et aussi sur un bon nombre de milieux de culture. Quel que soit l'explant, on note que les premières manifestations de la callogénèse se déclenchent, après 8 à 10 jours qui suivent l'ensemencement. Et c'est souvent, au niveau des zones de blessures que les cals prennent naissance (fig.16 : A, B, C et D).
- Les cals sont souvent de coloration blanchâtre et de texture compacte ou friable. Ils peuvent parfois prendre un aspect brunâtre (fig.16: E et F).

- La callogénèse est à la fois influencée par la nature des explants mais aussi par la composition hormonale (tableau 7).
- Les aptitudes à la callogénèse des feuilles sont meilleures que celles des pétioles.
- Les combinaisons faites avec l'ANA induisent facilement la callogène, que ce soit avec les explants de feuilles ou de pétioles.

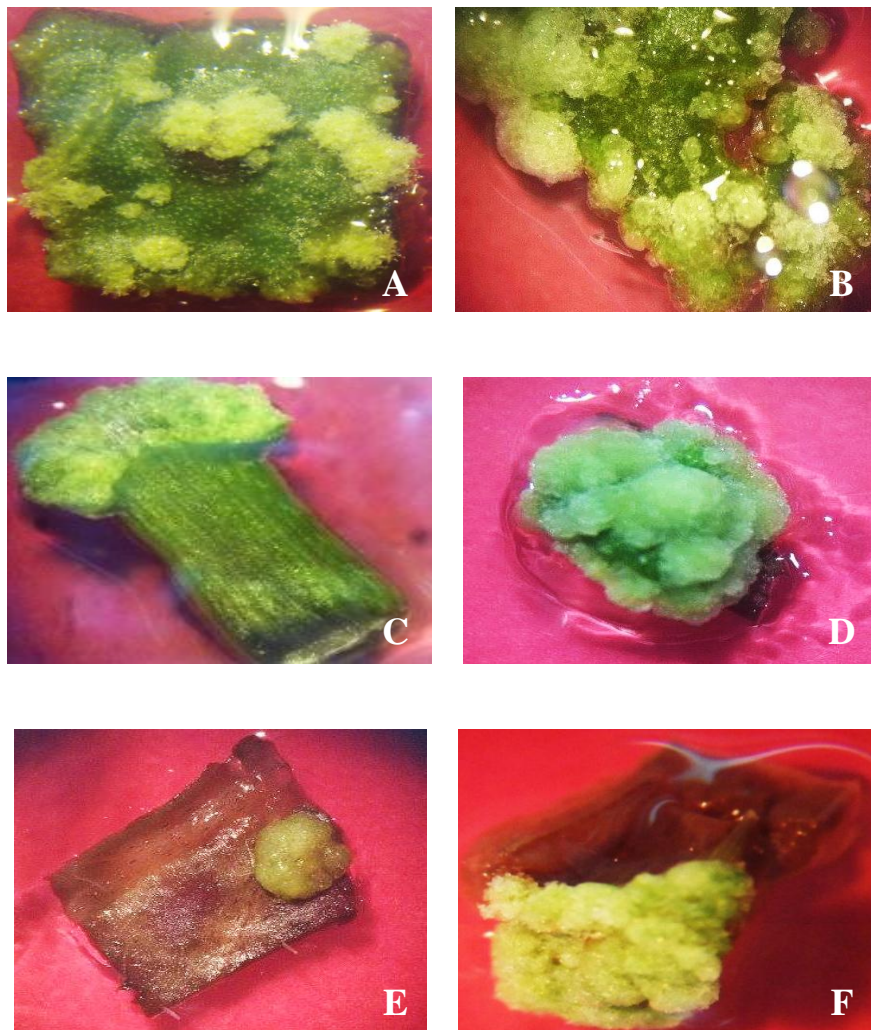


Figure 16 : Induction de la callogénèse sur les fragments des feuilles (A et B) et des pétioles (C et D) et aspect du phénomène du brunissement des calcs formés (E et F).

Les aptitudes à la callogenèse varient en fonction de nombreux paramètres comme la nature et l'âge des explants, la composition hormonale des milieux de culture, la source carbonée, le génotype, etc. (Zryd, 1988 ; Margara., 1989 ; Hopkins, 2003).

Les bonnes potentialités exprimées par les feuilles à l'égard de la callogenèse et même de la caulogenèse sont signalées par de nombreux auteurs ayant travaillé sur une espèce proches de la nôtre comme *Carthamus tinctorius* (Singh, 1991 ; Sujatha et Dinesh Kumar, 2007).

La composition hormonale compte parmi les facteurs les plus influents sur la callogenèse. Ce sont les milieux combinant (cytokinines * auxines) qui favorisent le développement de cals. Les meilleurs taux de callogenèse (100 %) sont obtenus sur les milieux combinant (BA * ANA) et (BA * 2,4-D). Avec les feuilles on trouve les milieux : (0.1 BA * 0.5 ANA), (0.1 BA * 4 ANA), (0.5 BA* 0.5 ANA), (0.5 BA* 1 ANA) et le milieu (0.5 BA*0.5 2,4-D) ; et un taux de 80 % avec les pétioles, surtout dans les milieux (0.5 BA * 4 ANA), (1 BA * 0.1 ANA) et (0.5 BA * 0.1 2,4-D) (tableau 7).

Dans ce travail, nous avons noté aussi que la callogenèse était absente en milieu à cytokinines seules. Plusieurs études conduites sur *Carthamus tinctorius* rapportent les mêmes observations (Orlikowska et Dyer, 1993; Mandal and Dutta; 2001; Sujatha et Dinesh Kumar, 2007). Cela n'est pas toujours le cas puisque certains auteurs signalent avoir réussi la callogenèse à partir de style et stigmate d'oranger en milieu pourvu de BA seule (1 mg/L).

Le processus de la callogenèse est fortement stimulé dans les milieux combinant (auxines * cytokinines) (tableau 7). Les milieux à fortes concentrations en auxines produisent plus de cals quelle que soit la nature et la concentration des cytokinines employées.

Les hormones de croissance de part leur qualité et leur quantité impactent fortement le processus de la callogenèse. Cette réalité est connue depuis longtemps (Zryd, 1988 ; Margara, 1989).

Souvent l'induction de cals nécessite la présence d'auxine. L'adjonction des cytokinines renforce le pouvoir mitogène des auxines et améliore les aptitudes callogènes des explants. Plusieurs études menées sur *Carthamus tinctorius* confirment cela (Orlikowska et Dyer, 1993; Mandal and Dutta; 2001; Sujatha et Dinesh Kumar, 2007). Cependant, le rapport entre ces deux régulateurs de croissance change en fonction de plusieurs paramètres comme l'espèce végétale étudiée, la nature des explants employés, la composition des milieux de base, etc. Sur ce registre, El Yacoubi et *al.*, 2010, signale que le rapport cytokinines / auxines doit être faible, dans le cas du Bigaradier et du Poncirier (1mg/L BA et 2 mg/L 2,4-D) et plus élevé dans le cas du Citrange (5 mg/L BA et 1mg/L 2,4-D).

Tableau 7: Aptitude à la callogenèse des feuilles et des pétioles de l'espèce *Carthamus caeruleus* en fonction de plusieurs combinaisons hormonales auxines/ cytokinines (ANA/ BA) et (2,4-D/BA).

Composition hormonale des milieux mg/L	La callogenèse (%)	
	Les feuilles	Les pétioles
0.1 BA/0.5 ANA	100	40
0.1 BA/1 ANA	40	20
0.1 BA/2 ANA	93.33	53.33
0.1 BA/4 ANA	100	60
0.5 BA/0.1 ANA	70	33.33
0.5 BA/0.5 ANA	100	20
0.5 BA/1 ANA	100	0
0.5 BA/2 ANA	65	50
0.5 BA/4 ANA	80	80
1 BA/0.1 ANA	0	80
1 BA/1 ANA	96	53.75
1 BA/2 ANA	92	48.33
1 BA/4 ANA	93.33	25
0,1 BA/0.1 2,4-D	40	20
0.5 BA/0.1 2,4-D	00	80
0.5 BA/0.5 2,4-D	100	30
0.5 BA/1 2,4-D	60	00
1 BA/0.5 2,4-D	20	00
1 BA/1 2,4-D	50	00

IV.2.2. Phase d'induction de la caulogénèse et/ou de la rhizogénèse

La caulogénèse, désigne la néoformation des bourgeons, soit directement sur les explants soit indirectement sur les calcs produits au cours de la phase d'induction. Quant à la rhizogénèse, elle signifie le processus morphologique qui conduit à la différenciation des racines soit directement sur l'explant soit indirectement sur les calcs produit au cours de la phase d'induction.

Concernant la caulogénèse (néoformation de bourgeons), aucun résultat positif n'a pu être décelé, quel que soit le milieu de culture employé ou le type d'explant utilisé. En effet, aucune néoformation de bourgeons (directe ou indirecte) ne s'est manifestée, que ce soit en maintenant les calcs produits sur leurs milieux d'induction de départ ou en les transférant sur des milieux dépourvus ou contenant uniquement des auxines seules.

Pourtant, d'autres auteurs, ayant utilisé des protocoles expérimentaux très proches du notre, signalent avoir réussi l'obtention d'une caulogénèse directe et même indirecte chez un bon nombre d'espèces appartenant au genre *Carthamus* (Orlikowska et Dyer, 1993; Mandal and Dutta; 2001; Sujatha et Dinesh Kumar, 2007). A titre d'exemple, souvent les auteurs recommandent des milieux MS, renfermant des mélanges (ANA * BA) pour micropropager via l'organogénèse l'espèce *Carthamus tinctorius* (George et Rao, 1982; Sujatha et Dinesh Kumar, 2007).

C'est vrai qu'il existe parfois des génotypes récalcitrants qui répondent très mal à la micropropagation (Zryd, 1988 ; Saadi et Hamdani, 2007) et il se pourrait que notre espèce *Carthamus caeruleus* entre dans ce cas de figure. Mais, d'après les travaux de Sujatha et Dinesh Kumar (2007), les milieux MS combinant ANA avec BA ou KN, peuvent convenir à une très large gamme d'espèce de *Carthamus* puisqu'il a réussi à en régénérer 9 (espèces) via l'organogénèse.

Notons par ailleurs, que les résultats négatifs enregistrés, lors de cette étude, ne peuvent pas être expliqués uniquement par l'effet milieu de culture. Nous estimons, qu'ils sont dans notre cas, dus beaucoup plus aux conditions de culture qui n'étaient pas favorables, surtout au niveau de la chambre de culture. En effet, les températures qui devaient être réglées au alentour de 23 ± 2 °C, étaient pratiquement incontrôlables à cause d'une défaillance de la climatisation.

S'agissant de la rhizogenèse, aucun résultat positif n'a pu être décelé quel que soit le milieu de culture employé ou le type d'explant utilisé. En effet, aucune néoformation de racines (directe ou indirecte) ne s'est manifestée, que ce soit en maintenant les cals produits sur leurs milieux d'induction de départ ou en les transférant sur des milieux dépourvus ou contenant uniquement des auxines seules (fig.17).

En tout les cas cette partie du travail n'avait pas une grande importance puisque l'étape de la caulogénèse qui la précède n'a pas donné des résultats positifs.

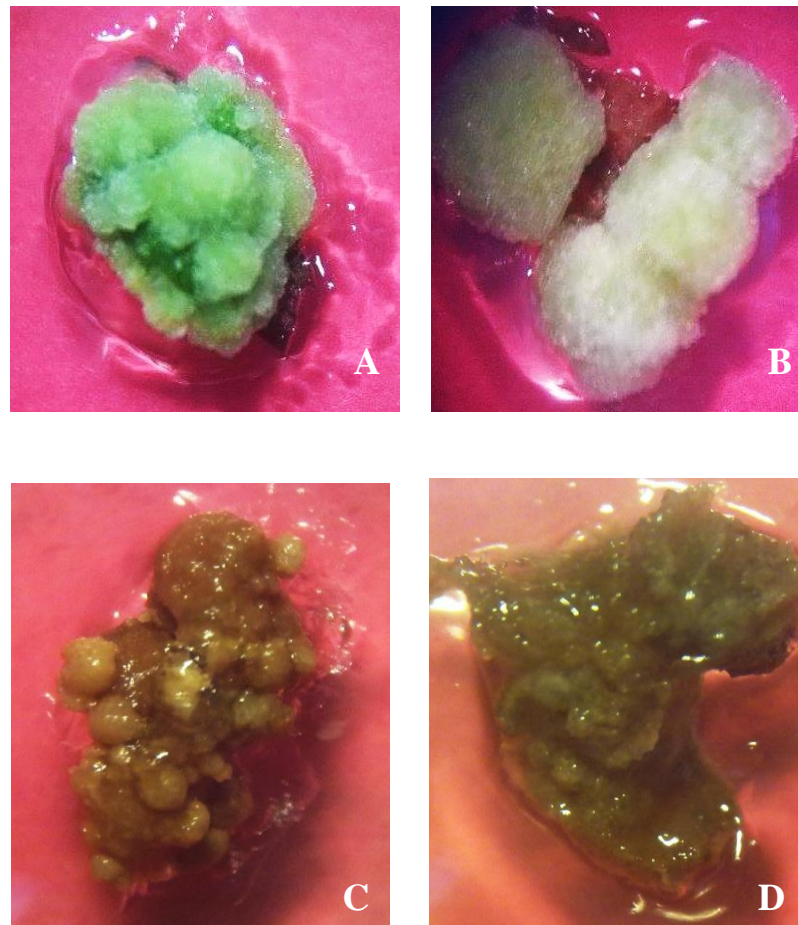


Figure 17 : Aspect des cals produits sur le milieu ANA 0,1 mg/L (A, B) et le phénomène de brunissement des cals obtenu sur un milieu sans hormone (C, D).

Conclusion

L'objectif principal de la présente contribution est de régénérer *in vitro* une plante sauvage qui fait partie de la grande panoplie des plantes médicinales que possède le pays. La plante en question est *Carthamus caeruleus L*, une espèce spontanée très utilisée en médecine traditionnelle Algérienne pour soigner les brûlures.

Deux principales voies de micropropagation ont été testées : le microbouturage (multiplication conforme) et l'organogenèse (multiplication non conforme).

Concernant le microbouturage, deux types d'explants ont été testés : les apex de tiges et les segments de nœuds. Tous les deux ont donné des résultats probants.

Pour la phase de reprise de croissance des apex et de débourrement des bourgeons axillaires et d'élongation des pousses végétatives, la composition hormonale des milieux s'est montrée déterminante. C'est l'adjonction de la KN seule dans le milieu, aux doses de 1 mg/L, que les meilleurs taux de reprise (pour les apex) et taux de débourrement des bourgeons (pour les segments de nœuds) chez *Carthamus caeruleus L* ont été obtenus. De même pour l'élongation des tiges, c'est toujours la KN appliquée à 1 mg/L, qui fournit les meilleurs scores (2,01 cm avec les apex et 2,56 cm avec les segments de nœuds). Aussi, avec la même cytokinine, le nombre moyen de tige par explant (jusqu'à 6 tiges par bouture) s'est vu nettement amélioré.

Pour la phase d'enracinement, elle s'est montrée difficile à réaliser dans les conditions de culture (particulièrement la composante hormonale) que nous avons choisies et qui semblent être inefficaces. Sur les milieux dits d'enracinement, s'est plutôt la callogenèse qui s'est déclenché au niveau de la base des tiges transférées au lieu des racines. On note par ailleurs que les mauvaises conditions de culture (défaillance de la climatisation dans les chambres de culture et de la photopériode) dans lesquelles nous avons mené ce présent travail ont aussi contribué à cet échec.

S'agissant de l'organogenèse, les meilleurs résultats obtenus sont ceux liés à la callogenèse. Nous avons relevé que les fragments de feuilles présentent de bonnes aptitudes callogènes comparativement aux explants de tiges.

L'induction de la callogenèse se trouve fortement stimulée lorsque les cytokinines sont combinées aux auxines. L'emploi de cytokinine seule dans le milieu est sans effet sur ce processus morphogénétique. Les meilleurs taux de callogenèse (100 %) sont obtenus avec les mélanges (ANA * BA).

Pour la caulogenèse et la rhizogenèse, aucun résultat n'a été décelé quel que soit l'explant ou le milieu de culture, utilisés. Les cals transférées sur des milieux à 0,1 mg/L d'ANA ou milieux sans hormone, n'induisent aucune néoformation de bourgeons (de racines ou de tiges). Souvent les cals brunissent et finissent par mourir.

En guise de conclusion, nous pouvons dire que la non réussite de la phase de l'organogenèse chez l'espèce *Carthamus caeruleus L* peut être attribuée à plusieurs facteurs. A côté de la composition hormonale des milieux qui peut être très déterminante, l'effet de la nature des explants et du génotype ont aussi leur part d'influence sur l'organogenèse. Il est probable que les facteurs que nous avons choisis, lors de cette étude ne conviennent pas pour induire une organogenèse. Moduler tous ces facteurs dans des travaux futurs peut conduire à des résultats probants.

Notons par ailleurs, que les résultats négatifs enregistrés, lors de cette étude, ne peuvent pas être expliqués uniquement par l'effet milieu de culture ou de la nature des explants. Nous estimons qu'ils sont dans notre cas, dus beaucoup plus aux conditions de culture qui n'étaient pas favorables, surtout au niveau de la chambre de culture. En effet, les températures qui devaient être réglées aux alentours de 23 ± 2 °C étaient pratiquement incontrôlables à cause d'une défaillance de la climatisation.

Références bibliographiques

A

- Abdoulaye D., Robin D., 2010. La Grande Muraille Verte: Capitalisation des recherches et valorisation des savoirs locaux. Ed : IRD, p 140-141.
- Altaf H., Iqbal A., Hummera N., Ikram U., 2012. Plant tissu culture : Currentstatus and oppportunities, In Annarita L., Laura M., Recentadvences plant *in vitro* culture. Ed : In Tech.
- Alvaro S., 2013. Biotechnologie végétale et éthique, faculté d'agriculture, université de Perugia (Italie).
- Amato F., 1977. *Nuclear cytology in relation to development*. Cambridge university Press. Cambridge.
- Anonyme., 2003. Age physiologique et préparation des semences. Ministère de l'Agriculture, des Pêches et de l'Aquaculture : www.gnb.ca.
- APG., 2009.« An update of the AngiospermPhylogeny Group classification for the orders and families of flowering plants: APG III », *Botanical Journal of the Linnean Society*, vol. 161, n° 2, p 105.
- Augé R., Beauchesne G., Boccon-Gibod J., Decourtye L., Digat B., Jalouzot R., Minier R., Morand J-Cl., Reynoird J P.,Strullu D G., 1989. La culture in vitro et ses application horticoles, Ed : Lavoisier, p225.
- Augé D., 1992. La culture in vitro et ses applications horticoles, 3ème édition. Technique et Documentation, Lavoisier, Paris, 225p.

B

- Balmey M., Grey-Wilson C., 2000. Toutes les fleurs de méditerranées : Les fleurs, les graminées, les arbres et les arbustes. Ed : Delachaux et Niestlé SA. Paris, p 458-459.
- Barkely T M., Brouillet L., Strother JL. 2006. « Flora of NorthAmerica – Asteraceae ». Oxford University Press, New York. 19.
- Bellakhdar J. 1997. « La Pharmacopée Marocaine Traditionnelle: Médecine arabe ancienne et savoirs populaires ». Saint –Etienne. Ed :IbisPress.

Références bibliographiques

- Bhojwani S. 1990. Handbook of plant cell culture. Techniques and applications. Ed : Scientia Horticulturae, P 347-348.
- Bommeneni UR., Jauhar P P., 2003. Regeneration of plant through isolated scirtelum culture of durum .Wheat .plant sci , p116, 197.
- Boullard B., 2001. Plantes médicinales du monde (Réalités et croyances), ESTEM, ISBNB 2 84371 1177, p 515-516.
- Bourgin N JP ., Nitsch JP., 1967. Obtention de NicotianaS haploïdes à partir d'étamines cultivées in vitro. Ann PhysiolVeg;9:377-82.
- Boxus P., 1995. Multiplication végétative : Micropropagation et embryogèse somatique in biotechnologie végétales. BV 93. Ed : Cned. Aupelf- Uref, p191.

D

- Diallo M., 2005. Etude de la phytochimie et l'activité biologique de la poudre de feuilles *Syzigiumguineense*wild. (Myrtaceae). Thèse de pharmacie. Univ de Bamako.
- Dymarly Y., Sibi M ., 1996. Amélioration des plantes et biotechnologie. Ed : John LibbeyEurotext. Paris, p99-111.

e

- El Yacoubi H., Zidane L., Douira A., Rochdi A. 2010. Effets de deux phytohormones et de l'hydrolysate de caséine sur la callogenèse de trois portes greffes d'agrumes bull. soc. Pharm. Bordeaux vol. 149, p 7-16.

F

- Ferry M., Bouguedoura N., El Hadrami I., 1998. Patrimoine génétique et techniques de propagation *in vitro* pour le développement de la culture de palmier dattier. Numéro spécial oasis. Sécheresse, 9(2) : 139-146.

G

- Gasper T., Vanlhoof., 1976. Application d'un test peroxydasique dans le choix des plantes d'asperge à propager *in vitro*. Revue agriculture, p583.
- George, L., Rao, P.S. 1982. In vitro multiplication of safflower (*Carthamus tinctorius L.*) through tissue culture. - Proc. Indian nat. Sci. Acad. 48: 791-794.
- Goncalves S., Romano A., 2012. *in vitro* culture of lavanders (*Lavandllaspp*) and the production of secondary metabolites, *biotechnol Adv.*

H

- Haicour R., 2004. Multiplications des plantes herbacées *in vitro*. Biotechnologie végétale. Technique de laboratoire. Ed : Tec et Doc, Paris.
- Hamadi F., Boudif K., Gougam H., Djouab A., Allane T., Benmounah A., Benamara S., 2014. Caractérisation d'une préparation semi-solide traditionnelle et anti-brûlure utilisée dans certaines régions d'Algérie.
- Hopkins W G., 2003. Physiologie Végétale. Traduction de la 2^e édition américaine par Serge Rambour, révision scientifique de Charles-Marie Evrard. Ed : De Boeck Université. 514 P.
- Huglin P., 1986. Biologie et écologie de *la vigne*. Paris : payot Lausanne.
- Hussey G., Stacey N J., 1981. *In vitro* propagation of potato (*Solanum tuberosum*) of potato of photoperiod on *in vitro* tuberisation of potato- *S. tuberosum*. Plant cell tissue and organe culture, p 43-51.

J

- Jimnez U M., 2001. Régulation of *in vitro* somatic embryogenesis with emphasis on the role of endogenous hormones. Ed : Revista Brasileira de fisiologia vegetal, p196- 223.
- Jouanneau L J P., 1975. Protein synthesis requirement for the cytokinin effect upon tobacco cell division. In: plant propagation by tissue culture, part I the technology, E.L.F. George. Exegetics Ltd. Edington wilts, England, p574.

Q

- Quézel P., Santa S., 1963. Nouvelle flore de l'Algérie et des régions désertiques méridionales .Ed : C.N.R.S, Paris.

L

- Larkin P J., Scowcroft W R., 1981. Somaclonal variation – a novel source of variability from cell cultures for plant improvement. Théor. Appl. Génét. 60, p197-201.
- Larpent-Gourgaut M., Sanglier J J., 1992. Biotechnologie principes et méthodes : doin éditeurs-Paris, p 344.
- Le C L., Thomas D., Nowbuth L., 2002. Conservation de pomme de terre *in vitro* et caractérisation des variétés cultivées en suisse .suisse Agric 34(3):133-136.
- Lindsey K., Jones M G K, 1989. Plant biotechnology in agriculture, biotechnology series, open university press.

- Lydie S., 2014. Les végétaux: Évolution, développement et reproduction. Ed : Quae, p16.

M

- Mandal AKA, Dutta GS .2001. Direct shoot organogenesis and plant regeneration in safflower. In *Vitro Cell Dev Biol Plant* 37:50–54
- Margara J., 1989. Base de multiplication végétative, Les méristèmes et l'organogenèse. Ed : INRA, p 262.
- Mioulane P., 2004. Encyclopédie universelle des 15000 plantes et fleurs de jardin. Larousse.Ed :ISBN,Paris.
- Montes E., 2009. Embryogenese somatique et transformation génétique du cotonnier via *agrobacterium tumefaciens* : mise au point d'une méthode de transformation sur tissus embryogène. Thèses. Ecole pratique des hautes études.
- Murashige T., Skoog F., 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol Plant* 15(3): 473-497.

N

- Nowbuth L., Clle., 2005. Teneur non- conforme en ADN comme indicateur de variation somaclonale chez la pomme de terre .Suisse agric .37 (6):257-266.

O

- OMS ., 2001. Reportof the commission on macroeconomics and health.Genève.
- OMS ., 2003. Rapport du Secrétariat sur la médecine traditionnelle. Genève.
- OMS., 2013. Rapport sur la santé dans le monde 2013 - La recherche pour la couverture sanitaire universelle. Genève.
- Orlikowska, T.K., Dyer, W.E. 1993: In vitro regeneration and multiplication of safflower (*Carthamus tinctorius L.*). - *Plant Sci.* 93: 151-157.

P

- Pati P K., Rath S P. , Sharma M. , Sood A. , Ahuja P S.,2006.*In vitro* propagation of rose - a review, *BiotechnolAdv*, Vol.24, p 94-114.
- Pickering RA ., Devaux P.,1992.Haploid production: approaches and use in plant breeding , p 519-547.
- Prakash J., Giles K L., 1987. Induction and growth of androgenichaploids. *IntRev. Cytol.* 107: 273-292.

K

- Karp A., Nelson R S., Thomas E., Bright S W J., 1982. Chromosom variation protoplast derived potato plants, p 265-272.

R

- Robert D, Dumas C, Bayon C., 1998. La reproduction .Ed : Doun initiatives santé, p 373.

S

- Saadi A., 1991. Régénération des plantes de pois (*Pisum sativum*L) par embryogenèse somatique. Thèse de doctorat. Paris Grignon, p162.
- Saadi A., Hamdani F.Z. 2007. Régénération *in vitro* du *scorpiurus muricatus ssp subvillosus* via la caulogenèse. Biotechnol. Argan. Soc. Environ., vol. 11p 185-191.
- Scriban., 1999. Biotechnologie, 5^{ème} éd : Tec et Doc, p 602.
- Sibi M .,1981. Hérité de variants épi géniques obtenus par culture des tissus *in vitro* chez les végétaux supérieurs .ThèseDocSci ,Univ Paris RSud, Orsay, p 280.
- Sihachakr D., Cavalcante-Alves J M., Tizroutine S., Allot M., Mussio I., Servaes A., Nzoghé D., Duceux G.,1994.Embryogenèse somatique chez la patate douce (*Ipomoeabatatas* (L) Lam.) : caractérisation et régénération des plantes.JohnLibbeyEurotext, Paris, p251-261.
- Singh HP., 1991. Morphogenetic potential of callus and organ cultures of saf ower. Narendra Deva J Agril Res 6(1):163–167
- Sujatha, M. and Kumar, D. V. 2007. In vitro bud regeneration of *Carthamus tinctorius* and wild *Carthamus* species from leaf explants and axillary buds, *Biologia plantarum*. 51(4): 782-786.

T

- Tap.,Novello., 2005.Introduction à la culture *in vitro* chez les végétaux PDF. [www.julienap.free.fr/travaille-fichiers/tp-in vitro-tape-novello.pdf](http://www.julienap.free.fr/travaille-fichiers/tp-in-vitro-tape-novello.pdf).
- Teoule E ., 1999. Biotechnologie et Amélioration des plantes in Biotechnologie Seriban R. Ed : TEC et DOC, p 565-589.
- Tetenyl I., 1985. Disponibilité et l'utilisation des plantes médicinales dans la production pharmaceutique. Rapport technique établis pour le gouvernementd'Algerie , p 32.

Références bibliographiques

- Thom E C .,1992. Selective Chromosome elimination in Barley : the 'Bulbosum System' .Possibilities and Limitations in Plant Breeding. Thesis, Swedish University of Agricultural Sciences, Sweden, p 63.
- To J P., Kieber JJ., 2008. Cytokinin signaling: two-components and more. Trends Plant Sci,13(2):85-92.

v

- Viguer M., 2006. Les perspectives économiques des secteurs de l'horticulture publique française. Ed : Conseil économique et social.

w

- Wenzel H., 1994. Tissue culture. In potato genetics. Edit by Bradshaw JE.; Macay GR., Ed : CAB International, p 173.
- William G., 2003. Physiologie végétale. Ed : De Boeck Supérieur, p 314 – 318.

y

- Yakoub-Bougdal , S. Bonaly , J. Barque , J P. Bennadji , A. Gaouar , A.2003. Organogenèse in-vitro des microboutures de l'Olea europea L., prélevées à différentes stades physiologiques.

z

- Ziauddin A., Kasha KJ., 1992. Haploids in cereal improvement : anther and microspores culture, p 213-235.
- Zryd J-P., 1988. Culture de cellules, tissus et organes végétaux. Ed : press Polytechniques Romandes Suisse, p308.

Annexe 1 : Milieu de Murashige et Skoog, (1962).

Constituent	Solution mères (mg/L)	Volume à ajouter (mg/L)	Concentration finale (mg/L)
Macroéléments 10X		100	
NH ₄ NO ₃	16500		1650
KNO ₃	19000		1900
CaCl ₂ .2H ₂ O	4400		440
MgSO ₄ .7H ₂ O	3700		370
KH ₂ PO ₄	1700		170
Microéléments 50X		20	
MnSO ₄ .H ₂ O	1115		22.3
ZnSO ₄ .7H ₂ O	430		8.6
H ₃ BO ₃	310		6.2
KI	41.5		0.83
Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	12.5		0.25
CuSO ₄ .5H ₂ O	1.25		0.025
CoCl ₂ .6H ₂ O	1.25		0.025
Fer- EDTA 50X		20	
Na ₂ EDTA	1865		37.3
FeSO ₄ .7H ₂ O	1390		27.8
Vitamins 100X		10	
Glycine	20		2
Acide Nicotinique	5		0.5
Pyridoxine.HCl	5		0.5
Thiamine HCl	5		0.5
Myo-inositol	10000		100
Sucre			
Saccharose			30g/l
Agar			7g/l

Annexe 2 : Préparation de la solution de fer EDTA

FeSO₄, 7H₂O et Na₂EDTA sont dissout séparément dans 1/10^e et 9/10^e du volume désiré finale d'eau distillée à 60°C respectivement. Sur une table d'agitation chauffante, verser progressivement la solution de FeSO₄, 7H₂O dans celle de Na₂EDTA, puis laisser le mélange sous agitation pendant une heure, le mélange passe progressivement d'une couleur jaune claire foncé, elle sera stockée à l'abri de la lumière à 4°C dans un flacon préalablement stérilisé.

Annexe 3 : Les régulateurs de croissances

Régulateurs	Solvants
ANA	1N NaOH
2,4-D	EtOH ou 1NaOH
BA	1N NaOH
KN	1N NaOH