

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية
République Algérienne Démocratique et Populaire
وزارة التعليم العالي والبحث العلمي
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique
جامعة امحمد بوقرة بومرداس
Université M'hamed Bougara-Boumerdes



Département de Biologie

Mémoire de fin d'étude

En vue de l'obtention du Diplôme de Master Académique

Domaine : Sciences de la Nature et de la Vie

Filière : Biotechnologie Spécialité : Biotechnologie Végétale

Thème

Optimisation de la production de biomasse *in vitro* chez la pervenche de Madagascar

« *Catharanthus roseus* »

Présenté par : HAMDI Belkacem

AMMOUCHE Hanaa Ahlem

MANSAR Khouloud

Le Jury:

M^{me} MOHEND KACI Hakima

Présidente

Professeur

UMBB

M^{me} ROUANE Asma

Examinatrice

MCB

UMBB

M^{me} BELALIA Nawel

Promotrice

MCB

UMBB

2021/2022

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية
République Algérienne Démocratique et Populaire
وزارة التعليم العالي والبحث العلمي
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique
جامعة امحمد بوقرة بومرداس
Université M'hamed Bougara-Boumerdes



Département de Biologie

Mémoire de fin d'étude

En vue de l'obtention du Diplôme de Master Académique

Domaine : Sciences de la Nature et de la Vie

Filière : Biotechnologie Spécialité : Biotechnologie Végétale

Thème

Optimisation de la production de biomasse *in vitro* chez la pervenche de Madagascar

« *Catharanthus roseus* »

Présenté par : HAMDI Belkacem

AMMOUCHE Hanaa

MANSAR Khouloud

Le Jury:

M ^{me} MOHEND KACI Hakima	Présidente	Professeur	UMBB
M ^{me} ROUANE Asma	Examinatrice	MCB	UMBB
M ^{me} BELALIA Nawel	Promotrice	MCB	UMBB

2021/2022

Louanges à Allah, le maître de l'univers et que la paix et les bénédictions soient sur le messager d'Allah, sa famille, ses compagnons et ceux qui le suivent.

Remerciements

On remercie en premier lieu Dieu tout puissant de nous avoir accordé la puissance et la volonté pour achever ce travail.

Nous remercions vont à notre promotrice **Mme BELALIA Nawel**, Maître de conférences classe B à l'université Mohammed Bougera Boumerdès (**UMBB**) pour avoir encadré et dirigé ce travail avec une grande rigueur scientifique, pour sa disponibilité et ces précieux conseils qui nous a permis de réaliser ce travail.

On remercie vivement **Mme ROUANE Asma** Maître de conférences classe B à l'UMBB d'avoir accepté d'examiner notre travail.

Nous remercions vont à l'équipe du Laboratoire des Ressources Génétiques et Biotechnologies (L-RGB) de l'ENSA, El-Harrach, Alger et plus particulièrement à **Mme ZAOUI Djamila**, ingénieur de laboratoire, pour sa disponibilité et son précieux soutien tout le long de mon travail.

À toute personne qui a participé de près ou de loin à la finalisation de ce travail, qu'il trouve ici l'expression de mes reconnaissances les plus sincères.

Enfin, **on** remercie également l'ensemble de nos enseignants du département de biologie qui nous ont accompagné tout au long de notre cursus universitaire, et plus spécifiquement Madame **MOHEND KACI Hakima**, responsable de la spécialité « Biotechnologie végétale » pour nous avoir accueillie à bras ouvert et nous avoir fait aimer cette spécialité.

Dédicaces

Je dédie ce travail à mes très chers parents que je ne remercierai jamais assez pour leurs sacrifices, leurs soutiens et leurs précieux conseils tout au long de mes études.

Mes deux sœurs qui m'ont toujours encouragé à aller de l'avant.

A tous les membres de ma famille, A tous mes amies, camarades de promotion A tous, je dédie ce travail.

Belkacem

Dédicaces

A mes chers parents, pour tous leurs sacrifices, leur amour, leur tendresse, leur soutien et leurs prières tout au long de mes études, aucun mot ne peut décrire l'amour et la gratitude que je porte envers vous, nul exploit ne pourra rendre hommage aux sacrifices et aux années que vous m'avez dédié.

A mes chers frères, pour leur appui et leur encouragement, Spécialement Raouf qui étais toujours présent quand j'avais besoin de lui, moi comme nous tous, c'est notre étoile dans l'obscurité.

A toute ma famille pour leur soutien tout au long de mon parcours universitaire.

A mes amis d'être toujours là pour moi pour le meilleur et pour le pire.

Et c'est avec un cœur lourd en ayant des larmes aux yeux que j'écris ces dernières lignes, en prenant compte que tout ce parcours, toutes ces années à travailler pour arriver là où j'en suis est finalement arrivé.

Merci, merci à tous, à toute personne qui a participé de près ou de loin à forgé la femme que je suis maintenant.

Merci à tous ceux qui ont contribué à la réalisation de cet ouvrage. Que ce travail soit l'accomplissement de vos souhaits sincères et le fruit de votre soutien indéfectible.

Hanaa Ahlem

Dédicaces

Merci allah (mon dieu) de m'avoir donné la capacité d'écrire et de réfléchir la force d'y croire, la patience d'accomplir ce modeste travail
Je dédie ce modeste travail

A l'homme de ma vie, mon exemple éternel, mon soutien moral et matériel, celui qui s'est toujours sacrifié pour me voir réussir, qui éclair mon chemin et m'illumine de douceur et d'amour que te garde
pour nous papa

A ma très chère maman en signe d'amour, de reconnaissance et de gratitude pour tous les soutiens et les sacrifices dont elle a fait preuve
à mon égard.

Aux fleurs de mon cœur mes chères sœurs : amina nihad et Ferial qui
m'ont toujours soutenu moralement
A la prunelle de mes yeux mon petit frère Mehdi le bijou de la maison

A tous les membres de la famille : tentes, oncles, cousins, cousines
paternelles et maternelles

A ceux que j'aime beaucoup qui m'ont toujours soutenu et étaient
toujours à mes côtés mes chères amis spécialement : Nacima, hanna,
delia, Nesrine, Nechoua et son mari monsieur alouane Ahmed

Khouloud

LISTE DES ABBREVIATIONS

- AITs** : Alcaloïdes indole terpénoïdes
- AJ** : Acide jasmonique
- ANA** : Acide naphthalène acétique
- ANOVA** : Analyse de la variance
- AS** : Acide salicylique
- B5** : Milieu de culture de Gamborg et *al.* (1968)
- BAP** : 6-Benzylaminopurine
- BHT** : butylhydroxytoluène
- C. roseus*** : *Catharanthus roseus*
- C.pusillus*** : *Catharanthus pusillus*
- Ca** : Calcium
- Cd** : Cadmium
- CRs** : Chevelus racinaires
- Cu** : cuivre
- DPPH** : 2,2-diphényl-2-picryl-hydrazyl
- ENSA** : Ecole Nationale Supérieure Agronomique
- ET** : éthylène
- FT** : facteurs de transcription
- KCl** : Chlorure de potassium
- KT** : Kinétine
- L-RGB** : Laboratoire Ressources Génétiques et Biotechnologies
- Mg L⁻¹** : Milligramme par litre
- MS** : Milieu de culture de Murashige et Skoog (1962)
- ON** : Oxyde nitrique
- PGR** : Régulateur de croissance des plantes
- RAS** : Espèces réactifs de l'azote
- ROS** : Espèces réactifs de l'oxygène

LISTE DES FIGURES

Figure 1: Présentation de la plante <i>Catharanthus roseus</i> (Veyret, 1974).....	3
Figure 2: Principaux types structuraux des alcaloïdes.	10
Figure 3: Formule générale des dérivés de l'acide benzoïque.	11
Figure 4: Formule générale des dérivés de l'acide cinnamique.	12
Figure 5: Structure de la vincristine et la vinblastine (Alam et al., 2017).	15
Figure 6: Différents types d'organogénèse contrôlés par les concentrations relatives d'auxine et de cytokinine dans les milieux de cultures	25
Figure 7: Vitrosemis de <i>C.roseus</i> âgés de 60 jours (G=0,66X)	31
Figure 8: Réactivité des explants de feuilles(b), et de tige(a) mise en culture sur divers milieux de callogenèse après trois semaines (G=0,80X).	32
Figure 9: Effet des différentes balances hormonales sur le pourcentage de callogenèse des différents explants (feuilles, tiges et racines) de la pervenche (annexe 1).	33
Figure 10: Aspect des cals des feuilles de <i>Catharanthus roseus</i> sur milieu de MS.....	34
Figure 11: Effet des différentes concentrations du Chitosan sur le poids frais (g) des cals après 20 jours d'élicitation (F=12,227 ddl=4 et P=0,000).	35
Figure 12: Effet des différentes concentrations du Chitosan sur le poids sec (g) des cals après 20 jours d'élicitation (F=12,80 , ddl= 4 et P=0,000).....	36
Figure 13: Effet des différentes concentrations du Chitosan sur la surface des cals après 20 jours d'élicitation (F=12,167, ddl= 4 et P=0,000).....	37
Figure 14: Effet des différentes concentrations du Chitosan sur le poids frais (g) des cals après 20 jours d'élicitation (F=18,039 ddl= 4 et P= 0,000).	38
Figure 15: Effet des différentes concentrations du Chitosan sur le poids sec (g) des cals après 20 jours d'élicitation (F=5,89 ddl= 4 et P = 0,000).....	39
Figure 16: Effet des différentes concentrations du Chitosan sur la surface des cals après 20 jours d'élicitation (F=13,867 ddl=4 P=0,000).....	40

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1: Les espèces du genre <i>Catharanthus</i>	3
Tableau 2: Principes actifs de <i>Catharanthus roseus</i>	14
Tableau 3: Classification des éliciteurs pour la production de métabolites secondaires.	16
Tableau 4: Les différentes balances hormonales testées pour l'induction de la callogenèse à partir de vitro-semis et de chevelus racinaires.	29
Tableau 5: Effet des différentes balances hormonales sur le pourcentage de callogenèse des différents explants feuilles, tiges et racines.....	48

Sommaire

Remerciements

Dédicaces

LISTE DES ABBREVIATIONS

LISTE DES FIGURES

LISTE DES TABLEAUX

Introduction	1
Chapitre I : Synthèse bibliographique	
I. Généralité sur la pervenche de Madagascar.....	2
I.1. Classification.....	2
I.2. Morphologie de la plante :	3
I.3. Distribution géographique :	4
I.4. Caractérisation cytogénétique de <i>Catharanthus roseus</i>	5
I.5. Importance et utilisation.....	5
I.6. Applications pharmacologiques	6
I.6.1. Activité anticancéreuse :	6
I.6.2. Activité anti-diabétique :	6
I.6.3. Activité anti-microbienne :	6
I.6.4. Propriété anti-oxydante :	7
I.6.5. Propriété anti-ulcéreuse.....	7
I.6.6. Propriété antidiarrhéique.....	7
I.6.7. Activité antihelminthique.....	7
I.6.8. Propriété de cicatrisation des plaies	8
II. Phytochimie des plantes	8
II.1. Les métabolites primaires :	8
II.2. Les métabolites secondaires :	8
II.2.1. Les alcaloïdes :	9
Le rôle des alcaloïdes :	10
II.2.2. Les composés phénoliques :	11
Rôle et intérêt des composés phénoliques :	13
II.2.3. Les terpènes :	13
Le rôle des terpènes :	13
II.3. Métabolites secondaires de la pervenche de Madagascar :	14
II.4. Elicitation des cellules végétales pour la production de métabolites secondaires :	15

II.4.1. Éliciteurs et élicitation :	15
II.4.2. Classification des éliciteurs :	15
a. Eliciteurs biotiques et abiotiques	15
b. Eliciteurs endogènes et exogènes	16
II.4.3. Caractéristiques des éliciteurs :	17
a. Concentration de l'éliciteur :	17
b. La perception du signal éliciteur :	18
c. Age de la culture	18
II.4.4. La réponse de la plante au signal éliciteur :	19
a. Les barrières structurales :	19
b. Les barrières chimiques :	19
III. Généralité sur la culture <i>in vitro</i>	20
III.1. Définition	20
III.2. La totipotence	20
III.3. Facteurs influents la culture <i>in vitro</i>	20
III.3.1. Effet de l'explant :	21
III.3.2. L'âge physiologique et ontogénique de l'organe :	21
III.3.3. L'époque du prélèvement :	21
III.3.4. La taille de l'explant	21
III.3.5. Effet du génotype :	22
III.3.6. La lumière :	22
III.3.7. La température :	22
III.3.8. L'hygrométrie :	22
III.4. La Micropropagation	22
III.4.1. Organogénèse directe	23
III.4.2. Organogénèse indirecte	23
III.4.2.1. Caulogénèse :	23
III.4.2.2. La rhizogénèse :	24
III.4.2.3. Callogenèse :	24
a. Facteurs influençant la callogenèse	24
b. Caractéristiques des cals :	26
c. Intérêt de la callogenèse :	26
Chapitre II : Matériel et méthodes	
I. Objectif du travail	27

II.1 Matériels	27
II.1.1 Instruments et équipements utilisés	27
II.1.2. Matériel végétal	27
II.2 Méthodes	28
II.2.1 Obtention des vitro semis	28
II.2.1.1. Désinfection des graines	28
II.2.1.2. Mise en culture <i>in vitro</i>	28
II.2.2. Induction de cals	28
II.2.3. Multiplication des cals	29
II.2.4. Elicitation des cals	30
II.2.4.1. Préparation de l'éliciteur	30
Chapitre III : Résultats et interprétations	
I. Obtention du matériel végétal	31
I.1 Germination des graines de <i>C. roseus</i> :	31
II. Effet du traitement hormonal sur l'induction de la callogenèse.....	31
II.1 Taux de callogenèse	31
II.2 Couleur et texture des cals	34
III. Multiplication des cals.....	34
IV. Elicitation des cals.....	35
V. Milieu à base de fructose.....	35
V.1.1. Effet de l'élicitation sur le poids frais des cals.....	35
V.1.2. Effet de l'élicitation sur le poids sec des cals	36
V.1.3. Effet de l'élicitation sur la surface des cals	37
V.2. Milieu à base de sucrose.....	38
V.2.1. Effet de l'élicitation sur le poids frais des cals.....	38
V.2.2. Effet de l'élicitation sur le poids sec des cals	39
V.2.3. Effet de l'élicitation sur la surface des cals	40
Chapitre IV : Discussion	
I. Etablissement du matériel végétal	41
II. Callogenèse :	41
III. Effet de l'élicitation du matériel végétal :	42
Conclusion générale	45
Références Bibliographiques :	46
LISTES DES ANNEXES.....	56

Introduction

Introduction

Les plantes sont encore utilisées dans le monde entier comme remèdes pour traiter une variété de maladies. Les remèdes à base de plantes sont considérés comme moins dangereux que les médicaments chimiques. En l'absence d'un système médical développé et sophistiqué, l'étude de l'ethnobotanique des plantes suscite l'intérêt de l'industrie pharmaceutique (Didier et *al.*, 2011). Ces plantes continuent d'être une source de soins médicaux dans les pays en développement (Tabuti et *al.*, 2003). Parmi ces plantes on trouve *Catharanthus roseus* (L.).

On trouve de nombreux principes actifs dans les plantes médicinales, dont certains proviennent du métabolisme secondaire. Elles produisent aujourd'hui 70 % de nos produits pharmaceutiques, et environ 170 000 molécules bioactives d'origine végétale (Chaabi, 2008). La plupart du temps, les propriétés thérapeutiques des plantes médicinales n'ont pas été découvertes par la recherche moderne, mais constituent plutôt un ensemble de connaissances anciennes accumulées au cours de nombreux siècles. Actuellement, des études scientifiques ont validé certaines de ces pratiques historiques (Beddou, 2015).

Grâce à ses alcaloïdes indoliques, la plante médicinale *Catharanthus roseus* a une valeur thérapeutique importante (Das et Sharangi, 2017). L'utilisation par les chercheurs de techniques de culture *in vitro* et de méthodes de génie génétique pour augmenter la production de ces alcaloïdes et élargir le marché de l'industrie pharmaceutique a été justifiée par le faible rendement de ces composés (Wu et Shi, 2008).

La culture *in vitro* de *C. roseus* permet de contrôler la stabilité et la longévité de la production de ses principes actifs (Siddiqui et *al.*, 2013). De plus, elle offre un environnement idéal pour faire avancer les études de recherche sur ces métabolites secondaires. Par conséquent, nous nous intéressons à l'amélioration de la croissance des tissus et à leur pouvoir de synthèse grâce à l'optimisation des conditions et des facteurs de contrôle de la synthèse des métabolites en culture *in vitro* (Mujib et *al.*, 2012).

L'objectif de la présente étude est d'optimiser la production de la biomasse chez *Catharanthus roseus* en mettant en évidence des protocoles permettant d'une part d'induire la formation de cals, et une part de les multiplier tout en améliorant leur biomasse suite à l'utilisation d'éliciteur.

Synthèse bibliographique

Chapitre I : Synthèse bibliographique

I. Généralité sur la pervenche de Madagascar

I.1. Classification

La pervenche de Madagascar, *Catharanthus roseus* (L.) G. Don, est communément appelé « Nayantara » ou « Sadabahar ». Le mot *Catharanthus* dérive d'un terme grec qui signifie "fleur pure" ; alors que *roseus* désigne la couleur rouge ou rose. *Catharanthus roseus* est la première espèce du genre à avoir été décrite sous le nom de *Vinca rosea* en 1758 par Linné (Veyret, 1974) , par la suite, c'est la botaniste George Don en 1838 qui l'a classée dans le genre *Catharanthus* (Kaushik et al., 2017).

Le genre de *Catharanthus* avait été introduit dans la littérature par G. Don en 1838 pour différencier la Pervenche de Madagascar, *Catharanthus roseus*, des *Vinca* européens, car plusieurs caractères morphologiques nécessitait la confection de deux genres. Selon Boiteau et Allorge-Boiteau (1993), deux variétés de *Catharanthus roseus* sont signalées ; la variété blanche à gorge pourpre appelée var. *ocellatus* et celle à gorge jaune appelée var. *albus*. (Veyret, 1974).

Conformément au Système d'information taxonomique intégré (ITIS), le numéro de série taxonomique (TSN) conçu pour *C. roseus* (L.) G. Don est 30168 et, à l'heure actuelle, la hiérarchie taxonomique établie est la suivante :

Règne : Plantae, plantes

Sous-règne : Tracheobionta, plantes vasculaires

Superdivision : Spermatophyta, plants à graines

Division : Magnoliophyta, plantes volantes

Classe : Magnoliopsida, dicotylédones

Sous-classe : Asteridae

Ordre : Gentianales

Famille: Apocynaceae, famille apocyn

Genre: *Catharanthus* G. Don, pervenche

Espèce : *C. roseus*(L.) G. Don (L.) G. Don, pervenche de Madagascar

Le genre *Catharanthus* comprend huit espèces dont sept sont originaires de Madagascar et une *C. pusillus*, originaire d'inde (Tableau1) (S. Das et Sharangi, 2017).

Tableau 1: Les espèces du genre *Catharanthus* (Barkat et *al.*, 2017).

Nom de l'espèce	Lieu d'origine
<i>C. roseus</i> (L.) G. Don	Madagascar
<i>C. ovalis</i> Markgraf	Madagascar
<i>C. trichophyllus</i> (Baker) Pichon	Madagascar
<i>C. longifolius</i> (Pichon) Pichon	Madagascar
<i>C. coriaceus</i> Markgraf	Madagascar
<i>C. lanceus</i> (Bojer ex A. DC.) Pichon	Madagascar
<i>C. scitulus</i> (Pichon) Pichon	Madagascar
<i>C. pusillus</i> (Murray) G. Don	Inde, Sri Lanka

I.2. Morphologie de la plante :

Catharanthus roseus est une plante vivace tropicale à feuilles persistantes, ou herbacée ayant une hauteur de 1 m (Ross, 2003). Les feuilles sont ovales à oblongues (2,5 à 9,5 cm de long et 1 à 3,5 cm de large), disposées de façon opposée, de couleur verte brillante sans poils avec une nervure médiane pâle (Gajalakshmi et *al.*, 2013 ; Renjini et *al.*, 2017). Les fleurs sont solitaires ou géminées, avec des pétales ob-ovales (3 à 4 cm de diamètre) de couleur rose, mauve violacé, bleu, saumon, écarlate ou blanc pur avec un œil violet, rouge, rose, jaune pâle ou blanc au centre (Aslam et *al.*, 2010).

C. roseus est une plante auto-fertile, propagée par graines sous les zones tropicales et subtropicales, et en zone tempérée par bouture (Sadowska et *coll.*, 1989). Les fruits sont des follicules allongés, de 15 à 25 mm de longueur contenant 12 à 20 petites graines noires. *C. roseus* fleurie et fructifie toute l'année dans des conditions climatiques chaude. Les premières fleurs apparaissent 6 à 8 semaines après la germination (Abul Barkat et *al.*, 2017).



Figure 1: Présentation de la plante *Catharanthus roseus* (Veyret, 1974)

Une description générale de la plante a été effectuée par Makhzoum (2007) :

- Noms : pervenche de Madagascar, *Catharanthus roseus* ;
- Origines : originaire et endémique de Madagascar ;
- Famille : Apocynacées ;
- Type : herbacée vivace, utilisée en annuelle ;
- Port : couvre-sol compact et buissonnant ;
- Utilisations : intérieur ou extérieur, pot, massif, rocaille ;
- Feuillage : semi-persistant à caduc ;
- Fleurs : couleurs très variées, très florifère ;
- Exposition au soleil : à mi- ombre ;
- Sol : léger ou sableux, caillouteux, drainé, neutre à acide ;
- Besoins en eau : moyens ;
- Densité : 6/8 pieds au m² ;
- Période de plantation : au printemps, de mars à mai, hors gel ;
- Période de floraison : continue entre mai et octobre ;
- Méthodes de multiplication : semis et bouturage ;
- Rusticité : plante gélive ;
- Croissance : rapide ;
- Spécificités : culture facile ;
- Qualités au jardin : plante anti-limace ;
- Attention : plante toxique.

I.3. Distribution géographique :

Catharanthus roseus est originaire de l'île de l'océan Indien Madagascar. Elle est aussi largement cultivée et naturalisée dans les régions tropicales et subtropicales du monde (Monokesh et al., 2013). Elle a été présentée comme une plante ornementale populaire en raison de sa résistance particulière à la sécheresse (Veyret, 1974). On rencontre cette espèce autour des cases, des maisons indigènes et dans les jardins, pour ses jolies fleurs roses ou blanches (Veyret, 1974).

Elle a été commercialisée aux États-Unis, en Chine, en Espagne, en Afrique, en Inde, en Australie et enfin en Europe du Sud pour son usage médicinal. Les médicaments dérivés de cette plante sont généralement fabriqués aux États-Unis, en Italie, en Hongrie, en Allemagne de l'Ouest, aux Pays-Bas ou encore au Royaume-Uni (Lata, 2007 ; Aruna et al., 2015). Bien que la dispersion de *C. roseus* ait eu lieu il y a plusieurs siècles, les plantes sauvages sont toujours récoltées et utilisées aujourd'hui en pharmacopées traditionnelles (Foureau, 2016).

I.4. Caractérisation cytogénétique de *Catharanthus roseus*

Le nombre de chromosomes pour toutes les espèces de *Catharanthus* est $2n= 16$. Cependant, les plantes tétraploïdes poussent plus vite et leurs fleurs ont une plus grande taille (Vermani et al., 1978). Le complément chromosomique de *C. roseus* comprend deux paires de chromosomes métacentriques, quatre sub-télocentriques et deux télocentriques, avec la présence d'une seule région organisatrice du nucléole dans le chromosome 6 (Vermani et al., 1978).

La longueur moyenne des chromosomes variait de 4,784 à 8,627 μm (Guimaraes et al., 2012). D'après des études caryo-morphologiques de *C. pusillus* et six variétés de *C. roseus*, Rani et Kumar (2011) ont conclu que *C. pusillus* était évolutivement plus primitif que la variété à fleurs blanches de *C. roseus*.

I.5. Importance et utilisation

Traditionnellement, *C. roseus* est utilisée dans de nombreux pays pour divers remèdes (Swanston-Flatt et al., 1989 ; Gupta et Sharma, 2006). Elle est utilisée pour les crampes d'estomac, les ménorragies et comme anti cancéreux aux philippines. A Madagascar, elle est utilisée comme vomitif, purgatif, vermifuge, dépuratif, remèdes hémostatiques et maux de dents. En Inde, le jus de feuilles est appliqué sur les piqûres d'abeilles et des guêpes. En Afrique, ils sont utilisés pour les ménorragies et les rhumatismes.

La plante est également utilisée pour le diabète, l'hypertension, l'insomnie et le cancer en Malaisie. La décoction/extrait de fleur est utilisée dans l'asthme, les flatulences et la tuberculose aux Bahamas, comme bain oculaire pour les nourrissons à Cuba et en Jamaïque. L'Amérique utilise le jus de la plante comme gargarisme pour soulager les maux de gorge, les maux de poitrine et la laryngite (Farnsworth, 1961).

I.6. Applications pharmacologiques

La plante a la capacité de synthétiser une grande variété de composés chimiques qui sont utilisés pour remplir des fonctions biologiques importantes, et pour se défendre contre les attaques de prédateurs tels que les insectes, les champignons et les mammifères herbivores. Les alcaloïdes sont les constituants chimiques potentiellement les plus actifs de *Catharanthus roseus*. En effet, plus de 400 alcaloïdes sont présents dans la plante, ils sont utilisés comme produits pharmaceutiques, agrochimiques, aromatisants et parfum, ingrédients, additifs alimentaires et pesticides (Bennouna et Campone 2008).

I.6.1. Activité anticancéreuse :

Les alcaloïdes anticancéreux Vincristine et Vinblastine sont dérivés de la tige et de la feuille de *Catharanthus roseus* (Banskota, 2002). Ces alcaloïdes inhibent la polymérisation de la tubuline dans les cellules en division. Ils sont utilisés dans le traitement d'un grand nombre de cancers.

La vinblastine demeure aujourd'hui un antimétabolite majeur de l'arsenal thérapeutique disponible pour traiter divers cancers ; celui du rein, la vessie, l'ovaire, le testicule, le sein, les histiocytoses ainsi que les choriocarcinomes (Vidal, 2001). La vincristine, quant à elle, est utilisée pour la leucémie chez les enfants. En effet, différents extraits méthanoliques de *Catharanthus* ont montré une activité anticancéreuse significative *in vitro* contre de nombreux types cellulaires et plus particulièrement contre les types de tumeurs multi-résistantes (Banskota, 2002 ; Wang et Zheng, 2004).

I.6.2. Activité anti-diabétique :

Les extraits éthanoliques des feuilles et fleurs de *C. roseus* a montré une baisse de la glycémie comparable au médicament standard (Glibenclamide). L'effet hypoglycémiant est apparu en raison du résultat de l'utilisation accrue du glucose dans le foie. L'activité hypoglycémiante des alcaloïdes isolés de *C. roseus* ont été étudiés pharmacologiquement et un remède dérivé de la plante a été commercialisé sous le nom Vinculine comme traitement du diabète (Chattopadhyay et al., 1991 ; S. N. Singh et al., 2001 ; Tiong et al., 2013)

I.6.3. Activité anti-microbienne :

Des extraits bruts de différentes parties de la plante ont été testés ; celui des feuilles a donné une meilleure activité antibactérienne. Cette dernière a été vérifiée contre le micro-organisme *Pseudomonas aeruginosa* NCIM2036, *Salmonella typhimurium* NCIM2501 et

Staphylococcus aureus NCIM5021 ; il a été constaté que les extraits pouvaient être utilisés comme agent prophylactique dans le traitement de nombreuses maladies (Patil et Ghosh, 2010).

I.6.4. Propriété anti-oxydante :

Le potentiel anti-oxydant de l'extrait éthanolique de racines des deux variétés de *C. roseus* à savoir rosea (fleur rose) et alba (fleur blanche) a été obtenue en utilisant différents systèmes de dosage tel que l'activité du piégeage des radicaux hydroxyles, l'activité de piégeage des radicaux superoxydes, l'activité de piégeage des radicaux DPPH et la méthode d'inhibition du radical oxyde nitrique. Le résultat obtenu a prouvé que l'extrait éthanolique des racines des variétés de Pervenche a montré un effet de piégeage satisfaisant dans l'ensemble des essais, cependant *C. roseus* s'est avéré possédant plus d'activité antioxydante que celle de *C. alba*. (Bhutkar et Bhise, 2011).

I.6.5. Propriété anti-ulcéreuse

Les alcaloïdes vincamine et vindoline de la plante ont montré une propriété antiulcéreuse. L'alcaloïde vincamine, présent dans les feuilles de la plante, présente une activité cérébrovasodilatatoire et neuroprotectrice. Les feuilles de la plante ont prouvé leur activité antiulcéreuse contre les dommages gastriques induits expérimentalement chez les rats (Nosálová et al., 1993).

I.6.6. Propriété antidiarrhéique

L'activité anti-diarrhéique des extraits éthanoliques de feuilles de la plante a été testée sur des rats Wistar avec de l'huile de ricin comme agent expérimental induisant la diarrhée en plus du prétraitement de l'extrait. L'effet anti-diarrhéique des extraits éthanoliques de *C. roseus* a montré l'inhibition dépendante de la dose de la diarrhée induite par l'huile de ricin (Rajput et al., 2011).

I.6.7. Activité antihelminthique

Les infections à Helminthes sont des maladies chroniques qui touchent les êtres humains et le bétail. *Catharanthus roseus* a été utilisé depuis la période traditionnelle comme un agent anti-helminthique. Cette propriété antihelminthique de *C. roseus* a été évaluée en utilisant *Pheretima posthuma* comme modèle expérimental et avec le citrate de pipérazine comme référence standard. L'extrait éthanolique à la concentration de 250 mg/ml a montré une activité antihelminthique significative (Agarwal et al., 2011 ; Rawat et Gupta, 2011).

I.6.8. Propriété de cicatrisation des plaies

Les rats traités avec 100 mg /kg/jour d'extrait éthanolique de *Catharanthus roseus* ont présenté un taux élevé de contraction de la plaie, une diminution significative de la période d'épithélisation, une augmentation significative du poids sec et de la teneur en hydroxyproline du tissu de granulation par rapport aux contrôles. La contraction de la plaie ainsi que l'augmentation de la résistance à la traction et de la teneur en hydroxyproline soutiennent l'utilisation de *C. roseus* dans le traitement de la cicatrisation des plaies (Nayak et al., 2007).

II. Phytochimie des plantes

Le métabolisme végétal est un processus très dynamique, les molécules se renouvellent constamment, toute cellule à un instant donné est en équilibre entre synthèse et dégradation. Les molécules synthétisées sont appelées métabolites parce que ce sont des molécules issues de leur métabolisme. L'essentiel des synthèses est orienté vers la production de molécules qui sont vitales pour la structure et le fonctionnement cellulaire, ce sont les métabolites primaires (lipides, protéines, glucides et acides nucléiques) (Hopkins, 2003). A l'inverse des métabolites primaires, les métabolites secondaires ne sont pas nécessaires à la survie des organismes et ne sont pas synthétisés de manière uniforme dans le règne végétale (Egbuna et al., 2018).

II.1. Les métabolites primaires :

Sont caractérisés par leur caractère vital pour la cellule ou l'organisme :

- Les glucides représentent une source d'énergie surtout au niveau des parois Cellulaires (cellulose).
- Les lipides constituent aussi une source d'énergie présente dans les membranes cellulaires.
- Les amino-acides représentent une source primaire de protéines (Epifano et al., 2007).

II.2. Les métabolites secondaires :

Les métabolites secondaires sont des composés chimiques synthétisés par les plantes, on peut les considérer comme des composés photochimiques qui possèdent des fonctions non essentielles, du fait que leur absence n'est pas mortelle pour l'organisme ce qui n'est pas le cas des métabolites primaires. Les métabolites secondaires sont impliqués dans les interactions écologiques entre la plante et son environnement, pour certains ils ne se trouvent que chez une seule espèce ou un seul groupe taxonomique, de sorte qu'ils sont souvent utiles en chimiotaxonomie (Jeaun et al., 2005).

On peut classer les métabolites secondaires en trois grands groupes : les composés phénoliques, les terpènes et les alcaloïdes. Chacune de ces classes renferme une très grande diversité de composés qui possèdent une très large gamme d'activité en biologie humaine (Krieff, 2003).

II.2.1. Les alcaloïdes :

Un alcaloïde est une substance organique azotée relativement stable d'origine végétale (Mauro, 2006), de distribution restreinte à caractère alcalin et présentant une structure complexe ». Leur atome d'azote est inclus dans un système hétérocyclique ; les alcaloïdes possèdent une activité pharmacologique significative (Ziegler et Facchini, 2008).

Chez les plantes, trois classes d'alcaloïdes ont été décrites :

- **Les alcaloïdes vrais** qui représentent le plus grand nombre d'alcaloïdes, sont toxiques et disposent d'un large spectre d'activités biologiques importantes. Ils sont classés suivant la nature de leur cycle. L'atome d'azote est inclus dans un hétérocycle. Biosynthétiquement formés à partir d'acides aminés. Ces substances sont douées d'une grande activité biologique, même à faible dose. Ils sont présents dans les plantes, soit sous forme libre, soit sous forme de sel, soit comme N-oxyde (Beddou, 2015).
- **Les pseudo-alcaloïdes** qui ont toutes les caractéristiques des vrais alcaloïdes, mais ils ne sont pas des dérivés d'acides aminés. Les alcaloïdes stéroïdaux et les purines représentent le plus cette classe d'alcaloïdes. Il s'agit d'isoprénoïdes dans la grande majorité des cas, et les alcaloïdes terpéniques (Beddou, 2015).
- **Les proto-alcaloïdes** sont des amines simples sans azote hétérocyclique ; ils ont un caractère basique et sont synthétisés dans l'organisme à partir d'acides aminés. Ils sont solubles dans l'eau et sont communément appelés "amines biologiques". Cette définition englobe un large éventail de substances, dont les amines simples comme la sérotonine, la cathinone du thé d'Abyssinie et la mescaline du peyotl, ainsi que les bêtaïnes (qui résultent de la quaternisation de l'azote des acides aminés) (Beddou, 2015).

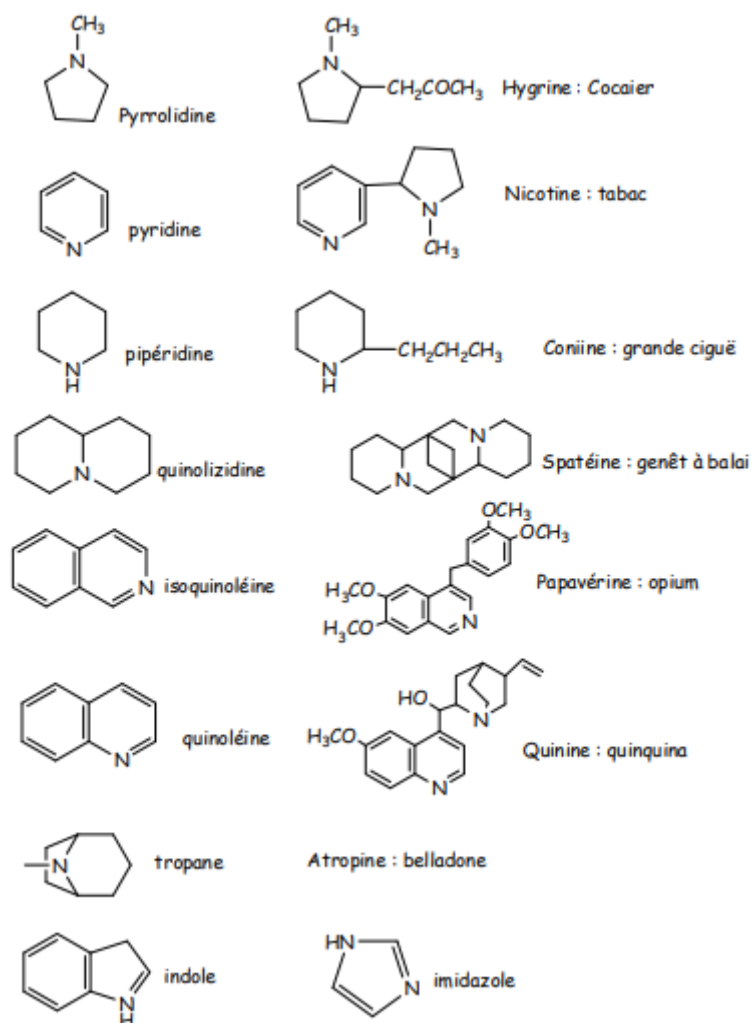


Figure 2: Principaux types structuraux des alcaloïdes.

Le rôle des alcaloïdes :

Ils ont une grande activité pharmacologique. Bien que beaucoup d'entre eux soient utilisés pour leurs qualités analgésiques (comme la morphine et la codéine), ils sont également utilisés à d'autres fins. Les traitements sédatifs (anesthésie, atropine) sont fréquemment accompagnés d'agents antipaludéens (Quinine, chloroquinine) ou d'agents secondaires (hypnotiques). Certains médicaments anticancéreux (Taxol, vinblastine et vincristine) sont néanmoins toxiques (Zenk et Jueng, 2007).

II.2.2. Les composés phénoliques :

Le terme "polyphénols" est fréquemment utilisé dans le langage courant, ainsi que dans les articles scientifiques et de vulgarisation, pour désigner l'ensemble des composés phénoliques végétaux. En réalité, il devrait être réservé aux seules molécules présentant plusieurs fonctions phénoliques. Par conséquent, les monophénols, malgré leur abondance et importance chez les végétaux, seraient exclus. Le terme "composés phénoliques" concerne à la fois les mono, di et polyphénols dont les molécules contiennent respectivement une, deux ou plusieurs fonctions phénoliques (Hattenswiller et Vitousek, 2000).

Les polyphénols comportent plusieurs groupements phénoliques, avec ou sans autres fonctions (alcoolique (OH), carboxylique (COOH), etc.). Ces composés, qui sont divisés en non- flavonoïdes et flavonoïdes, présentent une large gamme de structures. La première classe est représentée par les acides phénoliques, qui comprennent les acides benzoïques (acide gallique) (Seyoum et *al.*, 2006).

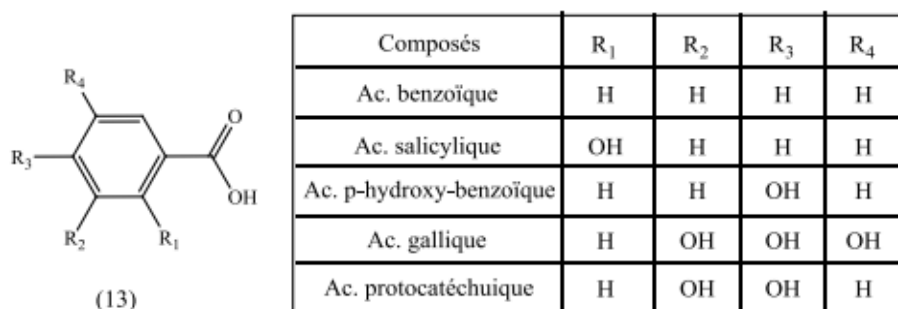


Figure 3:Formule générale des dérivés de l'acide benzoïque.

La deuxième classe est constituée d'un noyau phénolique avec une chaîne latérale insaturée en C3 (acide caféique). La dernière classe est basée sur un squelette C6-C3-C6 (catéchine), et elle est constituée de nombreux groupes qui se distinguent par le degré d'oxydation de l'hétérocycle C3 central.

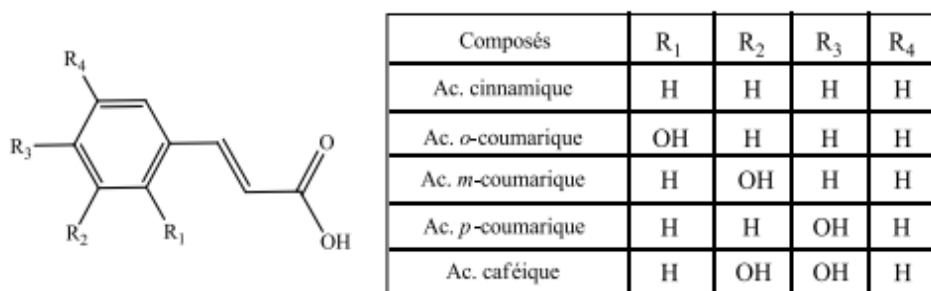


Figure 4: Formule générale des dérivés de l'acide cinnamique.

Différentes classes de polyphénols peuvent être distinguées, d'une part sur la base du nombre d'atomes constitutifs et d'autre part en se basant sur la structure du squelette de base. Deux grandes catégories existent : les flavonoïdes et les tanins.

Les flavonoïdes sont connus sous le nom de vitamine P (P est la première lettre du mot perméabilité) car ils sont efficaces pour normaliser la perméabilité vasculaire (Nijveldt et *al.*, 2001). Ils contiennent une très large gamme de composés naturels appartenant à la famille des polyphénols (Seyoum et *al.*, 2006), qui sont considérés comme des pigments quasi universels des végétaux, en partie responsables de la coloration des fleurs, des fruits et parfois des feuilles (Guignard, 1996 ; Medic et *al.*, 2003). A l'état naturel, les flavonoïdes se retrouvent le plus souvent sous forme d'hétérosides. (Bruneton, 1999 ; Ghestem et *al.*, 2001).

Les flavonoïdes peuvent être subdivisés en plusieurs catégories dont les plus importantes sont : les flavones, les isoflavandiols, les flavonols, les flavondiols, les aurones, les chalcones, et les anthocyanins (EffendiI et Yajun, 2008).

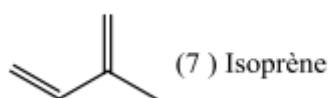
Les tanins sont des substances polyphénoliques hydrosolubles aux structures variées, de saveur astringente (Hurabielle, 1981), produites naturellement par les plantes, aux propriétés qui transforment la peau fraîche en un matériau imputrescible : le cuir. Cette propriété de tannage provient de la liaison entre les molécules de tanin et les fibres de collagène de la peau, et leur capacité à lier les macromolécules (protéines, polysaccharides, etc.) et d'autres polymères organiques (tels que les glucides, les acides nucléiques, la gélatine, les stéroïdes et des alcaloïdes) pour former un précipité (Bruneton, 1999).

Rôle et intérêt des composés phénoliques :

Les composés phénoliques peuvent être impliqués dans certains aspects de la physiologie de la plante (lignification, régulation de la croissance, interactions moléculaires avec certains microorganismes symbiotiques ou parasites...), ainsi que l'interactions des plantes avec leur environnement biologique et physique (relations avec les champignons, les bactéries, insectes et résistance aux UV) (Fleuriet et *al.*, 2005).

II.2.3. Les terpènes :

Représente un type d'hydrocarbure produit par une variété de plantes, en particulier les conifères ; ce sont les principaux composants de la résine et de l'essence de térébenthine. Les terpènes sont des dérivés de l'isoprène C₅H₈ (7) et ont pour formule de base des multiples de (C₅H₈). On pourrait considérer l'isoprène comme l'un des matériaux de construction préférés de la nature. Leur squelette carboné est constitué d'unités isopréniques interconnectées. Ces squelettes peuvent être disposés selon un motif linéaire ou utilisés pour créer des cycles (Beaulieu et Baldwin, 2002 ; Kabera, et *al.*, 2014).



En fonction du nombre n d'unités, on peut distinguer : n = 2 : monoterpènes (C₁₀), n = 3 : sesquiterpènes (C₁₅), n = 4 : diterpènes (C₂₀), n = 5 : sesterpènes (C₂₅), n = 6 : triterpènes (C₃₀).

Le rôle des terpènes :

Les terpènes sont largement utilisés dans les domaines thérapeutiques comme antiviraux et antimicrobiens. De plus, ils sont utilisés dans l'industrie des parfums et des épices (Beaulieu et Baldwin, 2002 ; Kabera et *al.*, 2014).

II.3. Métabolites secondaires de la pervenche de Madagascar :

Catharanthus roseus contient une large gamme de composés phytochimiques dans ses différentes parties (Tableau 2) (Monokesh et al., 2013). Les alcaloïdes indoliques terpénoïdes (AITs) se trouvent principalement dans les feuilles et les racines des plantes (Tableau 2).

Ils sont représentés par plus de 130 molécules, notamment la vinblastine et la vincristine (Figure 5), ainsi que la leurosine, la vincadioline, la leurosidine, la catharanthine, l'ajmalicine, la réserpine, la serpentine, la tabersonine, la lochnérine, la vindoline, la vindolidine, la vindolicine, la vindolinine et la perivine (Usia et al., 2005 ; Zhong, 2010 ; Wang et al., 2011 ; Kaushik et al., 2017). Ces AITs possèdent une valeur en raison de leur intérêt pharmaceutique, mais aussi un impact économique important (Monokesh et al., 2013).

On trouve dans les parties aériennes de la pervenche des flavonodes et des polyphénols, principalement des glycosides de flavonol (di- et trisaccharides de kaempférol, quercétine, glycosides d'anthocyanidine et isorhamnetine) (Voukeng et al., 2016 ; Akbar, 2020), connus pour leurs propriétés antioxydantes (Ferrerres et al., 2008). Des tanins, des phlorotanines, des triterpénoïdes, des sucres réducteurs, des anthraquinones et des stéroïls sont également présents dans les feuilles de cette plante (Ohadoma et Michael, 2011).

Tableau 2: Principes actifs de *Catharanthus roseus* (Monokesh et al., 2013).

Partie de la plante	Principes actifs
Plante entière	Vinblastine, Vincristine, Catharanthine, Vindoline, monoterpénoïdes glycosidiques, Stéroïdes, composés phénoliques, flavonoïdes, 7-O-methylated anthocyanin
Tige	Alcaloïdes, Carbohydrates, flavonoïdes, Tanins, Stéroïdes
Fleur	Alcaloïdes, Carbohydrates, Saponins, Tanins, Stéroïdes
Racines	Alcaloïdes, Carbohydrates, Saponins, flavonoïdes, Tanins, Stéroïdes, triterpénoïdes, Ajmalicine, Serpentine
Feuille	Alcaloïdes, Carbohydrates, Vinblastine, Vincristine, Saponins, flavonoïdes, Tanins, Stéroïdes, triterpénoïdes, chlorogenic acid, loganic acid, secologanin, Vindoline.

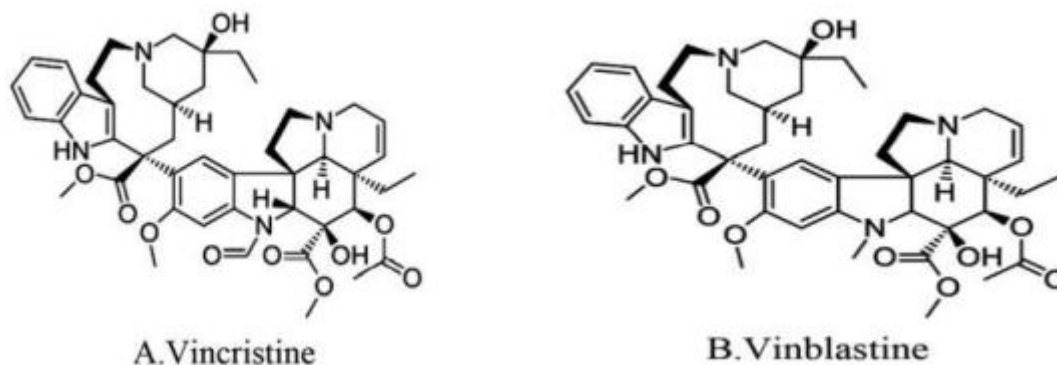


Figure 5: Structure de la vincristine et la vinblastine (Alam et al., 2017).

II.4. Elicitation des cellules végétales pour la production de métabolites secondaires :

II.4.1. Éliciteurs et élicitation :

Les éliciteurs, également connus sous le nom de stimulateurs des défenses naturelles (SDN) ou, plus récemment, de stimulateurs des défenses des plantes (SDP), ont un large éventail d'effets sur une variété de maladies et, dans certains cas, favorisent la tolérance au stress climatique (ex. : stress hydrique). C'est un produit chimique qui, lorsqu'il est introduit en faible quantité dans un système cellulaire vivant, provoque une réponse par un déclenchement ou une amélioration de la biosynthèse de composés spécifiques. L'élicitation consiste à stimuler ou à améliorer la biosynthèse de métabolites par l'ajout de grandes quantités de substances métabolites après l'ajout de traces d'éliciteurs (Montesano et al., 2003).

II.4.2. Classification des éliciteurs :

Les éliciteurs peuvent être classés sur la base de leur « nature » comme les éliciteurs abiotiques ou les éliciteurs biotiques, ou sur la base de leur « origine » comme les éliciteurs exogènes et les éliciteurs endogènes (Veersham, 2004).

a. Eliciteurs biotiques et abiotiques

Les éliciteurs abiotiques sont des substances d'origine non biologique, principalement des sels inorganiques, et des facteurs physiques agissant comme éliciteurs dont les ions Cu, Cd, Ca²⁺ et le pH élevé. Les « éliciteurs biotiques », quant à eux, sont des substances d'origine biologique, ils comprennent des polysaccharides dérivés des parois cellulaires des plantes (pectine ou cellulose), des micro-organismes (chitine ou glucanes) et glycoprotéines ou protéines G ou protéines intracellulaires dont les fonctions sont couplées à des récepteurs et

agissent en activant ou inactivant un certain nombre d'enzymes ou de canaux ioniques (Veersham, 2004).

b. Eliciteurs endogènes et exogènes

Les éliciteurs endogènes sont originaires de la plante hôte à la suite de son interaction avec l'agresseur, ces éliciteurs jouent un rôle important dans le système de transduction du signal intracellulaire (Eder and Cosio, 1994 ; Wang and Wu, 2013).

Parmi les éliciteurs endogènes les mieux caractérisés on trouve les oligosaccharides pectiques libérés des parois cellulaires des plantes et les molécules signales de réactions de défense des plantes, tels que la systémine, l'acide salicylique (AS), l'éthylène (ET), l'acide abscissique (ABA), l'acide jasmonique (AJ), et le méthyle jasmonate (MeJa) (Pitta-Alvarez *et al.*, 2000 ; Wang and Wu, 2013 ; Giri and Zaheer, 2016). Cependant, les éliciteurs exogènes proviennent de l'agent pathogène, la plupart des champignons et des bactéries, et certains virus et insectes (Pitta-Alvarez *et al.* 2000).

Tableau 3: Classification des éliciteurs pour la production de métabolites secondaires.

A) Nature de l'éliciteur	
Éliciteurs biotiques	Éliciteurs abiotiques
<ul style="list-style-type: none"> -Directement libérés par les micro-organismes et reconnus par la cellule végétale (enzymes, fragments de paroi cellulaire) - Formés par l'action des microorganismes sur la paroi cellulaire végétale (fragments de pectines, etc.) -Formés par l'action des enzymes végétales sur les parois cellulaires microbiennes (chitosan, glucanes) - Composés, de nature endogène et constitutive, formés ou libérés par la cellule végétale. en réponse à divers stimuli. 	<ul style="list-style-type: none"> - De nature physique ou chimique, agissant par l'intermédiaire d'éliciteurs biotiques formés de manière endogène. - Lumière UV -Effet d'aubaine - Protéines dénaturées (RNase) -Cycles de congélation et de décongélation -Composants non essentiels des milieux (agarose, étain, etc.) -Métaux lourds -Produits chimiques - Avec une forte affinité pour l'ADN - Avec des activités de destruction de la membrane comme les détergents :xénobiochimiques. - Fongicides (Maneb, Butylamine. Benomyl) -Herbicides (Acifluorofen)

B) Origine de l'éliciteur

Les éliciteurs exogènes	Eliciteurs endogènes
<ul style="list-style-type: none"> - provenant de l'extérieur de la cellule, y compris la réaction immédiate ou via des médiateurs endogènes -Polysaccharides : Glucomannose, Glucanes, Chitosan. -Peptides sous forme de poly cations : Monilicoline, Poly-L-lysine, Polyamines, Glycoprotéines. -En tant qu'enzymes : Polygalacturonase, acide endo-polygalacturonique lyase, Cellulase. -Acides gras : acide arachidonique, acide eicosapentanoïque. 	<ul style="list-style-type: none"> -Formés par des réactions secondaires induites par un signal de nature biotique ou abiotique dans la cellule - dodéca-β-1,4-D-galacturonide - hepta-β-glucosides -oligomères d'alginate

II.4.3. Caractéristiques des éliciteurs :

La génération accrue de métabolites secondaires à partir de cultures de cellules végétales par élicitation a ouvert un nouveau domaine de recherche qui pourrait avoir des implications économiques significatives.

Plusieurs facteurs tels que la concentration et la sélectivité de l'éliciteur, la durée d'exposition à l'éliciteur, l'âge de la culture, la lignée cellulaire, les régulateurs de croissance, et la teneur en nutriments jouent un rôle important dans l'efficacité de l'élicitation (Namdeo *et al.* 2007).

Lors de l'élicitation de la cellule de *Catharanthus roseus*, certains de ces facteurs ont été mis en évidence pour la production de composés actifs.

a. Concentration de l'éliciteur :

La concentration des éliciteurs est hautement essentielle dans la procédure de l'élicitation. Namdeo *et al.* ont rapporté une plus grande quantité d'ajmalicine dans des cultures de *C. roseus* traitées avec différentes concentrations d'extraits.

L'accumulation d'ajmalicine était plus élevée dans les cellules traitées avec un extrait d'éliciteurs (5,0 %) par rapport à une concentration plus faible (0,5 %). Cependant, l'augmentation de la concentration jusqu'à 10,0 % a eu un effet négatif sur l'accumulation

d'ajmalicine. Une dose élevée d'éliciteur provoquait une hypersensibilité et la mort cellulaire, alors qu'une quantité optimale était nécessaire à la survie des cellules (Wang and Wu, 2013).

b. La perception du signal éliciteur :

La détection d'un signal éliciteur par un récepteur spécifique est une condition préalable à l'initiation d'une série d'événements conduisant à la stimulation des gènes de défense. Cependant, ce n'est qu'au cours de la dernière décennie que plusieurs découvertes fondamentales ont permis un examen détaillé de la structure et de la fonction de plusieurs récepteurs de haute affinité (Eder and Cosio, 1994; Wang and Wu, 2013).

Par conséquent, la détection d'un agent pathogène semble être inextricablement liée à la présence de plusieurs récepteurs protéiques en différentes catégories. Les récepteurs membranaires (receptor-like proteins, ou RLPs) et les récepteurs kinases (receptor-like kinase, ou RLKs) sont deux de ces catégories. Deux autres classes incluent les récepteurs intracytoplasmiques possédant un domaine LRR (Leucine-Rich-Repeats) et un domaine NB (Nucleotide Binding), c'est-à-dire un domaine qui permet la fixation des nucléotides. Pattern Recognition Receptors, ou PRRs, sont le nom collectif de tous ces récepteurs aujourd'hui. Les plantes, en général, possèdent un grand nombre de récepteurs qui reconnaissent des motifs moléculaires spécifiques associés aux éliciteurs. Tous les micro-organismes produisent ces motifs, qui sont appelés Pathogen-Associated Molecular Patterns, ou PAMPs (Yu *et al.*, 2016).

Les plantes ont développé un système sophistiqué de transduction des signaux à la suite de cette interaction éliciteur-récepteur. Ce système très complexe est constitué de voies de signalisation qui s'interconnectent pour se renforcer ou, au contraire, s'inhiber mutuellement (Vinale *et al.*, 2008).

c. Age de la culture

Le moment de l'application de l'éliciteur est un autre facteur important pour la production des métabolites secondaires. En effet, l'élicitation pendant la phase de croissance accélérée (la phase exponentielle), est généralement la plus favorable. Alors que l'élicitation précoce (pendant la phase de latence) peut arrêter la croissance de la biomasse et l'élicitation tardive (pendant la phase stationnaire) ne permettrait pas un contact suffisant entre l'éliciteur et la culture. (Baíza *et al.* 1998; Hernández-Domínguez *et al.*, 2004; Goklany *et al.*, 2009; Harfi *et al.*, 2015).

Selon Shilpa *et al.* (2010) il est possible que les cellules végétales soient plus aptes à activer les voies de biosynthèse des métabolites secondaires à des stades bien définis de leur développement.

II.4.4. La réponse de la plante au signal éliciteur :

L'arsenal défensif de la plante comprend un large éventail de molécules, dont certaines agissent pour renforcer les défenses de la plante afin de ralentir la propagation des agents pathogènes, tandis que d'autres, comme les phytoalexines et certaines des protéines de stress, ont un rôle antimicrobien direct (Glick, 1995).

a. Les barrières structurales :

Les plantes développent des barrières structurelles en réponse à une infection par un agent pathogène dans le but de renforcer la paroi et de la rendre imperméable à la propagation des substances délétères produites par l'agent pathogène (enzymes hydrolytiques, toxines, antibiotiques). Ainsi, la plante va renforcer sa barrière externe afin de ralentir la progression de l'agent pathogène, ce qui inclut une large gamme de molécules antimicrobiennes. La création de papilles et, plus largement, d'appositions pariétales est un phénomène courant dans diverses interactions plantes-microorganismes (Vinale *et al.*, 2008).

D'autres réponses structurelles comprennent l'occlusion des espaces intercellulaires par des substances riches en composés phénoliques et la création de barrières vasculaires telles que des gels pectiques, des thylles (excroissances cellulaires) et un tapissage phénolique polymérisé de l'intérieur des vaisseaux du xylème (Glick, 1995).

b. Les barrières chimiques :

En plus de renforcer son architecture défensive, la cellule végétale alertée va produire une série de molécules chimiques aux propriétés antimicrobiennes. Ces molécules produites de manière séquentielle agissent en synergie pour offrir à la plante une défense efficace et durable contre les attaques microbiennes. Parmi ces molécules, on peut citer les phytoalexines et les inhibiteurs de protéases (Vinale *et al.*, 2008).

III. Généralité sur la culture *in vitro*

III.1. Définition

La culture *in vitro* de plantes sont des cultures d'explants de plantes, de cellules sur un milieu nutritif artificiel, en conditions stériles, dans un environnement contrôlé et dans un espace réduit. C'est donc une méthode pour maintenir et cultiver indéfiniment des plantes sur des milieux nutritifs artificiels (Zryd, 1988).

Les techniques de culture *in vitro* doivent toutes leur extension au premier principe de la propagation des végétaux : la totipotence, dont les cellules indifférenciées sont capables de se développer en plante entière. Concept énoncé par Haberland en 1902, est à l'origine même du fondement de la culture *in vitro* (Auge et *al.*, 1989).

III.2. La totipotence

La théorie omnipotente d'Haberland mise en avant en 1902 a été valorisée et renversée par Steward (1967). La théorie est basée sur le fait que toutes les informations génétiques et donc le processus d'embryogenèse sont présents dans le noyau de chaque cellule vivante (Norrel, 1973). Les tissus ou cellules dédifférenciés peuvent évoluer dans n'importe quelle direction qui peut montrer la pluri potence des cellules végétales. Cette totipotence des cellules végétales se retrouve également au niveau des cellules germinales : grains de pollen ou ovules.

III.3. Facteurs influents la culture *in vitro*

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

- ✓ Les facteurs internes, liés à la plante : concerne d'une part le génotype, la nature et l'âge ontogénique de l'explant et d'autre part l'état physiologique de la plante mère sur laquelle, l'explant a été prélevé.
- ✓ Les facteurs externes qui englobent, les milieux de cultures (notamment leur composition en régulateurs de croissance et les sucres) et les conditions de la mise en culture (Saadi et Hamdani, 2007).

III.3.1. Effet de l'explant :

L'effet de l'explant dans la culture *in vitro* est la réponse physiologique et morphologique des tissus ou organes végétaux prélevés et cultivés *in vitro*. La réponse dépend de facteurs tels que l'espèce, le type d'explant, le milieu de culture, les hormones et les conditions de culture. La culture *in vitro* peut être utilisée pour la production de plantes génétiquement identiques ou résistantes à des stress environnementaux. Le processus peut être utilisé pour la multiplication végétative ou le clonage. C'est un processus complexe qui permet la régénération de nouveaux tissus et organes. (Saadi et Hamdani, 2007).

III.3.2. L'âge physiologique et ontogénique de l'organe :

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

III.3.3. L'époque du prélèvement :

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

III.3.4. La taille de l'explant

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

III.3.5. Effet du génotype :

La plupart des plantes présentent une régénération génotypique spécifique des espèces. Au sein de la même espèce, un génotype produira des bourgeons, et l'autre ne peut fournir que des embryons (Boxus, 1995). Cependant, quelques auteurs mentionnent que seuls certains génotypes semblent avoir cette capacité à induire l'embryogenèse somatique. Dans de nombreuses espèces, cette capacité semble être sous contrôle génotypique (Vidalis *et al.*, 1985 ; Isac *et al.*, 1994 ; Caraglio, 2012).

III.3.6. La lumière :

La photosynthèse n'est pas une activité essentielle chez les plantes cultivées *in vitro* puisque l'énergie est fournie par les glucides intermédiaires. Cependant, même si la réduction de la photosynthèse persiste dans les tissus, la lumière est essentielle pour déclencher et assurer le bon déroulement de certains processus morphogénétiques. L'intensité lumineuse à fournir dépend de la durée de l'éclairage et la qualité spectrale de la lumière reçue par la culture ; il faut de longues journées afin d'obtenir des boutons floraux, par exemple (Vidalis *et al.*, 1985).

III.3.7. La température :

La température est généralement régulée à 20/25°C en continu. Il ne faut pas négliger que la température dans les flacons de cultures peut être supérieure de 2 à 4°C à la température de la pièce à cause de l'éclairage (Caraglio, 2012).

III.3.8. L'hygrométrie :

Elle doit atteindre les 100% d'humidité relative dans les flacons. Cependant, il faut veiller à ne pas noyer les explants par un excès de condensation à la surface du milieu (Caraglio, 2012).

III.4. La Micropropagation

La micropropagation est utilisée dans un but de multiplication en masse, puisqu'elle permet, en partant d'un seul individu (Plant), l'obtention d'un nombre considérable de plantes génétiquement identiques à la plante mère (Ferry *et al.*, 1998 ; Semal, 1998).

Elle est aussi appelée clonage végétal. Les plants reproduits ne sont pas seulement conformes mais présentent aussi une grande uniformité. Le principe consiste à prélever un explant à partir de la plante, et le cultiver en conditions aseptiques sur milieu de culture, et dont le rôle est de provoquer soit le développement de bourgeons préexistants, soit la néoformation

de bourgeons ou d'embryons somatiques, qui, une fois repiqués, pourront donner une plante entière (Auge *et al.*, 1989).

Les techniques de micro propagation empruntent essentiellement deux voies:

- L'une qui utilise des tissus méristématiques (méristème ou apex de tige, bourgeons axillaires) potentiellement capable de donner suite, au développement normal, d'un individu est appelée microbouturage l'individu est généralement obtenu en deux étapes successives, d'abord la production de tige, puis son enracinement (Saadi, 1991).
- L'autre voie, utilise toutes sortes de tissus différenciés (fragments de tige, de racines, de pétiole, de feuilles, d'embryons matures et immatures, d'hypocotyles, de cotylédons...etc.) pour aboutir à la néoformation soit des tiges (caulogénèse) et de racines (Rhizogénèse), soit des embryons somatiques (Zryd, 1988 ; Margara, 1989).

III.4.1. Organogénèse directe

L'organogénèse directe fait référence à l'induction d'organes (pousses et racines) *in vitro* directement à partir de tissu explanté contenant du tissu indifférencié (méristème) (Su et Zhang, 2014 ; A. Das et al., 2020).

III.4.2. Organogénèse indirecte

L'organogénèse indirecte est la formation d'un organe à partir de cals, qui est un amas de cellules indifférenciées (Su et Zhang, 2014 ; A. Das et al., 2020). L'organogénèse indirecte peut reproduire un nouveau tissu et aboutit à la formation d'un nouvel individu par l'élaboration des bourgeons (caulogénèse) et des racines (rhizogénèse) (Su et Zhang, 2014).

L'organogénèse indirecte présente plusieurs avantages par rapport à l'organogénèse directe à partir d'un méristème prédéterminé, parmi ces avantages ; l'étude de la biologie du développement (Ikeuchi et al., 2016) et / ou l'obtention d'une variation somaclonale (Krishna et al., 2016).

III.4.2.1. Caulogénèse :

La caulogénèse désigne à la fois l'initiation et le développement des bourgeons terminaux, axillaires, adventifs ou néoformés sur un cal ou un explant initial. Ces bourgeons sont induits sur n'importe quel type d'organe ou de tissu y compris sur ceux qui ne les produisent pas dans les conditions naturelles (Belabbas, 2011).

Les études cytologiques, conduites dans le but de déterminer l'origine des bourgeons néoformés, à partir d'un fragment d'organe contenant divers tissus, montrent souvent que l'aptitude à la caulogénèse se manifeste à partir de certaines catégories de tissus telle que : le cambium, le parenchyme vasculaire ou libérien (Zryd, 1988).

III.4.2.2. La rhizogénèse :

La rhizogénèse désigne la formation des racines. Elle comporte différentes phases: la dédifférenciation, formation d'amas de cellules méristématiques, différenciation et organisation des amas méristématiques en primordium racinaire, qui se développeront en jeunes racines. Les méristèmes de racines se répartissent en plusieurs catégories selon leurs origines (Boxus et Bercetche, 1995).

III.4.2.3. Callogénèse :

Le développement d'un cal à partir d'un tissu passent par trois étapes : l'induction ; la division de cellules et la dédifférenciation (Dodds et Roberts, 1985; R. H. Smith, 2012).

Tous les types d'organes (feuilles, racines, tiges) peu différenciés peuvent être utilisés comme matières premières. De plus, le cal peut être divisé et propagé par sous-culture continue avant qu'un traitement hormonale appropriée ne permet une nouvelle différenciation (Dodds et Roberts, 1985; R. H. Smith, 2012).

a. Facteurs influençant la callogénèse

Les facteurs qui influencent la formation des cals sont très complexes et divers, y compris la nature et l'état physiologique des explants qui sont considérés comme des facteurs intrinsèques, ainsi que la balance hormonale qui est considérée comme facteurs extrinsèques (Robert et *al*, 1998).

Facteurs intrinsèques :

Selon Nozeran (1985), les explants cultivés *in vitro* ont des fonctions différentes. Ainsi, selon Auge (1989), les tissus les plus réactifs, à la callogénèse, sont les tissus épidermiques et les tissus corticaux ou cambiaux qui présentent également de bonnes réactions.

De plus, selon Zryd, (1988), les explants de jeunes plantes donnent de meilleurs résultats de callogénèse comparant à ceux prélevés sur les individus âgés selon Zryd (1988).

Facteurs extrinsèques (balance hormonale) :

Les méthodes de culture *in vitro* permettent de diriger la morphogénèse des organes, en utilisant deux types de régulateurs, les auxines et les cytokinines (Margara, 1989). L'équilibre relatif de ces deux phytohormones (balance hormonale) dans le milieu de culture est spécifique selon le type d'organe à induire (Robert et *al.*, 1998).

Les types et les concentrations de régulateurs de croissance incluse dans le milieu de culture déterminent, en grande partie, le succès de toutes cultures de tissu. Le processus de différenciation et de dédifférenciation des cellules est étroitement réglé par les concentrations relatives en auxines et en cytokinines dans le milieu (Figure 6) (Rout et *al.*, 2000).

- ✓ Si le rapport auxine sur cytokinine (R) est élevé ($R > 1$), on obtiendra un fonctionnement rhizogène.
- ✓ Si le rapport (R) est voisin de l'unité ($R = 1$), on aura un comportement callogène.
- ✓ Si le rapport est faible ($R < 1$), on obtiendra un fonctionnement caulogène.

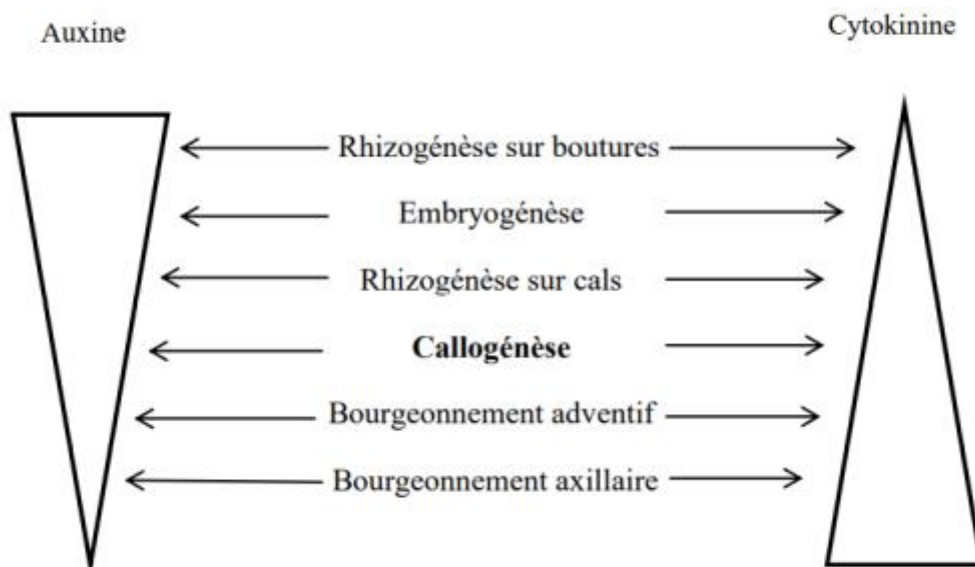


Figure 6: Différents types d'organogénèse contrôlés par les concentrations relatives d'auxine et de cytokinine dans les milieux de cultures (Zryd, 1988).

b. Caractéristiques des cals :

Le cal se caractérise par une croissance active ou lente et peut avoir une structure homogène ou nodulaire plus ou moins dissociée (fragile) ou compacte, incolore ou plus rarement chlorophyllienne ou anthocyane (Margara, 1989).

On peut distinguer deux types cals :

Des cals embryogènes: Elle se caractérise par la formation d'embryons somatiques. Grâce à plusieurs études de culture *in vitro* citées par Zryd, (1988) et Margara, (1989), il a été montré que les cellules somatiques (avec 2n chromosomes) peuvent produire des structures comparables à des embryons zygotiques. Selon Robert et *al.* (1998), les embryons somatiques sont des ensembles pluricellulaires bipolaires aptes à régénérer des plantules.

Des cals morphogènes : ce sont des cals à croissance rapide en donnant naissance dans certains cas à des néoformations (tiges, racines), On dit que les bourgeons et les racines sont régénérés lorsqu'ils se développent sur le cal (Jaiwal et Singh, 2013).

c . Intérêt de la callogénèse :

La formation des cals est une étape essentielle de la sélection *in vitro* en raison de la variation somaclonale (variation génétique) qui peut se produire lors de la division cellulaire des cals (Mzouri et *al.*, 2001).

Selon Robert et *al.* (1998) deux voies d'évolution du cal sont possibles, soit la conservation par fractionnement en éléments plus petits transplantés dans un nouveau milieu, soit la multiplication végétative par néoformation d'organes ou d'embryons.

Selon Ducreux et *al.* (1986), le cal fragile à croissance rapide est utilisé pour obtenir des cellules isolées (protoplastes) ou des embryons somatiques, tandis que le cal compact à croissance lente sont capables de donner des plantes entières.

Matériel et méthodes

Chapitre II : Matériel et méthodes

L'étude a été menée au Laboratoire des Ressources Génétiques et Biotechnologies (L-RGB) à l'Ecole Nationale Supérieure Agronomique (ENSA), El Harrach, Alger, Algérie.

I. Objectif du travail

L'objectif principal de ce travail est d'améliorer la croissance des tissus végétaux et donc optimiser la production de biomasse et de métabolites secondaires *in vitro* chez *Catharanthus roseus*. A cet effet, nous avons testé l'effet d'un éliciteur abiotique, à différentes concentrations, sur le développement et la croissance des cals.

II.1 Matériels

II.1.1 Instruments et équipements utilisés

- Tubes à essai
- Boîtes de pétri
- Erlenmeyer
- Distillateur
- Balance de précision
- pH mètre
- Agitateur
- Plaque chauffante
- Etuve
- Autoclave
- Hôte à flux laminaire

II.1.2. Matériel végétal

Le matériel végétal de départ utilisé pour l'induction de la callogenèse est constitué de graines matures de *Catharanthus roseus* (L.) G., appartenant à la variété Cooler blush, aux fleurs de couleur rose.

II.2 Méthodes

II.2.1 Obtention des vitro semis

II.2.1.1. Désinfection des graines

La désinfection des graines de *C. roseus* (Cooler blush) est effectuée selon la méthode préconisée par Khelifi-Slaoui et al. (2005). Les graines non scarifiées sont désinfectées suite à leur passage dans l'éthanol à 70° pendant 30 secondes et un trempage dans de l'hypochlorite de sodium à 12° pendant 10 minutes. La désinfection est suivie de trois rinçages à l'eau distillée stérile et un séchage sur du papier filtre stérile.

II.2.1.2. Mise en culture *in vitro*

Dans le but d'étudier l'effet de l'imbibition sur le taux de germination des graines, une partie des graines désinfectées sont imbibées dans l'eau distillée stérile pendant 24 heures ; le reste des graines sont mise en culture directement sans imbibition. L'ensemble des graines, imbibées et non imbibées, sont ensemencées directement dans des tubes contenant environ 20 ml de milieu de culture MS (Murashige Et Skoog, 1962) (annexe1), préalablement stérilisé par autoclavage à 120 °C pendant 20 minutes, et additionne de 7 g/l d'agar et de 20 g/l de saccharose. Les tubes sont placés dans la chambre de culture à une température de 26±1 C° et une photopériode de 16 heures lumière et 8h obscurité.

II.2.2. Induction de cals

Après trois semaines de culture, les feuilles et les tiges des vitroplants obtenus sont découpés, à raison d'un centimètre pour chaque explant, et placés sur le milieu de culture MS additionné de 20 g/l de saccharose, 7g/ l d'Agar et différentes combinaisons hormonales de types 6-Benzylaminopurine (BAP), acide naphthalène acétique (ANA) et 2,4-D (Tableau) choisies selon plusieurs protocoles de régénération (Choi et al., 2004; He-Ping et al., 2011; Mehrotra et al., 2013; Habibi et al., 2016). Le même protocole est appliqué pour préparer l'explant racines en utilisant les chevelus racinaires obtenues par Semaili (2020). Le pH du milieu est ajusté à 5.6-5.8.

Pour chaque traitement hormonal, environ 45 cals sont mises en culture puis incubées à une température de 25 ± 2 °C sous une photopériode de 16 heures par jour. Les contaminations sont éliminées chaque fois qu'elles apparaissent.

Tableau 4: Les différentes balances hormonales testées pour l'induction de la callogénèse à partir de vitro-semis et de chevelus racinaires.

Milieux	2,4 -D (mg/L)	ANA (mg/L)	BAP (mg/L)
M0	0	0	0
M1	1	0.25	0.5
M2	0.5	0	0.25
M3	1	0	0.5
M4	0	1	0.5

Pour chaque traitement, des observations ont été réalisés pendant 3 semaines afin d'évaluer les paramètres suivants :

- Le taux de callogénèse induit, qui est le rapport du nombre d'explants callogènes sur le nombre total d'explants.
- Le rapport du nombre d'explants bruns ou morts sur le nombre total d'explants, appelé taux de brunissement et de nécrose.
- La texture des cals

II.2.3. Multiplication des cals

Les cals obtenues suite à la callogénèse sont multipliés chaque moi. Chaque cal est découpée en plusieurs fragments de 1cm puis déposés sur le milieu de culture MS additionné de 20 g/l de saccharose et 7g d'agar. Deux balances hormonales différentes sont utilisées pour maintenir et multiplier les cals: l'une composée de BAP seul (0.5mg/l) et le l'autre renferme une combinaison de BAP (0.5mg/l) et de l'ANA (1mg/l). Le pH est ajusté à 5,6 – 5,8. Une fois le milieu de culture est stérilisé par autoclavage à 120°C, sous une pression de 1 bar pendant 20 minutes, le milieu est coulé dans des boites de pétri de 9 cm de diamètre, à raison de 20 ml par boîte. Les cultures sont déposées dans la chambre de culture à une température de 25± 2 °C avec une photopériode de 16 heures.

II.2.4. Elicitation des cals

Afin d'étudier l'effet de l'élicitation sur la biomasse des cals, nous avons utilisé un éliciteur abiotique le Chitosan à différentes concentrations. L'effet du sucre rajouté au milieu de culture a également été déterminé en employant le sucrose ou bien le fructose comme source de carbone.

II.2.4.1. Préparation de l'éliciteur

L'éliciteur abiotique employé au cours de cette étude est le Chitosan (Annexe). La poudre du produit a été dissoute dans l'acide acétique à 1% afin de préparer une solution mère de 100mg/ml. Cette dernière a été utilisée pour la préparation des différents milieux de culture en prélevant le volume adéquat.

Une première élicitation a été effectuée sur milieu MS contenant le sucrose. Environ 25 cals de 200mg de poids frais et 1cm² de surface sont cultivés sur un milieu de culture MS additionné de 0.5mg de BAP, 20g/l de sucrose avec différentes concentrations de Chitosan ; à savoir : 5mg /l, 10mg/l, 20mg /l et 40 mg/l. Le pH du milieu est ajusté à 5,6 – 5,8.

La deuxième élicitation a eu lieu sur le même milieu de culture MS additionné de 0.5mg de BAP, et les mêmes concentrations de Chitosan ; il faut juste substituer le sucrose par le fructose.

Une fois les milieux de culture préparés, ils sont par la suite stérilisés par autoclavage à 120 °C pendant 20 minutes. Les cultures sont incubées à une température de 25 ± 2 °C sous une photopériode de 16 heures par jour. Après 20 jours de culture, les cals ont été récoltés et séchés à 40°C pendant 24 heures. L'effet du Mannitol est évalué sur la base du poids frais et du poids sec des cals qui ont été évalués à l'aide d'une balance de précision ; la surface de cals a été également estimée.

Résultats et interprétations

Chapitre III : Résultats et interprétations

I. Obtention du matériel végétal

I.1 Germination des graines de *C. roseus* :

Dès que la radicule perce le tégument, la graine est considérée comme ayant germée. Nos résultats montrent que les graines de *C. roseus* non scarifiées et imbibées pendant 24 heures ont présenté un taux de germination élevé compris entre 80% et 85% ; les premières germinations apparaissent dès le septième jour de culture. D'autre part, les graines non scarifiées et non imbibées ont mis plus de temps pour germer (9 à 10 jours) avec un taux de germination compris entre 73 et 80 %. En réalité, la scarification n'est pas nécessaire pour la germination des grains de *C. roseus*.



Figure 7: Vitrosemis de *C.roseus* âgés de 60 jours (G=0,66X)

II. Effet du traitement hormonal sur l'induction de la callogenèse

II.1 Taux de callogenèse

L'induction de la callogenèse a été réalisée en utilisant des explants de feuilles, tiges et racines de *C. roseus* âgés de 12 jours. Après 10 jours de culture, les explants ont réagi différemment, certains d'entre eux ont présenté un gonflement total ou partiel. Après trois à quatre semaines, nous avons remarqué des structures de couleur beige pour les feuilles, les tiges et les racines au niveau des explants réactifs (**Figure 8**). Ceci a signalé le début de la

dédifférenciation cellulaire et la formation de cals friables ou compacts. Les explants témoins n'ont présenté aucun changement.

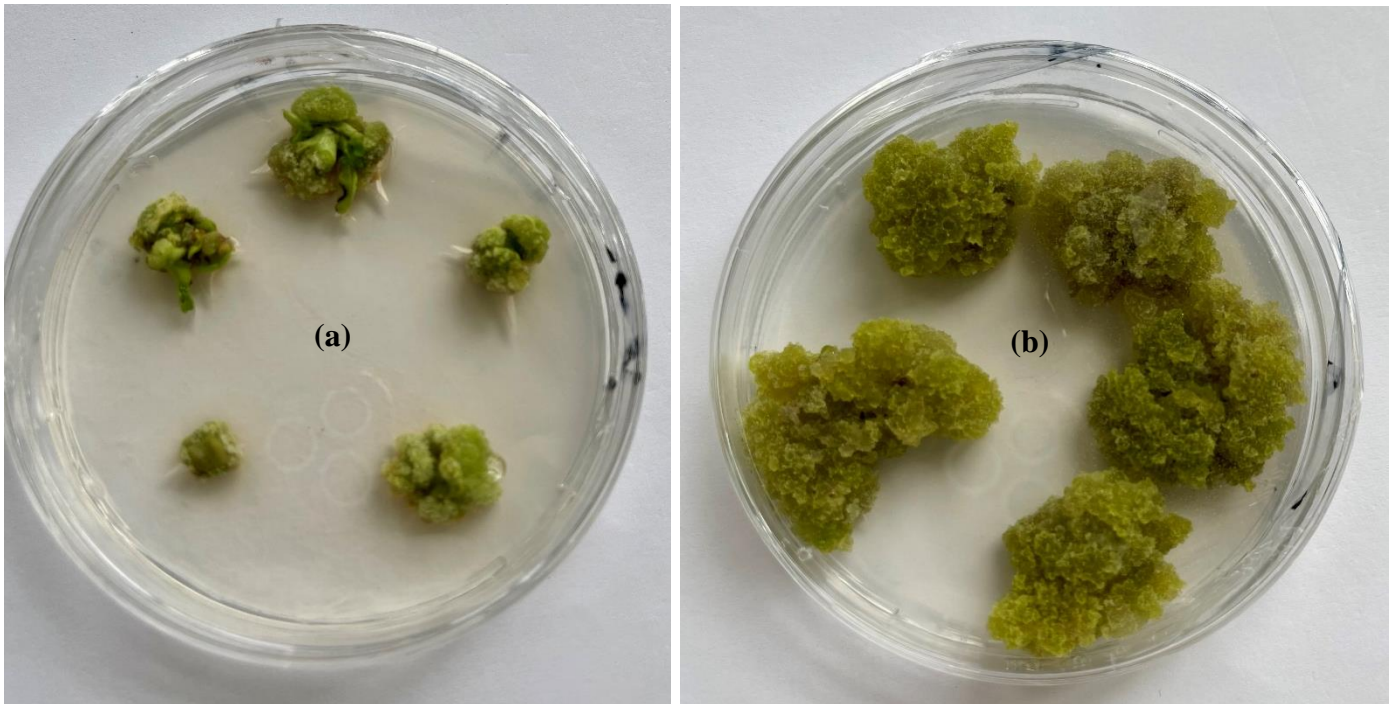


Figure 8: Réactivité des explants de feuilles(b), et de tige(a) mise en culture sur divers milieux de callogenèse après trois semaines (G=0,80X).

D'après les résultats de l'effet des différentes hormones (2,4- D, BAP et ANA) sur la callogenèse des explants, nous avons remarqué une variabilité des réponses des explants par rapport au milieu de culture, selon le type et la concentration des hormones végétales. Selon la **figure 9** qui représente le pourcentage de callogenèse des explants mis en culture, on observe que pour les feuilles et les tiges, les milieux M3 (1 mg/l de 2,4D et 0,5 mg/l de BAP) et M4 (1mg/l d'ANA et 0,5mg/l de BAP) ont induit le meilleur taux de callogenèse (100%). Pour les racines, le meilleur taux de callogenèse (81.81%) est atteint sur le milieu M3.

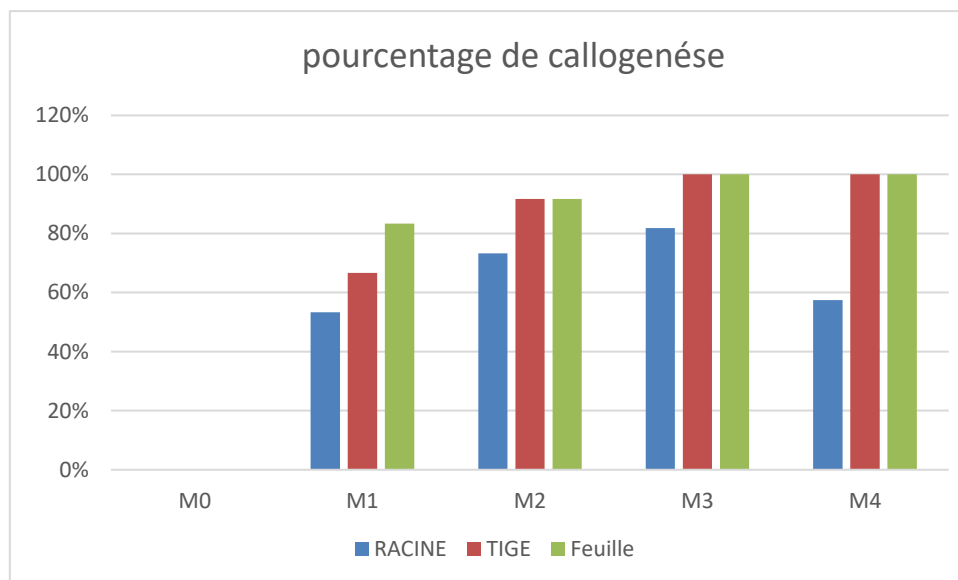


Figure 9: Effet des différentes balances hormonales sur le pourcentage de callogenèse des différents explants (feuilles, tiges et racines) de la pervenche (annexe 1).

II.2 Couleur et texture des cals

Les cals obtenus suite à la callogenèse sont de différentes couleurs et nature en fonction des explants. Dans le cas des feuilles, les cals ont une couleur verte, une forme nodulaire et une consistance compacte (Figure 10), alors que les cals issus des tiges sont de couleur beige, une forme granuleuse et une consistance friable.



Figure 10: Aspect des cals des feuilles de *Catharanthus roseus* sur milieu de MS.

III. Multiplication des cals

Les cals obtenus suite à la callogenèse ont été multipliés sur milieu MS dans des boîtes Petri avec deux traitements hormonaux. Après 4 semaines de culture, nous avons observé une augmentation rapide de la masse des cals sur milieu MS additionné de 0.5mg/l BAP. Pour le

second milieu, à base de 0.5mg/l BAP avec 1mg ANA, le développement des cals été moindre par rapport au premier ; cependant des formations de racines néoformées sont observées.

IV. Elicitation des cals

L'optimisation de la masse des cals par l'utilisation de l'éliciteur biotique, le Chitosan, a été évaluée en mesurant le poids frais, le poids sec et la surface des cals pour les différents traitements étudiés. Un témoin négatif sans éliciteur a été également utilisé.

V. Milieu à base de fructose

V.1.1. Effet de l'élicitation sur le poids frais des cals

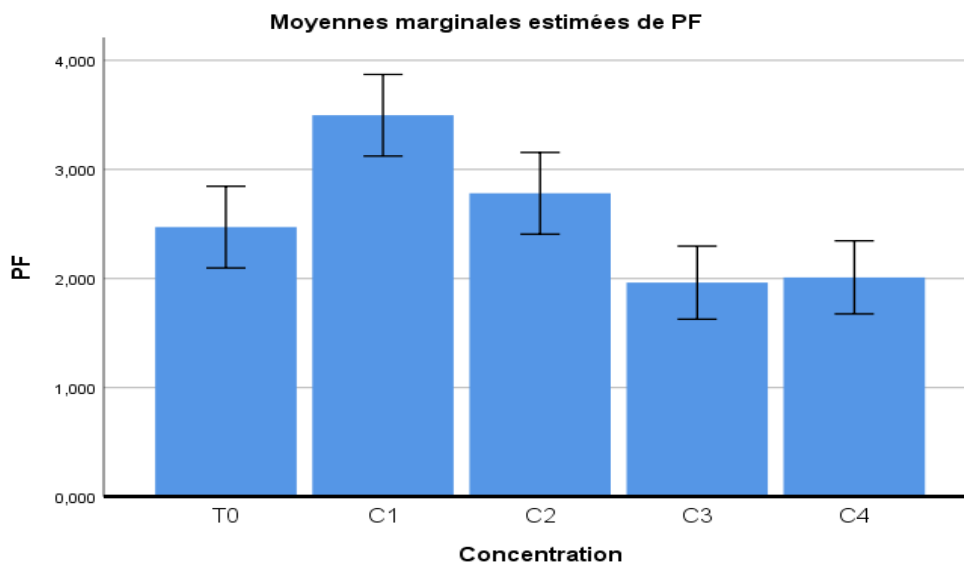


Figure 11: Effet des différentes concentrations du Chitosan sur le poids frais (g) des cals après 20 jours d'élicitation ($F=12,227$ ddl=4 et $P=0,000$).

Les résultats de l'ANOVA (**Figure 11**) montrent que l'élicitation par le Chitosan a un effet hautement significatif sur les poids frais des cals.

Le test de Tukey (au seuil $\alpha = 5\%$) réalisé sur les poids frais des cals, révèle trois groupes homogènes qui se chevauchent « a », « b » et « c ». Le groupe homogène le plus intéressant est représenté par la lettre « a » qui correspond à la première concentration en

Chitosan (5mg/l), dont le poids moyen des cals est de 3.49 g. Autrement, le groupe homogène « b » est aussi très intéressant et correspond au traitement hormonal C2 et T0 dont le poids frais moyen des cals est de 2.78 et 2.47g, respectivement. Cependant, le groupe le moins intéressant est représenté par la lettre « c », qui correspond au traitement C3 et C4 avec des poids frais moyen des cals compris entre 1.96 et 2g.

V.1.2. Effet de l'élicitation sur le poids sec des cals

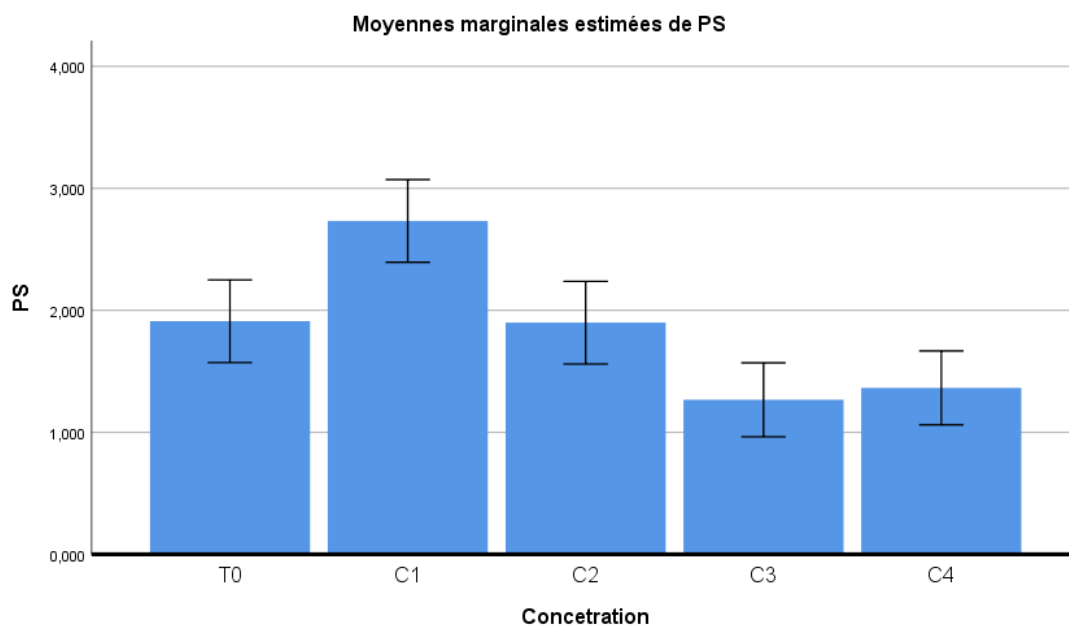


Figure 12: Effet des différentes concentrations du Chitosan sur le poids sec (g) des cals après 20 jours d'élicitation ($F=12,80$, $ddl= 4$ et $P=0,000$).

Les résultats de l'ANOVA (**Figure 12**) montrent que l'élicitation par le Chitosan a un effet hautement significatif sur les poids sec des cals.

Le test de Tukey (au seuil $\alpha = 5\%$) réalisé sur les poids sec des cals, révèle trois groupes homogènes qui se chevauchent « a », « b » et « c ». Le groupe homogène le plus intéressant est représenté par la lettre « a » qui correspond à première concentration C1 en Chitosan, dont le poids moyen des cals avoisine 2,73 g. Autrement, le groupe intermédiaire « b » est aussi intéressant et correspond au traitement hormonal T0, C2 et C4 dont le poids sec moyen des cals est de 1,91, 1,89 et 1,36 , respectivement. Cependant, le groupe le moins intéressant est représenté par la lettre « c », qui correspond au traitement C3 avec un poids sec moyen des cals ne dépassant pas 1,26 g.

V.1.3. Effet de l'élicitation sur la surface des cals

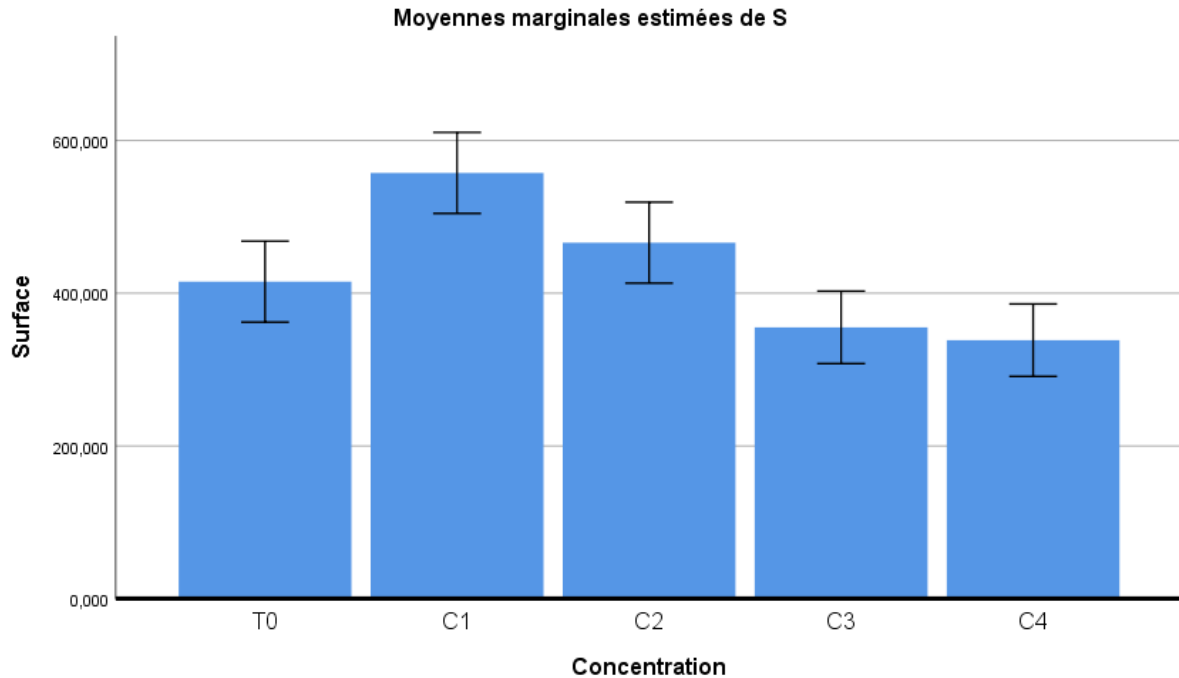


Figure 13: Effet des différentes concentrations du Chitosan sur la surface des cals (mm²) après 20 jours d'élicitation (F=12,167, ddl= 4 et P=0,000)

La surface des cals est déterminée après 20 jours de culture sur milieu contenant différentes concentrations de Chitosan. Les résultats de l'ANOVA ont montré un effet très hautement significatif de l'éliciteur sur la surface des cals. Le test de Tukey (au seuil $\alpha = 5\%$) réalisé sur la surface des cals a La surface des cals est déterminée après 20 jours de culture sur milieu contenant différentes concentrations révéle trois groupes homogènes qui se chevauchent « a », « b » et « c ». Les concentrations C1 et C2 occupent le groupe de tête « a » avec des surfaces moyennes des cals de 557.5 et 466.1mm², respectivement. Le groupe intermédiaire « b » renferme la concentration C2 et le témoin avec des surfaces moyennes des cals comprises entre 466.1 et 415.2 mm². Le dernier groupe « c » rassemble le témoin, la C3 et la C4 qui ont enregistré les surfaces des cals les plus faibles (**Figure 13**).

V.2. Milieu à base de sucre

V.2.1. Effet de l'élicitation sur le poids frais des cals

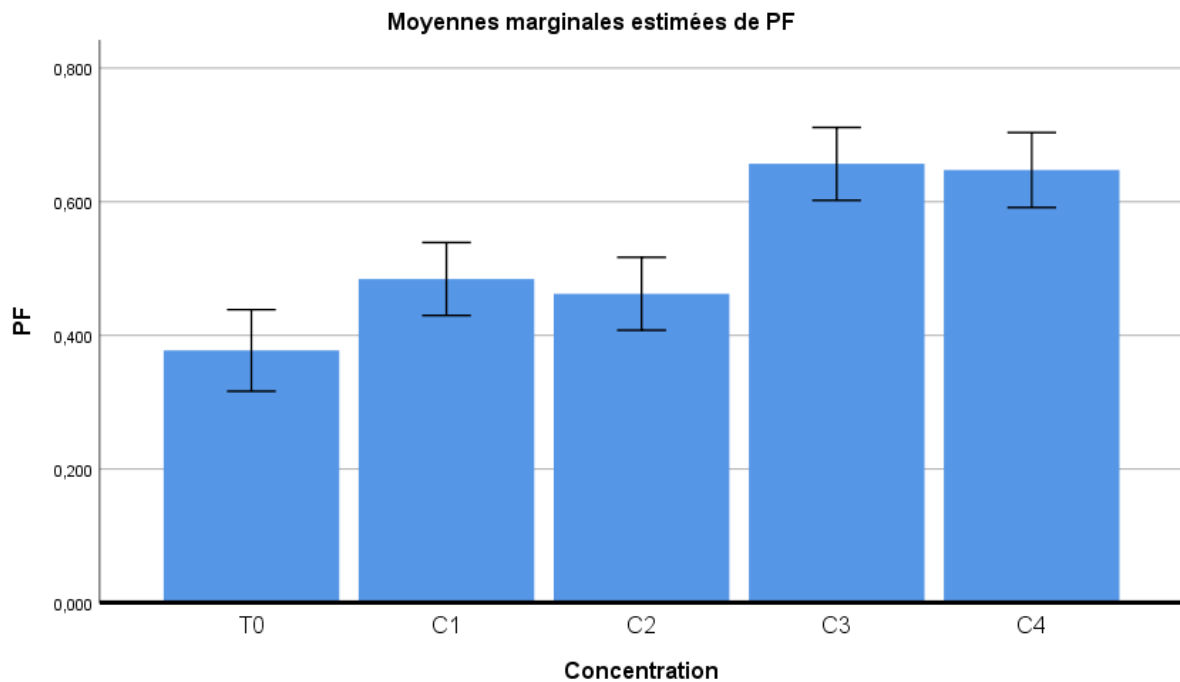


Figure 14: Effet des différentes concentrations du Chitosan sur le poids frais (g) des cals après 20 jours d'élicitation ($F=18,039$ $ddl= 4$ et $P= 0,000$).

Les résultats de l'ANOVA (**Figure 14**) montrent que l'élicitation par le Chitosan a un effet très hautement significatif sur les poids frais des cals.

Le test de Tukey (au seuil $\alpha = 5\%$) réalisé sur les poids frais des cals a mis en évidence deux groupes homogènes « a » et « b ». Le premier groupe « a », le plus intéressants, rassemble la C3 et C4 ayant donné des poids moyens des cals de 0.65 et 0.64g, respectivement. Le deuxième groupe « b » regroupe la C1, C2 et T0 qui se caractérisent par des poids moyens des cals compris entre 0.48 et 0.37g.

V.2.2. Effet de l'élicitation sur le poids sec des cals

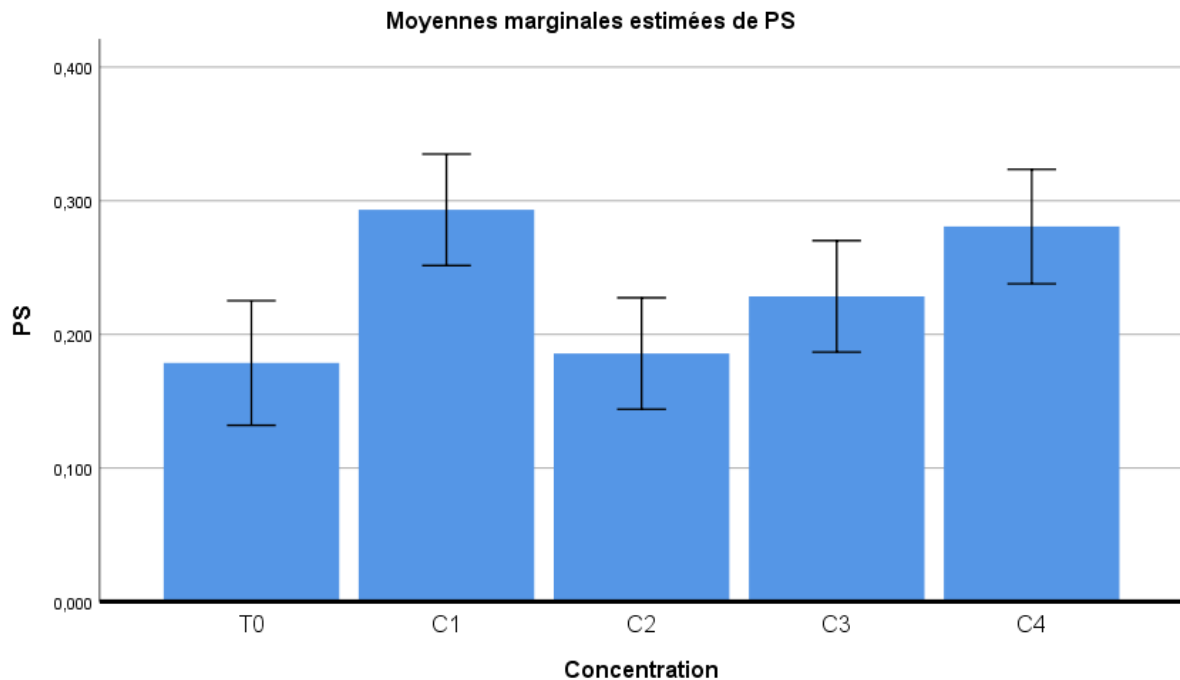


Figure 15: Effet des différentes concentrations du Chitosan sur le poids sec (g) des cals après 20 jours d'élicitation ($F=5,89$ ddl= 4 et $P = 0,000$).

Les résultats de l'ANOVA (**Figure 15**) montrent que l'élicitation par le Chitosan a un effet très hautement significatif sur les poids sec des cals.

Le test de Tukey (au seuil $\alpha = 5\%$) réalisé sur les poids sec des cals a repartis les différentes concentrations de Chitosan en deux groupes homogènes qui se chevauchent. Le groupe le plus intéressant « a » renferme les concentrations C1, C4 et C3 dont le poids moyen des cals est compris entre 0,22 et 0,29g. Le second groupe « b » rassemble la C3, C2 et T0 avec des poids moyens des cals compris entre 0,22 et 0,17g.

V.2.3. Effet de l'élicitation sur la surface des cals

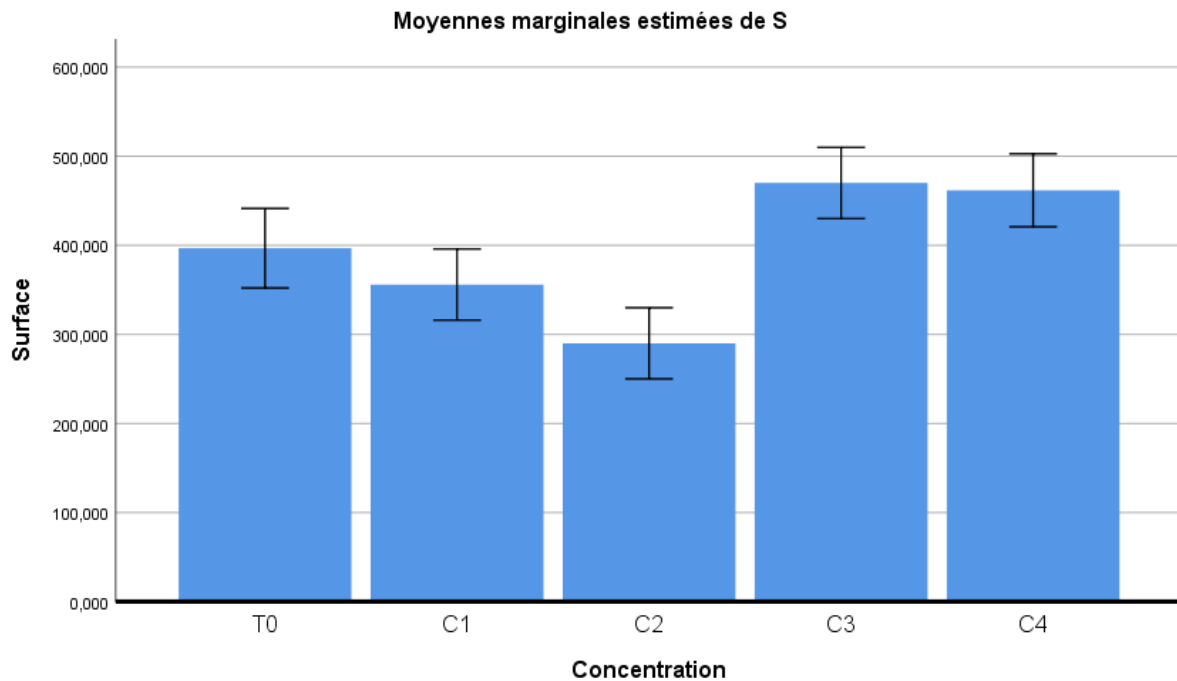


Figure 16: Effet des différentes concentrations du Chitosan sur la surface des cals (mm²) après 20 jours d'élicitation (F=13,867 ddl=4 P=0,000).

La surface des cals est déterminée après 20 jours de culture sur milieu contenant différentes concentrations de Chitosan. Les résultats de l'ANOVA ont montré un effet très hautement significatif de l'éliciteur sur la surface des cals. Le test de Tukey (au seuil $\alpha = 5\%$) réalisé sur la surface des cals a révélé trois groupes homogènes qui se chevauchent « a », « b » et « c ». Les concentrations C3, C4 et T0 occupent le groupe de tête « a » avec des surfaces moyennes des cals compris entre 396 et 470g. Le groupe intermédiaire « b » renferme la concentration T0 et C1. Le dernier groupe « c » rassemble la C1 et la C2 qui ont enregistré les surfaces des cals les plus faibles.

DISCUSSION DES RESULTATS

Chapitre IV : Discussion

I. Etablissement du matériel végétal

Afin Au début de notre expérimentation, nous avons testé l'effet de l'imbibition sur le taux de germination des gaines de *C. roseus*. Nos résultats de germination démontrent que les grains de *C. roseus* trempés dans l'eau distillée pendant 48 heures donnent un taux de germination relativement élevé. Par conséquent, la germination des graines de *C. roseus* ne nécessite qu'un simple trempage dans l'eau distillée pour avoir une germination rapide et efficace.

En effet, la germination commence par l'absorption de l'eau par imbibition, suivie de l'expansion de l'embryon (Schopfer et Plachy, 1984 ; Manz et *al.*, 2005). Après avoir trempé des grains de *C. roseus* dans de l'eau distillée pendant cinq jours, Abdul Jaleel et *al.*, (2007) rapportent un taux de germination de 60%. De plus, Pandey et *al.*, (2007) affirment que pour améliorer le taux de germination, il faut tremper les grains de *C. roseus* pendant 12 heures dans de l'eau distillée.

Outre, les besoins de base en eau, en oxygène et en une température appropriée, la germination dépend également du type de la graine qui peut être dormantes ou non. Une graine complètement non dormante a la capacité de germer sur la plus large gamme de facteurs environnementaux (Baskin & Baskin, 2004). Des études menées sur *C. roseus* ont montré que la scarification des graines peut augmenter le taux de germination en réduisant la dormance tégumentaire (Reisman-Berman et *al.*, 1991 ; Tieu et Egerton Warburton 2000 ; Loddo et *al.*, 2013).

II. Callogenèse :

La formation de cal (callogenèse) est une étape critique de la sélection *in vitro*. Ce tissu végétal est une source importante de variation génétique et peut être considéré comme un stock de matériel génétique. De nombreuses études sur *Catharanthus roseus* ont été menées en vue d'induire la callogenèse à partir de divers types d'explants puis la régénération de plantes entières (Zhao et *al.*, 2001).

Dans la présente étude, l'induction de la callogenèse a été réalisée sur différents types d'explants des vitrosemis de *Catharanthus roseus* ; à savoir : tige, racine et feuille. Nos expériences ont permis de mettre en évidence une variabilité dans les aptitudes callogènes des différents explants induits. L'induction de cette callogenèse semble être influencée par certains facteurs qui sont liés à la composition hormonale du milieu de culture, la concentration et le type d'explants.

L'analyse de variance effectuée sur les résultats obtenus après six semaines de culture révèle un effet très hautement significatif du traitement hormonal utilisé. De manière générale, le milieu M3 (1 mg/l de 2,4D et 0,5 mg/l de BAP) apparaît comme le meilleur milieu pour l'induction de cal, avec un pourcentage de callogenèse de 93,93% ; il est suivi par le milieu M4.

En effet, la formation des cals dépend fortement de l'équilibre hormonal et du type d'hormones appliquées, de sorte que le type et le génotype de l'explant affecteront la fréquence de la callogenèse (Junaid *et al.*, 2006 ; Bakiri, 2011 ; Negi, 2011 ; Haq *et al.*, 2013 ; Kawtar *et al.*, 2015). L'ajout des deux régulateurs de croissance aux milieux de culture est essentiel pour le cal induit, car la cytokinine agit en présence d'auxine comme clé pour initier la division cellulaire. Cependant, des concentrations élevées en ANA peut nuire à la fonction des enzymes responsables de la construction de la paroi cellulaire, ce qui affecte les propriétés mécaniques et influençant la division cellulaire et la formation de cals (Taha, 2017).

Des études sur *C. roseus* (Das *et al.*, 2020) ont montré que la combinaison de la cytokinine avec l'auxine à une dose plus faible entraîne une callogenèse. D'autres études ont démontré que l'auxine 2,4-D, lorsqu'elle est combinée avec d'autres cytokinines, contribue efficacement au développement des cals (Haq *et al.*, 2013). En effet, l'application exogène d'auxine entraîne la création de cals sur toute la surface de l'explant, et la présence de cytokinine favorise la bonne croissance des cals (Okazawa *et al.*, 1967).

III. Effet de l'élicitation du matériel végétal :

Dans l'objectif d'améliorer la biomasse des cals obtenus, nous avons testé l'éliciteur biotique le Chitosan à différentes concentrations. Les éliciteurs sont des composés abiotiques et biotiques déclenchant l'accumulation de constituants actifs. L'utilisation de tels éliciteurs pour améliorer la production de métabolites secondaires est devenue une stratégie très

importante, elle se base sur la réduction de la période nécessaire pour produire des concentrations élevées de produits (Cai et *al.*, 2012).

L'élicitation a été effectuée avec quatre concentrations en Chitosan (5mg /l, 10mg/l, 20mg /l et 40 mg/l) et en présence de deux sucres différents, fructose et sucrose, comme source de carbone. Nos résultats montrent que les différentes concentrations de Chitosan testées ont un effet significatif sur la production en biomasse des cals, plus précisément sur le poids frais et le poids sec ainsi que la surface.

La différence d'effet entre Chitosan + fructose et Chitosan + sucrose a révélé que l'efficacité de l'élicitation avec le Chitosan dépend de la source de carbone utilisée dans le milieu de culture. Le Chitosan en présence du fructose s'est avéré plus efficace que le Chitosan associé au sucrose dans l'amélioration de la biomasse. Cela confirme que l'interaction entre l'éliciteur et la source de carbone dans le milieu fait également partie des facteurs qui contrôlent la réponse de la plante à l'éliciteur (Sayed et *al.*, 2017).

En effet, le chitosan est un polymère du résidu β -1,4 -glucosamine (Chakraborty et *al.*, 2009) , il est considéré comme éliciter biotique exogène obtenu à partir de la paroi cellulaire fongique (Montesano et *al.*, 2003) . Selon la concentration, le chitosan peut avoir un impact négatif sur l'accumulation de la biomasse végétale, mais son impact négatif est contrebalancé par son action nutritionnelle bénéfique (Sivanandhan et *al.*, 2012 ; Ali et Abbasi, 2013).

Dans le cas de l'augmentation de l'accumulation de biomasse suite à l'application de chitosan, son action résulte de sa capacité à augmenter la disponibilité et l'absorption de l'eau et des nutriments essentiels en contrôlant la pression osmotique cellulaire (Bautista-Baños et *al.*, 2003 ; Hien ,2004). Chakraborty et *al.*, (2009) ont suggéré que le chitosan limite les effets de certains micro-organismes pathogènes pour stimuler les plantes à synthétiser des métabolites secondaires liés à la défense.

La stimulation de la production de biomasse a été rapportée pour divers systèmes de culture *in vitro* pour différentes espèces végétales telles que les suspensions cellulaires de différentes espèces de basilic (Mathew et Sankar, 2012) et de sauge rouge (*Salvia miltiorhiza*) (Zhao et *al.*,2010), les cultures de cals de lin (Ahmad et *al.*,2019) et de *Fagonia indica* (Khan et *al.*,2019), ainsi que des racines adventives de ginseng indien (*Withania somnifera*)

(Benhamou et *al.*, 1994) lorsqu'elles sont traitées avec du chitosan. Au contraire, la diminution de l'accumulation de biomasse suite à l'application de concentrations élevées de chitosan est le résultat de son action élicitrice.

Dans notre cas, la concentration optimale du Chitosan combinée avec le fructose qui a permis une amélioration du poids sec et frais ainsi que la surface, est de 5mg/l. Un résultat similaire a été observé chez une Asteraceae (*Silybum marianum*) suite à l'elicitation d'une suspension cellulaire ; l'accumulation maximale de biomasse (du poids frais et du poids sec) été obtenue en utilisant une concentration de chitosan de 5 mg/l (Shah et *al.*, 2021).

Pour ce qui est de la source de carbone, il est intéressant de signaler que les sucres jouent un rôle régulateur et physiologique vital dans la croissance et le développement des plantes (Stokes et *al.*, 2013). En général, le saccharose s'est avéré être la meilleure source de carbone pour la culture de tissus végétaux, suivi du glucose, du maltose et du raffinose ; le fructose était moins efficace et le mannose et le lactose étaient les moins adaptés (George et *al.*, 2008). Khan et *al.*, (2018) confirme l'efficacité du saccharose, un disaccharide, à une concentration de 3% dans l'accumulation de biomasse dans les cultures de cals de *Fagonia indica*

En effet, le glucose et le fructose sont des monosaccharides qui se dégradent facilement dans la cellule, ce qui les rend moins utilisables pour la biomasse (Tognetti et *al.*, 2013). Dans notre cas, l'augmentation de la biomasse sur milieu à base de fructose peut être attribuée à un effet synergique entre le Chitosan exogène et le fructose.

Conclusion

Conclusion générale

Dans l'objectif de valoriser les propriétés thérapeutiques de la plante médicinale *Catharanthus roseus*, nous avons opté pour la mise en évidence de protocoles permettant d'améliorer sa biomasse *in vitro*. Dans un premier temps, nous avons établi le matériel végétal, les vitro-semis et les cals par différents protocoles d'induction. Par la suite, nous avons procédé à multiplier en masse les cals en optimisant les conditions de culture.

Les résultats obtenus montrent que *C. roseus* présente un taux de germination très intéressant qui avoisine 70% après 10 jours de culture ; la vitesse de germination des graines imbibées était plus rapide que celle des graines non imbibées.

Les résultats de la callogenèse ont mis en évidence un effet significatif des traitements hormonaux sur les taux d'induction de la callogenèse. Les meilleurs taux de callogenèse ont été atteints pour les feuilles sur quatre milieux différents (M1, M2, M3 et M4), mais le 100% a été atteint pour les feuilles et les tiges sur les milieux (M3 et M4). Enfin, les racines ont présenté le plus faible taux de callogenèse.

Les résultats de l'optimisation de la biomasse des cals en utilisant l'éliciteur biotique, le Chitosan, ont montré que les différentes concentrations de Chitosan testées ont un effet significatif sur la production en biomasse des cals, plus précisément sur le poids frais et le poids sec ainsi que la surface. Nous avons également révélé que le Chitosan en présence du fructose s'est avéré plus efficace que le Chitosan associé au sucrose dans l'amélioration de la biomasse. La meilleure concentration du Chitosan combinée avec le fructose qui a permis une amélioration du poids sec et frais ainsi que la surface, est de 5mg/l.

Afin de poursuivre et d'approfondir cette étude, il serait intéressant d'étudier l'effet d'autres régulateurs de croissance, mais, aussi d'autres éliciteurs, biotiques ou abiotiques, pour optimiser la production de la biomasse et des molécules d'intérêts.

Références bibliographiques

Références Bibliographiques :

A. Ross, I. (2003). Medicinal Plants of the World Chemical Constituents, Traditional and Modern Medicinal Uses (Springer-Science+Business Media, LLC, Vol. 1).

Abul Barkat, M., Abul, H., & Akhlaquer Rahman, M. (2017). Agricultural, Pharmaceutical, and Therapeutic Interior of *Catharanthus roseus* (L.) G. Don. Springer. https://doi.org/10.1007/978-3-319-51620-2_5.

Agarwal, S., Jacob, S., Chettri, N., Bisoyi, S., Tazeen, A., Vedamurthy, A., . . . Hoskeri, H. (2011). Evaluation of in-vitro anthelmintic activity of *Catharanthus roseus* extract. *Int J Pharm Sci Drug Res*, 3(3), 211-213.

Ahmad, W.; Zahir, A.; Nadeem, M.; Garros, L.; Drouet, S.; Renouard, S.; Doussot, J.; Giglioli-Guivarc'h, N.; Hano, C.; Abbasi, B.H. Enhanced production of lignans and neolignans in chitosan-treated flax (*Linum usitatissimum* L.) cell cultures. *Process Biochem.* 2019, 79, 155–165.

Akbar, A., & Liew, K. M. (2020). Assessing recycling potential of carbon fiber reinforced plastic waste in production of eco-efficient cement-based materials. *Journal of Cleaner Production*, 274, 123001.

Alam, A., Bhat, M. S., Kotlia, B. S., Ahmad, B., Ahmad, S., Taloor, A. K., & Ahmad, H. F. (2017). Hybrid tectonic character of the Kashmir basin: Response to comment on “Coexistent pre-existing extensional and subsequent compressional tectonic deformation in the Kashmir basin, NW Himalaya (Alam et al., 2017)” by **Shah (2017)**. *Quaternary International*, 468, 284-289.

Ali, M.; Abbasi, B.H. Production of commercially important secondary metabolites and antioxidant activity in cell suspension cultures of *Artemisia absinthium* L. *Ind. Crops Prod.* 2013, 49, 400–406.

An, Mou, X., Zhang, L., Bovik, A. C., & Feng, X. (2014). Blind elicitation assessment using joint statistics of gradient magnitude and Laplacian features. *IEEE Transactions on Image Processing*, 23(11), 4850-4862.

Aruna, M. S., Prabha, M. S., Priya, N. S., Nadendla, R. J. J. o. D. D., & therapeutics. (2015). *Catharanthus Roseus*: ornamental plant is now medicinal boutique. *Journal of Drug Delivery & Therapeutics*, 5(3), 1-4.

Aslam, J., Khan, S. H., Siddiqui, Z. H., Fatima, Z., Maqsood, M., Bhat, M. A., . . . Khan, S. A. J. P.G. (2010). (L.) G. Don. An important drug: it's applications and production. *Pharmacie Globale (IJCP)* 4(12), 1-16.

ASLAM, J., MUJIB, A., & SHARMA, M. P. (2014). Somatic embryos in *Catharanthus roseus*: a scanning electron microscopic study. *Notulae Scientia Biologicae*, 6(2), 167-172.

AUGE , R., BEAUCHESNE , G., BOCCON-GIBOD , J., DECOURTYE , L., DIGAT , B.,JALOUSOT , R., . . . VIDALIE , H. (1989). La culture in vitro et ses applications horticoles.Lavoisier., paris., 225p.

Baíza, A. M., Quiroz, A., Ruíz, J. A., & Maldonado-Mendoza, I. (1998). Growth patterns and alkaloid accumulation in hairy root and untransformed root cultures of *Datura stramonium*. *Plant cell, tissue and organ culture*, 54(2), 123-130.

Bakiri, N. (2011). *Régénération in vitro de la pervenche (Catharanthus roseus L.)*.

Banskota, A. H., Nagaoka, T., Sumioka, L. Y., Tezuka, Y., Awale, S., Midorikawa, K., ... & Kadota, S. (2002). Activité antiproliférative de la propolis néerlandaise et ses principes actifs dans les lignées cellulaires cancéreuses. *Journal of ethnopharmacology*, 80(1), 67-73.

Baskin JM et Baskin CC. (2004) : A classification system for seed dormancy. *Seed Science Research* 14: 1–16.

Bautista-Baños, S.; Hernández-López, M.; Bosquez-Molina, E.; Wilson, C.L. Effects of chitosan and plant extracts on growth of *Colletotrichum gloeosporioides*, anthracnose levels and quality of papaya fruit. *Crop Prot.* 2003, 22, 1087–1092.

Beaulieu, J. C., & Baldwin, E. A. (2002). Flavor and aroma of fresh-cut fruits and vegetables. *Fresh Cut Fruits and Vegetables: Science, Technology and Market*, 391-425.

Beddou, F. (2015). Etude phytochimique et activités biologiques de deux plantes médicinales sahariennes *Rumex vesicarius L.* et *Anvillea radiata Coss.* et Dur. Abou Bekr Belkaid. 13.

Belabbas, M. (2011). Sélection de cals de pomme de terre (*Solanum tuberosum L.* var. Kondor et Spunta) tolérants à la salinité. 186.

Benhamou, N.; Lafontaine, P.J.; Nicole, M. Induction of systemic resistance to *Fusarium* crown and root rot in tomato plants by seed treatment with chitosan. *Phytopathology* 1994, 84, 1432–1444. [CrossRef]

Bennouna, J., Delord, J.-P., Campone, M., & Nguyen, L. (2008). Vinflunine: a new microtubule inhibitor agent. *Clinical cancer research*, 14(6), 1625-1632.

Bhutkar, M., & Bhise, S. (2011). Comparative studies on antioxidant properties of *Catharanthus rosea* and *Catharanthus alba*. *Int J Pharm Tech Res*, 3(3), 1551-1556.

Boiteau, P., & Allorge-Boiteau, L. (1993). Plantes médicinales de Madagascar: Cinquante-huit plantes médicinales utilisées sur le marché de Tananarive (Zoma) à Madagascar. KARTHALA Editions.

Boxus P. 1995 : multiplication végétative:micropropagation et embryogenèse somatique dans les biotechnologies Végétales. BV 93, Ed CNED.AUPELF-UREF 191p.

Bruneton, J. (1999). Toxic plants dangerous to humans and animals. Intercept Limited.

- Cai, Z.; Kastell, A.; Mewis, I.; Knorr, D. and Smetanska, I. (2012).** Polysaccharide elicitors enhance anthocyanin and phenolic acid accumulation in cell suspension cultures of *Vitis vinifera*. *Plant Cell Tiss. Organ Cult.*, 108: 401-409.
- Caraglio Y. 2012.** L'organogènesèse. UMR Cirad/Inra de Modélisation des plantes (AMAP).(Programme modélisation des plantes du Cirad-amis <http://amap.cirad.fr/architecture/organo/organo.html#introduction> Benabdelhafid, Z. Embryogénèse somatique, variations somaclonales et tolérance à la salinité chez le blé dur (*Triticum durum* Desf.).
- Chattopadhyay, R., Sarkar, S., Ganguly, S., Banerjee, R., & Basu, T. (1991).** Hypoglycemic and antihyperglycemic effect of leaves of *Vinca rosea* linn. *Indian Journal of Physiology and Pharmacology*, 35(3), 145-151.
- Das, A., Sarkar, S., Bhattacharyya, S., & Gantait, S. (2020).** Biotechnological advancements in *Catharanthus roseus* (L.) G. Don. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 1-25.
- Das, S., & Sharangi, A. B. (2017).** Madagascar periwinkle (*Catharanthus roseus* L.): Diverse medicinal and therapeutic benefits to humankind. *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry*, 6(5), 1695-1701.
- Demarly Y., 1985.** L'épigénétique. *Bull. Soc. Bot. Fr.*132. Actual. Bot (314),pp 79- 94.
- Demarly, Y., et Sibi, M. (1996).** Amélioration des plantes et biotechnologie. Ed. John Libbey Eurotext. Paris. pp 99-111.
- Djennane, S., et Klifatti, A. (1996).** Etude de quelque facteur influençant la tubérisation in vitro de trois variétés de pomme de terre. Mémoire en vue d'obtention du diplôme d'ingénieur d'état en Agronomie. Institut national d'Agronomie (INA) Alger. pp 26-37.
- Dodds, J. H., & Roberts, L. W. (1985).** Experiments in plant tissue culture: International Potato Center.
- Ducreux, G., Rossignol, L., & Rossignol, M. (1986).** La pomme de terre. *Recherche* (Paris, 1970)(174), 192-203.
- Eder, J., & Cosio, E. G. (1994).** Elicitors of plant defense responses. *International review of cytology*, 148, 1-36.
- Egbuna, C., Ifemeje, J. C., Udedi, S. C., & Kumar, S. (2018).** *Phytochemistry: Volume 1: Fundamentals, Modern Techniques, and Applications*. Apple Academic Press.
- Epifano, F., Genovese, S., Menghini, L., & Curini, M. (2007).** Chemistry and pharmacology of oxyprenylated secondary plant metabolites. *Phytochemistry*, 68(7), 939-953.
- Farnsworth NR:** The pharmacognosy of the periwinkles: *Vinca* and *Catharanthus*. *Lloydia*. 1961; 24(3):105-138.

- Ferreres, F. & Llorach, R., Martínez-Sánchez, A., Tomás-Barberán, F. A., Gil, M. I., (2008).** Characterisation of polyphenols and antioxidant properties of five lettuce varieties and escarole. *Food chemistry*, 108(3), 1028-1038.
- Ferry, M. (2008).** Potential of date palm micropropagation for improving small farming systems. In *Date Palm Biotechnology* (pp. 15-28). Springer, Dordrecht.
- Fleuriot, A., & Jay-Allemand, C. (2005).** Les composés phénoliques des végétaux: un exemple de métabolites secondaires d'importance économique. PPUR presses polytechniques.
- Foureau, Stavrinides, A., Tatsis, E. C., Caputi E., Stevenson, C. E., Lawson, D. M., ... & O'connor, S. E. (2016).** Structural investigation of heteroyohimbine alkaloid synthesis reveals active site elements that control stereoselectivity. *Nature communications*, 7(1), 1-14.
- George, E.F.; Hall, M.A. and De-Klerk, G.J. (2008).** The components of plant tissue culture media II: Organic additions, osmotic and pH effects, and support systems. In: George EF, Hall MA, De Klerk GJ (eds), *plant propagation by tissue culture* (3rd edition) Springer, The Neth., 115
- Glick, B. R. (1995).** The enhancement of plant growth by free-living bacteria. *Canadian journal of microbiology*, 41(2), 109-117.
- Guignard, F., Mauel, J., & Markert, M. (1996).** Phosphorylation of myeloid- related proteins MRP- 14 and MRP- 8 during human neutrophil activation. *European journal of biochemistry*, 241(1), 265-271.
- Guimaraes, G., Cardoso, L., Oliveira, H., Santos, C., Duarte, P., & Sottomayor, M. (2012).** Cytogenetic characterization and genome size of the medicinal plant *Catharanthus roseus* (L.) G. Don. *AoB Plants*, 2012.
- Gupta VK, Sharma SK.** Plants as Natural antioxidants. *Nat Prod Rad.* 2006; 5(4): 326-334
- Gupta, M., Tomar, R. S., Kaushik, S., Mishra, R. K., & Sharma, D. (2018).** Effective antimicrobial activity of green ZnO nano particles of *Catharanthus roseus*. *Frontiers in microbiology*, 9, 2030.
- Haberlandt, G. 1902.** Plant cell culture experiment with isollierten. *S.B. Vienna Ways Sci.*, 111: 69-92.
- Haq, R., Naz, S., Aslam, F., & Manzoor, F. (2013).** Comparison of in vitro response of micropropagation and callogenesis of medicinal plant, *Vinca rosea*. *J Agric Res*, 51(1), 9-17.
- Hien, N.Q.** Radiation degradation of chitosan and some biological effects. *Radiat. Process. Polysacch.* 2004, 1422, 67.
- Hopkins W.G.2003.** *Physiologie végétale*. De Boeck Supérieur, 532 p.

Hurabielle, M. (1981). CONTRIBUTION A L'ETUDE CHIMIQUE DE DEUX HUILES D'ARTEMISIA: ARTEMISIA HERBA-ALBA ASSO ET ARTEMISIA VULGARIS LINNAEUS. INTERET CHIMIOTAXONOMIQUE.

Ikeuchi, M., Ogawa, Y., Iwase, A., & Sugimoto, K. (2016). Plant regeneration: cellular origins and molecular mechanisms. *Development*, 143(9), 1442-1451. doi: org/10.1242/dev.134668

Isac V., Popescu A.N. et M. Coman. 1994. Studies on plant regeneration from tissue-derived callus in *Fragaria X ananassa* Duch. In :Schmidts H. et M Kellerhals. *Progress in temperate fruit breeding*. Kluwer Academic Publishers, , p 395-398.

Jaiwal, P. K., & Singh, R. P. (2013). *Applied genetics of leguminosae biotechnology (Vol. 10)*: Springer Science & Business Media.

Jeun, S. D., Mergeai, G., Baudoin, J. P., & Toussaint, A. (2005). Culture in vitro de *Jatropha curcas* L. *Biotechnologie, Agronomie, Société et Environnement*, 15(4), 567-574.

Junaid, A., Mujib, A., Bhat, M., Ilah, A., & Sharma, M. (2006). Embryogenesis in *Catharanthus roseus*: Roles of Some External Factors in Proliferation, Maturation and Germination of Embryos *Somatic Embryogenesis* (pp. 259-270): Springer

Kaushik, S. H. U. C. H. I., Tomar, R. S., Gupta, M. O. N. I. K. A., & Mishra, R. K. (2017). An overview of *Catharanthus roseus* and medicinal properties of their metabolites against important diseases. *European Academic Research*, 5(2), 1237-1247

Kawtar, L., Najat, H., Najiba, B., Najat, A., Najat, G., Elmustapha, E., . . . Hamid, B. (2015). Optimisation de l'induction de callogenèse à partir des embryons excisés de mandariniers (*Citrus* spp.). *Journal of Applied Biosciences*, 89, 8300-8310.7

Khan T, Abbasi BH, Zeb A, Ali GS (2018) Carbohydrate-induced biomass accumulation and elicitation of secondary metabolites in callus cultures of *Fagonia indica*. *Ind Crop Prod* 126:168–176

Khan, T.; Khan, T.; Hano, C.; Abbasi, B.H. Effects of chitosan and salicylic acid on the production of pharmacologically attractive secondary metabolites in callus cultures of *Fagonia indica*. *Ind. Crops Prod.* 2019, 129, 525–535.

Krief, S. (2003). Métabolites secondaires des plantes et comportement animal: surveillance sanitaire et observations de l'alimentation des chimpanzés (*Pan troglodytes schweinfurthii*) en Ouganda. Activités biologiques et étude chimique de plantes consommées (Doctoral dissertation, Museum national d'histoire naturelle-MNHN PARIS).

Krishna, H., Alizadeh, M., Singh, D., Singh, U., Chauhan, N., Eftekhari, M., & Sadh, R. K. (2016). Somaclonal variations and their applications in horticultural crops improvement. *3 Biotech*, 6(1), 54. doi: org/10.1007/s13205-016-0389-7

Makhzoum, A. B., Sharma, P., Bernards, M. A., & Trémouillaux-Guiller, J. (2013). Hairy Roots: An Ideal Platform for Transgenic Plant Production and Other Promising Applications. In *Phytochemicals, Plant Growth, and the Environment* (Springer-Verlag New York, Vol. 42, p. 178).

Makhzoum, M. A. B. (2007). Mise en place d'un système de transfert de gènes et de régénération de plantes in vitro pour l'étude de la régulation du métabolisme des alcaloïdes chez *Catharanthus roseus* (L.) G. Don. Application au promoteur de la déacétylvindoline 4-O-acétyltransférase. UNIVERSITÉ FRANÇOIS RABELAIS - TOURS.

Manz B., Müller K., Kucera B., Volke F., Leubner-Metzger G. (2005): Water uptake and distribution in germinating tobacco seeds investigated in vivo by nuclear magnetic resonance imaging. *Plant Physiology* 138:1538–1551.

Margara, J. (1982). LA MULTIPLICATION VEGETATIVE IN VITRO. ASPECTS GENERAUX.

Margara, J. (1984). Bases de la multiplication vegetative. les méristèmes et l'organogénèse.

MARGARA, J. (1989). Bases de la Multiplication Vegetative. Les Méristèmes et l'Organogénèse;INRA. Institut National de la Recherche Agronomique: Paris, France, 262p.

Marie-Luce, Q. A., & Kouami, K. O. K. O. U. Culture In Vitro Et Herbarium In Vitro Culture And Herbarium. <http://users.ugent.be> HISTORIQUE : HABERLAND, consulté le 30 décembre 2009 .

Mathew, R.; Sankar, P.D. Effect of methyl jasmonate and chitosan on growth characteristics of *Ocimum basilicum* L., *Ocimum sanctum* L. and *Ocimum gratissimum* L. cell suspension cultures. *Afr. J. Biotechnol.* 2012, 11, 4759–4766

Monokesh, Kumer Sen, A. N. M., Mamun-Or-Rashid, et Nayeem Md., Towfique. (2013). ETHNOMEDICAL PROFILES OF DIFFERENT PLANT PARTS OF CATHARANTHUS ROSEUS L. - A REVIEW.

Montesano, M., Brader, G., & Palva, E. T. (2003). Pathogen derived elicitors: searching for receptors in plants. *Molecular Plant Pathology*, 4(1), 73-79.

Montesano, M.; Brader, G. and Palva, E.T. (2003). Pathogen derived elicitors: searching for receptors in plants. *Mol. Plant Pathol.*, 4: 73-79.

Montesano, M.; Brader, G. and Palva, E.T. (2003). Pathogen derived elicitors: searching for receptors in plants. *Mol. Plant Pathol.*, 4: 73-79.

Mujib, A., Ilah, A., Aslam, J., Fatima, S., Siddiqui, Z. H., & Maqsood, M. (2012). *Catharanthus roseus* alkaloids: application of biotechnology for improving yield. *Plant growth regulation*, 68(2), 111-127.

- Mzouri, K., Amssa, M., & Bouiamrine, E. H. (2001).** Embryogenèse somatique à partir d'embryons immatures de Blé tendre (*Triticum aestivum* L.): effet génotype. *Acta botanica gallica*, 148(3), 215-225.
- Namdeo, A. G. (2007).** Plant cell elicitation for production of secondary metabolites: a review. *Pharmacogn Rev*, 1(1), 69-79.
- Nayak, B., Anderson, M., & Pereira, L. P. (2007).** Evaluation of wound-healing potential of *Catharanthus roseus* leaf extract in rats. *Fitoterapia*, 78(7-8), 540-544.
- Negi, R. (2011).** Fast in-vitro callus induction in *Catharanthus roseus*-A medicinally important plant used in cancer therapy. *Res J Pharm Biol Chem Sci*, 2(4), 597-603.
- Nijveldt, R. J., Van Nood, E. L. S., Van Hoorn, D. E., Boelens, P. G., Van Norren, K., & Van Leeuwen, P. A. (2001).** Flavonoids: a review of probable mechanisms of action and potential applications. *The American journal of clinical nutrition*, 74(4), 418-425.
- Norrel, B. (1973).** Cultures de tissus végétaux et embryogenèse non zygotique. Soc. Bot mémoire. coll Morphologie. pp 71 - 98.
- Nosálová, V., Machova, J., & Babulová, A. (1993).** Protective action of vinpocetine against experimentally induced gastric damage in rats. *Arzneimittel-Forschung*, 43(9), 981-985.
- Nozeran R., Bancilhon L., 1972.** Les cultures in vitro en tant que technique pour l'approche de problèmes posés par l'amélioration des plantes. In *Ann.Amélioration. Plantes* 22 (2), pp167-185.<http://labos.ulg.ac.be/cedevit/plantes-in-vitro/culture-in-vitro/interets/>
- Ohadoma, S. C., & Michael, H. U. (2011).** Effects of co—administration of methanol leaf extract of *Catharanthus roseus* on the hypoglycemic activity of metformin and glibenclamide in rats. *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine*, 4(6), 475-477.
- Patil, P. J., & Ghosh, J. S. (2010).** Antimicrobial activity of *Catharanthus roseus*—a detailed study. *British Journal of Pharmacology and Toxicology*, 1(1), 40-44
- Pietrosiuk, A., Furmanowa, M., & Łata, B. (2007).** *Catharanthus roseus*: micropropagation and in vitro techniques. *Phytochemistry Reviews*, 6(2-3), 459-473. <https://doi.org/10.1007/s11101-006-9049-6>
- Pitta–Alvarez, S. I., Spollansky, T. C., & Giulietti, A. M. (2000).** The influence of different biotic and abiotic elicitors on the production and profile of tropane alkaloids in hairy root cultures of *Brugmansia candida*. *Enzyme and Microbial Technology*, 26(2-4), 252-258.
- Rajput, M. S., Nair, V., Chauhan, A., Jawanjai, H., & Dange, V. (2011).** Evaluation of antidiarrheal activity of aerial parts of *Vinca major* in experimental animals. *Middle-East Journal of Scientific Research*, 7(5), 784-788.
- Rani, N., & Kumar, K. (2011).** Karyomorphological studies in the genus 69 *Catharanthus*. *Indian Journal of Genetics and Plant Breeding*, 71(1), 55.

ROUT, G., Samantaray, S., & Das, P. (2000). In vitro manipulation and propagation of medicinal plants. *Biotechnology advances*, 18(2), 91-120.

Saadi A. Et F. Hamdani. 2007. Régénération in vitro du *Scorpiurus muricatus* ssp. *subvillosus* via la caulogénèse. *Biotechnologie, Agronomie, Société et Environnement*, Volume 11 (2007) – numéro 3.

Saadi, A. (1991). Régénération de plantes de pois *Pisum sativum* L par embryogénèse somatique. Thèse de doctorat. Paris Grignon 162p.

Sadowska, M., & Lin, S. P. (1989, January). Timing driven placement. In 1989 IEEE International Conference on Computer-Aided Design (pp. 94-95). IEEE Computer Society.

Sayed, M., Khodary, S.E.A., Ahmed, E.S., Hammouda, O., Hassan, H.M. and El-Shafey, N.M. (2017). Elicitation of flavonoids by chitosan and salicylic acid in callus of *Rumex vesicarius* L. *Acta Hort.* 1187, 165-176.

Chakraborty, M.; Karun, A. and Mitra, A. (2009). Accumulation of phenylpropanoid derivatives in chitosan-induced cell suspension culture of *Cocos nucifera*. *J. Plant Physiol.*, 166: 63-71.

Schofer P., Planchy C., 1984. Control of seed germination by abscisic acid. II. Effect on embryo water uptake in *Brassica napus* L. *Plant Physiol* 76: 155- 160

Semal, J., & Lepoivre, P. (1998). Application of tissue culture variability to crop improvement. In *Developments in crop science* (Vol. 19, pp. 301-315). Elsevier.

Seyoum, A., Asres, K., & El-Fiky, F. K. (2006). Structure–radical scavenging activity relationships of flavonoids. *Phytochemistry*, 67(18), 2058-2070.

Shah M, Jan H, Drouet S, Tungmunnithum D, Shirazi JH, Hano C, Abbasi BH. Chitosan Elicitation Impacts Flavonolignan Biosynthesis in *Silybum marianum* (L.) Gaertn Cell Suspension and Enhances Antioxidant and Anti-Inflammatory Activities of Cell Extracts. *Molecules*. 2021 Feb 3;26(4):791

Shanmugaraju, V., & Bhagyaraj, R. (2016). Antimicrobial potential activity of leaf extracts of *Catharanthus roseus* against human pathogens under laboratory conditions. *Int J Curr Res Biol Med*, 1, 35-51.

Shilpa, K., Varun, K., & Lakshmi, B. S. (2010). An alternate method of natural drug production: eliciting secondary metabolite production using plant cell culture. *Journal of Plant Sciences*, 5(3), 222-247.

Sivanandhan, G.; Arun, M.; Mayavan, S.; Rajesh, M.; Mariashibu, T.S.; Manickavasagam, M.; Selvaraj, N.; Ganapathi, A. Chitosan enhances withanolides

production in adventitious root cultures of *Withania somnifera* (L.) Dunal. *Ind. Crops Prod.* 2012, 37, 124–129.

Smith, R. H. (2012). *Plant tissue culture: techniques and experiments*: Academic Press.

Steward F.C. And Reinert J., 1958. Growth and division of freely suspended cells. *Am. J. Bot.*, 45: 693-695.

Steward, F. C., Mapes, M. O., Kent, A. E. and Holston, R. D. 1964. Growth and development of cultured plant cells- Biochemical and morphogenetic studies with cells yield new evidence on their metabolism and totipotency. *Sci.* 143: 20.

Steward, F.C., Maper, M.O. and Smith, J. (1958). Growth and organized development of cultured cell 11. Organization in culture grown from freely suspended cells. *Amer. J. Bot.* 45: 705-708.

Stokes, M.E., Chattopadhyay, A., Wilkins, O., Nambara, E., Campbell, M.M., 2013. Interplay between sucrose and folate modulates auxin signaling in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* 162, 1552–1565.

Swanston-Flatt, Day C Flatt PR, et al. 1989. Glycaemia effects of traditional European plant treatments for diabetes studies in normal and streptozotocin diabetic mice. *Diabetes Res.*; 10(2): 69-73.

Tognetti, J.A., Pontis, H.G., Martinez-Noel, G.M., 2013. Sucrose signaling in plants: a world yet to be explored. *Plant Signal. Behav.* 8, e23316.

Veersham & Krishnamurthy, R. (2004). Elicitors in plant tissue culture. *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry*, 2(2), 60-65.

Vidal 2001. *Le dictionnaire*. 77e ed. Paris : Éditions Vidal, 2001 ; 2343 : 256 p.

Vidalis H., Augé R., Beauchesne G., et al. 1989. *La culture in vitro et ses applications horticoles*. Lavoisier, Tec et Doc (ed). 7- 24.

Vinale, F., Sivasithamparam, K., Ghisalberti, E. L., Marra, R., Woo, S. L., & Lorito, M. (2008). Trichoderma–plant–pathogen interactions. *Soil biology and Biochemistry*, 40(1), 1- 10.

Virmani, O. P., Srivastava, G. N., & Singh, P. (1978). *Catharanthus roseus* – The tropical periwinkle *Indian Drugs*, 15, 231-252.

Voukeng, I. K., Beng, V. P., & Kuete, V. (2016). Antibacterial activity of six medicinal Cameroonian plants against Gram-positive and Gram-negative multidrug resistant phenotypes. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 16(1), 1-9.

Wang, J. W., & Wu, J. Y. (2011). Effective elicitors and process strategies for enhancement of secondary metabolite production in hairy root cultures. *Biotechnology of Hairy Root Systems*, 55-89.

Wang, L., Zhang, Y., He, H.-P., Zhang, Q., Li, S.-F., & Hao, X.-J. (2011). Three New Terpenoid Indole Alkaloids from *Catharanthus roseus*. *Planta Medica*, 77(07), 754-758. <https://doi.org/10.1055/s-0030-1250569>.

Wang, S., Zheng, Z., Weng, Y., Yu, Y., Zhang, D., Fan, W., ... & Hu, Z. (2004). Angiogenesis and anti-angiogenesis activity of Chinese medicinal herbal extracts. *Life sciences*, 74(20), 2467-2478.

Zenk & Jueng, B. (2007). *Catharanthus roseus*: micropropagation and in vitro techniques. *Phytochemistry Reviews*, 6(2), 459-473.

Zhao, J.-L.; Zhou, L.-G.; Wu, J.-Y. Effects of biotic and abiotic elicitors on cell growth and tanshinone accumulation in *Salvia miltiorrhiza* cell cultures. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2010, 87, 137–144. [CrossRef]

Zhao, Y. Z., Luo, Y. K., Lu, C. T., Xu, J. F., Tang, J., Zhang, M., ... & Liang, H. D. (2001). Phospholipids-based microbubbles sonoporation pore size and reseal of cell membrane cultured in vitro. *Journal of drug targeting*, 16(1), 18-25.

Zhong, R., Lee, C., & Ye, Z. H. (2010). Global analysis of direct targets of secondary wall NAC master switches in *Arabidopsis*. *Molecular plant*, 3(6), 1087-1103.

Zhu, J., Wang, M., Wen, W., & Yu, R. (2015). Biosynthesis and regulation of terpenoid indole alkaloids in *Catharanthus roseus*. *Pharmacognosy reviews*, 9(17), 24. doi: 10.4103/09737847.156323

Zhu, X., Zeng, X., Sun, C., & Chen, S. (2014). Biosynthetic pathway of terpenoid indole alkaloids in *Catharanthus roseus*. *Frontiers of medicine*, 8(3), 285-293.

Ziegler, J., & Facchini, P. J. (2008). Alkaloid Biosynthesis: Metabolism and Trafficking. *Annual Review of Plant Biology*, 59(1), 735-769. <https://doi.org/10.1146/annurev.arplant.59.032607.092730>

ZRYD, J. (1988). *Culture des Cellules et Organes Végétaux: Fondements Théoriques et Utilisations Pratiques* (pp. pp 120-134): Presses Polytechniques.

ZRYD, J. P., SCHWITZGUEBEL, J. P., & Goloubinoff, P. (2007). Activation of the heat shock response in plants by chlorophenols: transgenic *Physcomitrella patens* as a sensitive biosensor for organic pollutants. *Plant, cell & environment*, 30(6), 753-763.

Annexes

LISTES DES ANNEXES

Annexe 1

Tableau 5: Effet des différentes balances hormonales sur le pourcentage de callogenèse des différents explants feuilles, tiges et racines

Colonne1	RACINE	TIGE	Feuille
M0	0%	0%	0%
M1	53,33%	66,66%	83,33%
M2	73,33%	91,66%	91,66%
M3	81,81%	100%	100%
M4	57,40%	100%	100%

Annexe 2

Sucrose poids frais

Tableau de l'analyse de la variance (ANOVA1)

ANOVA

PF

	Somme des carrés	ddl	Carré moyen	F	Sig.
Intergroupes	1,089	4	,272	18,039	,000
Intragroupes	1,359	90	,015		
Total	2,448	94			

Tests post hoc

Comparaisons multiples :

Variable dépendante: PF

Différence significative de Tukey

(I) CC	(J) CC	Différence moyenne (I-J)	Erreur standard	Sig.	Intervalle de confiance à 95 %	
					Borne inférieure	Borne supérieure
0	1	-.106963	.041210	,080	-.22168	.00776
	2	-.084812	.041210	,247	-.19953	.02991
	3	-.279262*	.041210	,000	-.39398	-.16454
	4	-.270089*	.041689	,000	-.38614	-.15403
1	0	.106963	.041210	,080	-.00776	.22168
	2	.022150	.038853	,979	-.08601	.13031
	3	-.172300*	.038853	,000	-.28046	-.06414
	4	-.163126*	.039361	,001	-.27270	-.05355
2	0	.084812	.041210	,247	-.02991	.19953

	1	-.022150	.038853	,979	-.13031	.08601
	3	-.194450*	.038853	,000	-.30261	-.08629
	4	-.185276*	.039361	,000	-.29485	-.07570
3	0	.279262*	.041210	,000	.16454	.39398
	1	.172300*	.038853	,000	.06414	.28046
	2	.194450*	.038853	,000	.08629	.30261
	4	.009174	.039361	,999	-.10040	.11875
4	0	.270089*	.041689	,000	.15403	.38614
	1	.163126*	.039361	,001	.05355	.27270
	2	.185276*	.039361	,000	.07570	.29485
	3	-.009174	.039361	,999	-.11875	.10040

*. La différence moyenne est significative au niveau 0.05.

Sous-ensembles homogènes :

PF

Différence significative de Tukey^{a,b}

CC	N	Sous-ensemble pour alpha = 0.05	
		1	2
0	16	.37744	
2	20	.46225	
1	20	.48440	
4	19		.64753
3	20		.65670
Sig.		,066	,999

Les moyennes des groupes des sous-ensembles homogènes sont affichées.

a. Utilise la taille d'échantillon de la moyenne harmonique = 18,859.

b. Les tailles de groupes ne sont pas égales. La moyenne harmonique des tailles de groupe est utilisée. Les niveaux d'erreur de type I ne sont pas garantis.

Sucrose Poids sec

Tableau de l'analyse de la variance (ANOVA1)

ANOVA

PS

	Somme des carrés	ddl	Carré moyen	F	Sig.
Intergroupes	,208	4	,052	5,890	,000
Intragroupes	,793	90	,009		
Total	1,001	94			

Tests post hoc

Comparaisons multiples :

Variable dépendante: PS

Différence significative de Tukey

(I) CC	(J) CC	Différence moyenne (I-J)	Erreur standard	Sig.	Intervalle de confiance à 95 %	
					Borne inférieure	Borne supérieure
0	1	-.114575*	.031486	,004	-.20223	-.02692
	2	-.007125	.031486	,999	-.09478	.08053
	3	-.049825	.031486	,512	-.13748	.03783
	4	-.102059*	.031852	,016	-.19073	-.01339
1	0	.114575*	.031486	,004	.02692	.20223
	2	.107450*	.029686	,004	.02481	.19009
	3	.064750	.029686	,196	-.01789	.14739
	4	.012516	.030074	,994	-.07120	.09624
2	0	.007125	.031486	,999	-.08053	.09478
	1	-.107450*	.029686	,004	-.19009	-.02481
	3	-.042700	.029686	,605	-.12534	.03994
	4	-.094934*	.030074	,018	-.17865	-.01121
3	0	.049825	.031486	,512	-.03783	.13748
	1	-.064750	.029686	,196	-.14739	.01789
	2	.042700	.029686	,605	-.03994	.12534
	4	-.052234	.030074	,417	-.13595	.03149
4	0	.102059*	.031852	,016	.01339	.19073
	1	-.012516	.030074	,994	-.09624	.07120
	2	.094934*	.030074	,018	.01121	.17865
	3	.052234	.030074	,417	-.03149	.13595

*. La différence moyenne est significative au niveau 0.05.

Sous-ensembles homogènes :

PS

Différence significative de Tukey^{a,b}

CC	N	Sous-ensemble pour alpha = 0.05	
		1	2
0	16	.17863	
2	20	.18575	
3	20	.22845	.22845
4	19		.28068
1	20		.29320
Sig.		,483	,222

Les moyennes des groupes des sous-ensembles homogènes sont affichées.

a. Utilise la taille d'échantillon de la moyenne harmonique = 18,859.

b. Les tailles de groupes ne sont pas égales. La moyenne harmonique des tailles de groupe est utilisée.

Les niveaux d'erreur de type I ne sont pas garantis.

Surface des cals

Sucrose

Tableau de l'analyse de la variance (ANOVA1)

ANOVA

S

	Somme des carrés	ddl	Carré moyen	F	Sig.
Intergroupes	448307,320	4	112076,830	13,867	,000
Intragroupes	727426,307	90	8082,515		
Total	1175733,627	94			

Tests post hoc

Comparaisons multiples :

Variable dépendante: S

Différence significative de Tukey

(I) CC	(J) CC	Différence moyenne (I-J)	Erreur standard	Sig.	Intervalle de confiance à 95 %	
					Borne inférieure	Borne supérieure
0	1	40.913788	30.154318	,657	-43.03142	124.85899
	2	106.702338*	30.154318	,006	22.75713	190.64754
	3	-73.306413	30.154318	,116	-157.25162	10.63879
	4	-65.012984	30.504961	,216	-149.93433	19.90836
1	0	-40.913788	30.154318	,657	-124.85899	43.03142
	2	65.788550	28.429763	,150	-13.35575	144.93285
	3	-114.220200*	28.429763	,001	-193.36450	-35.07590
	4	-105.926771*	28.801410	,004	-186.10568	-25.74786
2	0	-106.702338*	30.154318	,006	-190.64754	-22.75713
	1	-65.788550	28.429763	,150	-144.93285	13.35575
	3	-180.008750*	28.429763	,000	-259.15305	-100.86445
	4	-171.715321*	28.801410	,000	-251.89423	-91.53641
3	0	73.306413	30.154318	,116	-10.63879	157.25162
	1	114.220200*	28.429763	,001	35.07590	193.36450
	2	180.008750*	28.429763	,000	100.86445	259.15305
	4	8.293429	28.801410	,998	-71.88548	88.47234
4	0	65.012984	30.504961	,216	-19.90836	149.93433
	1	105.926771*	28.801410	,004	25.74786	186.10568
	2	171.715321*	28.801410	,000	91.53641	251.89423
	3	-8.293429	28.801410	,998	-88.47234	71.88548

*. La différence moyenne est significative au niveau 0.05.

Sous-ensembles homogènes :

S

Différence significative de Tukey^{a,b}

CC	N	Sous-ensemble pour alpha = 0.05		
		1	2	3
2	20	290.01710		
1	20	355.80565	355.80565	
0	16		396.71944	396.71944
4	19			461.73242
3	20			470.02585
Sig.		,172	,631	,099

Les moyennes des groupes des sous-ensembles homogènes sont affichées.

a. Utilise la taille d'échantillon de la moyenne harmonique = 18,859.

b. Les tailles de groupes ne sont pas égales. La moyenne harmonique des tailles de groupe est utilisée. Les niveaux d'erreur de type I ne sont pas garantis.

Fructose poids frais

Tableau de l'analyse de la variance (ANOVA1)

ANOVA

PF

	Somme des carrés	ddl	Carré moyen	F	Sig.
Intergroupes	27,742	4	6,935	12,227	,000
Intragroupes	47,079	83	,567		
Total	74,820	87			

Tests post hoc

Comparaisons multiples :

Variable dépendante: PF

Différence significative de Tukey

(I) CC	(J) CC	Différence moyenne (I-J)	Erreur standard	Sig.	Intervalle de confiance à 95 %	
					Borne inférieure	Borne supérieure
0	1	-1.025000*	.266273	,002	-1.76754	-.28246
	2	-.309813	.266273	,772	-1.05236	.43273
	3	.509325	.252609	,267	-.19511	1.21376
	4	.461025	.252609	,366	-.24341	1.16546
1	0	1.025000*	.266273	,002	.28246	1.76754
	2	.715187	.266273	,065	-.02736	1.45773
	3	1.534325*	.252609	,000	.82989	2.23876
	4	1.486025*	.252609	,000	.78159	2.19046
2	0	.309813	.266273	,772	-.43273	1.05236
	1	-.715187	.266273	,065	-1.45773	.02736

	3	.819137*	.252609	,014	.11470	1.52358
	4	.770837*	.252609	,025	.06640	1.47528
3	0	-.509325	.252609	,267	-1.21376	.19511
	1	-1.534325*	.252609	,000	-2.23876	-.82989
	2	-.819137*	.252609	,014	-1.52358	-.11470
	4	-.048300	.238162	1,000	-.71245	.61585
4	0	-.461025	.252609	,366	-1.16546	.24341
	1	-1.486025*	.252609	,000	-2.19046	-.78159
	2	-.770837*	.252609	,025	-1.47528	-.06640
	3	.048300	.238162	1,000	-.61585	.71245

*. La différence moyenne est significative au niveau 0.05.

Sous-ensembles homogènes :

PF

Différence significative de Tukey^{a,b}

CC	N	Sous-ensemble pour alpha = 0.05		
		1	2	3
3	20	1.96230		
4	20	2.01060		
0	16	2.47162	2.47162	
2	16		2.78144	
1	16			3.49662
Sig.		,278	,744	1,000

Les moyennes des groupes des sous-ensembles homogènes sont affichées.

a. Utilise la taille d'échantillon de la moyenne harmonique = 17,391.

b. Les tailles de groupes ne sont pas égales. La moyenne harmonique des tailles de groupe est utilisée. Les niveaux d'erreur de type I ne sont pas garantis.

Fructose poids sec

Tableau de l'analyse de la variance (ANOVA1)

ANOVA

PS

	Somme des carrés	ddl	Carré moyen	F	Sig.
Intergroupes	23,741	4	5,935	12,800	,000
Intragroupes	38,487	83	,464		
Total	62,228	87			

Tests post hoc

Comparaisons multiples :

Variable dépendante: PS

Différence significative de Tukey

(I) CC	(J) CC	Différence moyenne (I-J)	Erreur standard	Sig.	Intervalle de confiance à 95 %	
					Borne inférieure	Borne supérieure
0	1	-.821750 [*]	.240755	,009	-1.49313	-.15037
	2	.012000	.240755	1,000	-.65938	.68338
	3	.644087 [*]	.228400	,046	.00716	1.28102
	4	.546687	.228400	,127	-.09024	1.18362
1	0	.821750 [*]	.240755	,009	.15037	1.49313
	2	.833750 [*]	.240755	,007	.16237	1.50513
	3	1.465838 [*]	.228400	,000	.82891	2.10277
	4	1.368438 [*]	.228400	,000	.73151	2.00537
2	0	-.012000	.240755	1,000	-.68338	.65938
	1	-.833750 [*]	.240755	,007	-1.50513	-.16237
	3	.632087	.228400	,053	-.00484	1.26902
	4	.534687	.228400	,142	-.10224	1.17162
3	0	-.644087 [*]	.228400	,046	-1.28102	-.00716
	1	-1.465838 [*]	.228400	,000	-2.10277	-.82891

	2	-.632087	.228400	,053	-1.26902	.00484
	4	-.097400	.215338	,991	-.69790	.50310
4	0	-.546687	.228400	,127	-1.18362	.09024
	1	-1.368437*	.228400	,000	-2.00537	-.73151
	2	-.534687	.228400	,142	-1.17162	.10224
	3	.097400	.215338	,991	-.50310	.69790

*. La différence moyenne est significative au niveau 0.05.

Sous-ensembles homogènes :

PS

Différence significative de Tukey^{a,b}

CC	N	Sous-ensemble pour alpha = 0.05		
		1	2	3
3	20	1.26685		
4	20	1.36425	1.36425	
2	16	1.89894	1.89894	
0	16		1.91094	
1	16			2.73269
Sig.		,057	,135	1,000

Les moyennes des groupes des sous-ensembles homogènes sont affichées.

a. Utilise la taille d'échantillon de la moyenne harmonique = 17,391.

b. Les tailles de groupes ne sont pas égales. La moyenne harmonique des tailles de groupe est utilisée. Les niveaux d'erreur de type I ne sont pas garantis.

Surface des cals

Fructose

Tableau de l'analyse de la variance (ANOVA1)

ANOVA

S

	Somme des carrés	ddl	Carré moyen	F	Sig.
Intergroupes	553679,615	4	138419,904	12,167	,000
Intragroupes	944227,327	83	11376,233		
Total	1497906,942	87			

Tests post hoc

Comparaisons multiples :

Variable dépendante: S

Différence significative de Tukey

(I) CC	(J) CC	Différence			Intervalle de confiance à 95 %	
		moyenne (I-J)	Erreur standard	Sig.	Borne inférieure	Borne supérieure
0	1	-142.342875*	37.709801	,003	-247.50238	-37.18337
	2	-50.944188	37.709801	,660	-156.10370	54.21532
	3	59.890588	35.774659	,455	-39.87248	159.65366
	4	76.716838	35.774659	,211	-23.04623	176.47991
1	0	142.342875*	37.709801	,003	37.18337	247.50238
	2	91.398687	37.709801	,119	-13.76082	196.55820
	3	202.233462*	35.774659	,000	102.47039	301.99653
	4	219.059712*	35.774659	,000	119.29664	318.82278
2	0	50.944188	37.709801	,660	-54.21532	156.10370
	1	-91.398687	37.709801	,119	-196.55820	13.76082
	3	110.834775*	35.774659	,022	11.07171	210.59784
	4	127.661025*	35.774659	,005	27.89796	227.42409
3	0	-59.890588	35.774659	,455	-159.65366	39.87248
	1	-202.233462*	35.774659	,000	-301.99653	-102.47039
	2	-110.834775*	35.774659	,022	-210.59784	-11.07171
	4	16.826250	33.728672	,987	-77.23127	110.88377
4	0	-76.716837	35.774659	,211	-176.47991	23.04623
	1	-219.059712*	35.774659	,000	-318.82278	-119.29664
	2	-127.661025*	35.774659	,005	-227.42409	-27.89796
	3	-16.826250	33.728672	,987	-110.88377	77.23127

*. La différence moyenne est significative au niveau 0.05.

Sous-ensembles homogènes :

S

Différence significative de Tukey^{a,b}

CC	N	Sous-ensemble pour alpha = 0.05		
		1	2	3
4	20	338.49185		
3	20	355.31810		
0	16	415.20869	415.20869	
2	16		466.15288	466.15288
1	16			557.55156
Sig.		,221	,624	,094

Les moyennes des groupes des sous-ensembles homogènes sont affichées.

- Utilise la taille d'échantillon de la moyenne harmonique = 17,391.
- Les tailles de groupes ne sont pas égales. La moyenne harmonique des tailles de groupe est utilisée. Les niveaux d'erreur de type I ne sont pas garantis.

Résumé : Grâce aux alcaloïdes indoliques qu'elle produit, la plante médicinale *Catharanthus roseus* a une valeur thérapeutique importante. *Catharanthus roseus*, cependant la complexité et les faibles capacités productives liées à la culture en plein champs constituent de réels obstacles. Pour surmonter ces problèmes, la culture *in vitro* offre une alternative intéressante. Les résultats de l'optimisation de la biomasse des cals en utilisant l'éliciteur biotique, le Chitosan, ont montré que les différentes concentrations de Chitosan testées ont un effet significatif sur la production en biomasse des cals. Nous avons constaté également que l'efficacité de l'élicitation avec le Chitosan dépend de la source de carbone utilisée dans le milieu de culture. Le Chitosan en présence du fructose s'est avéré plus efficace que le Chitosan associé au sucrose dans l'amélioration de la biomasse des cals. L'accumulation maximale de biomasse (du poids frais et du poids sec) sur milieu contenant le fructose comme source de carbone été obtenue en utilisant une concentration de chitosan de 5 mg/l.

Mots clés : *Catharanthus roseus*, métabolites secondaires, cals, éliciteur biotique, Chitosan.

Abstract: Due to the indole alkaloids it produces, the medicinal plant *Catharanthus roseus* has significant therapeutic value. *Catharanthus roseus*, however, the complexity and low production capacity of field cultivation are real obstacles. To overcome these problems, *in vitro* cultivation offers an interesting alternative. The results of callus biomass optimisation using the biotic elicitor, Chitosan, showed that the different concentrations of Chitosan tested had a significant effect on callus biomass production. We also found that the efficiency of elicitation with Chitosan depends on the carbon source used in the culture medium. Chitosan in the presence of fructose was more effective than Chitosan in combination with sucrose in enhancing callus biomass. The maximum biomass accumulation (of fresh weight and dry weight) on medium containing fructose as carbon source was obtained using a chitosan concentration of 5 mg/l.

Keywords: *Catharanthus roseus*, secondary metabolites, callus, biotic elicitor, chitosan.

الخلاصة :

عناقية مدغشقر *Catharanthus roseus* بفضل قلويدات الإندول التي تنتجها ، فإن للنبات الطبي قيمة علاجية كبيرة . كاثارانثوس روزوس ، ومع ذلك ، فإن التعقيد وانخفاض القدرات الإنتاجية المرتبطة بزراعة الحقول المفتوحة تشكل عقبات حقيقية للتغلب على هذه المشاكل ، تقدم الثقافة في المختبر بديلاً مثيراً للاهتمام. أظهرت نتائج تحسين الكتلة الحيوية للكالس باستخدام اليكيتور الحيوي ، الشيتوزان ، أن التراكيز المختلفة للكييتوزان التي تم اختبارها لها تأثير كبير على إنتاج الكتلة الحيوية للكالس. وجدنا أيضاً أن كفاءة الاستنباط مع الشيتوزان تعتمد على مصدر الكربون المستخدم في وسط الاستزراع. كان الكيتوزان بوجود الفركتوز أكثر فعالية من الكيتوزان مع السكر في تحسين الكتلة الحيوية للكالس. تم الحصول على أقصى تراكم للكتلة الحيوية (الوزن الطازج والوزن الجاف) (على الوسط المحتوي على الفركتوز كمصدر للكربون باستخدام تركيز الشيتوزان البالغ 5مجم /لتر.

الكلمات المفتاحية:

Catharanthus roseus ، المستقلبات الثانوية ، الكالس ، elicitorالحيوي ، Chitosan.