

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية  
République Algérienne Démocratique et  
وزارة التعليم والبحث العلمي  
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique  
جامعة أمم بؤرة بومرداس  
Université M'hamed Bougara – Boumerdes



**Département de Biologie**

**Mémoire de fin d'études**

**En vue de l'obtention du diplôme de MASTER ACADEMIQUE**

**Domaine:** Sciences de la Nature et de la Vie

**Filière:** Biotechnologie

**Spécialité:** Biotechnologie Végétale

## **THÈME**

**Evaluation de la croissance et des activités biologiques des cultures *in vitro* de la pervenche de Madagascar  
« *Catharanthus roseus* (L.) G. Don »**

Soutenue le : 30/09/2021

**Présenté par : KHEDDOUCI Yasmine Mélissa**

**Jury :**

<b>M<sup>me</sup> Benzina Farida</b>	<b>Présidente</b>	<b>MCA</b>	<b>FS-UMBB</b>
<b>M<sup>me</sup> Rouane Asma</b>	<b>Examinatrice</b>	<b>MCB</b>	<b>FS-UMBB</b>
<b>M<sup>me</sup> Belalia Nawel</b>	<b>Promotrice</b>	<b>MCB</b>	<b>FS-UMBB</b>
<b>M<sup>me</sup> Benyammi Roukia</b>	<b>Co-Promotrice</b>	<b>MCB</b>	<b>ENS- Kouba</b>

**2020/2021**

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية  
République Algérienne Démocratique et  
وزارة التعليم والبحث العلمي  
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique  
جامعة أمم بؤرة بومرداس  
Université M'hamed Bougara – Boumerdes



**Département de Biologie**

**Mémoire de fin d'études**

**En vue de l'obtention du diplôme de MASTER ACADEMIQUE**

**Domaine:** Sciences de la Nature et de la Vie

**Filière:** Biotechnologie

**Spécialité:** Biotechnologie Végétale

## **THÈME**

**Evaluation de la croissance et des activités biologiques des cultures *in vitro* de la pervenche de Madagascar  
« *Catharanthus roseus* (L.) G. Don »**

Soutenue le : 30/09/2021

**Présenté par : KHEDDOUCI Yasmine Mélissa**

**Jury :**

<b>M<sup>me</sup> Benzina Farida</b>	<b>Présidente</b>	<b>MCA</b>	<b>FS-UMBB</b>
<b>M<sup>me</sup> Rouane Asma</b>	<b>Examinatrice</b>	<b>MCB</b>	<b>FS-UMBB</b>
<b>M<sup>me</sup> Belalia Nawel</b>	<b>Promotrice</b>	<b>MCB</b>	<b>FS-UMBB</b>
<b>M<sup>me</sup> Benyammi Roukia.</b>	<b>Co-Promotrice</b>	<b>MCB</b>	<b>ENS- Kouba</b>

**2020/2021**

# *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.*

*Mon cher frère et ma chère sœur qui m'ont toujours encouragé à aller de l'avant.*

*A tous les membres de ma famille,*

*A tous mes amis, camarades de promotion*

*A tous, je dédie ce travail.*

***Mélissa***

# *Remerciements*

Mon immense reconnaissance, gratitude et remerciements vont à ma promotrice **Mme BELALIA Nawel**, Maître de conférences classe B à l'université Mohammed Bougera Boumerdès (UMBB) pour avoir encadré et diriger ce travail avec une grande rigueur scientifique, pour sa disponibilité et ces précieux conseils qui m'ont permis de réaliser ce travail.

Mes remerciements s'étalent aussi à maco-promotrice **Mme BENYAMMI Roukia**, Maître de conférences classe B à l'ENS-Kouba, pour son intérêt et son aide précieuse, ses encouragements et pour les connaissances qu'elle m'a transmises et surtout pour m'avoir initié à la recherche dans le domaine de la biotechnologie végétale.

Mon remerciement est adressé à **Mme BENZINA Farida** Maître de conférences classe A à l'UMBB pour l'honneur qu'elle me fait en acceptant de présider le jury de soutenance.

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

Toute ma reconnaissance et mes remerciements les plus profonds 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.

Un grand remerciement est adressé à **Monsieur NOUASRI Ahmed**, Professeur à l'ENS Kouba pour son aide et ces précieux conseils, ainsi qu'à **Mme TOUNSI Hassina** ingénieur de laboratoire a l'ENS Kouba ; lieu où j'ai réalisé une partie de mon stage.

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

## TABLE DES MATIÈRES

DEDICACES	
REMERCIEMENTS	
TABLE DES MATIERES	
LISTE DES TABLEAUX	
LISTE DES FIGURES	
LISTE DES ABREVIATIONS	
LISTE DES ANNEXES	
INTRODUCTION.....	1
<b>Chapitre I : Synthèse bibliographique</b>	
<b>1. Considérations générales sur la pervenche de Madagascar : <i>Catharanthusroseus</i>.....</b>	<b>2</b>
Position systématique du genre <i>Catharanthus</i> .....	2
Origine et répartition géographique.....	3
Caractéristiques morphologiques de la plante .....	3
Génétique de <i>Catharanthusroseus</i> .....	4
<b>2. Culture in vitro .....</b>	<b>5</b>
Définition.....	5
Principe de culture in vitro .....	6
La micropropagation.....	7
Mécanisme de régénération .....	8
Organogénèse direct .....	8
2.3.1.2 Organogénèse indirect.....	9
2.4 Micropropagation in vitro des plantes médicinales.....	11
<b>3. Métabolites secondaires .....</b>	<b>12</b>
Les alcaloïdes.....	13
Rôle des alcaloïdes .....	13
Les polyphénols .....	13
Rôle des polyphénols.....	15
Les Terpènes .....	15

3.1.3 Rôle des terpènes.....	15
Métabolites secondaires de la pervenche de Madagascar.....	15
<b>4. Optimisation de production des métabolites secondaires.....</b>	<b>17</b>
Mécanisme générale de l'élicitation.....	17
Type d'éliciteurs.....	18
Eliciteurs abiotiques et biotiques.....	19
Eliciteurs endogènes et exogènes.....	19
Caractérisation d'une elicitation efficace.....	20
Concentration optimale de l'eliciteur.....	20
Age de la culture.....	20
<b>5. Activités biologiques de la pervenche de Madagascar.....</b>	<b>21</b>
<b>Chapitre II : Matériel et Méthodes</b>	
<b>1. Objectif recherché.....</b>	<b>24</b>
<b>2. Matériel végétal.....</b>	<b>24</b>
<b>3. Obtention de vitro semis.....</b>	<b>24</b>
Désinfection des graines.....	24
Mise en culture.....	25
<b>4. Induction de cals (Callogenèse).....</b>	<b>25</b>
Mise en culture des feuilles, tiges et chevelus racinaires.....	25
Observations réalisées.....	26
<b>5. Multiplication des cals.....</b>	<b>26</b>
<b>6. Multiplication des chevelus racinaires.....</b>	<b>26</b>
<b>7. Elicitation du matériel végétal.....</b>	<b>27</b>
Elicitation des cals.....	27
Première élicitation.....	27
Elicitation par le saccharose.....	27
Elicitation par l'acide salicylique.....	27

Elicitation par le chlorure de potassium .....	28
Deuxième élicitation .....	28
Elicitation par le saccharose .....	28
Elicitation par le mannitol .....	28
Elicitation par le chlorure de potassium .....	29
Observations réalisées .....	29
7.2 Elicitation des chevelus racinaires .....	29
<b>8. Extraction des polyphénols.....</b>	<b>30</b>
Préparation des extraits bruts hydroéthanoliques .....	30
Calcul du rendement d'extraction.....	31
<b>9. Détermination de l'activité antioxydante des différents extraits .....</b>	<b>31</b>
Principe du test de piégeage du radical libre DPPH.....	31
9.2. Protocole.....	31
<b>10. Analyse statistique.....</b>	<b>32</b>
<b>Chapitre III : Résultats et interprétations</b>	
<b>1. Obtention du matériel végétale .....</b>	<b>33</b>
Germination des graines de <i>C.roseus</i> .....	33
<b>2. Effet du traitement hormonal sur l'induction de la callogenèse.....</b>	<b>34</b>
Effet des différentes combinaisons d'hormones sur l'apparition des cals.....	34
Couleur et texture des cals.....	36
Surface des cals .....	37
<b>3. Effet de l'élicitation des cals .....</b>	<b>38</b>
Pour la première élicitation.....	38
Effet de l'élicitation sur le poids sec des cals.....	38
Élicitation par le saccharose .....	38
Elicitation par l'acide salicylique .....	39
Elicitation par le chlorure de potassium .....	39

Surface des cals .....	40
Deuxième élicitation .....	43
Effet de l'élicitation sur le poids sec des cals .....	43
Élicitation par le saccharose .....	43
Elicitation par le mannitol .....	43
Elicitation par le chlorure de potassium .....	45
Surface des cals .....	45
Effet de l'élicitation des chevelus racinaire.....	47
<b>4. Rendement d'extraction des différents extraits.....</b>	<b>47</b>
<b>5. Evaluation de l'activité antioxydante des différents extraits .....</b>	<b>48</b>
<b>Chapitre IV : Discussion</b>	
<b>1. Etablissement du matériel végétal .....</b>	<b>51</b>
<b>2. Callogenèse.....</b>	<b>51</b>
<b>3. Elicitation et croissance du matériel végétal.....</b>	<b>53</b>
<b>4. Activité antioxydante de la pervenche de Madagascar.....</b>	<b>55</b>
CONCLUSION GENERALE .....	56
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES .....	58
ANNEXES	

## LISTE DES TABLEAUX

<b>Tableau 1:</b> Les espèce du genre <i>Catharanthus</i> .....	3
<b>Tableau 2:</b> Principe actifs de <i>Catharathus roseus</i> .....	16
<b>Tableau 3:</b> Différentes balances hormonales testées pour l'induction de la callogenèse à partir des vitrosemis et des chevelus racinaires .....	25
<b>Tableau 4:</b> Rendement des extraits bruts des échantillons de cals.....	48
<b>Tableau 5 :</b> Rendement des extraits bruts des échantillons de chevelues racinaires.....	48

## LISTE DES FIGURES

<b>Figure 1</b> : Présentation de la plante <i>Catharanthus roseus</i> .....	2
<b>Figure 2</b> : Morphologie de <i>Catharanthus roseus</i> L.....	4
<b>Figure 3</b> : Schéma représentant les voies de régénération d'une plante.....	8
<b>Figure 4</b> : Différents types d'organogénèse contrôlés par les concentrations relatives d'auxine et de cytokinine dans les milieux de culture.....	10
<b>Figure 5</b> : Spectre de recherche de <i>Catharanthus roseus</i> .....	12
<b>Figure 6</b> : Figure de la vincristine et de la vinblastine .....	16
<b>Figure 7</b> : Figure des glycosydes de flavonol a potentiel antioxydant .....	16
<b>Figure 8</b> : Représentation schématique des réponses des cellules a l'élicitation .....	18
<b>Figure 9</b> : Protocole suivi pour l'induction de la callogénèse .....	26
<b>Figure 10</b> : Protocole expérimentale suivie dans l'élicitation des cals.....	31
<b>Figure 11</b> : Protocole expérimentale suivie dans l'élicitation des chevelus racinaires... ..	32
<b>Figure 12</b> : Schéma des démarches expérimentales suivies dans l'étude phytochimique.....	33
<b>Figure 13</b> : Germination des graines de <i>C.roseus</i> .....	36
<b>Figure 14</b> : Vitrosemis de <i>C.roseus</i> âgés de 60 jours .....	36
<b>Figure 15</b> : Réactivité des explants mis en culture sur différents milieux de callogénèse .....	37
<b>Figure 16</b> : Effet des différentes balances hormonales sur le pourcentage de callogénèse....	38
<b>Figure 17</b> : Effet des différentes balances hormonales sur le pourcentage de callogénèse....	39
<b>Figure 18</b> : Réactivité des feuilles sur le milieu M5.....	39
<b>Figure 19</b> : Bourgeons issus des cals mis en cultures sur le milieu M5.....	40
<b>Figure 20</b> : Effet des différentes balances hormonales sur la surface des cals.....	41
<b>Figure 21</b> : Effet des différentes concentrations du saccharose sur le poids sec des cals .....	42
<b>Figure 22</b> : Effet des différentes concentrations de l'AS sur le poids sec des cals .....	43
<b>Figure 23</b> : Effet des différentes concentrations du KCl sur le poids sec des cals.....	43
<b>Figure 24</b> : Effet des différentes concentrations de saccharose sur la surface des cals.....	44
<b>Figure 25</b> : Effet des différentes concentrations d'acide salicylique sur la surface des cals...45	
<b>Figure 26</b> : Effet des différentes concentrations de KCl sur la surface des cals .....	45
<b>Figure 27</b> : Effet des différentes concentrations du saccharose sur le poids sec des cals .....	46
<b>Figure 28</b> : Effet des différentes concentrations du mannitol sur le poids sec des cals .....	47
<b>Figure 29</b> : Effet des différentes concentrations du KCl sur le poids sec des cals.....	47
<b>Figure 30</b> : Effet des différentes concentrations du saccharose sur sur la surface des cals.....	48

<b>Figure 31:</b> Effet des différentes concentrations du mannitol sur la surface des cals.....	49
<b>Figure 32 :</b> Effet des différentes concentrations du KCl sur la surface des cals .....	49
<b>Figure 33 :</b> Effet des différentes concentrations du KCl sur le poids sec des CRs .....	50
<b>Figure 34 :</b> Variation de l'inhibition du DPPH en fonction de la concentration du BHT .....	52
<b>Figure 35:</b> Variation de l'inhibition du DPPH de l'extrait des cals traités par le mannitol ....	52
<b>Figure 36 :</b> Variation de l'inhibition du DPPH de l'extrait des cals témoins.....	53
<b>Figure 37 :</b> Activité antiradicalaire des extraits des cals de <i>C. roseus</i> et BHT .....	53

## **LISTE DES ANNEXES**

**Annexe 1** : Composition des milieux de culture

**Annexe 2** : Effet du traitement hormonal sur l'induction de la callogenèse

**Annexe 3** : Effet de la première élicitation sur le poids sec et la surface des cals

**Annexe 4** : Effet de la deuxième élicitation sur le poids sec et la surface des cals

**Annexe 5** : Effet de l'élicitation sur le poids sec des chevelus racinaires

**Annexe 6** : Test DDPH des différents extraits issus des cals de *Catharanthus roseus*

## LISTE DES ABBREVIATIONS

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

## ***INTRODUCTION GENERALE ET PROBLEMATIQUE***

---

Depuis des milliers d'années, l'homme utilisé les plantes trouvées dans la nature, pour traiter et soigner des maladies (Sanago, 2006). La phytothérapie est l'une des vieilles médecines du monde. Elle représente une alternative intéressante pour traiter et soigner sans créer de nouvelles maladies. Malgré le développement phénoménal de l'industrie pharmaceutique et chimique, l'intérêt populaire pour la phytothérapie n'a jamais cessé d'évoluer (Shu, 1998).

Les plantes médicinales renferment de nombreux principes actifs dont certains sont issus du métabolisme secondaire. Elles produisent déjà 70% de nos médicaments, et c'est environ 170000 molécules bioactives qui ont été identifiées à partir des plantes (Chaabi, 2008). Le plus souvent, les propriétés thérapeutiques des plantes médicinales n'ont pas été découvertes par les recherches modernes, mais font partie d'un savoir ancien, accumulé pendant plusieurs millénaires. Certains de ces usages anciens sont aujourd'hui vérifiés par des études scientifiques (Beddou, 2015).

Les métabolites secondaires de *Catharanthus roseus* possèdent certaines propriétés médicinales pour lesquelles ils ont été utilisés depuis longtemps. Cette plante médicinale produit un certain nombre d'alcaloïdes indole terpénoïdes et de polyphénols, qui sont utilisés dans les produits pharmaceutiques (Das *et al.*, 2020). Cependant, le rendement de ces principes actifs est très faible, donc très coûteux (van der Heijden *et al.*, 2004). Cela a justifié le recours aux techniques de biotechnologie végétale, afin d'améliorer la production de ces molécules et d'enrichir le marché de l'industrie pharmaceutique (Wu et Shi, 2008; Geetha *et al.*, 2009; Verma *et al.*, 2015; Benyammi, 2018).

La culture *in vitro* de *C.roseus* offre une voie de choix pour la stabilité et la durabilité de la production de ses principes actifs (Siddiqui *et al.*, 2013). Elle fournit également un excellent environnement pour approfondir les études de recherche sur ces métabolites secondaires. Ainsi, nous nous sommes intéressés à améliorer la croissance des tissus et leur pouvoir synthétique qui passe inévitablement par l'optimisation des conditions et des facteurs de culture qui contrôlent la synthèse des métabolites, ainsi que l'ingénierie métabolique ou la surexpression excessive d'enzymes clés (Mujib *et al.*, 2012).

La présente étude consiste à mettre au point des protocoles qui permettent d'améliorer la biomasse des cals et des chevelus racinaires, et d'évaluer l'activité antioxydante de certains extraits *in vitro* de la pervenche de Madagascar, *Catharanthus roseus*.

***SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE***

---

## 1. Considérations générale sur la pervenche de Madagascar

### Position systématique du genre *Catharanthus*

Le mot *Catharanthus* est dérivé du termes grecs *katharos* (Pur) et *anthos* (Fleur), mentionnant la netteté, la beauté et l'élégance de la fleur, et *roseus* signifie couleur rouge ou rose en latin. *Catharanthus roseus* fut découverte par le naturaliste suédois Carl von Linné en 1759, sous le nom initial de *Vinca rosea*, puis révisée par le botaniste britannique George Don en 1837, qui l'a classée dans le genre *Catharanthus* (Kaushik *et al.*, 2017).

Conformément au Système d'information taxonomique intégré (ITIS), le numéro de série taxonomique (TSN) conçu pour *Catharanthus 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 : *Catharanthus 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 (Das and Sharangi, 2017).



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

## **Origine et répartition géographique**

*Catharanthus roseus* est originaire de l'île de l'océan Indien Madagascar. Dans de nombreuses régions tropicales et subtropicales et dans le monde entier, elle a été présentée comme une plante ornementale populaire. *C. roseus* est cultivée et commercialisée en Espagne, aux États-Unis, en Chine, en Afrique, en Australie, en Inde et enfin en Europe du Sud pour son usage médicinal. Les médicaments dérivés de cette plante sont généralement fabriqués aux États-Unis, en Hongrie, en Allemagne de l'Ouest, en Italie, aux Pays-Bas ou encore au Royaume-Uni (Lata, 2007; Aruna *et al.*, 2015).

Cette vaste répartition de *C. roseus* est liée à d'importants transports de cette plante, en effet elle est utilisée comme coupe faim et tonifiant pour éliminer la fatigue des marins lors de longues traversées. 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).

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

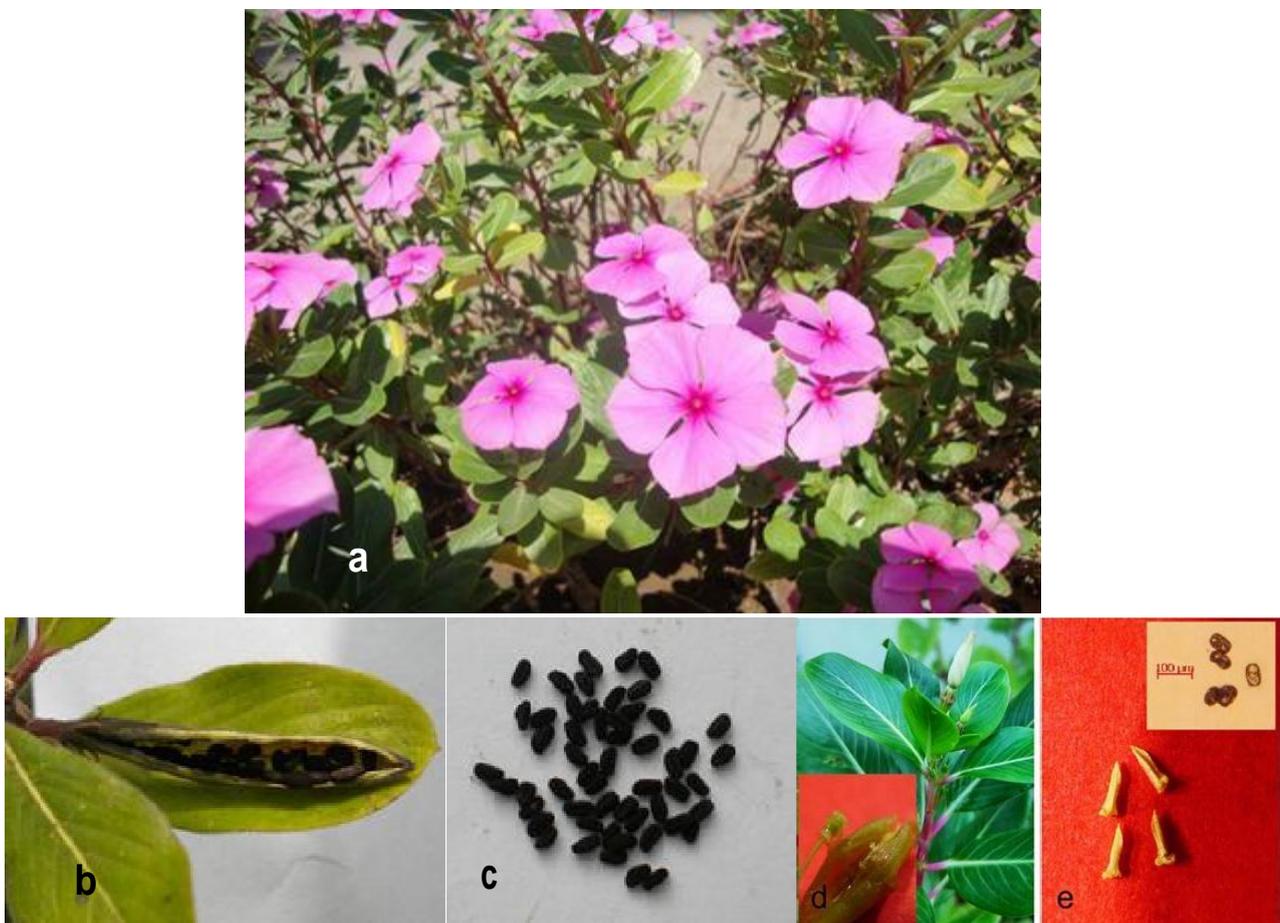
Nom de l'espèce	Lieu d'origine
<i>C. roseus</i> (L.) G. Don	Madagascar
<i>C. ovalis</i> Markgraf	Madagascar
<i>C. trichophyllus</i> (Baker) Pichon	Madagascar
<i>C. longifolius</i> (Pichon) Pichon	Madagascar
<i>C. coriaceus</i> Markgraf	Madagascar
<i>C. lanceus</i> (Bojer ex A. DC.) Pichon	Madagascar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

## **Caractéristiques morphologiques de la plante**

*Catharanthus roseus* est une plante vivace tropicale, herbacée sub-ligneuse à latex. Elle peut atteindre 75 cm de hauteur et porte des tiges glabres et rougeâtres et des racines très développées (Ross, 2003). Ses feuilles sont persistantes, entières, opposées et d'une forme elliptiques à oblongues (3 à 8 cm de longueur et 1,5 à 3,5 cm de largeur), leur couleur est d'un vert brillant au-dessus et vert pâle au-dessous avec une nervure médiane

pâle. Ses 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 al.*, 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 2** : Morphologie de *Catharanthus roseus* (Photographie prise à ENSA), a : Plant de *Catharanthus roseus* (Gr= 0.2X); b:fruit (Gr= 2.75X);c : Graines (Gr= 1,2X) (Benyammi, 2018).

## **Génétique de *Catharanthus roseus***

La pervenche est une espèce diploïde avec un nombre de chromosome de  $2n = 16$  (De Padua *et al.*, 2006). Sur huit paires de chromosomes, quatre paires se sont révélées avoir des centromères sub-médians alors que le reste possèdent des centromères sub-terminaux et médians. La longueur moyenne des chromosomes varient de 4,784 à 8,627  $\mu\text{m}$  (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*. Ils ont en outre observé des constriction secondaires au niveau du bras court de trois des huit paires de chromosomes de *C. pusillus* mais aucun chez *C. roseus*.

## **2. Culture *in vitro***

### **Définition**

La culture *in vitro* est un mode de multiplication végétative artificielle des plantes, qui doit respecter la conformité variétale des caractères végétatifs et productifs. Il s'agit d'un ensemble de méthodes faisant intervenir d'une part l'asepsie (Stérilisation du matériel, désinfection des explants), et d'autre part des conditions de culture parfaitement contrôlées (milieux de culture définis pour chaque type de plante, température, lumière, humidité,...). Les cultures *in vitro* de plantes sont donc des cultures d'explants de plantes, 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 ou des cellules sur des milieux nutritifs artificiels (Zryd, 2007).

Ces méthodes s'appliquent aux organes ou aux fragments d'organes appelés les explants : ils peuvent être des parties d'organes ou des organes entiers (Tige, feuille, racine, fleurs, etc.), des tissus, des pièces florales, des graines ou des embryons, des bourgeons ou des apex ou des méristèmes, des cellules somatiques ou sexuelles, des cellules végétales débarrassées de la paroi ou protoplastes. L'explant est choisi en fonction de la technique utilisée, l'objectif visé, mais aussi de l'espèce choisie (Togo, 2009).

## **Principe de culture *in vitro***

Chez les végétaux, l'organogenèse est assurée par les méristèmes qui sont constitués de massifs de cellules non différenciées, conservant la capacité de se diviser activement. L'organogenèse implique une différenciation cellulaire, à l'inverse d'une dédifférenciation, dans les tissus déjà spécialisés, qui peut conduire à la formation de nouveaux massifs méristématiques. Cette particularité illustre la totipotence des cellules végétales, c'est à dire C'est grâce à cette remarquable capacité de la cellule végétale que la culture *in vitro* doit tout l'aptitude des cellules à se diviser puis à se différencier de nouveau en fonction des conditions expérimentales (Larpen-Gourgaud et Sanglier, 1992). te son pouvoir. C'est ainsi que, tout individu du règne végétal peut être cultivé *in vitro*, il n'y a pas d'exception. Cependant cela ne veut pas dire que le développement actuel des milieux de culture, et les connaissances que l'on peut avoir du comportement des différentes espèces sur ces milieux de culture, nous permettent de réaliser immédiatement et sans problème la culture *in vitro* de toutes les plantes existant sur la terre (Augé *et al.*, 1989).

### **a. La dédifférenciation**

Il est bien évident que le passage d'un état différencié à l'état de cellules méristématiques proliférantes, ne se fait pas sans que des modifications profondes n'apparaissent dans la structure de la cellule. Ces modifications permettent à la cellule adulte à l'état juvénile de s'orienter vers la formation de n'importe quel organe. Suivant la composition du milieu de culture, les cellules dédifférenciées continueront à proliférer à l'infini, elles deviennent parfois capables de poursuivre leur prolifération, même en l'absence de substances stimulantes, telle que les phytohormones (Exemple : Auxine et cytokinine). Les cellules végétales ont la capacité de se dédifférencier et de retourner à l'état cellulaire indifférencié (Embryonnaire ou méristématique). Cette perte de l'inhibition corrélative permet l'expression de toutes les possibilités embryonnaires (Lachachi, 2009)

### **b. La différenciation**

Tout individu est issu d'une cellule indifférenciée, la cellule-œuf. Cette cellule se multiplie et donne des masses cellulaires qui se différencient pour construire l'individu. Cette différenciation se fait sous la pression d'un certain nombre d'informations de différents types (Bhatia, 2015):

- Les régulateurs de croissance : exemple l'auxine pour former des racines.
- Les ressources: les carences ou disponibilités orientent les métabolismes et la différenciation.
- Le troisième facteur pouvant jouer sur l'orientation de la différenciation est l'échange d'énergies .Toute synthèse cellulaire, nécessaire à la différenciation, nécessite de l'énergie et dépend donc, entre autres, de la disponibilité en molécules de type NTP.

### **c. La totipotence**

Un tissu ou une cellule dédifférencié peut évoluer dans toute sorte de direction cela manifeste la totipotencialité de la cellule végétale. Cette totipotence de la cellule végétale se retrouve aussi au niveau des cellules reproductrices: grains de pollen ou ovules. Une cellule végétale même très différenciée est souvent capable de revenir à l'état juvénile en se dédifférenciant, elle peut ensuite se diviser pour donner tel ou tel tissu dépendant des circonstances (Djennane *et al.*, 2002).

La totipotence est donc une dédifférenciation expérimentale qui peut être déclenchée par la perturbation de corrélations organiques, par des traumatismes, par l'action des phytohormones ou par leur suppression (Fracaro and Echeverrigaray, 2001).

### **La Micropropagation**

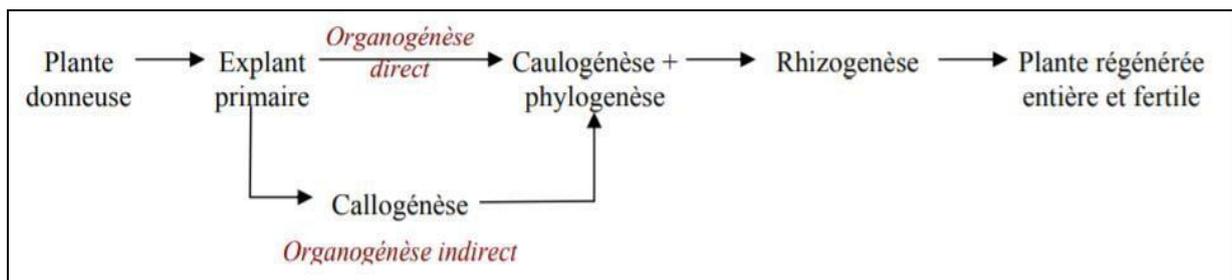
La multiplication végétative par culture in-vitro ou micro propagation présente plusieurs avantages sur les méthodes classiques dites "conventionnelles" de propagation. Cette technique a rendu possible la multiplication d'espèces chez lesquelles les semences sont rares, ou présentent des difficultés de germination où les techniques de bouturage ou de greffage sont inapplicables, ce qui a conduit à une plus grande diversité des plantes commercialisées. La micropropagation est utilisé 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).

### 2. 3.1 Mécanisme de régénérations (Organogénèse)

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 soient des tiges (caulogénèse) et de racines (Rhizogénèse), soit des embryons somatiques (Zryd, 1988; Margara, 1989).



**Figure 3:** Schéma représentant les voies de régénération d'une plante (Auge *et al.*, 1989).

#### Organogénèse direct

L'organogénèse directe fait référence à l'induction de bourgeons et de racines sans aucune callogénèse, conduisant directement à compléter le développement de plantules à partir d'explant (Figure 3) (De Klerk, 2008). Les hormones végétales ajoutées au milieu de culture orientent le développement de l'explant vers une organogénèse directe. Un rapport élevé de cytokinine/auxine est très efficace en cas d'initiation et de prolifération des bourgeons. De toutes les combinaisons d'auxine et cytokinine utilisée pour la prolifération des pousses, la combinaison N6-benzyladénine (BA) et acide  $\alpha$ -naphthalène acétique (ANA) était jugée la plus prometteuse (Das *et al.*, 2020).

## **Organogénèse indirecte**

L'organogénèse indirecte indique un processus de régénération via la formation de callosités à partir de l'explant (Das *et al.*, 2020). L'induction des plantes utilisant cette voie, d'organogénèse indirecte, n'assure pas la fidélité clonale, mais, cela pourrait être un système idéal pour sélectionner des variantes somaclonales de caractéristiques souhaitées, et également de permettre la multiplication de masse. La bonne dose et le type d'hormone végétale induisent la callogénèse dans l'explant. Généralement, les auxines sont connues pour leur capacité à initier la division cellulaire et la formation du méristème, ce qui aboutit à la formation de cals (Gantait *et al.*, 2018).

Il ressort clairement des rapports disponibles sur la callogénèse (Kim *et al.*, 1994; Hilliou *et al.*, 1999 ; Zhao *et al.*, 2001; Ataei-Azimi *et al.*, 2008) que l'auxine en combinaison avec la cytokinine, en dose inférieure, induit un cal de l'explant. Parmi toutes les auxines, l'ANA ou l'acide 2,4 dichlorophénoxyacétique (2,4-D) étaient couramment utilisées pour l'induction de cal. La combinaison de NAA et de la kinétine (Kn) s'est avérée efficace lors de l'induction du cal, tel que rapporté par plusieurs chercheurs (Ramani et Jayabaskaran, 2008; Moghe *et al.*, 2016).

### **a. Callogénèse**

La callogénèse est obtenue par la mise en culture *in vitro* de divers fragments de plantes dépourvues de méristème sur un milieu de culture, additionné des concentrations faibles d'auxine et/ou de cytokinine, en provoquant une désorganisation importante des tissus végétaux, conduisant à une prolifération anarchique et à la formation de masses inorganisées (Dédifférenciées) nommées cals (Zryd, 1988).

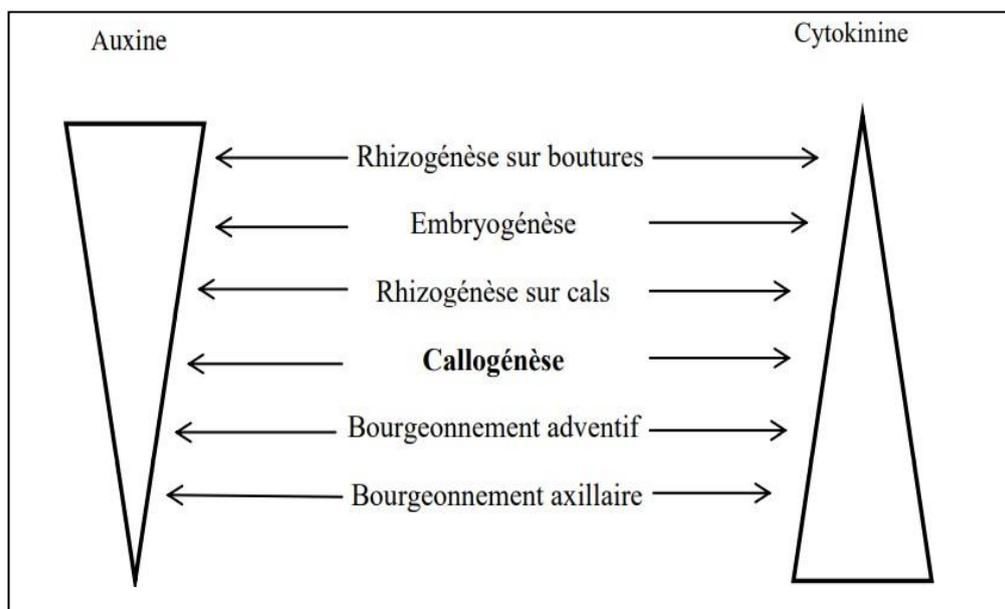
Dans ce processus, les cellules adultes et vives sont temporairement capables de revenir à l'état juvénile. Les cellules rajeunies ont une plus grande croissance et un meilleur potentiel de division. La formation de callosités a lieu sous l'influence des régulateurs de croissance exogène présents dans le milieu nutritif. Le type d'exigence de régulateur de croissance et leur concentration dans le milieu dépend fortement du génotype et du taux d'hormones endogène contenu dans un explant (Chawla, 2009).

Le rapport des régulateurs de croissance de plantes utilisées dans un milieu de culture semble souvent déterminer si la croissance et le développement procède d'une façon inorganisée ou pas. Skoog et Miller (1957) dans leur étude sur l'organogénèse *in vitro* ont

démonstré que la callogénèse est induite quand le rapport Auxine / Cytokinine est équilibré (Figure 4). En plus du milieu de culture et des conditions environnementales, la culture de cals est influencée par la taille et la nature de l'explant, car plus il est grand, plus l'équilibre endogène est déterminant, ainsi, le milieu n'a qu'une influence limitée (Belabbas, 2011).

Par contre, un explant de petite taille sera plus facilement orienté par les substances contenues dans le milieu. Les tissus épidermiques sont les plus réactifs, également, les tissus corticaux ou cambiaux présentent de bonnes réactions, cependant, les parenchymes médullaires sont les moins réactifs car ils demandent un ensemble assez complet de régulateurs (Belabbas, 2011). Les facteurs de croissance physiques et environnementaux sont très importants dans le développement des cals. L'effet de la lumière sur la formation de callosités dépend de l'espèce végétale, la lumière peut être nécessaire dans certains cas et l'obscurité dans d'autres cas. Une température de 22 à 28 ° C est normalement avantageuse pour la formation de callosités (Dahdouh, 2013).

La nature, l'aspect et la couleur des cals sont différents selon les espèces et le type d'explant et d'hormone utilisé. Ils peuvent être blanc ou coloré, aqueux ou dur, friable ou compact. La croissance du cal au sein d'une espèce végétale peut également dépendre de facteurs tels que la position initiale de l'explant dans la plante et les conditions de croissance. (Dahdouh, 2013).



**Figure 4 :** Différents types d'organogénèse contrôlés par les concentrations relatives d'auxine et de cytokinine dans les milieux de cultures (Zryd, 1988).

## **b. Caulogénèse**

La caulogénèse désigne à la fois l'initiation et le développement des bourgeons et des tiges. Les bourgeons néoformés *in vitro* peuvent apparaître sur l'explant initial ou sur un cal. Ces derniers 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 (Zryd, 1988).

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 telles que: le cambium, le parenchyme vasculaire ou libérien (Fortes and Pais, 2000).

Ainsi, l'intensité de cette néoformation est nettement dépendante de la nature des tissus contenus dans l'explant. Elle est maximale pour les tissus cambiaux, élevée pour les tissus du phloème et du xylème, très faible ou nulle pour le parenchyme cortical ou médullaire. (Margara, 1989).

## **c. Rhizogénèse**

La rhizogénèse désigne la néoformation et la croissance des racines. Les méristèmes de racines se répartissent en plusieurs catégories selon leur origine (Aïdam, 2013).

La rhizogénèse est un phénomène complexe, il comporte différentes phases: la dédifférenciation, la formation d'amas de cellules méristématiques, la différenciation et l'organisation d'amas méristématiques en primordium racinaire qui se développeront en jeunes racines (Boxus et Bercetche, 1995)

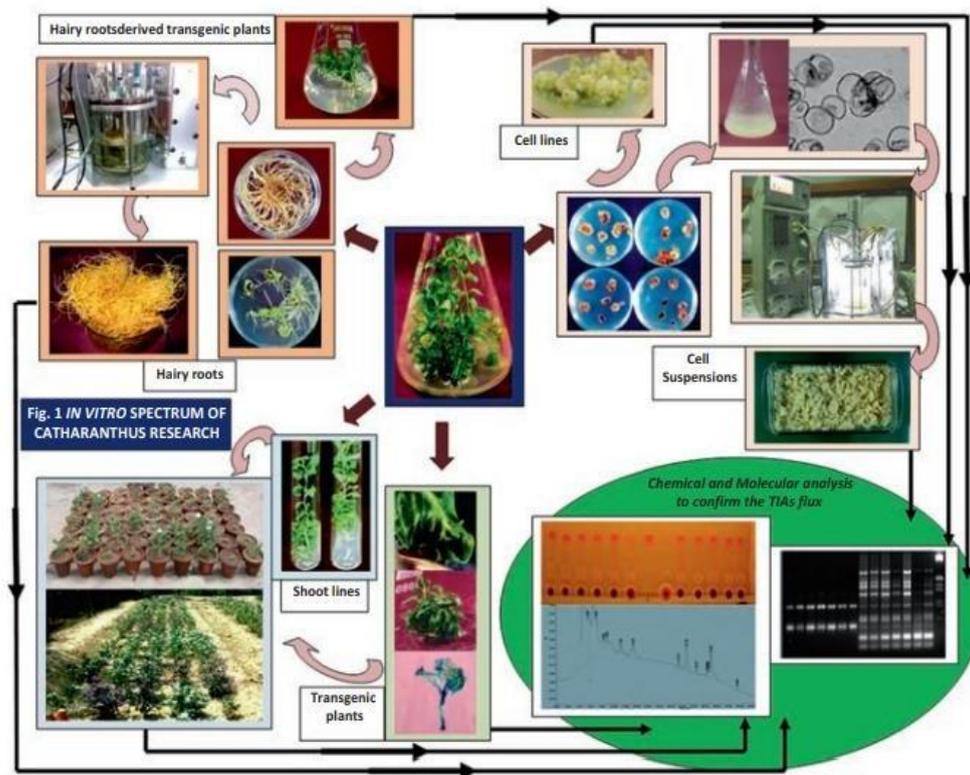
## **2.4 Micropropagation *in vitro* des plantes médicinales**

La micropropagation *in vitro* a été largement utilisée pour la propagation végétative de nombreuses plantes médicinales, en vue de leur conservation et en vue d'une production rapide de biomasse et de métabolites secondaires d'intérêt pharmacologique (Shahzad *et al.*, 2013). Cela a été rapportée par plusieurs chercheurs (Hirata *et al.*, 1994; Rout *et al.*, 2000; Pietrosiuk *et al.*, 2007; Abbott *et al.*, 2010).

En outre, la micropropagation permet d'obtenir des régénérations d'un génotype génétiquement stable et invariable (Pietrosiuk *et al.*, 2007). Les études menées dans différents laboratoires hautement spécialisés ont démontré que, dans de nombreux cas, la capacité de

produire des métabolites secondaires est associée au processus de l'organogénèse. Cette constatation a contribué à des progrès considérables dans le domaine de la micropropagation (van der Heijden *et al.*, 2004).

*C. roseus* a été régénéré avec succès par la culture *in vitro*, aussi bien par l'organogénèse directe (Benyammi *et al.*, 2011), que par l'organogénèse indirecte en passant par les embryons somatiques (Choi *et al.*, 2014). La micropropagation de *C. roseus* dépend énormément des phytohormones additionnées au milieu de culture, et le rapport hormone Auxine /Cytokinine joue un rôle primordiale sur l'accumulation de biomasse et l'amélioration des rendements des métabolites secondaires (Hirata *et al.*, 1994).



**Figure 5:** Spectre de recherche *in vitro* de *Catharanthus roseus* (Verma *et al.*, 2016).

### 3. Métabolites secondaires

Les plantes ont une importance capitale pour la survie de l'homme et des différents écosystèmes. Elles renferment une part importante des composés qui interviennent dans l'ensemble des réactions enzymatiques ou biochimiques ayant lieu dans l'organisme. On distingue ainsi deux groupes de métabolites : les métabolites primaires et les métabolites secondaires (Hartmann, 2007).

- **Les métabolites primaires** : sont des molécules organiques qui se trouvent dans toutes les cellules de l'organisme d'une plante pour y assurer sa survie (Epifano *et al.*, 2007).
- **Les métabolites secondaires** : ont une répartition limitée dans les différentes espèces de végétaux. Ils ont des fonctions très importantes pour la survie et la propagation des plantes qui les produisent, comme signaux chimiques, pour défendre leur producteur contre les herbivores et les pathogènes. Ils participent à des réponses allélopathiques (Compétition entre les plantes pour la germination et croissance) (Jeun *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).

### **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 moléculaire hétérocyclique complexe. Ils existent à l'état de sels et ils sont biosynthétiquement formés à partir d'un acide aminé (Reynier, 2007)

Les alcaloïdes existent rarement à l'état libre dans la plante, le plus souvent ils sont combinés à des acides organiques ou à des tanins (Roux and Catier, 2007).

### **Rôles des alcaloïdes**

Ils possèdent une activité pharmacologique significative. Bien que beaucoup d'entre eux sont employés pour leurs propriétés analgésiques (Comme la morphine, la codéine), dans le cadre de protocoles de sédation (Anesthésie, atropine) souvent accompagnés des hypnotiques, ou comme agents antipaludéens (Quinine, chloroquinine) ou agents secondaires anticancéreux (Taxol, vinblastine, vincristine), certains d'entre eux restent toxiques (Comme la strychnine ou l'aconitine) (Zenk et Jueng, 2007).

### **Polyphénols**

Le terme « polyphénols » est fréquemment utilisé dans le langage courant et même dans des articles scientifiques ou de vulgarisation pour désigner l'ensemble des composés phénoliques des végétaux donc la désignation générale « composés phénoliques » concerne à

la fois les mono, les di et les polyphénols dont les molécules contiennent respectivement une, deux ou plusieurs fonctions phénoliques (Fleuriet *et al.*, 2005).

Les composés phénoliques forment un groupe diversifié de métabolites secondaires (Hattenswiller et Vitousek, 2000), d'un poids moléculaire élevé (Harbone, 1994). Ces molécules constituent le groupe majoritaire le plus important dans le règne végétal.

Les différentes parties de la plante possèdent des quantités en polyphénols variables selon l'espèce végétale et le groupe phénolique considéré (Bamforth, 2000). Ils sont constitués des composés chimiques aromatiques contenant au moins une fonction phénol, c'est-à-dire d'un noyau aromatique lié à un ou plusieurs groupement(s) hydroxyle(s), en plus d'autres constituants modifié(s) ou non (Lattanzio *et al.*, 2006)

On peut distinguer les différentes classes des polyphénols en se basant d'une part, sur le nombre d'atomes constitutifs et d'autre part, sur la structure de squelette de base. Deux principales classes sont largement répandues : Les flavonoïdes et les tanins.

Les flavonoïdes sont désignés sous le nom de vitamine P (P étant la première lettre de mot perméabilité), en raison de leur efficacité à normaliser la perméabilité des vaisseaux sanguins (Nijveldt *et al.*, 2001). Ces premiers renferment une très large gamme de composés naturels appartenant à la famille des polyphénols (Seyoum *et al.*, 2006), ils sont considérés comme des pigments quasiment universels des végétaux qui sont en partie responsables de la coloration des fleurs, des fruits et parfois des feuilles (Guignard, 1996 ; Medic *et al.*, 2003). À l'état naturel les flavonoïdes se trouvent le plus souvent sous forme d'hétérosides. (Bruneton, 1999 ; Ghestem *et al.*, 2001). Les flavonoïdes peuvent être subdivisés en plusieurs classes dont les plus importantes sont : les flavones, les isoflavandiols, les flavonols, les flavandiols, les auronnes, les chalcones, et les anthocyanins (Effendi et Yajun, 2008)

Les tannins sont des substances polyphénoliques hydrosolubles de structure variée, de saveur astringente (Hurabielle, 1981) naturellement produits par les plantes qui ont la propriété de transformer la peau fraîche en un matériau imputrescible: le cuir. Cette propriété de tannage provient de la création de liaisons entre les molécules de tannins et les fibres de collagène de la peau, et à leur aptitude à se combiner à des macromolécules (protéines, polysaccharides...) et à d'autres polymères organiques tels que des glucides, des acides nucléiques, des gélatines, des stéroïdes et des alcaloïdes pour former un précipité (Bruneton, 1999)

## **Rôles des polyphénols**

Les composés phénoliques possèdent des propriétés biologiques diverses d'où leur utilisation en thérapeutique. Ils participent à la protection contre certaines maladies en raison de leur interaction possible avec de nombreuses enzymes et de leurs propriétés antioxydantes (Fleuriet *et al.*, 2005). En outre, Un certain nombre de molécules polyphénoliques ont été testés cliniquement comme des antiagrégants plaquettaires, ou hypotenseurs avec des résultats moins probants (Martin et Andriantsitohaina, 2002).

## **Terpènes**

Les terpènes sont une classe d'hydrocarbures cycliques ou à chaînes ouvertes. Ce sont des produits naturels largement répartis dans le règne végétal. Leur particularité structurale la plus importante est la présence dans leur squelette un assemblage d'un nombre entier d'unités pentacarbonées ramifiées dérivées du 2-méthylbutadiène, appelées unités isopréniques à 5 atomes de carbones (C<sub>5</sub>H<sub>8</sub>) reconnue par Wallach dès 1887. Cet isoprène est la base du concept de la "règle isoprénique" énoncée en 1953 par Ruzicka. Cette règle considère le diphosphate d'isopentényle (IPP), désigne sous le nom d'isoprène actif comme le véritable précurseur de la molécule terpénique.

## **Rôles des terpènes**

Les terpènes ont une large utilisation dans le domaine thérapeutique comme antiviraux et antimicrobienne de plus, ils sont utilisés dans le domaine industriel des épices et des parfums (Beaulieu et Baldwin, 2002 ; Kabera, *et al.*, 2014).

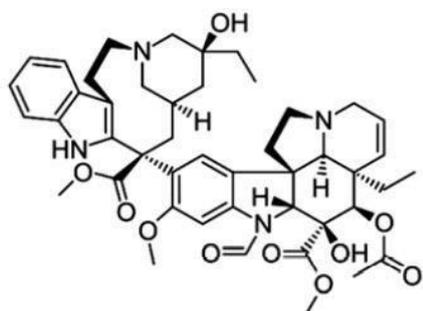
## **Métabolites secondaire de la pervenche de Madagascar**

*Catharanthus roseus* renferme une large gamme de composés phytochimiques dans ces différentes parties (Tableau 2) (Monokesh *et al.*, 2013). Les alcaloïdes indoliques terpénoïdes (AITs) se trouvent, essentiellement, dans les feuilles et les racines (Figure 6) (Tableau 2). Ils sont représentés par plus de 130 molécules, dont particulièrement la vinblastine et la vincristine (Figure 6), 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 périvine (Usia *et al.*, 2005; Zhong *et al.*, 2010; Wang *et al.*, 2011 ; Kaushik *et al.*, 2017). Ces AITs possèdent une valeur économique très importante due à leur intérêt pharmaceutique (Monokesh *et al.*, 2013).

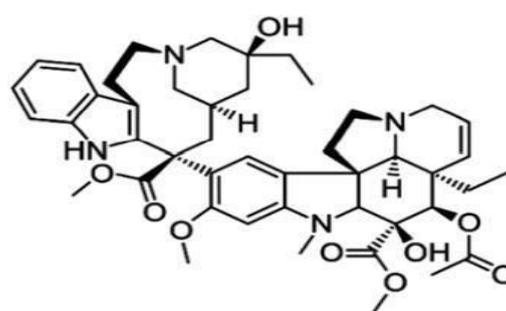
Aussi, les flavonoïdes et polyphénols sont présents dans les parties aériennes de la pervenche, principalement, les glycosides de flavonol (di- et trisaccharides de kaempférol, quercétine, anthocyanidines glycosides et isorhamnetine) (Voukeng *et al.*, 2016; Akbar, 2020), caractérisés par leur potentiel antioxydant (Ferrerres *et al.*, 2008). Cette plante contient aussi des tanins, des phlorotannins, des triterpénoïdes, des sucres réducteurs, des anthraquinones et des stérols, qui sont présents dans les feuilles (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, composées 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.

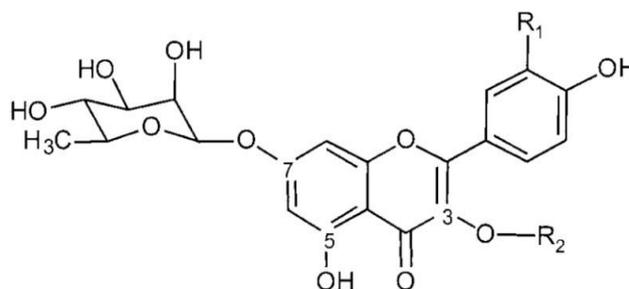


A. Vincristine



B. Vinblastine

**Figure 6:** Structure de la vincristine et la vinblastine (Alam *et al.*, 2017)



**Figure 7:** Structure des glycosides de flavonol (di- et trisaccharides de kaempférol, quercétine, anthocyanidines glycosides et isorhamnetine) a potentiel antioxydant (Alam *et al.*, 2017).

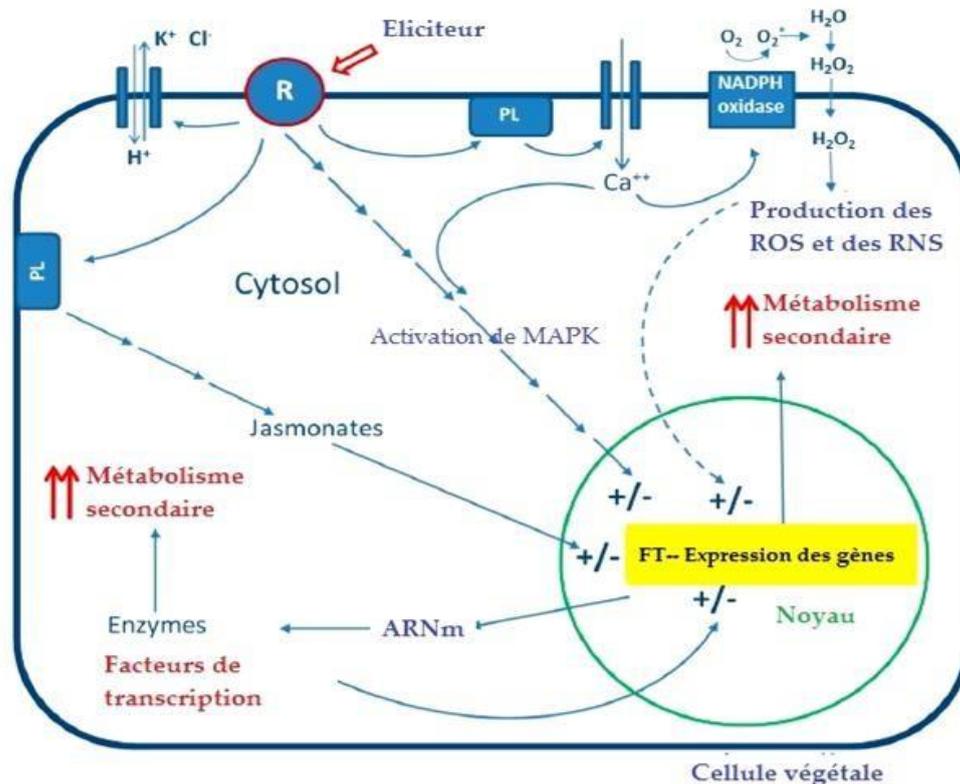
#### **4. Optimisation de production des métabolites secondaires par élicitation**

##### **Mécanisme générale de l'action des éliciteurs**

La réponse des plantes au stress induite par les éliciteurs commence, généralement, au niveau de la membrane plasmique des cellules végétales, en impliquant une cascade d'événements entre la perception du signal (Eliciteur) par un récepteur membranaire et l'activation des gènes liés à la défense dans le noyau (Zhao *et al.*, 2005; Gorelick and Bernstein, 2014). Plusieurs événements précoces se produisant, dès la perception du signal émis par l'éliciteur. Ces événements sont importants pour le système de transduction du signal, tel que l'induction d'influx de  $\text{Ca}^{2+}$  au niveau de la membrane, et ainsi la production provisoire des espèces réactives de l'oxygène (ERO ou ROS), de l'oxyde nitrique (ON) et la biosynthèse de l'Acide jasmonique et / ou de l'Acide Salicylique (Barz *et al.*, 1988; Angelova *et al.*, 2006; Gorelick and Bernstein, 2014). Ces molécules jouent un rôle de signalisation pour activer les réactions de défense en aval telles que la peroxydation lipidique, l'activation des gènes liés à la défense et la synthèse de métabolites secondaires (Zhao *et al.*, 2005; Ramirez-Estrada *et al.*, 2016). La cascade des événements intervenant dans les réactions de défense induite par les éliciteurs peut se résumer comme suit :

- Perception de l'éliciteur par le récepteur membranaire (Lebrun-Garcia *et al.*, 1999);
- Phosphorylation réversible et déphosphorylation des protéines de la membrane plasmique et des protéines cytosoliques (Zimmermann *et al.*, 1999);
- Augmentation de la concentration cytosolique du calcium [ $\text{Ca}^{2+}$ ] (Laxalt and Munnik, 2002) ;
- Influx de  $\text{Cl}^-$  et  $\text{K}^+$  et de l'efflux  $\text{H}^+$ , conduisant à l'alcalinisation extracellulaire et l'acidification cytoplasmique (Zimmermann *et al.*, 1999);
- Activation de la « mitogen activate d- protein kinase (MAPK) » (Romeis, 2001);
- Activation de la NADPH oxydase et la production des dérivés réactifs de l'oxygène e l'azote (ROS et RNS) (Lebrun-Garcia *et al.*, 1999);
- Début de l'expression des gènes de défense (Memelink *et al.*, 2001);
- Accumulation des phytoalexines et des tanins qui stimulent la production des composés de signaux intracellulaires, tels que Acide jasmonique(AJ), Acide salicylique (AS), Oxyde nitrique (ON) et Ethylène (ET) (Pedras *et al.*, 2002) ;

- Expression des gènes impliqués dans la biosynthèse des métabolites secondaires (Memelink *et al.*, 2001; Katz *et al.* 2002) ;
- Biosynthèse et accumulation des métabolites secondaires dont les polyphénols (Siddiqui *et al.*, 2013).



**Figure 8:** Représentation schématique des réponses possibles des cellules à l'élicitation. R: Récepteur; PL: Phospholipase; MAPK: Mitogen activate dproteïn kinase; ERO / ROS: Espèces réactifs de l'oxygène; ERA / RNS: Espèces réactifs de l'azote; FT: Facteurs de transcription (Ramirez-Estrada *et al.*, 2016).

## Type d'éliciteurs

Le terme « éliciteur » s'applique à l'origine aux molécules susceptibles d'induire la production de métabolites secondaires (Gadzoska *et al.*, 2004). Il est maintenant utilisé pour l'ensemble des molécules qui induisent des réactions de défense chez les plantes. 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 ou endogènes (Montesano *et al.*, 2003).

## **Éliciteurs 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, Ca<sup>2+</sup> 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).

## **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).

Dans de nouvelles approches en vue d'améliorer les rendements agricoles, des micro-organismes fongiques (Yu *et al.*, 2016) et bactériens (Glick, 1995), qui en interaction avec les plantes, peuvent provoquer une réponse défensive de ces dernières et accélérer leur croissance, sont utilisés comme éliciteurs en alternative aux produits chimiques.

En effet, certains champignons tels que *Gliocladium*, *Trichoderma* et *Ampelomyces* virulents, symbiotiques et antagonistes de champignons phytopathogènes, sont capables de stimuler la croissance racinaire et provoquer la synthèse de molécules de défense de la plante (Vinale *et al.*, 2008). Les rhizobactéries comme les PGPRs « Plant Growth Promoting Rhizobacteria » ou rhizobactéries promotrices de la croissance des plantes (Tels que *Pseudomonas*, *Bacillus* et *Streptomyces*) ayant le pouvoir de coloniser les racines des végétaux

et exercer des effets bénéfiques sur ces dernières (Par divers mécanismes qui se traduisent en une phytostimulation), représentent actuellement le groupe de bactéries le plus utilisé en élicitation biotique (Antoun and Kloepper, 2001)

### **Caractéristiques d'une élicitation efficace**

L'amélioration de la production de métabolites secondaires des cultures végétales *in vitro*, par élicitation a ouvert un nouveau domaine de recherche qui pourrait avoir d'importants avantages économiques pour l'industrie pharmaceutique. Plusieurs paramètres tels que la concentration de l'éliciteur, la durée de l'exposition à l'éliciteur, l'âge de la culture, etc. jouent un rôle important dans l'efficacité de l'élicitation (Namdeo *et al.*, 2007).

### **Concentration optimale de l'éliciteur**

L'effet d'un éliciteur sur le rendement du métabolite secondaire dépend énormément des concentrations appliquées sur les cultures. Ces concentrations varient selon la nature de l'éliciteur (Biotique ou abiotique). Pour les éliciteurs biotiques, les doses efficaces et optimales sont fréquemment entre 50 à 300 µg / mL de l'extrait brut. Ces doses sont généralement quantifiées par la teneur totale en glucides des cultures traitées. Cependant, pour les composés purifiés, les molécules de signalisations telles que MeJa ou AS, et les éliciteurs abiotiques de composés connus, les doses appropriées sont généralement exprimées en unités molaires, variant dans un large éventail de 0,1 à 100000 µM (Wang and Wu, 2013).

Singh *et al.* (1994) ont mesuré la liaison récepteur/ éliciteur afin de prévoir les doses nécessaires de l'éliciteur pour les cultures de tissus végétaux. Le raisonnement de cette méthode est basé sur l'hypothèse que les éliciteurs se lient à des récepteurs spécifiques sur la membrane des cellules végétales, selon une cinétique de saturation et un équilibre entre les éliciteurs liés et libres. D'après ce modèle, la quantité ou la dose de l'éliciteur requise dépend de la biomasse des cultures à traitées.

### **Âge 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 (Phase exponentielle), est généralement la plus favorable. Alors que l'élicitation précoce (Phase de latence) peut arrêter la croissance de la biomasse et l'élicitation tardive (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.

## **5. Activités biologiques de la plante de *Catharanthus roseus***

Traditionnellement utilisée pour ses propriétés thérapeutiques, la pervenche de Madagascar a fait l'objet de recherches approfondies pour la mise au point de nouveaux médicaments. La pervenche de Madagascar fait partie intégrante d'un bon nombre de pharmacopées traditionnelles, et les vertus médicinales qu'on lui prête divergent selon les régions du globe. *Catharanthus roseus* a fait l'objet de nombreuses recherches qui ont pu démontrer les nombreuses activités pharmacologiques qu'elles possèdent (Van der Heijden *et al.*, 2004).

### **Activité anti-cancéreuse**

Les alcaloïdes anticancéreux Vinblastine et Vincristine sont dérivés de la tige et de la feuille de *Catharanthus roseus*. Ces alcaloïdes ont un effet d'inhibition de la croissance sur certaines tumeurs humaines. La vinblastine est utilisée expérimentalement pour le traitement des néoplasmes et est recommandée pour la maladie de Hodgkins, le carcinome chorio. La vincristine, un autre alcaloïde, est utilisée pour la leucémie chez les enfants (El Guessabi, 2017).

Différents pourcentages des extraits bruts méthanoliques de *C. roseus* ont montré une activité anticancéreuse significative contre de nombreux types de cellules dans des conditions *in vitro* et une activité particulièrement élevée a été trouvée contre les types de tumeurs multirésistantes. La vinblastine est vendue sous le nom de Velban et la vincristine sous le nom d'oncovin (Van der Heijden *et al.*, 2004).

### **Activité anti-diabétique**

Les extraits éthanoliques des feuilles et des fleurs de *C. roseus* ont montré une baisse de la glycémie comparable à celle du médicament standard glibenclamide. L'effet hypoglycémique est apparu en raison de l'augmentation de l'utilisation du glucose dans le foie. L'extrait aqueux a fait baisser la glycémie d'environ 20 % chez les rats diabétiques en comparaison avec les extraits au dichlorométhane et au méthanol qui ont abaissé la glycémie

à 49-58 %. L'effet hypoglycémiant est apparu en raison du résultat de l'utilisation accrue du glucose dans le foie (Mohan *et al.*, 2015).

L'activité hypoglycémiante des alcaloïdes isolés de *C. roseus* a été étudiée pharmacologiquement et un remède dérivé de la plante a été commercialisé sous le nom de Vinculin comme traitement du diabète (Muralidharan, 2015).

### **Activité anti-microbienne**

Des extraits bruts de différentes parties de la plante *C. roseus* ont été testés pour leur activité antibactérienne. L'extrait de feuilles a montré une efficacité significativement plus élevée. L'activité antibactérienne de l'extrait de feuille de la plante a été vérifiée contre des micro-organismes tels que *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella typhimurium* et *Staphylococcus aureus*, et il a été constaté que les extraits pouvaient être utilisés comme agent prophylactique dans le traitement de nombreuses maladies (Govindasamy and Srinivasan, 2012).

### **Propriété anti-ulcéreuse**

Les alcaloïdes de *C. roseus* vincamine et vindoline ont montré des propriétés anti-ulcéreuses. L'alcaloïde vincamine, présent dans les feuilles de la plante, présente une activité cérébrovasodilatatrice et neuroprotectrice. Les feuilles de la plante ont prouvé leur activité anti-ulcéreuse contre les dommages gastriques induits expérimentalement chez le rat (Eurentin - Hegel, 2013)

### **Activité antioxydante**

La recherche en chimie des produits naturels a un potentiel infini et est particulièrement importante dans des pays comme l'Inde qui possède une riche biodiversité (Jayakumar, 2010). Les antioxydants sont des composés qui agissent comme des piègeurs de radicaux lorsqu'ils sont ajoutés aux produits alimentaires, ils empêchent la réaction en chaîne de l'oxydation, retardent ou inhibent le processus d'oxydation et augmentent la durée de conservation en retardant le processus de peroxydation des lipides (Young, 2001).

La capacité des substances phénoliques, y compris les flavonoïdes et les acides phénoliques, à agir comme antioxydants a été démontrée (Liu, 2003). Ainsi, le potentiel antioxydant de l'extrait éthanolique des racines des deux variétés de *C. roseus*, à savoir rosea

(Fleur rose) et alba (Fleur blanche), a été obtenu en utilisant différents systèmes de test tels que l'activité de piégeage du radical hydroxyle, l'activité de piégeage du radical uperoxyde, l'activité de piégeage du radical 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 l'effet de piégeage satisfaisant (Nasir Rasool, 2011).

Pour ce qui est des fleurs de *C.roseus*, l'étude du piégeage des radicaux libres à mis en évidence une activité antioxydante (Nasir Rasool, 2011). Cette activité est dû à la présence de nombreux composés volatils et phénoliques y compris les acides caféoylquinines et les glycosides de flavonol. En effet il existe de nombreuses preuves que les produits naturels et leurs dérivés ont des caractéristiques antioxydantes efficaces, qui sont liées à des activités anticancéreuses, hypolipidémiques, anti-vieillessement et anti-inflammatoires (Kapoor, 1969).

## ***MATERIEL ET METHODES***

---

Tout le travail pratique de ce mémoire a été effectué au laboratoire des ressources génétiques et biotechnologies végétales à l'annexe de l'école Nationale Supérieure Agronomique (E.N.S.A.), El-Harrach, Alger. Le laboratoire est doté de tout le matériel nécessaire pour la culture *in vitro*.

### 1. Objectif recherché

L'objectif essentiel de ce travail est d'optimiser la production de biomasse et de métabolites secondaire à partir de cals et de chevelus racinaires *in vitro* de *Catharanthus roseus*, en vue de quantifier les composés bioactifs présent et de déterminer leur activité antioxydante.

Pour parvenir à cela, nous avons testé deux facteurs principales susceptibles d'influencer la production de métabolites secondaires : qui sont l'effet de l'élicitation abiotiques sur les cals et chevelus racinaires *in vitro* de *Catharanthus roseus* et l'influence des hormones végétales: l'auxine et la cytokinine.

### 2. Matériel végétal

Le matériel végétal utilisé pour l'induction des cals est obtenu à partir des graines matures de *Catharanthus roseus* (L.) G. Don dont une variété a été utilisée : Cooler blush, la variété a fleurs rose. De plus, des cals préalablement obtenus par Semaili (2020) à partir des chevelus racinaires, ainsi, des chevelus racinaires obtenus par Benyammi *et al.* (2016), ont été utilisés pour l'étude de l'optimisation de la production de la biomasse et la production des métabolites secondaires.

### 3. Obtention des vitrosemis

#### Désinfection des graines

Un lot de graines de *C. roseus* a fleurs roses non scarifiées (Cooler blush) a subi une désinfection qui consiste en : un passage dans l'éthanol à 70 % pendant 30 secondes puis un trempage dans de l'hypochlorite de sodium à 12 % pendant 10 minutes, suivi de trois rinçages à l'eau distillée stérile. A la suite du protocole de désinfection les graines ont été trempées dans l'eau distillée stérile, pendant 24 heures puis séchés sur du papier filtre stérile.

## Mise en culture

Après désinfection, les graines sont ensemencées dans des tubes à essai contenant 20 ml de milieu semi-solide MS (Murashige and Skoog, 1962) sans hormones de croissance préalablement stérilisé par autoclavage à 120 °C pendant 20 minutes, additionné de 20 g/l de saccharose. Le pH du milieu est ajusté à 5,6 – 5,8. Les cultures sont ensuite placées en chambre de culture à une température de 25±2 °C et sous une photopériode de 16 heures.

## 4. Induction de cals

### Mise en culture des feuilles, tiges et chevelus racinaires

Les vitrosemis obtenus précédemment sont découpée à raison de 1 cm pour chaque explant, afin de préparer deux types d'explants ayant comme origine: tige et feuille. Les chevelus racinaires sont aussi découpés en petit fragments de 1 cm afin de préparer l'explant racines. Ces explants sont par la suite placés sur le milieu de culture MS (Murashige et Skoog, 1962) additionné de 30 g /l de saccharose, 6 g/l de gélose (Agar) et différentes concentrations hormonales de types 2,4-D, ANA et BAP (Tableau 3 , Figure 9), choisies selon plusieurs protocoles de régénération (Choi *et al.*, 2004; He-Ping *et al.*, 2011; Mehrotra *et al.*, 2013; Habibi *et al.*, 2016). Le pH est ensuite ajusté à 5.6-5.8. Pour chaque traitement, environ 60 explants sont utilisés. Les cultures sont incubées à une température de 25 ± 2 °C sous une photopériode de 16 heures par jour.

**Tableau 3 :** Les différentes balances hormonales testées pour l'induction de la callogenèse à partir de vitro-semis et des chevelus racinaires.

Milieux	2,4 -D (mg/L)	ANA (mg/L)	BAP (mg/L)
M1	1	0	0
M2	0	1	0
M3	1	0	0.5
M4	0	1	0.5
M5	0.5	0	0
M6	0	0.5	0

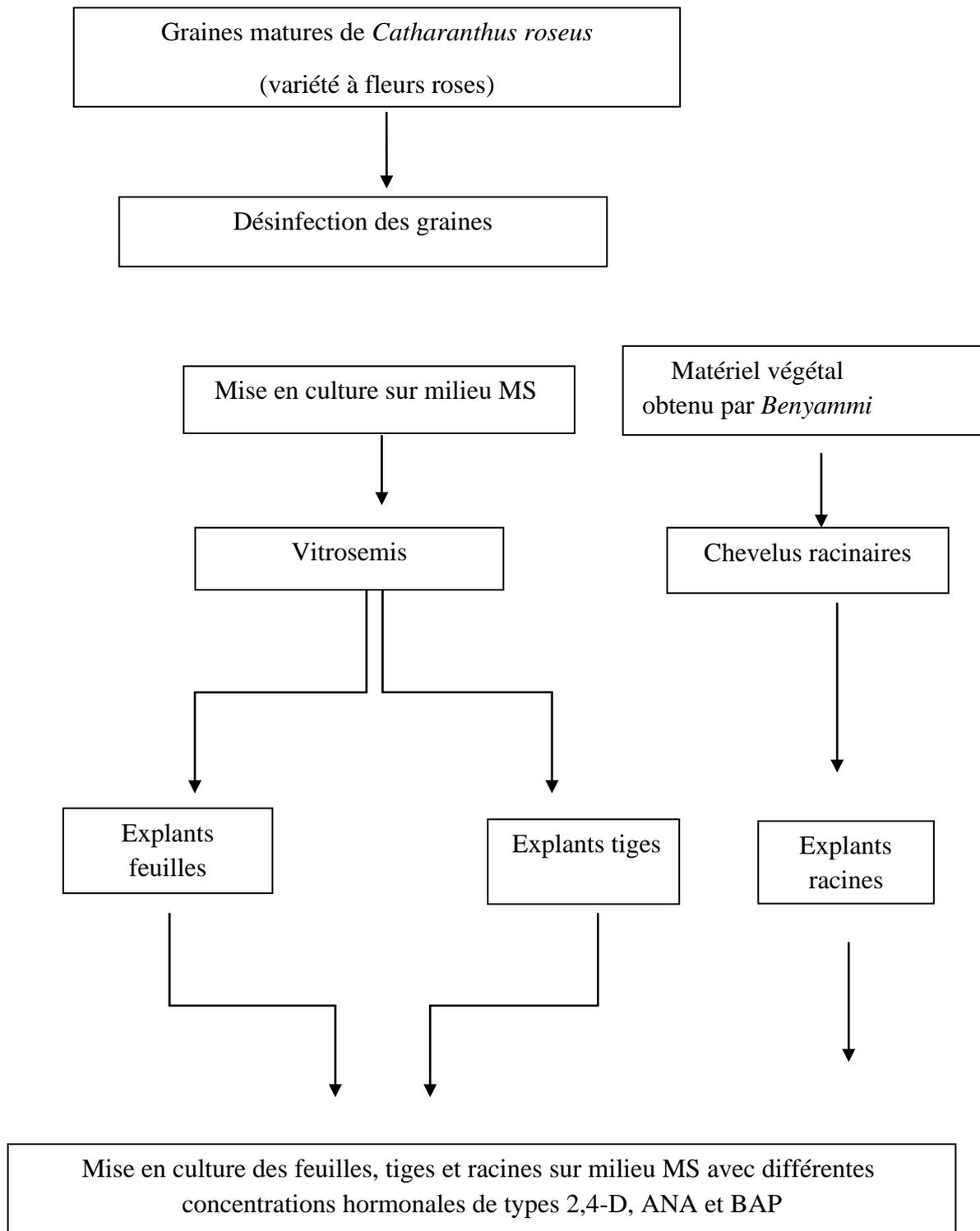


Figure 9 : Protocole suivi pour l'induction de la callogénèse

## **Observations réalisées**

Pour chaque traitement hormonal et pour les différents explants utilisés des observations ont été réalisées au bout de trois à quatre semaines de culture, ces observations ont porté sur :

- ✓ Le taux de callogénèse induit ou le taux d'induction : qui est le rapport entre le nombre d'explants callogènes sur le nombre total d'explants.
- ✓ La couleur et la texture des cals
- ✓ La surface des cals : qui a été calculée avec le logiciel image J

(<https://imagej.net/Fiji/Downloads>)

## **5. Multiplication des cals**

La multiplication des cals est effectuée, chaque mois, pour les cals obtenus par Semaili (2020) à partir des chevelus racinaires. Des morceaux des cals non nécrosés (Environ 1 cm) sont déposés sur milieu de culture MS (Murashige and Skoog, 1962) (Annexe 2) additionné de 7g d'agar et de 20 g/l de saccharose. Deux balances hormonales différentes sont utilisées pour maintenir et multiplier les cals: l'une composée de BAP seul (0.25 mg/l) et l'autre renferme une combinaison de BAP (0.25mg/l) et de 2.4 D (0.5mg/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 boîtes de pétri de 9 cm de diamètre, à raison de 20 ml par boîte.

Les cultures sont placées dans la chambre de culture à une température de  $25 \pm 2$  °C et sous une photopériode de 16 heures.

## **6. Multiplication des chevelus racinaires**

Les chevelus racinaires utilisés dans notre travail sont obtenus par Benyammi *et al.* (2016). Ces racines transgéniques sont issus par l'infection des bourgeons de *C. roseus* (Cooler blush) par *l'Agrobacterium rhizogenes* (A4).

La multiplication de chevelus racinaires est faite, chaque mois, par mise en culture des extrémités ramifiées de chevelus racinaires (Environ 5 cm) sur un milieu de culture solide B5 (Gamborg *et al.*, 1968) dilué au 1/2 (Annexe 1), additionné de 6 g/l d'agar et 30 g/l de

saccharose et il est dépourvue d'hormones de croissance. 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 boîtes de Pétri de 9 cm de diamètre, à raison de 20 ml par boîte.

Les cultures sont placées dans la chambre de culture à une température de  $25 \pm 2$  °C, et à l'obscurité totale.

### **7. Élicitation du matériel végétale**

#### **Élicitation des cals**

L'élicitation des cals a été réalisées avec différents éliciteurs abiotiques, mais aussi sur deux milieux de cultures qui différent par leurs composition en hormones végétales. Une première élicitation a été effectuée sur milieu MS additionné de 0,5mg /l de 2,4D et 0,25mg /l de BAP, alors que la deuxième élicitation a eu lieu sur un milieu MS additionné de 0,25mg/l de BAP. Les contaminations sont éliminées chaque fois qu'elles apparaissent. Des témoins sont aussi préparés pour chaque élicitation.

#### **Première élicitation (Milieu MS à base de 2,4D et BAP)**

#### **Élicitation par le saccharose**

Environ 50 cals de 200 mg de poids frais et 1cm<sup>2</sup> de surface sont cultivés sur un milieu de culture MS additionné de 0.5 mg/l de 2,4D et 0.25 mg/l de BAP avec différentes concentrations de saccharose ; à savoir 3 %, 6 % et 9 %. Ces concentrations ont été choisies selon plusieurs protocoles d'élicitation (Al-Jibouri *et al.*, 2012; Wee *et al.*, 2018). Le pH du milieu est ajusté à 5,6 – 5,8. Le milieu de culture est par la suite stérilisé par autoclavage à 120 °C pendant 20 minutes. Les cultures sont incubées à une température de  $25 \pm 2$  °C sous une photopériode de 16 heures par jour.

#### **Élicitation par l'Acide salicylique**

Environ 40 cals de 200 mg de poids frais et 1 cm<sup>2</sup> de surface sont cultivés sur un milieu de culture MS additionné de 0.5 mg/l de 2,4D et 0.25 mg/l de BAP avec différentes concentrations d'acide salicylique : à savoir 25 mg/l , 50 mg/l et 100 mg/l. Ces concentrations ont été choisies selon plusieurs protocoles d'élicitation (Idrees *et al.*, 2013; Karalija *et al.*, 2020). Le pH du milieu est ajusté à 5,6 – 5,8. Le milieu de culture est par la

suite stérilisé par autoclavage à 120 °C pendant 20 minutes. Les cultures sont incubées à une température de  $25 \pm 2$  °C sous une photopériode de 16 heures par jour.

### **Élicitation par le chlorure de potassium**

Environ 45 calcs de 200 mg de poids frais et 1 cm<sup>2</sup> de surface sont cultivés sur un milieu de culture MS additionné de 0.5 mg/l de 2,4D et 0.25 mg/l de BAP avec différentes concentrations de chlorure de potassium (KCl): à savoir 100 mg/l, 200 mg/l et 300 mg/l. Les traitements ont été choisis selon plusieurs protocoles d'élicitation (Fatima *et al.*, 2015; Jaleel *et al.*, 2007). Le pH du milieu est ajusté à 5,6 – 5,8. Le milieu de culture est par la suite stérilisé par autoclavage à 120 °C pendant 20 minutes. Les cultures sont incubées à une température de  $25 \pm 2$  °C sous une photopériode de 16 heures par jour.

### **Deuxième élicitation (Milieu MS à base de BAP)**

#### **Élicitation par le saccharose**

Environ 30 calcs de 200 mg de poids frais et 1 cm<sup>2</sup> de surface sont cultivés sur un milieu de culture MS additionné de 0.25 mg/l de BAP avec différentes concentrations de saccharose ; à savoir 30 g/l, 60 g/l et 90 g/l. Ces concentrations ont été choisis selon plusieurs protocoles d'élicitation (Al-Jibouri *et al.*, 2012; Wee *et al.*, 2018). Le pH du milieu est ajusté à 5,6 – 5,8. Le milieu de culture est par la suite stérilisé par autoclavage à 120 °C pendant 20 minutes. Les cultures sont incubées à une température de  $25 \pm 2$  °C sous une photopériode de 16 heures par jour.

#### **Élicitation par le mannitol**

Environ 20 calcs de 200 mg de poids frais et 1cm<sup>2</sup> de surface sont cultivés sur un milieu de culture MS additionné de 0.25 mg/l de BAP avec différentes concentrations de mannitol; à savoir 40 mg/l, 80 mg/l et 120 mg/l. Ces concentrations ont été choisis selon plusieurs protocoles d'élicitation (Guo *et al.*, 2011; Matter *et al.*, 2017). Le pH du milieu est ajusté à 5,6 – 5,8. Le milieu de culture est par la suite stérilisé par autoclavage à 120 °C pendant 20 minutes. Les cultures sont incubées à une température de  $25 \pm 2$  °C sous une photopériode de 16 heures par jour.

## **Élicitation par le chlorure de potassium**

Environ 45 calcs de 200 mg de poids frais et 1cm<sup>2</sup> de surface sont cultivés sur un milieu de culture MS additionné de 0.25 mg/l de BAP avec différentes concentrations de chlorure de potassium (KCl): à savoir 100 mg/l , 200 mg/l et 300 mg/l. Ces concentrations ont été choisies selon plusieurs protocoles d'élicitation (Fatima *et al.*, 2015; Jaleel *et al.*, 2007). Le pH du milieu est ajusté à 5,6 – 5,8. Le milieu de culture est par la suite stérilisé 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.

### **Observations réalisées**

Pour chaque élicitation des calcs, et après 20 jours de culture, les calcs ont été récoltés et séchés à 40 °C pendant 24 heures. L'effet des différents éliciteurs est évalué sur la base des observations réalisées et qui ont porté sur :

- L'évaluation du poids frais –poids secs des explants pesés après 20 jours de traitement.
- La couleur et la texture des calcs
- La surface des calcs : qui a été calculée avec le logiciel image J.

<https://imagej.net/Fiji/Downloads>

## **Élicitation des chevelus racinaires**

Environ 200 mg de chevelus racinaires (CRs) (4 à 5 extrémités de racines de 5 cm de longueur), sont introduits dans des Erlenmeyers de 250 mL contenant 50 mL de milieu de culture liquide B5 dilué au ½ et additionné de 30 g / l de saccharose et de différentes concentrations de chlorure de potassium (KCl): à savoir 100 mg/l , 200 mg/l et 300 mg/l., puis ajusté au pH de 5,6 – 5,8. Les traitements ont été choisies selon plusieurs protocoles d'élicitation (Fatima *et al.*, 2015; Jaleel *et al.*, 2007). Les cultures sont placées dans l'obscurité, sous agitation à une vitesse de 100 rpm et à une température de 25 ± 2 °C.

Après 20 jours, les CRs ont été récoltés et séchés à 60°C pendant 24 heures. Pour chaque modalité, trois répétitions ont été réalisées. L'effet de l'élicitation par KCl est évalué sur la base de la surface et du poids frais et sec des calcs.

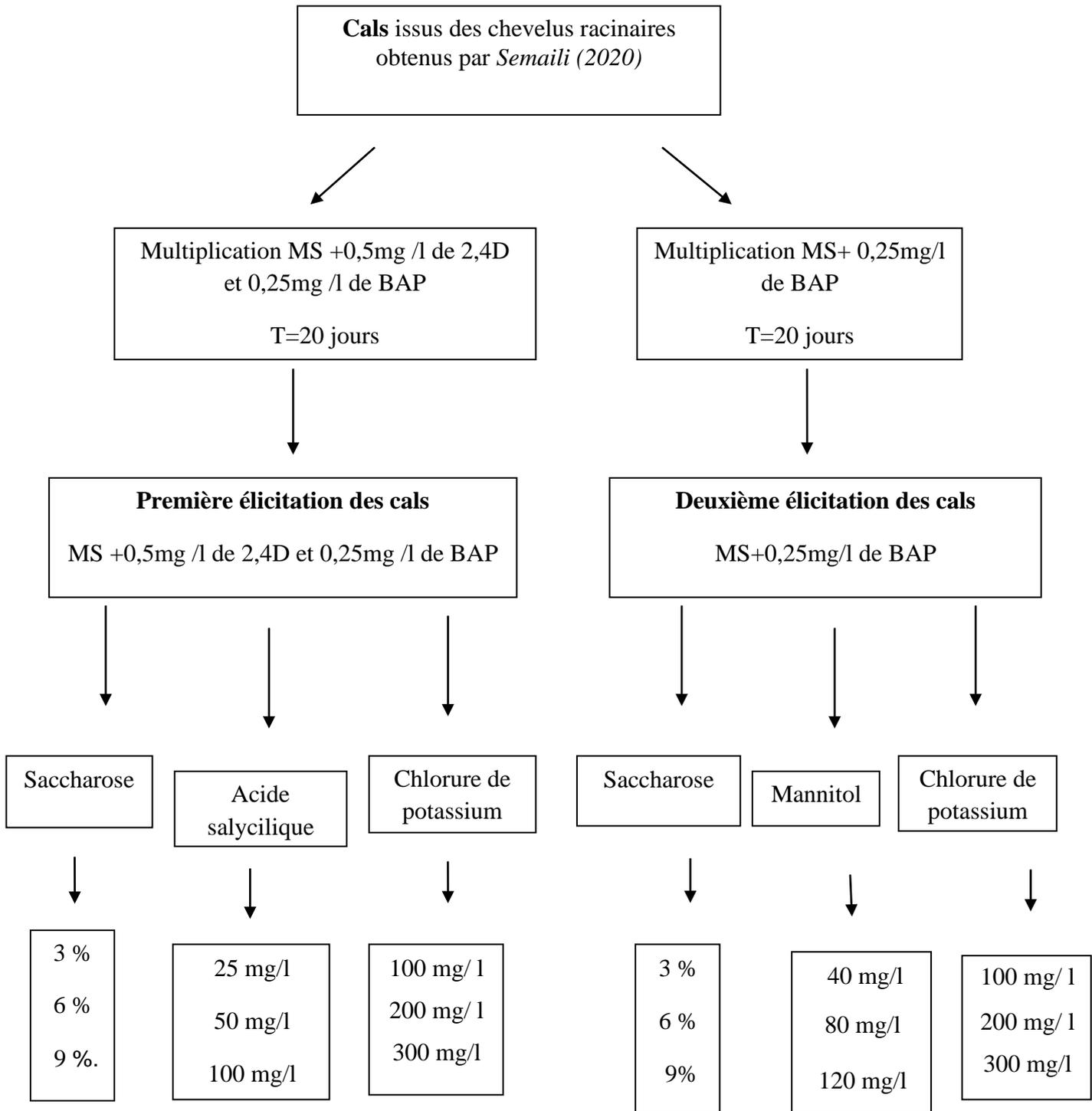
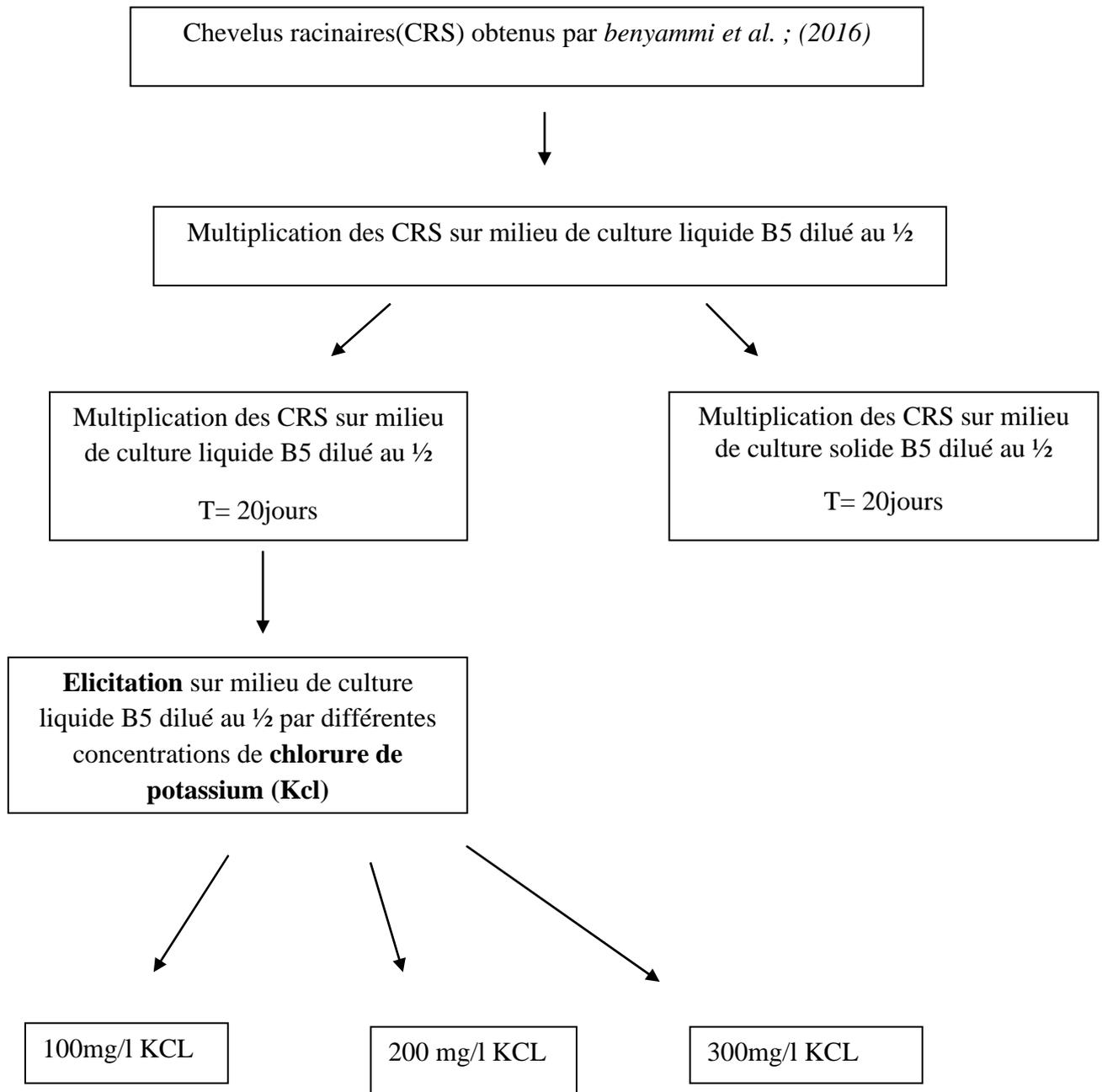


Figure : Protocole expérimentale suivie dans l'élicitation des cals



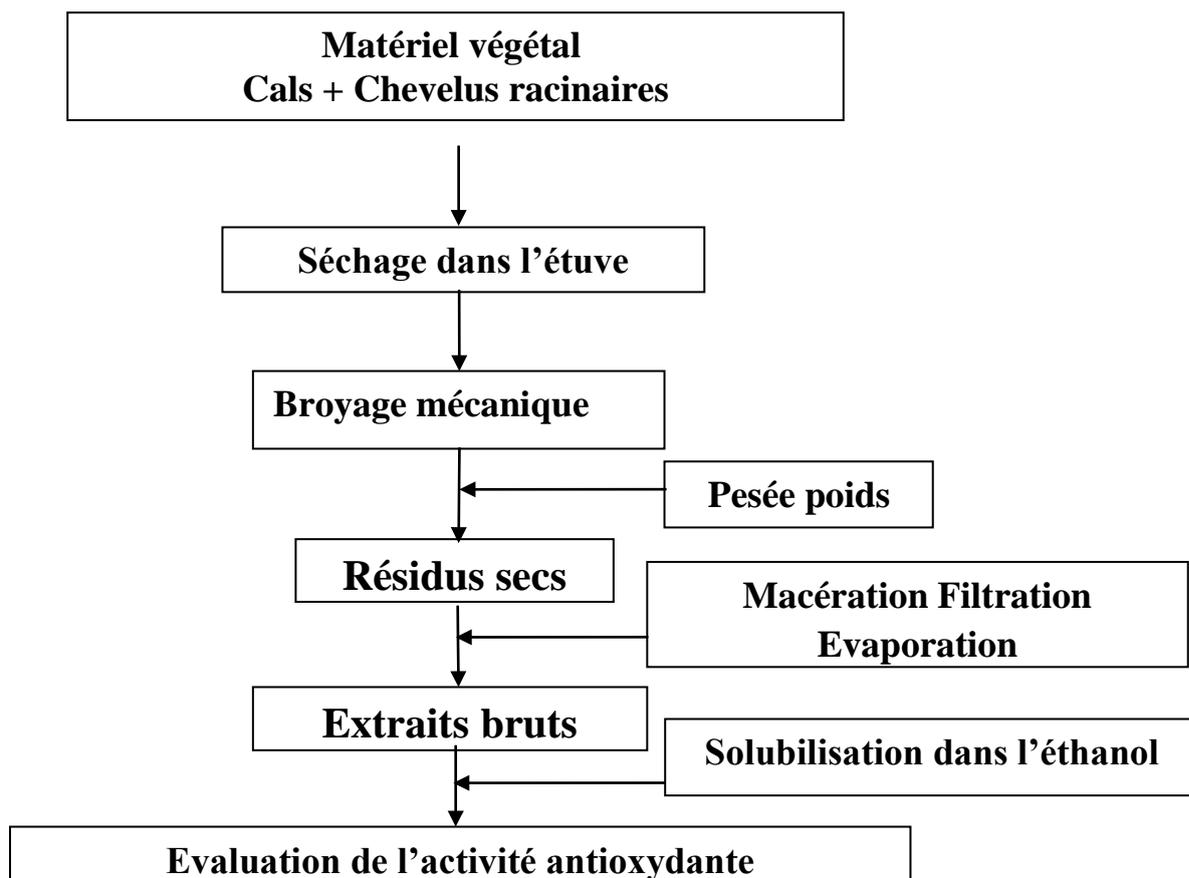
**Figure :** Protocole expérimentale suivie dans l’elicitation des chevelus racinaires.

## 8. Extraction des polyphénols

### Préparation des extraits bruts hydro-éthanoliques

L'extraction des polyphénols a été effectuée à partir des chevelus racinaires et des cals suite à leurs élicitations pendant 20 jours. Le matériel végétal séché issu de chaque traitement éliciteurs est broyé à l'aide d'un mortier. Les quantités de matière végétale obtenues sont macérées dans une solution hydro-éthanoliques dans une proportion de (3:7) en volume pendant 48 heures, sous agitation à une vitesse de 100 rpm et à une température de  $25 \pm 2$  °C dans l'obscurité.

Les macérations hydro-éthanoliques, ainsi obtenues, sont filtrées à l'aide du papier filtre, puis évaporées dans un rota-vapeur à 40 °C (Le principe du rota-vapeur est basé sur l'abaissement du point d'ébullition avec la pression). Les résidus secs sont pesés puis repris dans l'éthanol afin d'obtenir une concentration finale de 10 mg/ml.



**Figure 9** : Schéma des démarches expérimentales suivies dans l'étude phytochimique.

## Calcul du rendement

Le rendement des substances végétales est défini comme étant le rapport entre le poids des résidus secs et ceux des poids secs des cals. Il est calculé par la formule suivante :

$$Rdt (\%) = (PB / PA) \times 100$$

*Rdt* : Rendement (Rdt en %)

*PB* : Poids des résidus secs (g)

*PA* : Poids sec des cals (g)

## 9. Détermination de l'activité antioxydante des différents extraits

### Test de piégeage du radical libre DPPH

#### Principe

Le test au 2,2-diphényl-2-picryl-hydrazyle (DPPH.) permet de mesurer le pouvoir réducteur par le calcul de IC<sub>50</sub> des substances antioxydantes contenues dans un extrait. Le DPPH est un radical libre de couleur violette qui devient jaune quand il est réduit par un donneur de proton H<sup>+</sup>.



Où AH est un composé capable de céder un H<sup>+</sup> au radical DPPH (Braca *et al.*, 2002).

#### Protocole

Deux extraits hydro-éthanoliques de cals ont été évalué pour leur activité antioxydante en utilisant le teste DPPH. La méthode de Braca *et al.*, (2002) rapporté par Krimate (2015), est utilisée pour la détermination de l'activité de piégeage du radical libre DPPH. Le premier extrait correspond à l'extrait issu des cals élicités avec 80 m g/l de mannitol (celle qui a donné le meilleur poids) , le deuxième extrait est issu des cals non élicité (Témoin). Brièvement, 1 ml de différentes concentrations des deux extraits préparées dans l'éthanol (50µg/ml à 1500µg/ml) sont ajoutés à un volume égal de solution éthanolique du DPPH fraîchement préparée (0,004% w/v). Le mélange réactionnel est agité au vortex et maintenu à l'obscurité pendant 30 minutes à une température ambiante. Le contrôle négatif est constitué uniquement

de DPPH et d'éthanol. La mesure de l'absorbance est effectuée à 517nm au spectrophotomètre En se qui concerne le contrôle positif une gamme d'acide ascorbique est préparée à différentes concentrations.

L'évaluation de l'activité antioxydante en utilisant la méthode DPPH est exprimée en pourcentage selon la relation suivante :

$$\% \text{ Inhibition} = [(AC-AE) / AC] \times 100$$

*AC* : Absorbance du contrôle négatif

*AE* : Absorbance de l'échantillon (E= échantillon)

La quantité d'antioxydant nécessaire pour diminuer la concentration du DPPH initiale à 50%, est appelée la concentration efficace EC<sub>50</sub> et parfois notée IC<sub>50</sub>, qui est calculée graphiquement par les régressions linéaires des graphes tracés, Elle est exprimée en µg/ml d'extraits par rapport au DPPH dans le milieu réactionnel.

### 10. Analyse statistique

L'analyse de la variance à un facteur (ANOVA) ainsi que le test de Tukey (Classification en groupes homogènes) au seuil de 5% sont utilisés pour traiter les résultats obtenus à l'aide du logiciel STASTICA version 8.0.

Par la suite les résultats obtenus sont représentés sous forme de graphiques grâce au logiciel STATISTICA version 8.0, les barres sur les graphes représentent les écarts types au seuil de 5%.

## ***RESULTATS ET INTERPRETATIONS***

---

## 1 .Obtention du matériel végétal

### Germination des graines de *C. roseus*

La graine est considérée germée, dès que la radicule perce le tégument et qu'il ya apparition de jeunes pousses. Ainsi, nos résultats montrent que les graines de *C. roseus*, variété à fleurs roses non scarifiées et trempées dans l'eau distillée pendant 48 heures, révèlent un taux élevés de germination de 75 % à 80 %. Les premières germinations se produisent dès le 8<sup>ème</sup> jour de culture, pour nos graines. En effet les graines de *C. roseus* ne nécessitent pas de scarification préalable pour leur germination. Un simple trempage de 48 heures dans l'eau distillée suffirait pour produire une germination rapide avec un taux élevé. Ainsi, les vitrosemis obtenus (Figure 10) sont utilisés pour prélever des hypocotyles, des racines et des feuilles pour induire ultérieurement des cals.



**Figure 13 :**Germination des graines de *C. roseus* (variété à fleurs blanches ; cooler).a: mise en culture des graines après leur désinfection b: Germination des graines après 10 jours. (G=0,80X)



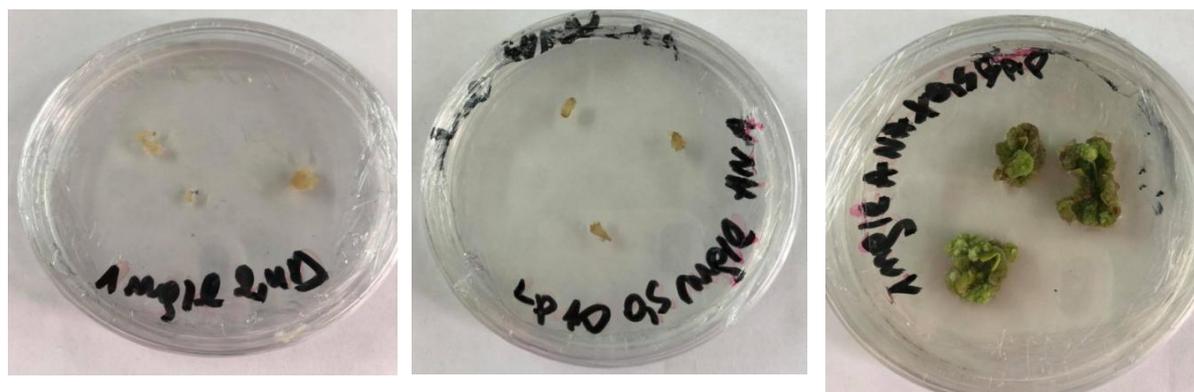
**Figure 14 :** Vitrosemis de *C. roseus* âgés de 60 jours (G= 0,66 X).

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

### Effet des différentes combinaisons hormonales sur l'apparition des cals

L'induction de la callogenèse est réalisée à partir des explants feuilles et tiges âgés de 12 jours issus de la germination des graines et des chevelus racinaires transgénique de *C. roseus*. Après 10 jours de mise en culture, les explants ont manifesté une réactivité différente qui s'est déterminé par un gonflement total ou partiel des explants. Après 3 à 4 semaines, des structures de couleur beige pour les feuilles, tiges et chevelus racinaires au niveau des explants réactifs ont été observées, indiquant l'initiation de la dédifférenciation cellulaire, en donnant par la suite des cals de nature friable ou compacte.

Pour les explants témoins (Milieu sans hormones), aucun changement n'a été remarqué, ni gonflement des explants, ni formation de cals proprement dits.



a

B

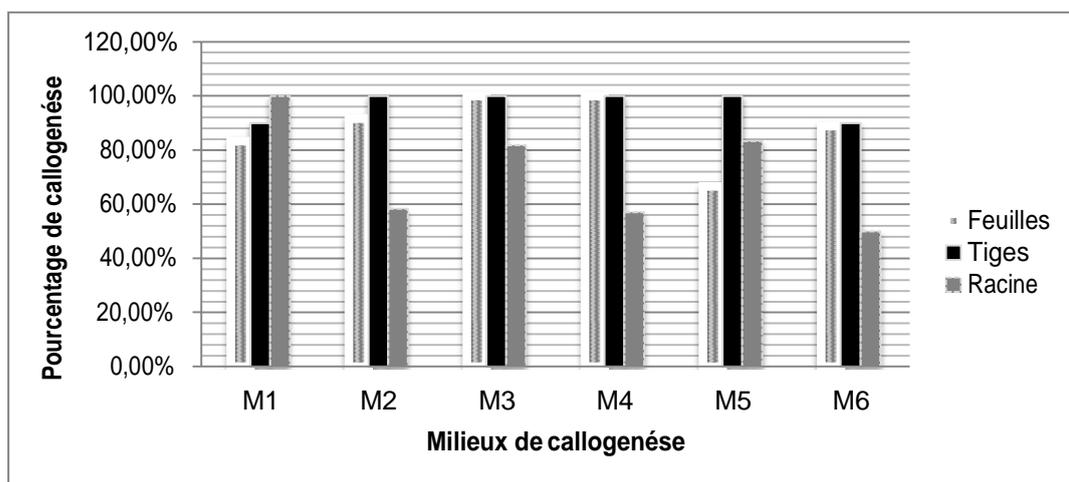
c

**Figure 15:** Réactivité des explants de feuilles (a) tiges (b) et chevelus racinaires (c) mis en culture sur différents milieux de callogenèse après trois semaines de culture (G=0.80X).

D'une manière générale les résultats de l'effet des différentes balances hormonales 2,4-D, BAP et ANA sur la callogenèse des explants montrent une variabilité des réponses des explants par rapport au milieu de culture, selon le type et la concentration des hormones végétales.

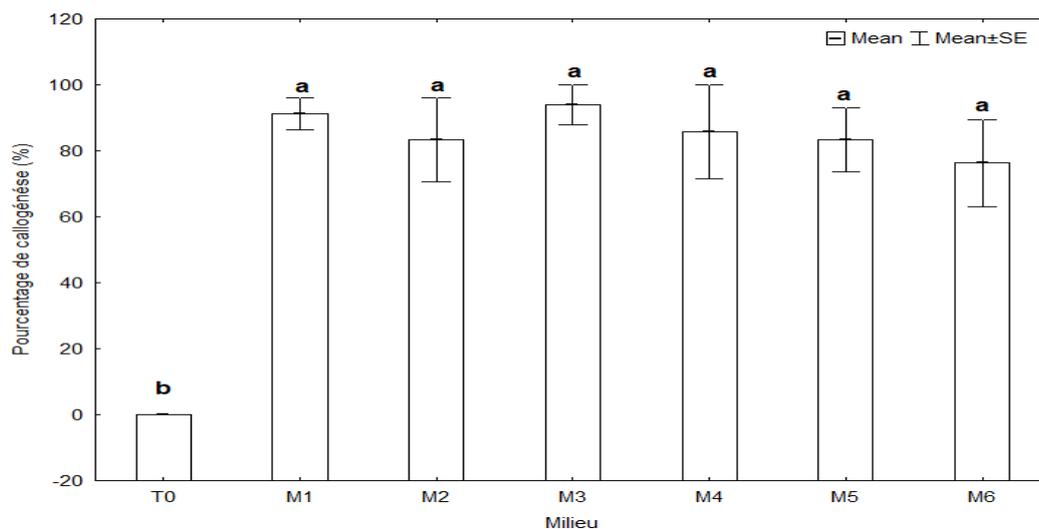
Les résultats du taux de callogenèse en fonction des différentes balances hormonales (Figure 16) montrent que les cals ont été obtenues à partir des différents types d'explants de

*C. roseus*. Le meilleur taux de callogénèse, 100%, a été atteint pour les tiges sur quatre milieux différents (M2, M3, M4 et M5), alors que pour les feuilles le 100% est atteint sur deux milieux uniquement (M3 et M4). En fin, l'organe qui a enregistré les faibles taux de callogénèse est la racine ayant le 100% de callogénèse sur un seul milieu (M1).



**Figure 16 :** Effet des différentes balances hormonales sur le pourcentage de callogénèse des différents explants (feuilles, tiges et racines) de la pervenche.

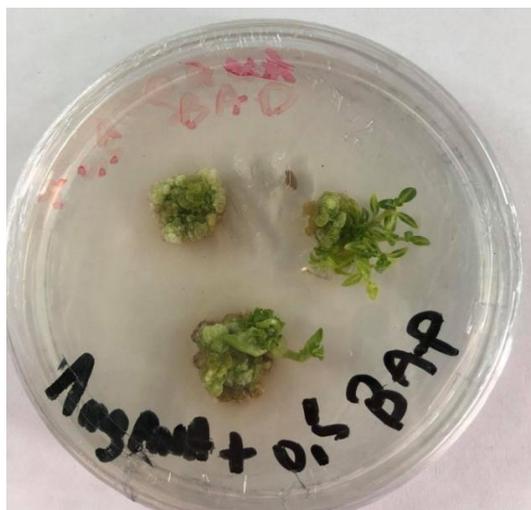
La figure 17 illustre les résultats de l'effet du traitement hormonal sur la callogénèse d'une manière globale. L'analyse de la variance effectuée sur les résultats obtenus après six semaines de culture, révèle un effet très hautement significatif du traitement hormonal utilisé (Annexe 2). Ainsi, le test de Tukey (au seuil  $\alpha = 5\%$ ) réalisé sur les taux de callogénèse révèle deux groupes homogènes « a » et « b ». Le groupe homogène le plus intéressant est représenté par la lettre « a » qui correspond aux milieux M1, M2, M3, M4, M5 et M6, dont les taux de callogénèse sont, respectivement de 91,11%, 83,33%, 93,33%, 85,71%, 83,33% et 76,29%. Parmi eux le milieu M3 reste le plus intéressant avec un pourcentage de 93,33%. Cependant, le groupe le moins intéressant est représenté par la lettre « b » qui correspondent aux traitements T0 témoins correspondant à un milieu sans hormone avec un pourcentage de callogénèse nul.



**Figure 17:** Effet des différentes balances hormonales sur le pourcentage de callogénèse ( $F=0,34$ ,  $ddl=6$ ,  $P=0,87$ )

### Couleur et Texture des cals

Sur le plan morphologique, la nature des cals formés est différente selon les explants. Dans le cas des feuilles les cals ont une couleur verte, un aspect nodulaire et une consistance compacte (Figure 15), alors que ceux issus des tiges et des chevelus racinaires sont de couleur beige, d'un aspect granuleux et de consistance friable.



**Figure 18 :** Réactivité des feuilles sur le milieu M5 (1mg ANA+0.5BAP) avec apparition de cals et la régénération des bourgeons (G=0.80X).

Sur certains explants de feuille, nous avons remarqués l'apparition de plusieurs bourgeons sur les cals induits, ce qui nous a incité à les faire régénérer sur milieu MS semi – solide additionnée de 1 mg/l de BAP et de 0,5 mg/l ANA, de 20 g de sucre et de 6 g d'agar (Figure 16).

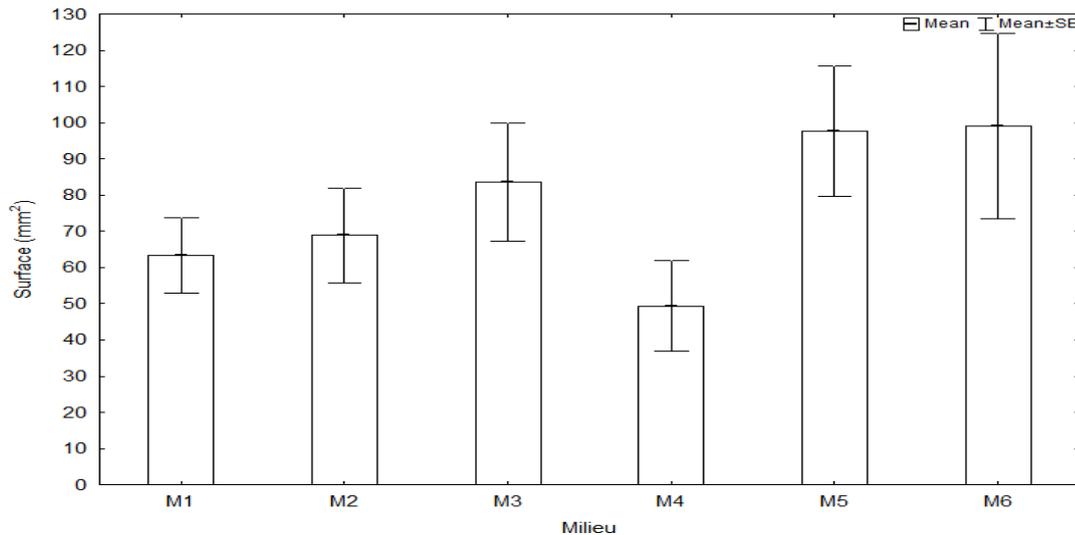


**Figure 19 :** Bourgeons issus des cals mis en culture sur le milieu M5 (1mg BAP+0.5ANA), après 4 semaines de culture (G=0.90X)

### Surface des cals

La surface des cals est estimée après six (6) semaines de culture sur les milieux de callogenèse issus de la mise en culture de divers explants (feuilles, tiges et chevelus racinaire). Cette surface peut déterminer le meilleur traitement hormonal testé qui correspond à une bonne callogenèse.

L'analyse de la variance effectuée sur les résultats obtenus après six semaines de culture sur les milieux de callogenèse, n'a révélé aucun effet significatif pour la surface des cals (Annexe3). Cette dernière est comprise entre 45 et 100 mm<sup>2</sup> observés respectivement, pour le milieu M4 et le milieu M6 (**Figure 20**).



**Figure 20** : Effet des différentes balances hormonales sur la surface des cals ( $F=1,54$ ,  $ddl=5$ ,  $P=0,18$ )

### 3. Effet de l'élicitation sur la biomasse des cals

Dans l'objectif d'évaluer l'effet des différents éliciteurs abiotiques utilisés sur la biomasse des cals, nous avons mesuré le poids sec et la surface des cals après 20 jours de culture. Un témoin négatif sans éliciteur a été également utilisé.

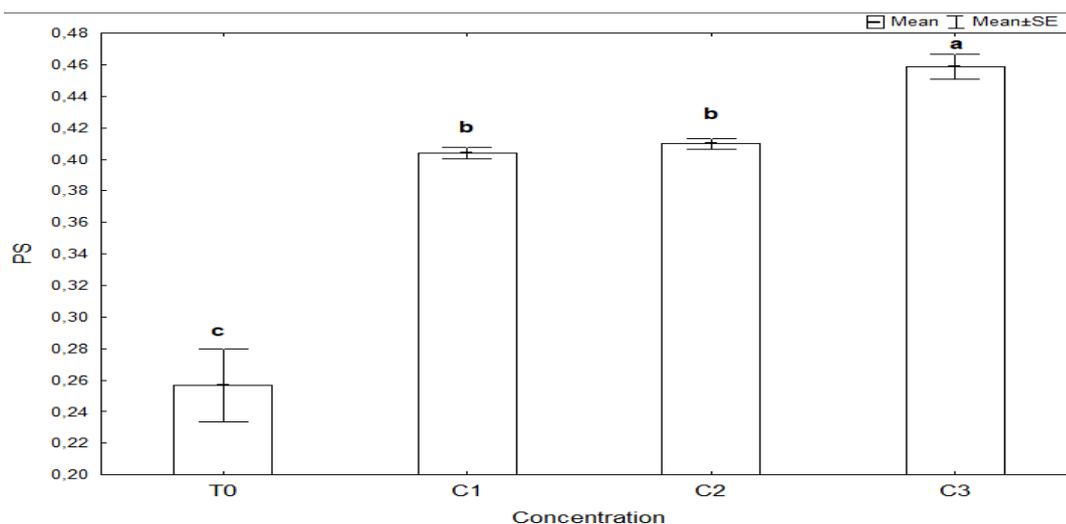
#### Pour la première élicitation

#### Effet de l'élicitation sur le poids des cals

#### Élicitation par le saccharose

Les résultats de l'ANOVA (**Figure 21**) montrent que l'élicitation par le saccharose a un effet hautement significatif sur les poids sec des cals issus des chevelus racinaires (Annexe2).

Le test de Tukey (au seuil  $\alpha = 5\%$ ) réalisé sur les poids sec des cals, révèle trois groupes homogènes « a », « b » et « c ». Le groupe homogène le plus intéressant est représenté par la lettre « a » qui correspond à la troisième concentration 90 g/l de saccharose, dont le poids moyen des cals est de 0,45 g. Autrement, le groupe homogène « b » est, aussi, très intéressant et correspond au traitement hormonal C2 et C1 (60 et 30g/l) dont le poids sec moyen des cals ne dépasse pas 0,41 g. Cependant, le groupe le moins intéressant est représenté par la lettre « c », qui correspond au traitement témoin TO avec un poids sec moyen des cals ne dépassent pas 0,25 g.



**Figure 21:** Effet des différentes concentrations (mg/l) du saccharose sur le poids sec (g) des cals issus de CRs après 20 jours d'élicitation ( $F=88,32$ ,  $ddl= 3$  et  $P=0,00000$ )

### Élicitation par l'acide salicylique

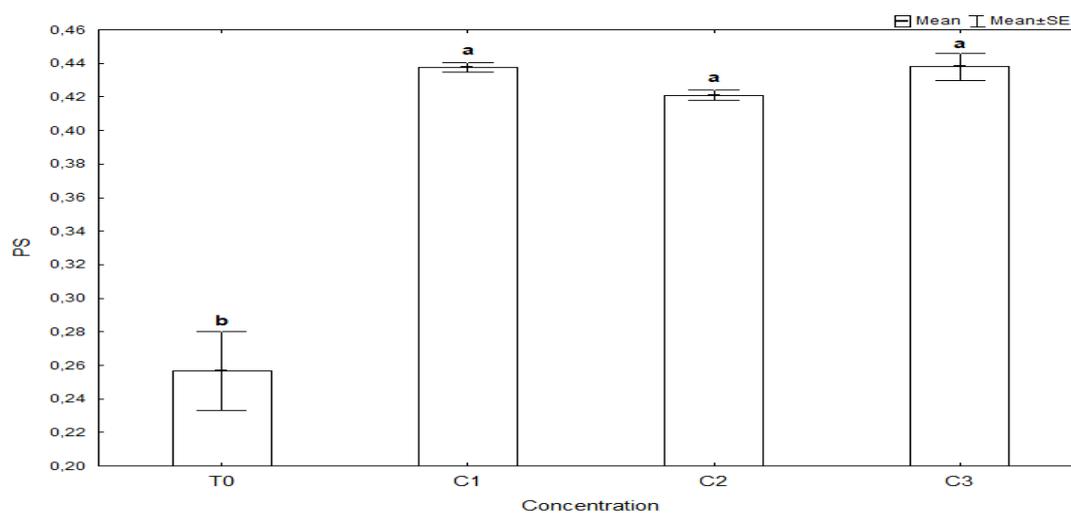
Les résultats de l'ANOVA (**Figure 22**) montrent que l'élicitation par l'acide salicylique a un effet hautement significatif sur les poids sec des cals (Annexe 2).

Le test de Tukey (au seuil  $\alpha = 5\%$ ) réalisé sur les poids sec des cals, révèle deux groupes homogènes « a » et « b ». Le groupe homogène le plus intéressant est représenté par la lettre « a » qui correspond à la concentration C1 (25 mg/l), C2 (50 mg/l) et C3 (100 mg/l) d'acide salicylique dont les poids moyen des cals est de 0,43 g, 0,42 g et 0,43g, respectivement. Autrement, le groupe homogène « b » est, le groupe le moins intéressant et correspond aux traitements témoin.

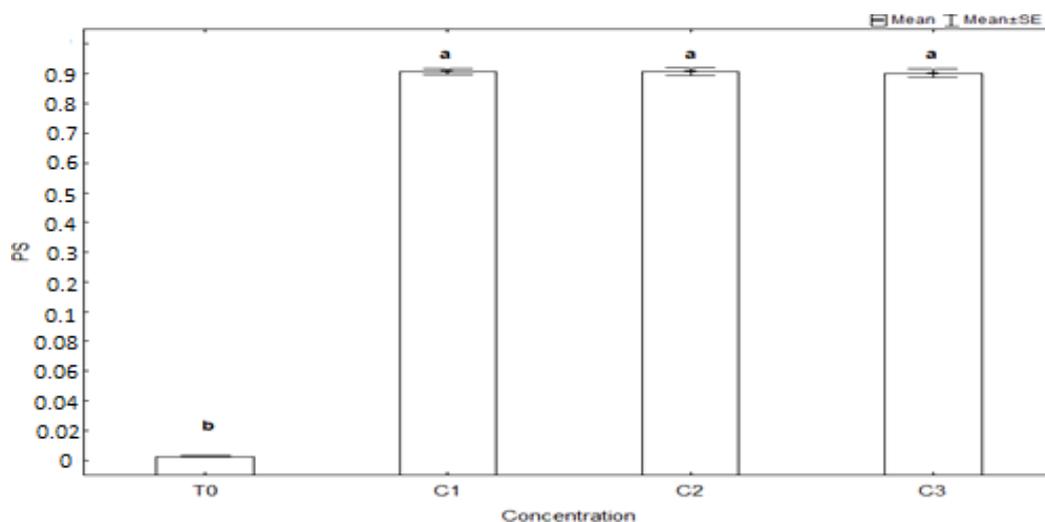
### Élicitation par le chlorure de potassium

Les résultats de l'ANOVA (**Figure 23**) montrent que l'élicitation par le chlorure de potassium a un effet hautement significatif sur les poids sec de cals (Annexe 2).

Le test de Tukey (au seuil  $\alpha = 5\%$ ) réalisé sur les poids sec des cals, révèle deux groupes homogènes « a » et « b ». Le groupe homogène le plus intéressant est représenté par la lettre « a » qui correspond aux concentrations de 100 (C1), 200 (C2) et 300 (C3) mg/l de chlorure de potassium et dont le poids moyen des cals est de 0,9 g, 0,88 g et 0,86 g. Autrement, le groupe homogène « b » est le groupe le moins intéressant et correspond au traitement témoin.



**Figure 22:** Effet des différentes concentrations (mg /l) d'acide salicylique sur le poids (g) sec des cals issus des CRs après 20 jours d'élicitation ( $F=76,22$ ddl=3 et  $P=0,0000$ )

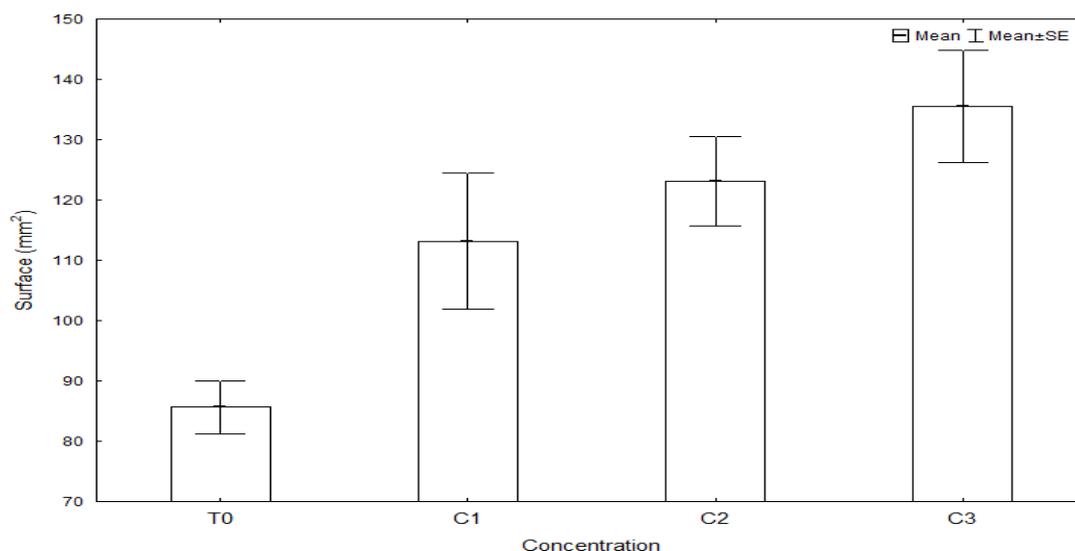


**Figure 23 :** Effet des différentes concentrations de chlorure de potassium sur le poids(g) sec des cals issus des CRs après 20 jours d'élicitation ( $F=1208,56$ ddl= 3 et  $P=0,00$ )

### Surface des cals

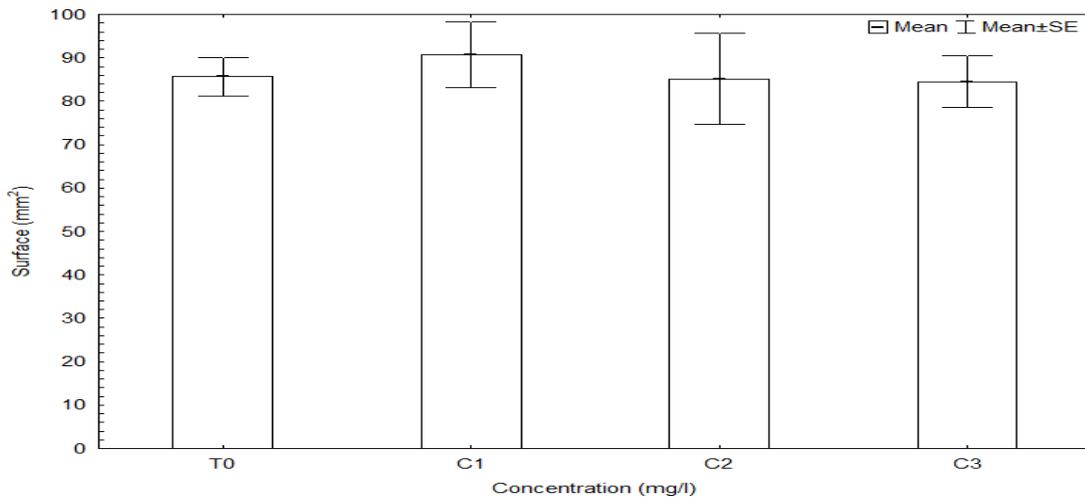
La surface des cals est estimée après 20 jours de culture sur milieu contenant différents éliciteurs. Cette surface peut déterminer le meilleur traitement éliciteurs testé qui correspond à une bonne élicitation.

Les résultats de l'ANOVA, effectuée sur la surface des cals après 20 jours d'élicitation, n'a révélé aucun effet significatif du saccharose (Annexe 2). Reste que, la surface la plus importante a été observé pour la concentration C3 (90 g/l) avec une surface moyenne de 135 mm<sup>2</sup>, à l'opposé, le témoin TO a présenté la surface la moins importante avec une surface de 85 mm<sup>2</sup> (**Figure 24**).



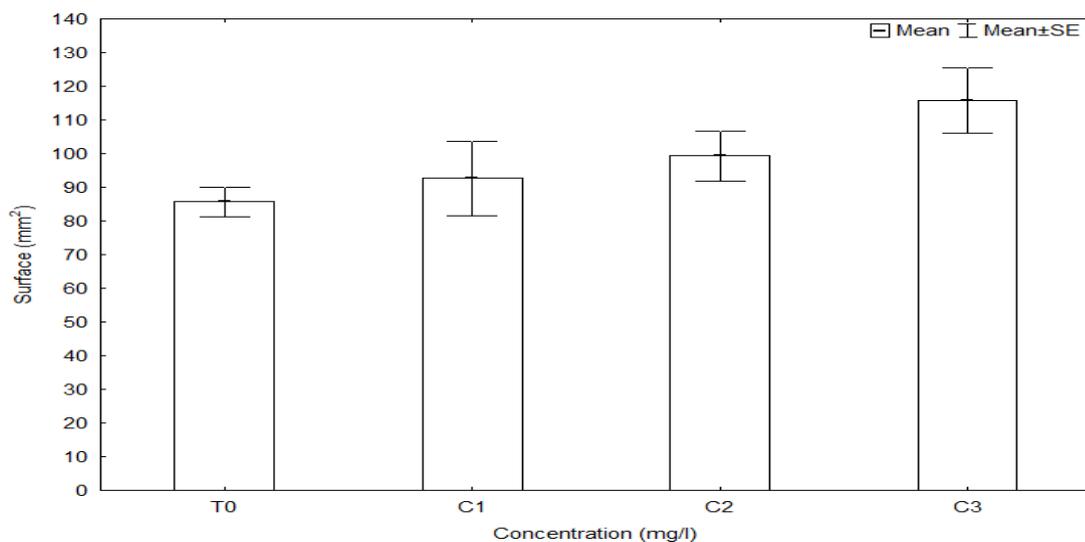
**Figure 24:** Effet des différentes concentrations de saccharose sur la surface des cals issus des CRs après 20 jour d'élicitation ( $F=2,60$ ddl= 3 et  $P= 0,072$ )

Selon la **figure 25**, qui représente la surface des cals après élicitation par l'acide salicylique, la surface des cals a été variable. L'analyse de la variance effectuée sur les résultats obtenus après 20 jours d'élicitation n'a révélé aucun effet significatif pour la surface des cals (Annexe 2). Reste que, la surface la plus importante a été observé avec la concentration C1 qui contient 25 mg /l d'acide salicylique avec une surface moyenne de 90 mm<sup>2</sup> face a un témoin TO avec une surface de 85 mm<sup>2</sup>.



**Figure 25:** Effet des différentes concentrations (mg /l) d'acide salicylique sur la surface des cals issus des CRs après 20 jour d'élicitation ( $F=0,11$ ,  $ddl=3$  et  $P=0,94$ )

Selon la **figure 26**, qui représente la surface des cals après élicitation par le chlorure de potassium, la surface des cals a été faible et variable. L'analyse de la variance effectuée sur les résultats obtenus après 20 jours d'élicitation n'a révélé aucun effet significatif pour la surface des cals (Annexe 2). Reste que, la surface la plus importante a été observé avec la concentration C3 qui contient 300mg /l de chlorure de potassium avec une surface moyenne de 115 mm<sup>2</sup> face à un témoin T0 avec une surface de 85 mm<sup>2</sup>.



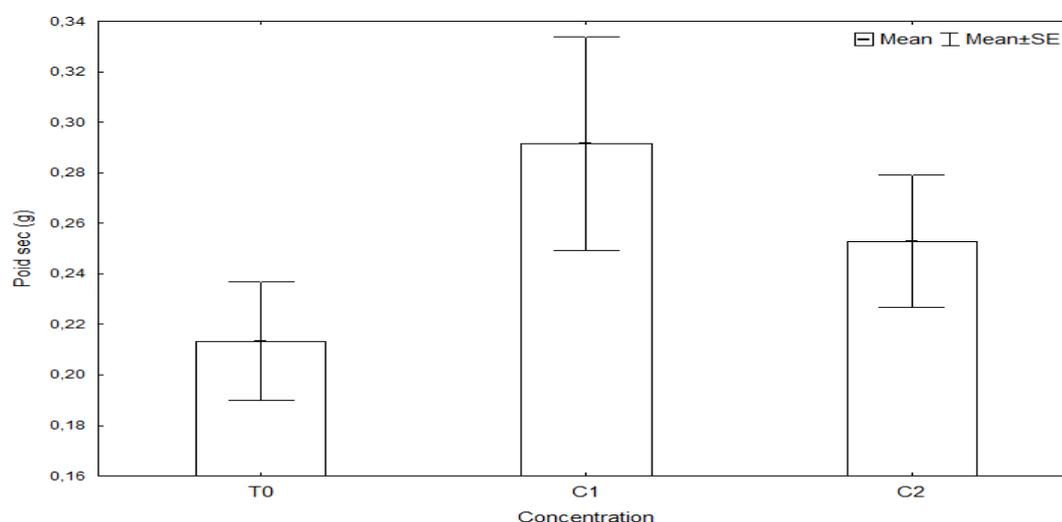
**Figure 26:** Effet des différentes concentrations de chlorure de potassium sur la surface des cals issus des CRs après 20 jour d'élicitation ( $F=1,46$   $ddl=3$  et  $P=0,24$ )

## Deuxième élicitation

### Effet de l'élicitation sur le poids des cals

#### Élicitation par le saccharose

L'analyse de la variance effectuée sur les résultats obtenus après 20 jours d'élicitation n'a révélé aucun effet significatif du saccharose pour le poids sec des cals (Annexe 3). Reste que, la surface la plus importante a été observée avec la concentration C1 (30 g/l) de saccharose avec un poids sec moyen de 0,29g face à un témoin TO avec un poids sec de 0,21g (Figure 27).



**Figure 27:** Effet des différentes concentrations (mg/l) du saccharose sur le poids (g) sec des cals issus des CRs après 20 jour d'élicitation ( $F= 0,97$   $ddl=2$  et  $P= 0,40$ )

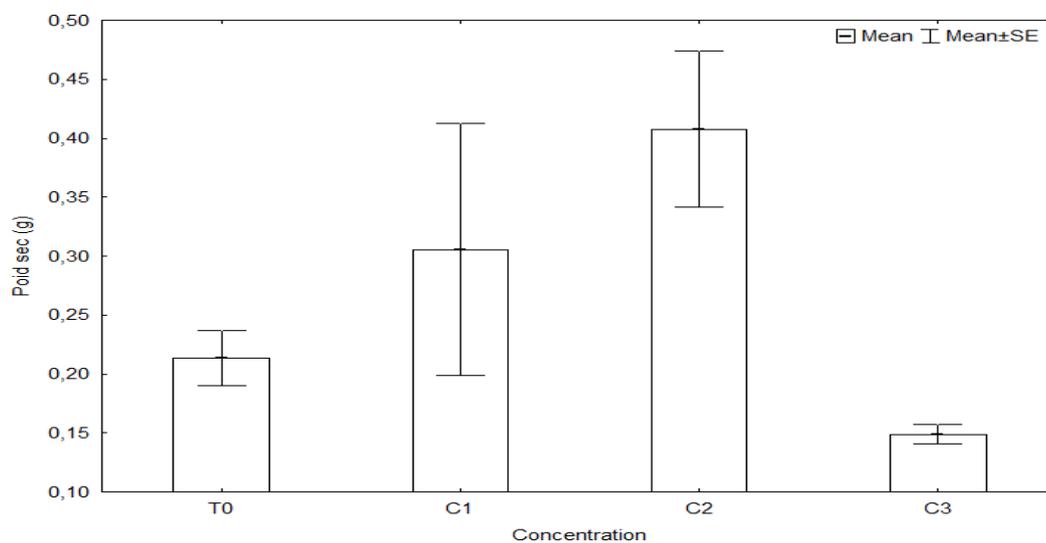
#### Élicitation par le mannitol

L'analyse de la variance effectuée sur les résultats obtenus après 20 jours d'élicitation n'a révélé aucun effet significatif du mannitol sur le poids sec des cals (Annexe 3). Reste que, la surface la plus importante a été observée avec la concentration C2 (80 mg/l) avec un poids sec moyen de 0,41 g face à un témoin TO. (figure 28)

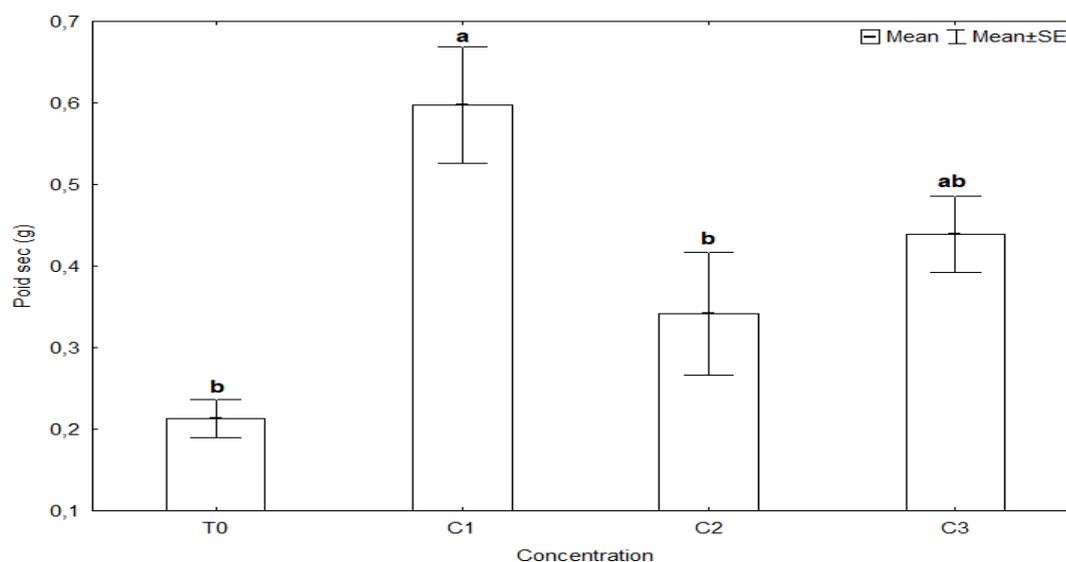
#### Élicitation par le chlorure de potassium

Les résultats de l'ANOVA (Figure 29) montrent que l'élicitation par le chlorure de potassium a un effet hautement significatif sur les poids sec de cals (Annexe 3). Le test de

Tukey (au seuil  $\alpha = 5\%$ ) réalisé sur les poids sec des cals, révèle deux groupes homogènes «a» et «b». Le groupe homogène le plus intéressant est représenté par la lettre «a» qui correspond à la concentration C1 (100 mg/l) de chlorure de potassium et dont le poids sec moyen des cals est de 0,59 g. Autrement, le groupe homogène «b» est le groupe le moins intéressant et correspond à la concentration C2 (0,34g) et au traitement témoin T0.



**Figure 28:** Effet des différentes concentrations (mg /l) du mannitol sur le poids sec(g) des cals issus des CRs après 20 jour d'élicitation ( $F=2,42$ ,  $ddl=3$  et  $P=0,088$ ).

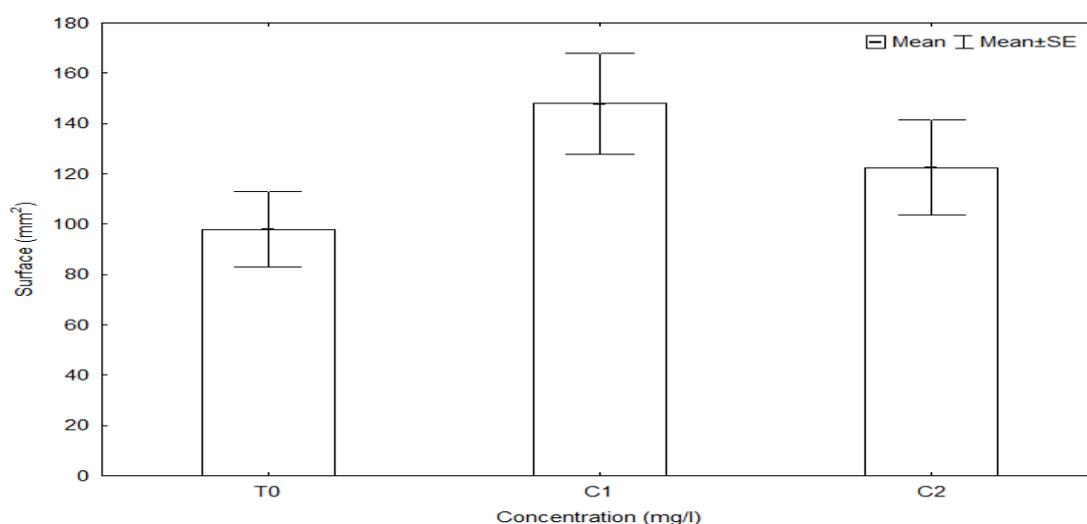


**Figure 29:** Effet des différentes concentrations du chlorure de potassium sur le poids sec (g) des cals issus des CRs après 20 jour d'élicitation ( $F=4,29$ ,  $ddl=3$  et  $P=0,088$ ).

### Surface des cals

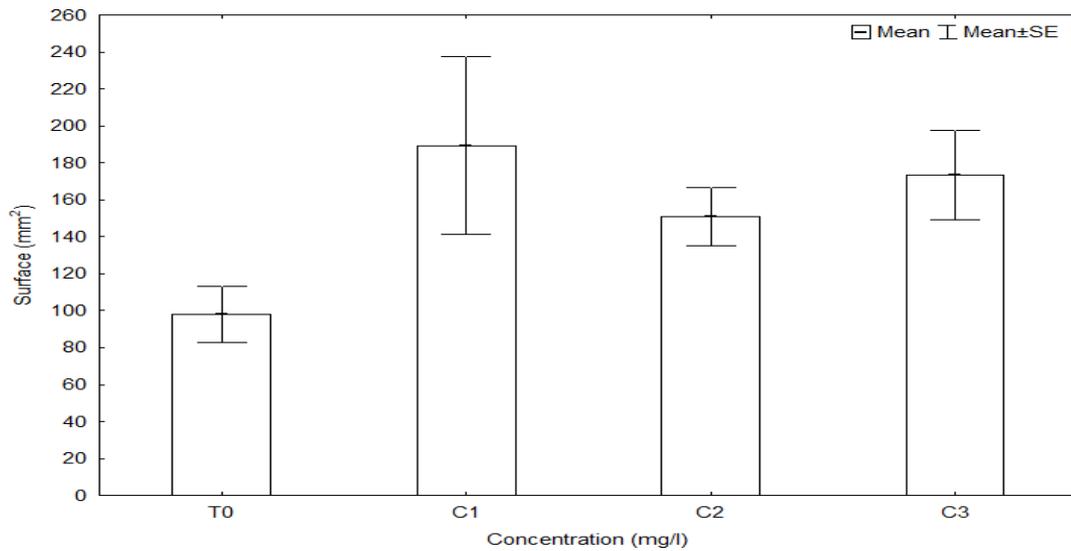
La surface des cals est estimée après 20 jours de culture sur les traitements éliciteurs. Cette surface peut déterminer le meilleur traitement éliciteurs testé qui correspond à une bonne élicitation.

Selon la **figure 30**, qui représente la surface des cals après la deuxième élicitation par le saccharose, la surface des cals a été faible et variable. L'analyse de la variance effectuée sur les résultats obtenus après 20 jours d'élicitation n'a révélé aucun effet significatif pour la surface des cals (Annexe 3). Reste que, la surface la plus importante a été observé avec la concentration C1 qui contient 30 g /l de saccharose avec une surface moyenne de 149 mm<sup>2</sup> face a un témoin TO avec une surface de 99 mm<sup>2</sup>.



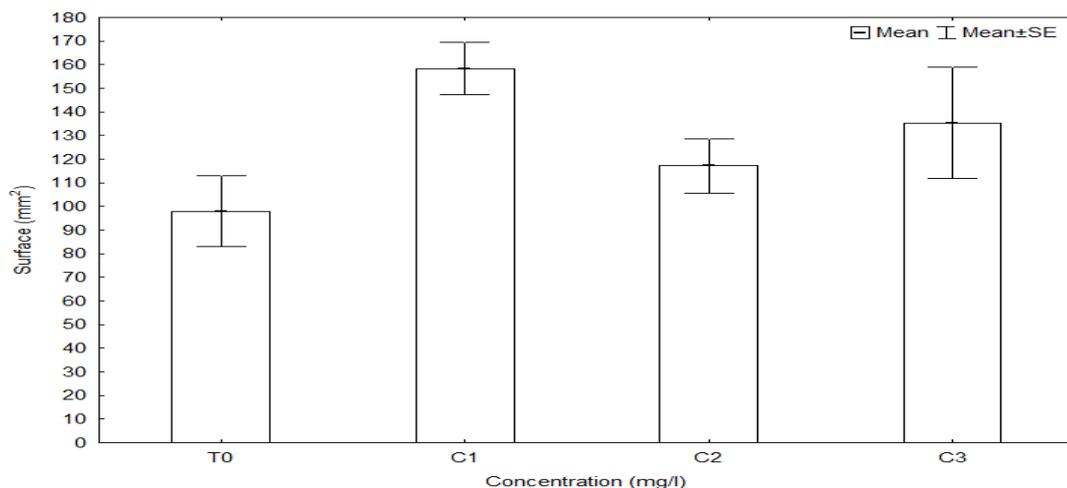
**Figure 30:** Effet des différentes concentrations du saccharose sur la surface des cals issus des CRs après 20 jour d'élicitation ( $F=1,22, ddl=2$  et  $P=0,32$ )

Selon la **figure 31**, qui représente la surface des cals après l'élicitation par le mannitol, la surface des cals a été faible et variable. L'analyse de la variance effectuée sur les résultats obtenus après 20 jours d'élicitation n'a révélé aucun effet significatif pour la surface des cals (Annexe 3). Reste que, la surface la plus importante a été observée avec la concentration C1 qui contient 40mg/l de mannitol avec une surface moyenne de 185 mm<sup>2</sup> face au témoin TO.



**Figure 31:** Effet des différentes concentrations du mannitol sur la surface des cals issus des CRs après 20 jour d'élicitation ( $F=0,80$ ddl=3 et  $P=0,50$ )

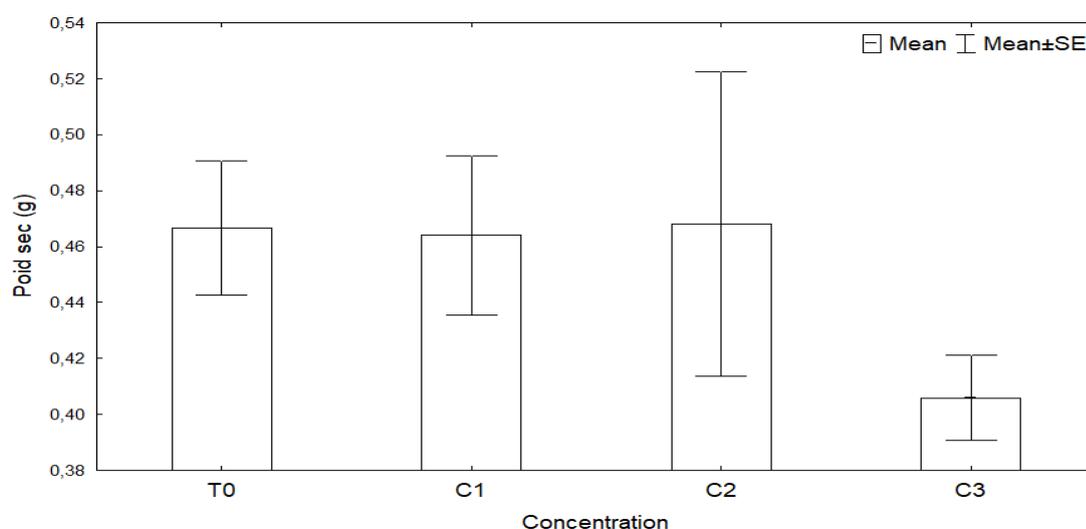
Selon la **figure 32**, qui représente la surface des cals après l'élicitation par le chlorure de potassium KCL, la surface des cals a été faible et variable. L'analyse de la variance effectuée sur les résultats obtenus après 20 jours d'élicitation n'a révélé aucun effet significatif pour la surface des cals (Annexe 3). Reste que, la surface la plus importante a été observée avec la concentration C1 qui contient 100mg/l de chlorure de potassium avec une surface moyenne de 159 mm<sup>2</sup> face au témoin T0.



**Figure 32:** Effet des différentes concentrations du chlorure de potassium sur la surface des cals issus des CRs après 20 jour d'élicitation ( $F=1,71$ , ddl=3 et  $P=0,18$ )

### 3.3. Effet de l'élicitation des chevelus racinaires CRS

L'analyse de la variance effectuée sur les résultats obtenus après 20 jours d'élicitation n'a révélé aucun effet significatif du chlorure de potassium sur le poids sec des CRS (Annexe 4). Reste que le poids le plus important a été observé avec la concentration C2 (200 mg/l) de chlorure de potassium avec un poids sec moyen de 0,47 g face à un témoin TO avec un poids sec de 0,46 g (Figure 33).



**Figure 33:** Effet des différentes concentrations (mg/l) du chlorure de potassium sur le poids sec (g) des chevelus racinaires après 20 jours d'élicitation ( $F=0,73$ ,  $ddl=3$  et  $P=0,5$ ).

### 4. Rendement d'extraction des différents extraits

Les résultats obtenus montrent que parmi les différentes fractions de l'extrait brut, l'extrait hydroéthanolique des cals traités par le mannitol et l'extrait hydroéthanolique des cals traités par le KCl représentent les rendements les plus élevés (42 % et 17 %, respectivement). Cependant, l'extrait hydroéthanolique du témoin (Cals non élicités) présente un rendement faible de 2%. Par ailleurs, les extraits des chevelus racinaires non élicités (Témoin) représente le rendement le plus élevé 72% suivi des CRS traité par 200 mg/l de KCl avec 28,33 %. En effet il est difficile de comparer les résultats avec ceux de la bibliographie car le rendement n'est que relatif et dépend de la méthode et des conditions dans lesquelles l'extraction a été effectuée.

**Tableau 4:** Rendements des extraits de cals.

Type d'éliciteurs	Concentrations	Résidu sec (g)	Rendement(%)
KCl	100mg/l	0,06g	3%
	200mg/l	0,36g	12%
	300mg/l	0,52g	17%
Saccharose	90 g/l	0,07g	7%
Mannitol	80 mg/l	0,42g	42%
Témoin	0 mg/l	0,08g	2%

**Tableau 5:** Rendements des extraits de chevelus racinaires

Type d'éliciteurs	Concentrations	Résidu sec(g)	Rendement(%)
KCl	100mg/l	0,18g	10.52%
	200 mg/l	0 ,51g	28,33%
	300mg/l	0,25g	13,02
Témoin	0 mg/l	0,51g	72%

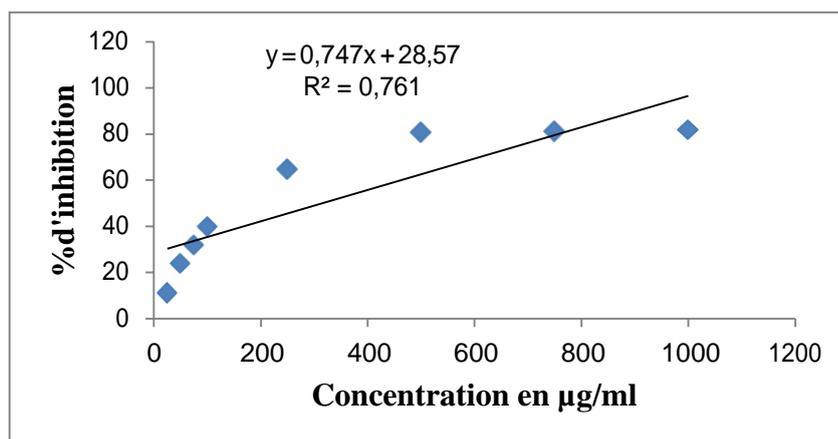
## 5. Évaluation de l'activité antioxydante des différents extraits de *C. roseus*

L'activité anti-radicalaire est réalisée par la méthode du radical 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyle (DPPH) qui est une méthode fréquemment utilisée pour sa simplicité. Cette méthode est basée sur la réduction d'une solution alcoolique de DPPH en présence d'un antioxydant qui donne un hydrogène ou un électron, la forme non radicalaire DPPH-H est formée (Bortolomeazziet *al.*, 2007). L'inhibition de la décoloration du radical DPPH est en fonction de la concentration des différents extraits utilisés et du témoin BHT (Stabilisant, butylhydroxytoluène ,antioxydydant de référence) ( $\mu\text{g/ml}$ ).

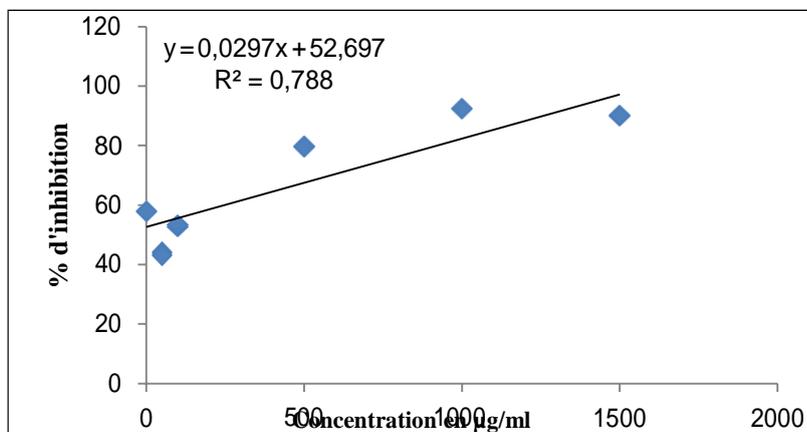
L'activité antioxydante des extraits est exprimée en  $\text{IC}_{50}$ , ce paramètre a été employé par plusieurs groupes de chercheurs pour présenter leurs résultats (Abdulmajedet *al.*, 2005; Ahmad *et al.*, 2012; Rangaet *al.*, 2009), il définit la concentration efficace du substrat qui cause la perte de 50% de l'activité du radical DPPH. Ces  $\text{IC}_{50}$  sont déterminées à partir des graphes (Figure 31, 32 et 33), dont l'abscisse représente la concentration de l'extrait brut et

l'ordonné l'activité antioxydante en pourcentage. Cette IC<sub>50</sub> est de 93 µg/ml pour l'extrait des calcs traités par le mannitol et de 1969µg/ml pour l'extrait témoin sans éliciteurs. La CI<sub>50</sub> du témoin standard le BHT est de 29 µg/ml.

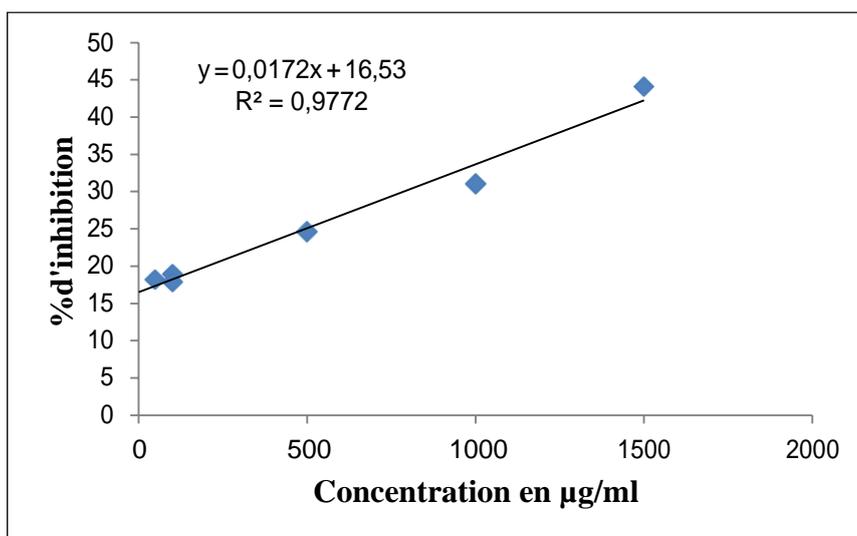
Tous les extraits ont un pouvoir anti-radicalaire envers le DPPH. (Fig 34), plus la valeur de l'IC<sub>50</sub> est petite plus l'extrait est considéré comme un antioxydant puissant.



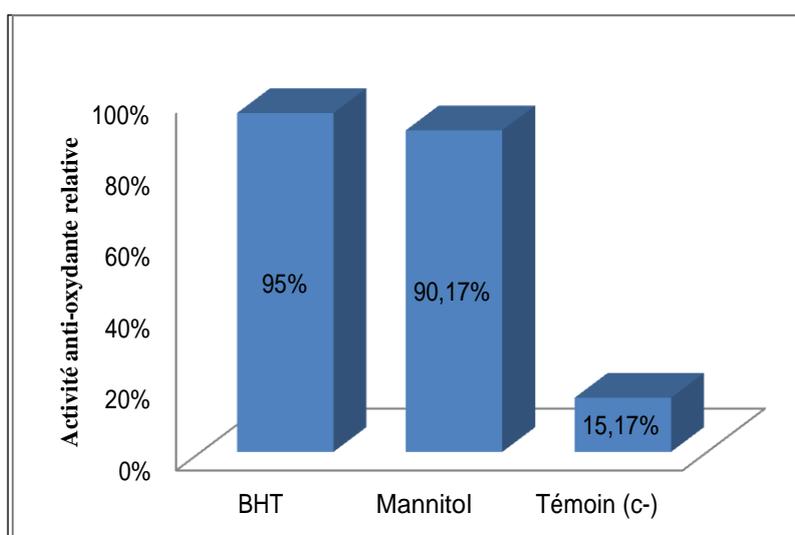
**Figure 34 :** Variation de l'inhibition du DPPH en fonction de la concentration du BHT (Contrôle positif).



**Figure 35 :** Variation de l'inhibition du DPPH en fonction de la concentration de l'extrait de calcs traités par le mannitol



**Figure 36:** Variation de l'inhibition du DDPH en fonction de la concentration de l'extrait des cals non traités (Témoin).



**Figure 37:** Activité anti-radicalaire des extraits des cals de *Catharanthus roseuset* du BHT.

## ***DISCUSSION DES RESULTATS***

---

## 1. Etablissement du matériel végétale

L'obtention du matériel végétal à partir de la germination des graines, constitue une étape primordiale dans l'établissement des cultures *in-vitro* afin de produire les métabolites secondaires. Nos résultats de germination, montrent que les graines de *C. roseus* trempées dans l'eau distillée pendant 48 heures donnent un taux relativement élevé de germination ( $\geq 70\%$ ). 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 à un pourcentage élevé.

Abdul Jaleel *et al.* (2007) notent un taux de germination de 60% après une imbibition des graines de *C. roseus* de 5 jours, dans l'eau distillée. De même, Pandey *et al.* (2007) indiquent que l'imbibition des graines de *C. roseus*, pendant 12 heures dans l'eau distillée, est essentielle pour améliorer le taux de germination.

Cependant, d'autres recherches (Reisman-Berman *et al.*, 1991; Tieu and Egerton-Warburton 2000; Loddo *et al.*, 2013), ont trouvés que la scarification des graines de *C. roseus*, permet de permettre d'augmenter le taux de germination par le levé de dormance tégumentaire.

## 2. Callogenèse

Plusieurs recherches sur *Catharanthus roseus* (Zhao *et al.*, 2001 ; Xu *et al.*, 2005 ; Yuan *et al.*, 2011 ; Moghe *et al.*, 2016), ont étudié l'induction de cals à partir de différents types d'explants, en vue de la régénération des plantes entières. Reste qu'un nombre très limité de recherches ont utilisé les chevelus racinaires de *Catharanthus roseus* pour induire une callogénèse (Choi *et al.*, 2004), dans le but d'obtenir des plantes transgéniques et aussi pour améliorer la production des métabolites secondaires.

Dans la présente étude, l'induction de la callogenèse a été réalisée à partir de deux matériaux végétaux différents ; d'une part à partir des vitrosemis (Feuilles et tiges) issus de la germination des graines de *Catharanthus roseus*, ainsi, à partir des chevelus racinaires. Nos expériences ont permis de mettre en évidence une variabilité dans les aptitudes callogènes des différents explants induite. Cette différence est conditionnée par l'action de divers facteurs, à savoir ; la composition hormonale du milieu de culture et le type d'explants. En outre, la fréquence d'apparition et l'aspect des cals a été variable selon

les traitements hormonaux utilisés. Les premières proliférations des cals sont déclenchées à partir de 10<sup>ème</sup> jour de mise en culture, essentiellement, pour les explants feuilles.

En outre, l'analyse de la variance effectuée sur les résultats obtenus, après six semaines de culture, révèle un effet très hautement significatif du traitement hormonal utilisé. D'une manière générale, le milieu M3 (1 mg / l de 2,4D et 0,5 mg / l de BAP) semble être le meilleure milieu inducteur de cals, dont le pourcentage de callogenèse de 93,33 %.

Par ailleurs, d'autres recherches sur *C. roseus* (Das *et al.*, 2020), ont montré qu'une combinaison de l'auxine avec la cytokinine, à plus faible dose, induit une callogenèse. De plus, des recherches ont confirmé que l'auxine 2,4-D, combinés avec d'autres cytokinines, contribue efficacement à la formation des cals (Haq *et al.*, 2013; Kalidass *et al.*, 2010; Kawtar *et al.*, 2015; Moghaieb *et al.*, 2004; Negi, 2011; Rahman *et al.*, 2019; Singh *et al.*, 2011; Verma *et al.*, 2012). En effet, l'application exogène d'auxine provoque une formation de cals sur toute la surface de l'explant, et la présence de cytokinine favorise un bon développement des cals (Okazawa *et al.*, 1967).

Les meilleurs résultats de callogenèse enregistrés pour les chevelus racinaires sont obtenus sur le milieu M1 qui contient 1 mg/l de 2,4D, avec un taux de 100 %. Ce résultat s'accorde avec celui constaté par Habibi *et al.* (2016) qui a enregistré un taux de callogenèse de 81.5 % à partir des chevelus racinaires d'*Origanum vulgare* cultivés sur un milieu MS contient 0.25 mg / L de 2,4-D. D'autre part, pour les explants tiges, plusieurs milieux semblent efficace pour l'induction des cals, avec un taux de 100%, à savoir le milieu M3 (1 mg/l de 2,4D et 0,5 mg/l de BAP), M4 (1 mg/l de ANA et 0,5 mg/l de BAP) et M5 (0,5 mg/l de 2,4D). Pour ce qui est des explants feuilles, le résultat de callogenèse le plus intéressant (100%) est représenté par le milieu M3 (1 mg/l de 2,4D et 0,5 mg/l de BAP) et M4 (1 mg/l de ANA et 0,5 mg/l de BAP).

Choi *et al.* (2004) ont utilisé les chevelus racinaires de *Catharanthus roseus*, comme explant, pour induire une callogenèse dans le but d'obtenir des plantes transgéniques, et aussi pour améliorer la production des métabolites secondaires. D'après le même auteur (Choi *et al.*, 2004), la culture des chevelus racinaires de *C. roseus* induits des cals en utilisant des concentrations de la cytokinine BAP (13,32 et 31,08 µM) combinées à des concentrations de l'auxine ANA (5,37 ou 10,74 µM). Plusieurs travaux sur différentes

espèces végétales (Mei *et al.*, 2006 ; Koga *et al.*, 2000; Shi *et al.*, 2011; Zhou *et al.*, 2007), ont utilisés de différentes combinaisons hormonales pour induire des cals à partir de chevelus racinaires. En effet, selon Zhou *et al.*, (2007) la culture des explants de chevelus racinaires de *Rehmannia glutinosa* ont induits des cals sur un milieu MS contenant 0,2 mg / l de Kinétine et 3,0 mg/l de BAP.

Les plus grandes surfaces des cals induits sont enregistrées, après six semaines de culture, au niveau des cals issus des différents explants et sont formées avec les traitements M4 (1 mg/ l de ANA et 0,5 mg/l de BAP) et M6 (0.5 mg/l de ANA), dont les moyennes de surface sont respectivement, d'une moyenne de 45 mm<sup>2</sup> et de 100 mm<sup>2</sup>.

En conséquence, la formation des cals dépend énormément de la balance hormonale et du type d'hormone appliqués, aussi le type d'explant et le génotype influencent la fréquence de la callogenèse (Moghaieb *et al.*, 2004; Junaid *et al.*, 2006; Saibi, 2006; Kalidass *et al.*, 2010; Bakiri, 2011; Negi, 2011; Haq *et al.*, 2013; Kawtar *et al.*, 2015).

### 3. Effet de l'élicitation du matériel végétal

Dans notre travail, trois éliciteurs (le saccharose, l'acide salicylique et le chlorure de potassium), ont été tester sur les cals, issus des chevelus racinaires et cultivé sur milieu MS additionnéde 0.5 mg/l de 2,4D et 0.25 mg/l de BAP. Le saccharose est un sucre phytostimulant, l'acide salicylique est un simple acide phénolique, qui possède une fonction hormonale. Il est synthétisé à partir de l'acide aminé phénylalanine ou chorismate en fonction de l'espèce végétale, du stade de développement ou des conditions de croissance (Tounekti *et al.*, 2013). De plus, l'acide salicylique est connu comme étant une importante molécule de signalisation impliquée dans la résistance systémique acquise (SAR : systemic acquired resistance) en réponse aux effets des facteurs de stress abiotiques et biotiques (Ryals *et al.*, 1996). Quand au chlorure de potassium c'est un sel ; un éliciteur abiotique très efficace pour stimuler l'accumulation de biomasse et la production des métabolites secondaires (Harfi *et al.*, 2015).

Nos résultats montrent que les différentes concentrations des éliciteurs testes lors de la première élicitation ont un effet significatif sur la production en biomasse des cals issus des CRs. Nous avons enregistrés une augmentation du poids sec des cals de 80 %, de 72 % et de 260 % par rapport aux témoins, suite à leurs élicitation par le saccharose (90

g/l), l'acide salicylique (25 mg/l) et le KCl (100 mg/l), respectivement.

Mujib *et al.* (2012) ont noté que l'élicitation de cals issues des feuilles de *C. roseus* par 4 g/l de KCl améliore la biomasse de 90 %. Selon Almagro *et al.* (2015) le traitement des cals par les sels (KCl et CaCl) favorise le développement rapide des cellule des cals, ce qui explique l'amélioration de l'accumulation de biomasse.

Parmi les éliciteurs testés (KCl, mannitol et saccharose) testés sur les cals, issus des chevelus racinaires et cultivé sur milieu MS additionné de 0.5 mg/l de BAP, lors la seconde élicitation, seul le chlorure de potassium a montré un effet significatif sur le poids sec des cals. En effet, l'élicitation par le KCl (100 mg/l) a permis d'enregistrer une amélioration du poids sec de 180 % par rapport au témoin (0,21 g). Cependant, des poids sec moyen moins important ont été conférés par l'élicitation avec le mannitol (80 mg/l) et le saccharose (30 g/l) avec des améliorations de 95 % et 38 %, respectivement

Toutefois, des travaux indiquent que l'application du stress salin avec des concentrations qui dépassent 1 g/l conduit à une diminution de la croissance de la biomasse des cals (Lee-Parsons and Ertürk, 2005; Abdul Jaleel *et al.*, 2007; Khelifi *et al.*, 2011; Harfi *et al.*, 2015). Par ailleurs, d'autres recherches affirment que l'effet du stress abiotique sur la biomasse dépend énormément du moment de son application et la concentration utilisée (Rijhwani and Shanks, 1998; Wang and Wu, 2013 ; Almagro *et al.*, 2015).

Les plus grandes surfaces des cals sont enregistrés pour la première élicitation, au niveau des cals issus des du traitement saccharose avec une surface de 135 mm<sup>2</sup> comparé a un témoin de surface de 85 mm<sup>2</sup>. Au niveau de la seconde élicitation le traitement mannitol présente la plus grande surface de cals avec une surface de 185 mm<sup>2</sup> comparé a un d'un témoin de 99 mm<sup>2</sup>.

D'une manière générale, les éliciteurs sont classés comme des composés de signaux extracellulaires (Exogènes) et intracellulaires (Endogènes) chez les cellules végétales, et peuvent déclencher des réponses de résistance physiologique et morphologique chez les plantes et initier l'accumulation de phytoalexine (Zhao *et al.*, 2005). Certaines molécules, synthétisées par les cellules végétales suite à une réponse contre un stress biotique et abiotique, telle que l'AS (Creelman and Mullet, 1995; Ryals *et al.*, 1996; Tounekti *et al.*, 2013; An and Mou, 2014) est considérée et utilisée comme

éliciteur endogènes et exogènes pour améliorer la production en métabolites secondaires, ainsi que, la production en biomasse chez différentes espèces (Catinot *et al.*, 2008; el Jaber-Vazdekis *et al.*, 2008; Abbott *et al.*, 2010; Khelifi *et al.*, 2011; Schluttenhofer *et al.*, 2014; Zhang *et al.*, 2014), y compris *C. roseus* (Rijhwani and Shanks, 1998; Zhao *et al.*, 2001; Lee-Parsons *et al.*, 2004; Vázquez-Flota *et al.*, 2009; Siddiqui *et al.*, 2013).

#### 4. Activité antioxydante des extraits hydroéthanolique des cals

L'activité antioxydante est l'une des principales capacités recherchées dans les plantes médicinales. Pour cela, nous avons évalué l'activité antioxydante de nos extraits en utilisant la méthode de réduction du DPPH. Cette technique est largement utilisée pour évaluer le pouvoir antioxydant des extraits végétaux et des produits alimentaires car elle est simple, rapide, sensible et non couteuse. Le DPPH (2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl) est un radical libre stable, caractérisé par une couleur violette, et présente un maximum d'absorption à 517 nm dans une solution de méthanol ou d'éthanol. Par conséquent, l'effet antioxydant peut être facilement évalué en suivant la diminution de l'absorption à 517 nm (Krishnaiah *et al.*, 2011 ; Thatoi *et al.*, 2014).

Nos résultats montrent que l'extrait hydroéthanolique des cals cultivés sur milieu MS additionné de 0.5 mg/l de BAP et traités ou non traités avec le mannitol, est capables de piéger le radical DPPH en fonction de leurs concentrations. Le pourcentage de piégeage du DPPH révèle que l'extrait hydroéthanolique de cals traitées avec 80 mg/l de mannitol, a révélé une activité d'inhibition qui atteint 90% à 1000 µg/ml. Tandis que, Le pourcentage de piégeage du DPPH de l'extrait hydroéthanolique du témoin, représenté par des cals non traité par le mannitol, a montré une activité d'inhibition qui ne dépasse pas les 50 % à 1500 µg/ml.

Le pouvoir antioxydant de nos extraits est exprimé en IC<sub>50</sub>. La valeur de chaque IC<sub>50</sub> exprime la concentration de l'extrait exigée pour réduire 50 % de DPPH. En comparant les valeurs d'IC<sub>50</sub> des extraits de cals traités et non traités (Témoin) avec le mannitol, on remarque que l'extrait des cals traités a une valeurs d'IC<sub>50</sub> de 93µg/ml, par contre, l'IC<sub>50</sub> du témoin est d'une valeur relativement élevé qui de 1969 µg/ml. Cependant, l'IC<sub>50</sub> du BHT (contrôle positif) est de 29 µg/ml qui représente la plus faible valeur.

L'IC<sub>50</sub> est inversement proportionnelle à la capacité antioxydante d'un composé, donc plus cette valeur est basse plus l'activité antioxydante d'un composé est grande

(Cheurfa and Allem, 2016). De ce fait, l'extrait ayant subi une élicitation présente une meilleure activité antioxydante que l'extrait n'ayant subi aucune élicitation. L'élicitation a permis donc d'augmenter la synthèse des composés phénoliques ce qui nous a permis de détecter l'activité antioxydante de la plante. Ces résultats s'accordent avec ceux rapportés par d'autres auteurs qui ont démontré une corrélation positive entre la présence des composés phénoliques et l'activité antioxydante (Djeridane *et al.*, 2006 ;Wong *et al.*, 2006 ;Turkmen *et al.*, 2007 ;Wojdylo *et al.*, 2007).

En effet, les capacités réductrices et de piégeage des radicaux libres de l'extrait brut des cals est comparable avec celles observées dans les extraits alcooliques de différentes parties de la plante *C.roseus* (Nisar *et al.*, 2017). En outre, Kagnou *et al.* (2020) ont évalué l'activité antioxydante de plusieurs variétés de *Catharanthus roseus* avec des extraits de feuilles, fleurs et racines, dont, l'analyse du DPPH a montré que les extraits de fleurs et racines étaient plus actifs.

## ***CONCLUSION GENERALE***

---

*Catharanthus roseus* est une plante médicinale qui possède des métabolites secondaires d'une grande valeur thérapeutique. Ce sont principalement des alcaloïdes indoliques terpéniques qui ont des propriétés anticancéreuses (vinblastine et vincristine), mais aussi des composés phénoliques (Glycosyl de flavone) qui ont des propriétés antioxydante (van Der Heijden *et al.*, 2004).

Deux types de matériel végétal, issus de culture *in vitro*, sont utilisés dans le cadre du présent travail, les cals et les chevelus racinaires (CRs), qui présentent une excellente alternative pour optimiser la production en biomasse et en métabolites secondaires de *C. roseus*. Ce choix se justifie par leur rythme de croissance rapide ainsi que leurs profils des métabolites secondaires, qui sont conformes à ceux de la plante entière (Giri and Narasu, 2000; Vázquez-Flota *et al.*, 2009; Pati *et al.*, 2010).

La présente étude avait comme objectif d'optimiser la biomasse et la croissance des cals et des chevelus racinaires de *C. roseus*, en employant des éliciteurs abiotiques à différentes concentrations. Dans un premier temps, nous avons étudié l'effet des balances hormonales sur l'induction de la callogenèse ainsi que la multiplication des cals obtenus. Par la suite, et dans l'objectif d'améliorer la biomasse en vue de l'amélioration des métabolites secondaires, nous avons opté pour l'utilisation de différents éliciteur abiotiques.

D'après les résultats de la callogenèse, le meilleur taux de callogenèse, 100%, a été atteint pour les tiges sur quatre milieux différents (M2, M3, M4 et M5), alors que pour les feuilles le 100% est atteint sur deux milieux uniquement (M3 et M4). En fin, l'organe qui a enregistré les faibles taux de callogenèse est les racines transgéniques.

Les résultats de l'élicitation des cals avec différents éliciteurs abiotiques, ont montré l'utilisation du chlorure de potassium (100 mg/l) sur milieu MS additionné de 0.25mg/l de BAP, augmente la production en biomasse des cals de 260 % du poids sec, par rapport au témoin. Cependant, une augmentation considérable en surface (80 %) par rapport au témoin, est enregistré avec les cals cultivé sur milieu MS (0.25 mg/l de BAP) et élicité par le mannitol (80 mg/l).

L'évaluation de l'activité antioxydante de deux extraits hydroéthanoliques des cals élicité par le mannitol a montré une activité antioxydante relativement importante, dont l'IC<sub>50</sub> de l'extrait de cals traitées est de 93 µg/ml, relativement inférieur à l'IC<sub>50</sub> du témoin qui est

d'une valeur d'IC50 de 1969 µg/ml.

En effet l'élicitation stimule et améliore la biosynthèse des composés spécifiques lorsqu'ils sont ajoutés en petite quantité à un système cellulaire en culture *in vitro*, cela influence les activités biologiques des plantes (Agarwal et *al.*, 2011).

Afin de compléter notre travail, il est intéressant d'évaluer l'activité antioxydante du reste des éliciteurs et même détecter l'effet d'autres éliciteurs sur la production en biomasse des cals et des chevelus racinaires.

## ***REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES***

---

**Abbott, N. J., Dolman, D. E., Yusof, S. R., & Reichel, A. (2010).** In vitro models of CNS barriers. *Drug Delivery to the brain*, 163-197.

**Abdul Jaleel, C. A., Sankar, B., Kishorekumar, A., Somasundaram, R., Lakshmanan, G. A., & Panneerselvam, R. (2007).** Growth, biochemical modifications and proline metabolism in *Helianthus annuus* L. as induced by drought stress. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 59(2), 141-149.

**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.

**Aïdam, A. V. Pitekellabou, R., Etse, K. (2013).** Micropropagation et rhizogenèse in vitro chez *Nauclea latifolia* smith (Rubiaceae). *European Scientific Journal*, 9(24).

**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.

**Amdoun, R., Khelifi, L., Zarouri, B., Amroun, S., & Khelifi-Slaoui, M. (2006).** Production de chevelus racinaires par transformation génétique in vitro de deux espèces de *Datura*. *Biotechnologie végétale*. Khelifi. Alger, 0, 83-85.

**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.

**Aniszewski, T. (2007).** *Alkaloids-Secrets of Life:: Alkaloid Chemistry, Biological Significance, Applications and Ecological Role*: Elsevier.

**Angelova, Z., Georgiev, S., & Roos, W. (2006).** Elicitation of plants. *Biotechnology & Biotechnological Equipment*, 20(2), 72-83.

**Antoun, H., & Kloepper, J. W. (2001).** *Encyclopedia of genetics*.

**Ara, N., Rashid, M., & Amran, S. (2009).** Comparison of hypotensive and hypolipidemic effects of *Catharanthus roseus* leaves extract with atenolol on adrenaline induced hypertensive rats. *Pakistan journal of pharmaceutical sciences*, 22(3).

**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.

**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.

**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.

**Athamena, S., Chalghem, I., Kassah-Laouar, A., Laroui, S., & Khebri, S. (2010).** Activité antioxydante et antimicrobienne d'extraits de *Cuminum cyminum* L. *Lebanese science journal*, 11(1), 69-81.

**Ataei-Azimi, A., Hashemloian, B. D., Ebrahimzadeh, H., & Majd, A. (2008).** High in vitro production of ant-canceric indole alkaloids from periwinkle (*Catharanthus roseus*) tissue culture. *African Journal of Biotechnology*, 7(16).

**Azhar, N. A., Ghozali, S. Z., Bakar, S. A. A., Lim, V., & Ahmad, N. H. (2020).** Suppressing growth, migration, and invasion of human hepatocellular carcinoma HepG2 cells by *Catharanthus roseus*-silver nanoparticles. *Toxicology in Vitro*, 67, 104910.

**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.

**Barhé, T. A., & Tchouya, G. F. (2016).** Comparative study of the anti-oxidant activity of the total polyphenols extracted from *Hibiscus Sabdariffa* L., *Glycine max* L. Merr., yellow tea and red wine through reaction with DPPH free radicals. *Arabian Journal of Chemistry*, 9(1), 1-8.

**Bamforth, C. W. (2000).** Brewing and brewing research: past, present and future. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 80(9), 1371-1378.

**Barkat, M., & Rompel, A. (2017).** Purification and characterization of latent polyphenol oxidase from apricot (*Prunus armeniaca* L.). *Journal of agricultural and food chemistry*, 65(37), 8203-8212.

**Barkat, M. A., Ahmad, I., Ali, R., Singh, S. P., Pottoo, F. H., Beg, S., & Ahmad, F. J. (2017).** Nanosuspension-based aloe vera gel of silver sulfadiazine with improved wound healing activity. *AAPS PharmSciTech*, 18(8), 3274-3285.

**Barz, W., Daniel, S., Hinderer, W., Jaques, U., Kessmann, H., Köster, J., & Tiemann, K. (1988).** Elicitation and metabolism of phytoalexins in plant cell cultures. In *Plant cell biotechnology* (pp. 211-230). Springer, Berlin, Heidelberg.

**Bhatia, L., Chandel, A. K., Singh, A. K., & Singh, O. V. (2015).** Biotechnological advances in lignocellulosic ethanol production. In *Sustainable Biotechnology-Enzymatic Resources of Renewable Energy* (pp. 57-82). Springer, Cham.

**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.

**Benabdesselam, F. E., & Bouhali, H. (2015).** Caractérisation des huiles essentielles de *Citrus sinensis* et étude de leur activité antioxydante: étude comparative entre l'huile essentielle des écorces sèches et fraîches.

- Belabbas, M. (2011).** Sélection de cals de pomme de terre (*Solanum tuberosum* L. var. Kondor et Spunta) tolérants à la salinité. 186.
- Belarbi, K., Atik-Bekkara, F., El Hacı, I. A., Bensaid, I., Beddou, F., & Bekhechi, C. (2017).** In vitro antioxidant activity and phytochemical analysis of *Teucrium pseudo-Scorodonia* Desf. collected from Algeria. *Oriental Pharmacy and Experimental Medicine*, 17(2), 151-160
- Bercetche, J. Boxus, P., & (1995).** Multiplication végétative: micropropagation, embryogénèse somatique. CNED.
- BENYAMMI, R. (2018).** Production par voie biotechnologique d'alcaloïdes d'intérêt médical à partir de la pervenche de Madagascar (*Catharanthus roseus* (L.) G. Don).
- Benyammi, R., Belabbassi, O. Harfi, B., Khelifi-Slaoui, M., Zaoui, D., & Khelifi, L. (2011).** Effect of culture medium on hyoscyamine production from four *Datura* sp hairy roots. *Adv Environ Biol*, 5, 1023-1030.
- Benyammi, R., Paris, C., Khelifi-Slaoui, M., Zaoui, D., Belabbassi, O., Bakiri, N., . . . Makhzoum, A. J. P. b. (2016).** Screening and kinetic studies of catharanthine and ajmalicine accumulation and their correlation with growth biomass in *Catharanthus roseus* hairy roots. *Pharmaceutical Biology*, 54(10), 2033-2043.
- Bensalem-Bournine, S. E., Belmouri, L., & Bendahmane, T. (2017).** Evaluation de l'activité antioxydante et cytoprotectrice des extraits alcaloïdiques d'une plante médicinale locale.
- Bhatia, S. (2015).** 2-Plant Tissue Culture. In *MODERN APPLICATIONS OF PLANT BIOTECHNOLOGY IN PHARMACEUTICAL SCIENCES*. Academic Press is an imprint of Elsevier.
- Bercetche, J., & Pâques, M. (1995).** Somatic embryogenesis in maritime pine (*Pinus pinaster*). In *Somatic embryogenesis in woody plants* (pp. 221-242). Springer, Dordrecht.
- 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.
- Bruneton, J. (1999).** Toxic plants dangerous to humans and animals. Intercept Limited.
- Chaabi, M. (2008).** Etude phytochimique et biologique d'espèces végétales africaines: *Euphorbia stenoclada* Baill.(Euphorbiaceae), *Anogeissus leiocarpus* Guill. & Perr.(Combretaceae), *Limoniastrum feei* (Girard) Batt.(Plumbaginaceae) (Doctoral dissertation, Strasbourg 1).
- Chawla, H. S., & Wenzel, G. (2009).** In vitro selection of barley and wheat for resistance against *Helminthosporium sativum*. *Theoretical and Applied Genetics*, 74(6), 841-845.
- Cheurfa, M., & Allem, R. (2016).** Évaluation de l'activité anti-oxydante de différents extraits des feuilles d'*Aloysia triphylla* (L'Hérit.) d'Algérie in vitro. *Phytothérapie*, 14(3), 181-187.
- Choi, K. H., Yoon, J. W., Kim, M., Jeong, J., Ryu, M., Park, S., ... & Lee, C. K. (2014).** Optimization of culture conditions for maintaining pig muscle stem cells in vitro. *Food Science of Animal Resources*, 40(4), 659.

**Choi, S. W., & Lee, I. B. (2004).** Nonlinear dynamic process monitoring based on dynamic kernel PCA. *Chemical engineering science*, 59(24), 5897-5908.

**Costa, M. M. R., Hilliou, F., Duarte, P., Pereira, L. G., Almeida, I., Leech, M., ... & Sottomayor, M. (2008).** Molecular cloning and characterization of a vacuolar class III peroxidase involved in the metabolism of anticancer alkaloids in *Catharanthus roseus*. *Plant physiology*, 146(2), 403-417.

**Cui, L., Ni, X., Ji, Q., Teng, X., Yang, Y., Wu, C., . . . Kai, G. (2015).** Co-overexpression of geraniol-10-hydroxylase and strictosidine synthase improves anti-cancer drug camptothecin accumulation in *Ophiorrhiza pumila*. *Scientific reports*, 5(1), 1-9.

**Creelman, R. A., & Mullet, J. E. (1995).** Jasmonic acid distribution and action in plants: regulation during development and response to biotic and abiotic stress. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 92(10), 4114-4119.

**Dahdouh, A. (2013).** Optimisation des conditions de morphogénèse par culture in-vitro de *Citrus reticulata* et *Citrus lemon* de la collection de l'INRA de Oued Ghir (Bejaia).

**Daniell, H. (2003).** Medical molecular pharming: expression of antibodies, biopharmaceuticals and edible vaccines via the chloroplast genome *Plant Biotechnology 2002 and Beyond* (pp. 371- 376): Springer.

**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.

**Datta, S. K., Datta, K., Soltanifar, N., Donn, G., & Potrykus, I. (1992).** Herbicide-resistant *Indica* rice plants from IRRI breeding line IR72 after PEG-mediated transformation of protoplasts. *Plant Molecular Biology*, 20(4), 619-629.

**De Carolis, E., Chan, F., Balsevich, J., & De Luca, V. (1990).** Isolation and characterization of a 2-oxoglutarate dependent dioxygenase involved in the second-to-last step in vindoline biosynthesis. *Plant physiology*, 94(3), 1323-1329.

**De Luca, V., & Cutler, A. J. (1987).** Subcellular localization of enzymes involved in indole alkaloid biosynthesis in *Catharanthus roseus*. *Plant Physiology*, 85(4), 1099-1102.

**Djennane, S., Chauvin, J. E., & Meyer, C. (2002).** Glasshouse behaviour of eight transgenic potato clones with a modified nitrate reductase expression under two fertilization regimes. *Journal of experimental botany*, 53(371), 1037-1045.

**Eder, J., & Cosio, E. G. (1994).** Elicitors of plant defense responses. *International review of cytology*, 148, 1-36.

**EFFENDI, B. S.YAJUN, E. H., & HAMZAH, D. A. (2008).** Evaluasi Sifat Ovisidal dan Nimfasidal Insektisida Buprofezin 100 g/l terhadap Telur dan Nimfa Wereng Coklat, *Nilaparvata lugens* (Stal.)(Hemiptera: Delphacidae). *Agrotrop*, 6(2), 90-104.

**Eurentin - Hegel, (2013).** Proteomic analysis of the changed proteins of *Trichinella spiralis*

infective larvae after co-culture in vitro with intestinal epithelial cells. *Veterinary parasitology*, 194(2-4), 160-163.

**Epifano, F., Genovese, S., Menghini, L., & Curini, M. (2007).** Chemistry and pharmacology of oxyprenylated secondary plant metabolites. *Phytochemistry*, 68(7), 939-953.

**El Guessabi, M., Kamal, R., Marmouzi, I., Doukkali, Z., Boudida, E. H., Touati, D., ... & Alaoui, K. (2017).** Chemical composition, acute toxicity, antioxidant and anti-inflammatory activities of Moroccan *Tetraclinis articulata* L. *Journal of traditional and complementary medicine*, 7(3), 281-287.

**Ferry, M. (2008).** Potential of date palm micropropagation for improving small farming systems. In *Date Palm Biotechnology* (pp. 15-28). Springer, Dordrecht.

**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.

**Fleuriet, A., & Jay-Allemand, C. (2005).** Les composés phénoliques des végétaux: un exemple de métabolites secondaires d'importance économique. PPUR presses polytechniques.

**Fortes, A. M., & Pais, M. S. (2000).** Organogenesis from internode- derived nodules of *Humulus lupulus* var. Nugget (Cannabaceae): histological studies and changes in the starch content. *American Journal of Botany*, 87(7), 971-979.

**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.

**Fracaro, F., & Echeverrigaray, S. (2001).** Micropropagation of *Cunila galioides*, a popular medicinal plant of south Brazil. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 64(1), 1-4.

**Gantait, S., El-Dawayati, M. M., Panigrahi, J., Labrooy, C., & Verma, S. K. (2018).** The retrospect and prospect of the applications of biotechnology in *Phoenix dactylifera* L. *Applied microbiology and biotechnology*, 102(19), 8229-8259.

**Gadzovska, S., Maury, S., Delaunay, A., Spasenoski, M., Joseph, C., & Hagege, D. (2004).** Jasmonic acid elicitation of *Hypericum perforatum* L. cell suspensions and effects on the production of phenylpropanoids and naphthodianthrones. *Plant cell, tissue and organ culture*, 89(1), 1-13.

**Gamborg, O. L. c., Miller, R. A., & Ojima, K. (1968).** Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells. *Experimental cell research*, 50(1), 151-158.

**Geetha, S. P., Raghu, A., Martin, G., George, S., & Balachandran, I. (2009).** In vitro propagation of two tuberous medicinal plants: *Holostemma ada-kodien* and *Ipomoea mauritiana* Protocols for in vitro cultures and secondary metabolite analysis of aromatic and medicinal plants (pp. 81-92): Springer.

**George, E. F. (1993).** Plant propagation by tissue culture. Part 1: The technology: Exegetics limited.

**George, E. F., Hall, M. A., & De Klerk, G. J. (2008).** The components of plant tissue culture media I: macro-and micro-nutrients. In *Plant propagation by tissue culture* (pp. 65-

113). Springer, Dordrecht.

**Giri, A., Zaheer, S. T., Dhingra, V., & Narasu, M. L. (2016).** Influence of different strains of *Agrobacterium rhizogenes* on induction of hairy roots and artemisinin production in *Artemisia annua*. *Current science*, 378-382.

**George, E. F., Hall, M. A., & De Klerk, G. J. (2008).** Micropropagation: uses and methods. In *Plant propagation by tissue culture* (pp. 29-64). Springer, Dordrecht.

**Glick, B. R. (1995).** The enhancement of plant growth by free-living bacteria. *Canadian journal of microbiology*, 41(2), 109-117.

**Gonsalves, D., Ferreira, S., Manshardt, R., Fitch, M., & Slightom, J. (2000).** Transgenic virus resistant papaya: New hope for controlling papaya ringspot virus in Hawaii. *Plant health progress*, 1(1), 20.

**Gorelick, J., & Bernstein, N. (2014).** Elicitation: An underutilized tool in the development of medicinal plants as a source of therapeutic secondary metabolites. *Advances in agronomy*, 124, 201-230..

**Goklany, S., Loring, R. H., Glick, J., & Lee-Parsons, C. W. (2009).** Assessing the limitations to terpenoid indole alkaloid biosynthesis in *Catharanthus roseus* hairy root cultures through gene expression profiling and precursor feeding. *Biotechnology progress*, 25(5), 1289-1296.

**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.

**Ghestem, A., Tabti, N., ... & Gourdon, G. (2001).** Mice transgenic for the human myotonic dystrophy region with expanded CTG repeats display muscular and brain abnormalities. *Human Molecular Genetics*, 10(23), 2717-2726.

**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.

**Guinebert, E., Durand, P., Prost, M., Grinand, R., & Bernigault, R. (2005).** Mesure de la résistance aux radicaux libres. *Acte du 6ème Journées de la Recherche Avicole*, S Malo, les, 30, 554-558.

**Guirimand, G., Burlat, V., Oudin, A., Lanoue, A., St-Pierre, B., & Courdavault, V. (2009).** Optimization of the transient transformation of *Catharanthus roseus* cells by particle bombardment and its application to the subcellular localization of hydroxymethylbutenyl 4-diphosphate synthase and geraniol 10-hydroxylase. *Plant cell reports*, 28(8), 1215-1234.

**Guirimand, G., Guihur, A., Poutrain, P., Héricourt, F., Mahroug, S., St-Pierre, B., . . . Courdavault, V. (2011).** Spatial organization of the vindoline biosynthetic pathway in *Catharanthus roseus*. *Journal of plant physiology*, 168(6), 549-557.

**Guignard, F., Mael, 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.

- Habibi, P., de Sa, M. F. G., da Silva, A. L. L., Makhzoum, A., da Luz Costa, J., Borghetti, I. A., & Soccol, C. R. (2016).** Efficient genetic transformation and regeneration system from hairy root of *Origanum vulgare*. *Physiology and Molecular Biology of Plants*, 22(2), 271-277.
- Hättenschwiler, S., & Vitousek, P. M. (2000).** The role of polyphenols in terrestrial ecosystem nutrient cycling. *Trends in ecology & evolution*, 15(6), 238-243.
- Hamill, J., Parr, A., Robins, R., & Rhodes, M. (1986).** Secondary product formation by cultures of *Beta vulgaris* and *Nicotiana rustica* transformed with *Agrobacterium rhizogenes*. *Plant Cell Reports*, 5(2), 111-114.
- Hartmann, C., Zozulya, A., Wegener, J., & Galla, H. J. (2007).** The impact of glia-derived extracellular matrices on the barrier function of cerebral endothelial cells: an in vitro study. *Experimental cell research*, 313(7), 1318-1325.
- HARFI, B. (2015).** Etablissement d'un procédé biotechnologique pour la production de l'hyoscyamine chez *Datura* sp.
- Hernández-Domínguez, E., Campos-Tamayo, F., & Vázquez-Flota, F. (2004).** Vindoline synthesis in in vitro shoot cultures of *Catharanthus roseus*. *Biotechnology letters*, 26(8), 671-674.
- Hirata, M., Kakizuka, A., Aizawa, M., Ushikubi, F., & Narumiya, S. (1994).** Molecular characterization of a mouse prostaglandin D receptor and functional expression of the cloned gene. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 91(23), 11192-11196.
- Hilliou, F., Christou, P., & Leech, M. J. (1999).** Development of an efficient transformation system for *Catharanthus roseus* cell cultures using particle bombardment. *Plant Science*, 140(2), 179-188.
- Hurabielle, M. (1981).** CONTRIBUTION A L'ETUDE CHIMIQUE DE DEUX HUILES D'ARTEMISIA: ARTEMISIA HERBA-ALBA ASSO ET ARTEMISIA VULGARIS LINNAEUS. INTERET CHIMIOTAXONOMIQUE.
- Ishtiaque, S., Khan, N., Siddiqui, M. A., Siddiqui, R., & Naz, S. (2013).** Antioxidant potential of the extracts, fractions and oils derived from oilseeds. *Antioxidants*, 2(4), 246-256.
- Jean, B. (2009).** Pharmacognosie, phytochimie, plantes médicinales (4e éd.). Lavoisier.
- 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.
- Jueng, J., & Kim, M. (2007).** Overexpression of the acidic c-terminus region of hvraf from barley confers enhanced cadmium tolerance in yeast. *Journal of Plant Biology*, 50(3), 383-385.
- 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
- Kagnou, H., Simalou, O., Tchani, G. W., Sanvee, S., Agbodan, K. A., Toundou, O., & Kpegba, K. (2020).** Etude phytochimique et activité antioxydante comparatives des trois variétés de *Catharanthus roseus* (L.) G. Don. *International Journal of Biological and Chemical*

Sciences, 14(6), 2352-2361.

**Kim, K. S., Davelaar, E., & De Klerk, G. J. (1994).** Abscisic acid controls dormancy development and bulb formation in lily plantlets regenerated in vitro. *Physiologia Plantarum*, 90(1), 59-64.

**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).

**Lattanzio, V., Lattanzio, V. M., & Cardinali, A. (2006).** Role of phenolics in the resistance mechanisms of plants against fungal pathogens and insects. *Phytochemistry: Advances in research*, 661(2), 23-67.

**Lata, B. (2007).** Relationship between apple peel and the whole fruit antioxidant content: year and cultivar variation. *Journal of agricultural and food chemistry*, 55(3), 663-671.

**Larpent-Gourgaud, M., & Sanglier, J. J. (1992).** *Biotechnologies: principes et méthodes*. Doin éditeurs.

**Lachachi, A. K., Zekkari, M., Beltrao-Nunes, A. P., Michelin, L., ... & Azzouz, A. (2009).** Effect of copper dispersion on SBA-15 and SBA-16 affinity towards carbon dioxide—an approach through thermal programmed desorption. *Journal of Nanoparticle Research*, 23(8), 1-16.

**Laxalt, A. M., & Munnik, T. (2002).** Phospholipid signalling in plant defence. *Current opinion in plant biology*, 5(4), 332-338.

**Lebrun-Garcia, A. Bourque, S., Binet, M. N., Ponchet, M., Pugin, A., & (1999).** Characterization of the cryptogein binding sites on plant plasma membranes. *Journal of Biological Chemistry*, 274(49), 34699-34705.

**Lee-Parsons, C. W., Ertürk, S., & Tengtrakool, J. (2004).** Enhancement of ajmalicine production in *Catharanthus roseus* cell cultures with methyl jasmonate is dependent on timing and dosage of elicitation. *Biotechnology letters*, 26(20), 1595-1599.

**Liu, Z., Wu, Q., Li, Y., Liu, S., Li, L., Chen, Q., ... & Yu, F. (2003).** Effects of exogenous salicylic acid on accumulation of camptothecin and gene expression in *Camptotheca acuminata*. *Canadian Journal of Forest Research*, 49(1), 104-110.

**Loddo, Badoni, D., Balwierz-Pytko, I., Bencivenni, G., Bini, C., Bloise, C., ... & KLOE-2 Collaboration. (2013).** Limit on the production of a light vector gauge boson in  $\phi$  meson decays with the KLOE detector. *Physics Letters B*, 720(1-3), 111-115.

**Lurquin, P. (1989).** Uptake and integration of exogenous DNA in plants *Plant Protoplasts and Genetic Engineering II* (pp. 54-74): Springer

**Memelink, J., Verpoorte, R., & Kijne, J. W. (2001).** ORCAnization of jasmonate-responsive gene expression in alkaloid metabolism. *Trends in plant science*, 6(5), 212-219.

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

- Margara, J. (1984).** Bases de la multiplication vegetative. les méristèmes et l'organogènese.
- MARGARA, J. (1989).** Bases de la Multiplication Vegetative. Les Méristèmes et l'Organogènese;INRA. Institut National de la Recherche Agronomique: Paris, France, 262p.
- McCabe, D. E., & Martinell, B. J. (1993).** Transformation of elite cotton cultivars via particle bombardment of meristems. *Bio/technology*, 11(5), 596-598.
- Medic, N. (2003).** Composes phénoliques effects .
- Mehrotra, S., Goel, M. K., Rahman, L. U., & Kukreja, A. (2013).** Molecular and chemical characterization of plants regenerated from Ri-mediated hairy root cultures of *Rauwolfia serpentina*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*, 114(1), 31-38.
- Mironova, V., & Xu, J. (2019).** A single-cell view of tissue regeneration in plants. *Current opinion in plant biology*, 52, 149-154.
- Mishra, J. N., & Verma, N. K. (2017).** A brief study on *Catharanthus Roseus*: A review. *Intern J Res Pharmacy Pharmaceut Sci*, 2(2), 20-23.
- Moghaieb, R. E., Saneoka, H., & Fujita, K. (2004).** Shoot regeneration from GUS-transformed tomato (*Lycopersicon esculentum*) hairy root. *Cellular and Molecular Biology Letters*, 9(3), 439-450.
- Monika Sain, & Sharma, V. (2013).** *Catharanthus roseus* (An anti-cancerous drug yielding plant) - A Review of Potential Therapeutic Properties. *International Journal of Pure & Applied Bioscience*, 1(6), 139-142.
- Montesano, M., Brader, G., & Palva, E. T. (2003).** Pathogen derived elicitors: searching for receptors in plants. *Molecular Plant Pathology*, 4(1), 73-79.
- Mohan S. Z., Fadaeinasab, M., Nikzad, G., Ali, H. M., & Kadir, H. A. (2015).** *Annona muricata* (Annonaceae): a review of its traditional uses, isolated acetogenins and biological activities. *International journal of molecular sciences*, 16(7), 15625-15658.
- Moghe, G. D., & Last, R. L. (2016).** Comparative biochemistry and in vitro pathway reconstruction as powerful partners in studies of metabolic diversity. *Methods in enzymology*, 576, 1-17.
- Murata, J., Roepke, J., Gordon, H., & De Luca, V. (2008).** The leaf epidermome of *Catharanthus roseus* reveals its biochemical specialization. *The Plant Cell*, 20(3), 524-542.
- Muralidharan, K., & Sundararaman, V. (2015).** The aggregate effect of school choice: Evidence from a two-stage experiment in India. *The Quarterly Journal of Economics*, 130(3), 1011-1066.
- Mujib, A., Ali, M., Tonk, D., Isah, T., & Zafar, N. (2016).** Embryogenesis in ornamental monocots: plant growth regulators as signalling element Somatic embryogenesis in ornamentals and its applications (pp. 187-201): Springer.
- 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.

- Namdeo, A. G. (2007).** Plant cell elicitation for production of secondary metabolites: a review. *Pharmacogn Rev*, 1(1), 69-79.
- Nejat, N., Valdiani, A., Cahill, D., Tan, Y.-H., Maziah, M., & Abiri, R. (2015).** Ornamental exterior versus therapeutic interior of Madagascar periwinkle (*Catharanthus roseus*): the two faces of a versatile herb. *The Scientific World Journal*, 2015.
- Neumann, E., Schaefer- Ridder, M., Wang, Y., & Hofschneider, P. (1982).** Gene transfer into mouselyoma cells by electroporation in high electric fields. *The EMBO journal*, 1(7), 841-845.
- Nosálová, V., Machova, J., & Babulová, A. (1993).** Protective action of vinpocetine against experimentally induced gastric damage in rats. *Arzneimittel-Forschung*, 43(9), 981-985.
- 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.
- Okazawa, Y., Katsura, N., & Tagawa, T. (1967).** Effects of auxin and kinetin on the development and differentiation of potato tissue cultured in vitro. *Physiologia Plantarum*, 20(4), 862-869.
- 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.
- Pandey, S. K. Moynihan, D. P., & (2007).** Finding workable levers over work motivation: Comparing job satisfaction, job involvement, and organizational commitment. *Administration & Society*, 39(7), 803-832.
- Pedras, M. S. C., Zaharia, L. I., & Ward, D. E. (2002).** The destruxins: synthesis, biosynthesis, biotransformation, and biological activity. *Phytochemistry*, 59(6), 579-596
- Pietrosiuk, A., Furmanowa, M., & Lata, B. (2007).** *Catharanthus roseus*: micropropagation and in vitro techniques. *Phytochemistry Reviews*, 6(2), 459-473.
- Pitta–Alvarez, S. I., Spollansky, T. C., & Giulletti, 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.
- Ramani, S., & Jayabaskaran, C. (2008).** Enhanced catharanthine and vindoline production in suspension cultures of *Catharanthus roseus* by ultraviolet-B light. *Journal of molecular signaling*, 3(1), 1-6.
- Rasool, N., Afshan, N., Shahid, M., & Ahmed, V. U. (2011).** Antimicrobial potential of various extract and fractions of leaves of *Solanum nigrum*. *International Journal of Phytomedicine*, 3(1), 63.
- Ramirez-Estrada, K., Vidal-Limon, H., Hidalgo, D., Moyano, E., Golenioswki, M., Cusidó, R. M., & Palazon, J. (2016).** Elicitation, an effective strategy for the biotechnological production of bioactive high-added value compounds in plant cell factories. *Molecules*, 21(2), 182.
- Rani, N., & Kumar, K. (2011).** Karyomorphological studies in the genus

Catharanthus. *Indian Journal of Genetics and Plant Breeding*, 71(1), 55.

**Reynier, P. & May- Panloup, P., Chretien, M. F., Malthiery, Y., (2007).** Mitochondrial DNA in the oocyte and the developing embryo. *Current topics in developmental biology*, 77, 51-83.

**Rijhwani, S. K., & Shanks, J. V. (1998).** Effect of elicitor dosage and exposure time on biosynthesis of indole alkaloids by *Catharanthus roseus* hairy root cultures. *Biotechnology progress*, 14(3), 442-449

**Rhodes, M. (1994).** Physiological roles for secondary metabolites in plants: some progress, many outstanding problems. *Plant molecular biology*, 24(1), 1-20.

**Romeis, T. (2001).** Protein kinases in the plant defence response. *Current opinion in plant biology*, 4(5), 407-414.

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

**Roux, D., & Catier, O. (2007).** *Botanique, Pharmacognosie, Phytothérapie*, 3e éd. Rueil-Malmaison: Wolters Kluwer France.

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

**Sandhya, M., Deepti, L., Bhakti, D., Ravindra, M., Pranay, S., Gauri, A., . . . Asmit, H. (2016).** Effect of growth regulator combination on in-vitro regeneration of *Catharanthus roseus*. *Int J Life Sci*, 6, 1-4.

**Sajadimajd, S., Bahramsoltani, R., Iranpanah, A., Patra, J. K., Das, G., Gouda, S., ... & Xiao, J. (2020).** Advances on natural polyphenols as anticancer agents for skin cancer. *Pharmacological research*, 151, 104584.

**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.

**Sanago, R. (2006).** Le rôle des plantes médicinales en médecine traditionnelle. Université Bamako (Mali), 53.

**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.

**Shahzad, A., Sharma, S., Parveen, S., Saeed, T., Shaheen, A., Akhtar, R., ... & Ahmad, Z. (2013).** Historical perspective and basic principles of plant tissue culture. In *Plant biotechnology: principles and applications* (pp. 1-36). Springer, Singapore.

**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.

- Shu, Y. Z. (1998).** Recent natural products based drug development: a pharmaceutical industry perspective. *Journal of natural products*, 61(8), 1053-1071.
- Skoog, F., & Miller, C. (1957).** Chemical regulation of growth and organ formation in plant tissues cultured. In *Vitro Symp Soc Exp Biol*.
- Siddiqui, Z. H., Mujib, A., Aslam, J., Hakeem, K. R., & Parween, T. (2013).** In vitro production of secondary metabolites using elicitor in *Catharanthus roseus*: a case study. In *Crop Improvement* (pp. 401-419). Springer, Boston, MA.
- Shukla, A. K., Shasany, A. K., Verma, R. K., Gupta, M. M., Mathur, A. K., & Khanuja, S. P. (2010).** Influence of cellular differentiation and elicitation on intermediate and late steps of terpenoid indole alkaloid biosynthesis in *Catharanthus roseus*. *Protoplasma*, 242(1), 35-47.
- Tieu, A., & Egerton-Warburton, L. M. (2000).** Contrasting seed morphology dynamics in relation to the alleviation of dormancy with soil storage. *Canadian Journal of Botany*, 78(9), 1187-1198.
- TOUATI, A., LACHACHI, S., YAHIA, N., & FYAD-LAMECHE, F. Z. (2015).** In vitro Variability of Morphogenetic Responses of Tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) Explants under Salt Stress and Thidiazuron as Plant Growth Regulator. *Journal of Applied Biological Sciences*, 9(2), 43-49.
- Togo, H., Uchikado, H., Arai, T., Hasegawa, M., Akiyama, H., Yokota, O., ... & Hirayasu, Y. (2009).** Accumulation of phosphorylated TDP-43 in brains of patients with argyrophilic grain disease. *Acta neuropathologica*, 117(2), 151-158.
- Van der Heijden, R., Jacobs, D. I., Snoeijer, W., Hallard, D., & Verpoorte, R. (2004).** The *Catharanthus* alkaloids: pharmacognosy and biotechnology. *Current medicinal chemistry*, 11(5), 607-628.
- Verma, A., Jiang, C. Y., Betts, T. R., Chen, J., Deisenhofer, I., Mantovan, R., ... & Sanders, P. (2015).** Approaches to catheter ablation for persistent atrial fibrillation. *New England Journal of Medicine*, 372(19), 1812-1822.
- Verma, P., Mathur, A., & Mathur, A. K. (2016).** Genetic engineering approach using early Vinca alkaloid biosynthesis genes led to increased tryptamine and terpenoid indole alkaloids biosynthesis in differentiating cultures of *Catharanthus roseus*. *Protoplasma*, 255(1), 425-435.
- Veyret, Y. (1974).** Quelques données pour la biosystématique de pervenches malgaches (genre *Catharanthus* G. Don, Apocynaceae). *Candollea*, 29, 297-307.
- Veersham & Krishnamurthy, R. (2004).** Elicitors in plant tissue culture. *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry*, 2(2), 60-65.
- 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.
- 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.
- Wojdyło, A., Oszmiański, J., & Czemerys, R. (2007).** Antioxidant activity and phenolic compounds in 32 selected herbs. *Food chemistry*, 105(3), 940-949.
- Wu, Q. X., & Shi, Y. P. (2008).** Chemical-constituent diversity of *Tridax procumbens*. *Canadian Journal of Chemistry*, 86(9), 892-898.
- Xing-Hua, M., Ruo-Lin, Q., & Wen-Bing, X. (1984).** Chromosome observations of some medical plants in Xinjiang. *Journal of Systematics and Evolution*, 22(3), 243-249.
- Xu, J. (2005).** The inheritance of organelle genes and genomes: patterns and mechanisms. *Genome*, 48(6), 951-958.
- Yuan, J. H., & Zhao, A. Z. (2011).** Adsorption of methyl violet from aqueous solutions by the biochars derived from crop residues. *Bioresource technology*, 102(22), 10293-10298.
- Zenk & Jueng, B. (2007).** *Catharanthus roseus*: micropropagation and in vitro techniques. *Phytochemistry Reviews*, 6(2), 459-473.
- 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.
- Zhao, D., Reddy, K. R., Kakani, V. G., & Reddy, V. R. (2005).** Nitrogen deficiency effects on plant growth, leaf photosynthesis, and hyperspectral reflectance properties of sorghum. *European journal of agronomy*, 22(4), 391-403.
- 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.
- Zimmermann, S., & Moelling, K. (1999).** Phosphorylation and regulation of Raf by Akt (protein kinase B). *Science*, 286(5445), 1741-1744.
- 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.
- 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***

---

## Annexe 1 : Composition des milieux de culture

**Tableau 1 :** Composition du milieu de culture B5 (Gamborg *et al.*, 1968)

Eléments	Composition chimique	concentration mg L <sup>-1</sup> )
<b>Macroéléments</b>	(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	134
	K NO <sub>3</sub>	2500
	Mg SO <sub>4</sub> ,7H <sub>2</sub> O	250
	Ca Cl <sub>2</sub> , 2H <sub>2</sub> O	150
	Na <sub>2</sub> H <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> .H <sub>2</sub> O	150
<b>Microéléments</b>	H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	3
	Mn SO <sub>4</sub> , 4H <sub>2</sub> O	10
	Zn SO <sub>4</sub> , 4H <sub>2</sub> O	2
	KI	0,75
	Na <sub>2</sub> 2Mo O <sub>4</sub> ,2H <sub>2</sub> O	0,25
	Cu SO <sub>4</sub> , 5H <sub>2</sub> O	0,025
	CO Cl <sub>2</sub> , 6H <sub>2</sub> O	0,0125
<b>Fer EDTA</b>	Fe SO <sub>4</sub> , 7H <sub>2</sub> O	27,85
	Na <sub>2</sub> EDTA	37,25
<b>Vitamines</b>	Glycine	2,00
	Acide nicotinique	0,50
	Pyridoxine HCl	0,50
	Thiamine HCl	0,1
	Myo inositol	100

**Tableau 2** : Composition du milieu de culture MS (MURASHIG et SKOOG, 1962)

Eléments	Composition chimique	Concentration mg L <sup>-1</sup> )
Macroéléments	NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	1650
	K NO <sub>3</sub>	1900
		440
		370
		170
		Mg SO <sub>4</sub> ,7H <sub>2</sub> O Ca Cl <sub>2</sub> , 2H <sub>2</sub> O K H <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>
Microéléments	H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	6,20
	Mn SO <sub>4</sub> , 4H <sub>2</sub> O	22,30
	Zn SO <sub>4</sub> , 4H <sub>2</sub> O	8,60
	KI	0,83
	Na <sub>2</sub> 2Mo O <sub>4</sub> ,2H <sub>2</sub> O	0,25
	Cu SO <sub>4</sub> , 5H <sub>2</sub> O	0,025
	CO Cl <sub>2</sub> , 6H <sub>2</sub> O	0,025
Fer EDTA	Fe SO <sub>4</sub> , 7H <sub>2</sub> O	27,85
	Na <sub>2</sub> EDTA	37,25
Vitamines	Glycine	2,00
	Acide nicotinique	0,50
	Pyridoxine HCl	0,50
	Thiamine HCl	0,1
	Myo inositol	100

## Annexe 2 : Effet du traitement hormonal sur l'induction de la callogénèse

- **Effet du traitement hormonal sur le pourcentage de callogénèse**

Tableau de l'analyse de la variance (ANOVA1)

Univariate Results for Each DV (Spreadsheet1) Sigma-restricted parameterization Effective hypothesis decomposition					
	Degr. of - Freedom	Pourcentage de callogénèse - SS	Pourcentage de callogénèse - MS	Pourcentage de callogénèse - F	Pourcentage de callogénèse - p
<b>Milieu</b>	6	19440,5	3240,1	10,9259	0,000135
<b>Error</b>	14	4151,7	296,6		
<b>Total</b>	20	23592,2			

### Post Hoc Tukey

Tukey HSD test; variable Pourcentage de callogénèse (Spreadsheet1) Homogenous Groups, alpha = ,05000  
Error: Between MS = 296,55, df = 14,000

	Milieu	Pourcentage de callogénèse - Mean	1	2
1	T0	0,00000		****
7	M6	76,29333	****	
3	M2	83,33000	****	
6	M5	83,33000	****	
5	M4	85,71333	****	
2	M1	91,11000	****	
4	M3	93,93667	****	

- **Effet du traitement hormonal sur la surface des cals induits par callogénèse**

Tableau de l'analyse de la variance (ANOVA1)

Univariate Results for Each DV (Spreadsheet1) Sigma-restricted parameterization Effective hypothesis decomposition					
	Degr. of - Freedom	Surface (mm <sup>2</sup> ) - SS	Surface (mm <sup>2</sup> ) - MS	Surface (mm <sup>2</sup> ) - F	Surface (mm <sup>2</sup> ) - P
<b>Milieu</b>	5	30987,1	6197,4	1,5472	0,183137
<b>Error</b>	91	364514,4	4005,7		
<b>Total</b>	96	395501,6			

### Annexe 3 : Effet de la première elicitation sur le poids sec et la surface des cals

- Saccharose
  - Poids sec

**Tableau de l'analyse de la variance (ANOVA1)**

Univariate Results for Each DV (Spreadsheet1_(Recovered)) Sigma-restricted parameterization Effective hypothesis decomposition					
	Degr. of - Freedom	PS - SS	PS - MS	PS - F	PS - p
<b>Concentration</b>	3	0,092198	0,030733	88,32	0,000000
<b>Error</b>	27	0,009396	0,000348		
<b>Total</b>	30	0,101594			

#### Post hoc Tukey

Tukey HSD test; variable PS (Spreadsheet1_(Recovered)) Homogenous Groups, alpha = ,05000 Error: Between MS = ,00035, df = 27,000					
	Concentration	PS - Mean	1	2	3
<b>4</b>	T0	0,256667		****	
<b>1</b>	C1	0,404000	****		
<b>2</b>	C2	0,410000	****		
<b>3</b>	C3	0,458889			****

- Surface des cals

Univariate Results for Each DV (Spreadsheet1_(Recovered)) Sigma-restricted parameterization Effective hypothesis decomposition					
	Degr. of - Freedom	Surface - SS	Surface - MS	Surface - F	Surface - p
<b>Concentration</b>	3	6276,1	2092,0	2,6011	0,072638
<b>Error</b>	27	21715,9	804,3		
<b>Total</b>	30	27992,0			

- **Acide salycilique**

- **Poids sec**

**Tableau de l'analyse de la variance (ANOVA1)**

Univariate Results for Each DV (Spreadsheet1_(Recovered)) Sigma-restricted parameterization Effective hypothesis decomposition					
	Degr. of - Freedom	PS - SS	PS - MS	PS - F	PS - p
<b>Concentration</b>	3	0,085515	0,028505	76,22	0,000000
<b>Error</b>	28	0,010472	0,000374		
<b>Total</b>	31	0,095988			

**Post hoc Tukey**

Tukey HSD test; variable PF (Spreadsheet1_(Recovered)) Homogenous Groups, alpha = ,05000 Error: Between MS = ,01352, df = 28,000				
	Concentration	PF - Mean	1	2
<b>2</b>	C2	0,726000	****	
<b>1</b>	C1	0,744444	****	
<b>3</b>	C3	0,775000	****	
<b>4</b>	T0	1,200000		****

- **Surface des calcs**

Univariate Results for Each DV (Spreadsheet1_(Recovered)) Sigma-restricted parameterization Effective hypothesis decomposition					
	Degr. of - Freedom	Surface - SS	Surface - MS	Surface - F	Surface - p
<b>Concentration</b>	3	218,5	72,8	0,1165	0,949694
<b>Error</b>	28	17511,4	625,4		
<b>Total</b>	31	17729,9			

- **Chlorure de potassium**

- **Poids sec**

**Tableau de l'analyse de la variance (ANOVA1)**

Univariate Results for Each DV (Spreadsheet1_(Recovered)) Sigma-restricted parameterization Effective hypothesis decomposition					
	<b>Degr. of - Freedom</b>	<b>PS - SS</b>	<b>PS - MS</b>	<b>PS - F</b>	<b>PS - p</b>
<b>Concentration</b>	3	1805,808	601,936	1208,56	0,00
<b>Error</b>	26	12,950	0,498		
<b>Total</b>	29	1818,757			

**Post hoc tukey**

Tukey HSD test; variable PS (Spreadsheet1_(Recovered)) Homogenous Groups, alpha = ,05000 Error: Between MS = ,49806, df = 26,000					
	<b>Concentration</b>	<b>PS - Mean</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	
<b>4</b>	T0	0,25667			****
<b>3</b>	C3	26,02889	****		
<b>1</b>	C1	26,15222	****		
<b>2</b>	C2	26,17111	****		

- **Surface des calcs**

**Anova 1**

Univariate Results for Each DV (Spreadsheet1_(Recovered)) Sigma-restricted parameterization Effective hypothesis decomposition					
	<b>Degr. of - Freedom</b>	<b>Surface - SS</b>	<b>Surface - MS</b>	<b>Surface - F</b>	<b>Surface - p</b>
<b>Concentration</b>	3	3342,8	1114,3	1,4690	0,246032
<b>Error</b>	26	19722,2	758,5		
<b>Total</b>	29	23065,0			

## Annexe 4 : Effet de la deuxième élicitation sur le poids sec et la surface des cals

- **Mannitol**

- **Poids sec**

**Tableau de l'analyse de la variance (ANOVA1)**

Univariate Results for Each DV (Spreadsheet1) Sigma-restricted parameterization Effective hypothesis decomposition					
	Degr. of - Freedom	Poids sec (g) - SS	Poids sec (g) - MS	Poids sec (g) - F	Poids sec (g) - p
<b>Concentration</b>	3	0,320867	0,106956	2,42671	0,088199
<b>Error</b>	26	1,145933	0,044074		
<b>Total</b>	29	1,466800			

- **Surface des cals**

Univariate Results for Each DV (Spreadsheet1) Sigma-restricted parameterization Effective hypothesis decomposition					
	Degr. of - Freedom	Surface (mm <sup>2</sup> ) - SS	Surface (mm <sup>2</sup> ) - MS	Surface (mm <sup>2</sup> ) - F	Surface (mm <sup>2</sup> ) - p
<b>Concentration</b>	3	21148,4	7049,5	0,80923	0,500269
<b>Error</b>	26	226494,8	8711,3		
<b>Total</b>	29	247643,2			

- **Saccharose**

- **Poids sec**

**Tableau de l'analyse de la variance (ANOVA1)**

Univariate Results for Each DV (Spreadsheet1) Sigma-restricted parameterization Effective hypothesis decomposition					
	Degr. of - Freedom	Surface (mm <sup>2</sup> ) - SS	Surface (mm <sup>2</sup> ) - MS	Surface (mm <sup>2</sup> ) - F	Surface (mm <sup>2</sup> ) - p
<b>Concentration</b>	3	21148,4	7049,5	0,80923	0,500269
<b>Error</b>	26	226494,8	8711,3		
<b>Total</b>	29	247643,2			

➤ **Surface des calcs**

**Anova 1**

Univariate Results for Each DV (Spreadsheet1) Sigma-restricted parameterization Effective hypothesis decomposition					
	Degr. of - Freedom	Surface (mm <sup>2</sup> ) - SS	Surface (mm <sup>2</sup> ) - MS	Surface (mm <sup>2</sup> ) - F	Surface (mm <sup>2</sup> ) - p
<b>Concentration</b>	2	5276,8	2638,4	1,22188	0,326389
<b>Error</b>	13	28070,6	2159,3		
<b>Total</b>	15	33347,4			

• **Chlorure de potassium**

➤ **Poids sec**

**Tableau de l'analyse de la variance (ANOVA1)**

Univariate Results for Each DV (Spreadsheet1) Sigma-restricted parameterization Effective hypothesis decomposition					
	Degr. of - Freedom	Poids sec (g) - SS	Poids sec (g) - MS	Poids sec (g) - F	Poids sec (g) - p
<b>Concentration</b>	3	0,464227	0,154742	4,2941	0,013747
<b>Error</b>	26	0,936939	0,036036		
<b>Total</b>	29	1,401165			

➤ **Post hoc**

Tukey HSD test; variable Poids sec (g) (Spreadsheet1) Homogenous Groups, alpha = ,05000 Error: Between MS = ,03604, df = 26,000				
	Concentration	Poids sec (g) - Mean	1	2
4	T0	0,213333	****	
2	C2	0,341778	****	
3	C3	0,438889	****	****
1	C1	0,597778		****

➤ **Surface des cals**

Univariate Results for Each DV (Spreadsheet1) Sigma-restricted parameterization Effective hypothesis decomposition					
	Degr. of - Freedom	Surface (mm <sup>2</sup> )-SS	Surface (mm <sup>2</sup> )-MS	Surface (mm <sup>2</sup> )-F	Surface (mm <sup>2</sup> )-p
<b>Concentration</b>	3	11741,4	3913,8	1,7156	0,188349
<b>Error</b>	26	59313,2	2281,3		
<b>Total</b>	29	71054,6			

**Annexe 4 : Effet de l'elicitation sur le poids sec des chevelus racinaires**

- **Chlorure de potassium**

➤ **Poids sec**

**Tableau de l'analyse de la variance (ANOVA1)**

Univariate Results for Each DV (Spreadsheet1) Sigma-restricted parameterization Effective hypothesis decomposition					
	Degr. of - Freedom	Poids sec - SS	Poids sec - MS	Poids sec - F	Poids sec - p
<b>Concentration</b>	3	0,013108	0,004369	0,7318	0,550040
<b>Error</b>	14	0,083587	0,005970		
<b>Total</b>	17	0,096694			

**Annexe 5 : Test DPPH des différentx extraits issus des cals de *Catharanthus roseus***

