



الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية
RÉPUBLIQUE ALGÉRIENNE DÉMOCRATIQUE ET POPULAIRE

وزارة التعليم العالي و البحث العلمي
MINISTÈRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPÉRIEUR ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE



Université des Frères Mentouri Constantine 1
Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie

جامعة الاخوة منتوري قسنطينة 1
كلية علوم الطبيعة و الحياة

Département : Biologie et Ecologie Végétale

قسم : البيولوجيا و علم البيئة النباتية

Mémoire présenté en vue de l'obtention du Diplôme de Master

Domaine : Sciences de la Nature et de la Vie

Filière : Biotechnologies

Spécialité : *Biotechnologie et Génomique Végétale*

Intitulé :

***Mise en évidence d'un protocole de germination in vitro
de Moringa oleifera et perspectives de propagation***

Présenté et soutenu par : SAIDI Nour El-yakine

Le : 08/07/2020

Jury d'évaluation :

Président du jury : **Pr. BENBELKACEM A** (Directeur de recherche INRAA Constantine).
Encadrant : **Dr. BENABDELHAFID Z** (Maitre de conférences B ENS- Constantine 3).
Examinatrice : **Dr. LOUALIY Y** (Maitre de conférences B - UFM Constantine1).

*Année universitaire
2019 - 2020*

Remerciements

Tout d'abord, je remercie DIEU Le Tout Puissant de m'avoir donné de la force et de la volonté pour terminer ce travail.

*Mes plus vifs remerciements s'adressent vivement à mon encadreur Madame **BENABDELHAFID Zoheïra** pour ses précieux conseils, le temps, l'attention et sa disponibilité consacrés tout au long de ce travail.*

*Je tiens tout particulièrement à remercier Monsieur **BENBELKACEM Abdelkader** d'avoir accepté la présidence du jury.*

*Mes remerciements s'adressent également à Madame **LOUALI Yamouna** d'avoir accepté d'examiner et de juger mon mémoire.*

A toute l'équipe et responsables du laboratoire de département de Biologie et Ecologie Végétale de l'Université de Constantine 1.

Je tiens également à remercier toutes les personnes qui, de près ou de loin, ont contribué à la réalisation de ce travail qu'ils trouvent ici ma sincère et profonde gratitude.

Dédicaces

Je dédie ce modeste travail :

*A mes chers parents mon père SAIDI
Karim et ma mère DARSOUNI Safia pour
tous les efforts et les sacrifices consentis
pour mon éducation et qui ont toujours été
là pour moi.*

A ma sœur et mes frères.

*A mes grands parents SAIDI Khelif et
DARSOUNI Kadouret toute ma famille.*

Sommaire

Remerciement	
Dédicace	
Liste des figures	
Liste des tableaux	
Résumé	
Abstract	
ملخص	
Introduction	1
Chapitre I : Etude bibliographique	
I. Culture in vitro et micropropagation	3
1) <i>Généralité sur la culture in vitro</i>	3
A. Définition	3
B. Historique	3
C. Principe	5
D. Buts	5
E. Conditions de la culture <i>in vitro</i>	6
1. Stérilisation	6
a) Définitions	6
b) Méthodes de stérilisation	6
2. Milieux de culture	7
a) Définitions	7
b) Compositions	8
c) Les types de milieux de culture	9
d) Modes de stérilisation des milieux	10
e) Explant utilisé	11
f) E. 2.f Régulateurs de croissances	13
2) <i>Micropropagation</i>	15
A. Définition	15
B. Caractéristiques et buts	15
C. Les étapes de la micropropagation	16
D. Les difficultés de la micropropagation	18
E. Les derniers résultats obtenus de la micropropagation	18
II. Moringa oleifera : vertus et utilisations	20
1) <i>Fiche technique de Moringa oleifera</i>	20
A. Classification botanique	20
B. Description botanique	20
C. Origine et répartition	22
1. Ecologie : préférences et tolérances environnementales	22
2. Récolte et rendement	23
2) <i>L'utilisation et le potentiel multidimensionnel de Moringa oleifera</i>	23
A. Potentiel de bioremédiation	23
B. Valeur nutritionnelle	24
C. Valeur pharmaceutique	26
1. Activité antioxydante	27
2. Activité antivirale	27

3. Activité antimicrobienne.....	28
4. Activité anti-inflammatoire.....	28
5. Activité cardio-protectrice.....	28
6. Effet neuro-protecteur.....	29
7. Régulation de la prolifération cellulaire.....	29
8. Traitement des troubles métaboliques.....	29
9. Autre services publics et économiques.....	29
3) <i>Micropropagation et Moringa oleifera</i>	31
Chapitre II matériels et méthodes	
1) Matériel végétal.....	35
2) Mise en place pour la germination <i>in vitro</i>	35
A. Définition de la germination.....	36
B. Les étapes de la germination.....	36
C. L'importance de la germination.....	37
D. Méthodes de levé la dormance et stérilisation des graines	37
1. Définition et méthodes de levée de dormance.....	38
2. Protocole de stérilisation des graines.....	38
E. Stérilisation et préparation du plan de travail.....	40
F. Stérilisation du milieu de culture.....	40
3) Paramètres étudiés.....	41
A. Temps nécessaire de germination.....	41
B. Taux de germination.....	41
C. Vitesse de germination.....	41
D. Taux de contamination.....	42
4) Micropropagation de <i>Moringa oleifera</i>	42
A. L'extrémité des tiges.....	43
B. Le segment nodal.....	43
C. Les feuilles.....	43
Chapitre III : Résultats et discussion	
✓ Etude de la germination <i>in vitro</i> chez <i>Moringa oleifera</i>	45
1) Choix des graines.....	45
2) Méthodes pour levée de dormance des graines.....	45
A. Test de germination préliminaire (sans-prétraitement).....	45
B. Test de germination des graines scarifiées.....	46
C. Test de germination des graines trempées dans l'eau pendant 24h.....	47
3) Méthode de stérilisation des graines.....	49
A. Test de germination du protocole de stérilisation I.....	49
B. Test de germination pour le protocole de stérilisation II	50
C. Test de germination du protocole de stérilisation III.....	50
D. Taux de contamination de chaque protocole.....	52
4) Conditions lumineuses de germination.....	53
A. Test de germination en conditions lumineuses.....	53
B. Test de germination en condition obscure.....	53
Discussion	55
Conclusion	57
Perspectifs	57
Références bibliographique.....	58

Annexes	59
---------------	----

Liste des figures

Figure 1	Illustration de la totipotence.	5
Figure 2	Illustration de méthodes de stérilisation physiques.	7
Figure 3	Les niveaux de production de phytohormones et ses directions de transport.	13
Figure 4	le tronc de <i>Moringa oleifera</i>	20
Figure 5	la feuille de <i>Moringa oleifera</i>	21
Figure 6	la fleur de <i>Moringa oleifera</i>	21
Figure 7	les fruits de <i>Moringa oleifera</i>	21
Figure 8	les graines de <i>Moringa oleifera</i>	21
Figure 9	la racine de <i>Moringa oleifera</i>	22
Figure 10	Carte géographique montre l'origine de <i>Moringa oleifera</i>	22
Figure 11	Carte géographique du monde où se trouve le <i>Moringa oléifera</i>	24
Figure 12	Schéma descriptif de la graine.	35
Figure 13	Evolution de la teneur en eau et les événements métaboliques associés à la germination des graines.	37
Figure 14	Manipulation lors de la phase de la multiplication.	42
Figure 15	La culture des extrémités des tiges.	43
Figure 16	La culture <i>in vitro</i> des segments nodaux.	43
Figure 17	La culture <i>in vitro</i> des feuilles.	43
Figure 18	Evolution du taux de la germination préliminaire.	46
Figure 19	L'évolution du taux de germination des graines scarifiées.	47
Figure 20	L'évolution du taux de germination des graines trempées dans l'eau pendant 24h.	48
Figure 21	Comparaison entre les méthodes de levé la dormance des graines de <i>Moringa oleifera</i>	48
Figure 22	L'évolution de la germination en utilisant le premier protocole de stérilisation.	49
Figure 23	L'évolution de la germination avec le deuxième protocole de stérilisation.	50
Figure 24	L'évolution de germination du troisième protocole de stérilisation.	51
Figure 25	Comparaison de la germination en fonction de protocole de stérilisation.	52
Figure 26	Taux de contamination de chaque protocole.	52
Figure 27	Taux de germination en présence de lumière.	53
Figure 28	Taux de germination dans l'obscurité.	54
Figure 29	Comparaison de la germination en fonction de lumière.	55

Liste des tableaux

Tableau 1	Les grandes étapes de l'avènement de la culture <i>in vitro</i>	4
Tableau 2	Les éléments minéraux contenant dans le milieu de culture.	8
Tableau 3	Les éléments organiques constituants dans les milieux de culture.	9
Tableau 4	Les types et les rôles de phytohormones.	14
Tableau 5	Conditions requises pour la culture de <i>Moringa oleifera</i>	23
Tableau 6	Représente les vitamines et les minéraux pour 100 gramme de feuilles de <i>Moringa oleifera</i>	25
Tableau 7	La quantité de vitamine E, lipides et protéines dans les extraits des graines et des feuilles de Moringa de l'île caribéenne.	26
Tableau 8	Acides aminés dans 100 grammes de feuilles séchées.	26
Tableau 9	Gains de poids chez les bovins nourris à satiété pendant la nuit d'herbe de pâturage fraîchement coupé ou de Moringa haché pendant 35 jours.	31
Tableau 10	Un résumé de 6 références, les produits de stérilisation de graines, milieu de culture et le type d'explant choisi pour l'étude.	32
Tableau 11	Les compositions hormonales optimales.	33
Tableau 12	Tableau récapitulatif de l'essai.	40
Tableau 13	Les résultats du test préliminaire de germination de <i>Moringa oleifera</i>	45
Tableau 14	Les résultats du test de germination des graines scarifiées de <i>Moringa oleifera</i>	46
Tableau 15	La germination des graines trempées pendant 24 h.	47
Tableau 16	La germination avec le premier protocole de stérilisation.	49
Tableau 17	La germination avec le deuxième protocole de stérilisation.	50
Tableau 18	La germination avec le troisième protocole de stérilisation.	51
Tableau 19	La germination en présence de la lumière.	53
Tableau 20	La germination en absence de la lumière.	54

Résumé

Grâce à sa richesse exclusive, le *Moringa oleifera* connaît aujourd'hui un intérêt grandissant au niveau mondial, en raison de ses vertus exceptionnelles dans les domaines médicinales, industrielles et nutritionnelles. Dans ce sens, des essais ont été menés pour l'optimisation d'un protocole de micropropagation de la plante, l'étude a été consacrée à la première étape de développement de la plante de « la germination » cette étape définira la réussite de la multiplication *in vitro*.

Pour cela, plus de 170 graines ont été confrontés à différents protocoles de stérilisation, de scarification et condition de culture ; afin de définir les conditions optimales pour la germination *in vitro*.

Les taux de contamination montrent que le protocole combiné de chlorure mercurique et hypochloride de sodium résulte le meilleur protocole de stérilisation des graines parmi les protocoles testés avec un taux de contamination de 13.95% par rapport à stérilisation avec chlorure mercurique et à stérilisation à hypochloride de sodium qui ont un taux de contamination de 30.61% et 68.88% successivement. Ainsi que les taux de germination révèlent que : d'une part, le levé de dormance est bien meilleur par la scarification avec un taux de 72.92% ; d'autre part, l'obscurité influence positivement à la germination *in vitro* avec un taux de 61.19%.

Mots clés *Moringa oleifera*, micropropagation, germination, stérilisation, levée de dormance.

Abstract

Thanks to its exclusive richness, *Moringa oleifera* is now experiencing a growing global interest, due to its exceptional virtues in the medicinal, industrial and nutritional fields. In this sense, tests have been conducted for the optimization of a micropropagation protocol of the plant, the study was devoted to the first stage of the development of the plant of "germination" this step define the success of *in vitro* multiplication.

To do this, more than 170 seeds were confronted with different sterilization, scarification and growing conditions protocols; to define the optimal conditions for *in vitro* germination.

Contamination rates show that the combined protocol using mercuric chloride and hypochloride sodium results in the best seed sterilization protocol among the protocols tested with a contamination rate of 13.95% compared to sterilization with mercuric chloride and hypochloride sterilization of sodium that have a contamination rate of 30.61% and 68.88% successively. As well as germination rates reveal that: on the one hand, dormancy is much better by scarification with a rate of 72.92%; and on the other hand, darkness influences positively *in vitro* germination with a rate of 61.19%.

الثروة الحصرية التي تتمتع بها نبتة المورينغا اوليفرا جعلتها تجذب الاهتمام العالمي بفضل استعمالاتها في عدة مجالات أبرزها المجالات الطبية ، الغذائية و الصناعية. و لأجل ذلك أجرينا عدة تجارب لتحسين بروتوكول الإكثار الدقيق لهذه النبتة، هذه الدراسة تركز على مرحلة الانتاش (الانبات) كونها أهم مرحلة في حياة النبات و التي تحدد نجاح بروتوكول الإكثار الدقيق، لهذا خصصت أكثر من 170 بذرة لدراسة الظروف الملائمة من ناحية بروتوكول تعقيم البذور و تحفيزها على الانتاش.

النتائج أظهرت بأن البروتوكول الثاني و الذي استعمل فيه كلوريد الزئبق و كلوريد الصوديوم هو أفضل بروتوكول لتعقيم البذور مقارنة بالبروتوكولات المجربة بنسبة تلوث 13.95% بينما بروتوكول كلوريد الزئبق و بروتوكول كلوريد الصوديوم أعطت النسب التالية 30.61% و 68.88% على التوالي. كما نسب الانتاش أظهرت من جهة أن عملية جرح البذور هي أحسن طريقة لرفع السبات بنسبة انتاش تصل إلى 72.92% و من جهة أخرى الظلام يؤثر بشكل إيجابي على هذه المرحلة حيث وصلت نسبتها إلى 61.19%.

الكلمات المفتاحية: الإكثار الدقيق، الإنبات، التعقيم، رفع السبات.

Les biotechnologies résultent d'un mariage entre la science des êtres vivants : la biologie et un ensemble de techniques nouvelles de laboratoire. La biotechnologie végétale est un domaine précis dans lequel des techniques scientifiques servent à mettre au point de nouvelles variétés de plantes. Elles s'appliquent sur des organes, des tissus, des cellules ou sur de l'ADN des végétaux dont le but est d'augmenter la productivité de l'agriculture et la fabrication de nouveaux produits par les plantes, comme par exemple des molécules thérapeutiques ou des sources renouvelables d'énergie, elle reposent principalement sur la culture *in vitro* qui est un mode de multiplication végétative artificielle des plantes. Il s'agit d'un ensemble de méthodes faisant intervenir d'une part l'asepsie (stérilisation du matériel, désinfection des explants), et d'autre part des conditions de culture parfaitement contrôlées (milieux de culture définis pour chaque type de plante, température, lumière, humidité,...). Le but de ce type de culture est de permettre la régénération d'une plante entière autonome et fertile à partir de la propriété des cellules végétales : la totipotence. (-potens : pouvoir, toti- : tout): elles ont la possibilité de revenir à un état embryonnaire, et de se redifférencier en toute cellule spécialisée qui serait nécessaire pour former une nouvelle plante.

La micropropagation est l'une des principales techniques de la culture *in vitro*, elle a pour principe de s'appuyer sur la capacité de la totipotence cellulaire afin de reproduire une plante entière à partir de n'importe quel type d'explant végétale, elle offre une parfaite garantie de conformité génétique et une bonne stabilité des caractères au cours des repiquages successifs (Demol *et al.*, 2008), ce système de reproduction représente sans aucun doute une alternative intéressante et efficace pour constituer rapidement un stock de matériel en très bon état sanitaire (Changins, 2011). Différents travaux de culture *in vitro* ont été réalisés dans le contexte de l'amélioration et la conservation de la biodiversité.

Parmi les miracles offerts de la nature, on compte le *Moringa oleifera*, qui un arbre d'origine indien, dont chaque partie représente une multitude de source d'avantages incomparables à bien d'autres plantes. Il peut être purificateur d'eau usée (Pritchard, M *et al.*, 2010), un complément alimentaire durable et économiquement sain, pour combattre la malnutrition (Fahey, J 2005; Thurber et Fahey, 2009) également une source de fourrage pour les animaux.....etc. Grâce à sa richesse extraordinaire, le Moringa connaît aujourd'hui un intérêt grandissant au niveau mondial, elle révolutionne l'économie mondiale de point de vue nutritionnel, médicinal et industriel. Pour cela, beaucoup de recherches sont développées pour propager cette plante *in vitro*.

L'application de la technique de micropropagation *in vitro* sur *Moringa oleifera* est en voie de développement et nécessite encore beaucoup de mise au point, en raison de la variation de son génotype, qui est due à l'impact de l'environnement sur les hormones végétales endogènes par rapport à la localisation de cet arbre (Hassanein, A *et al.*, 2019). La réponse de différents types d'explant aux mêmes conditions de culture varie aussi, en raison des différences hormonales endogènes de la plante (Kumar et Reddy, 2011).

Dans ce contexte, un essai de micropropagation *in vitro* a été réalisé à partir de la germination *in vitro* de graines de *Moringa oleifera*, dans le but de mettre au point un protocole adéquat pour la réussite de la régénération complète à partir de différents types d'explants issus de vitro-plan germé *in vitro*.

L'objectif du travail présenté est de mettre en évidence un protocole de micropropagation propre au génotype de notre pays l'Algérie. Pour cela on doit étudier :

- ✓ Déterminer un protocole de stérilisation des graines pour la culture *in vitro*.
- ✓ Etudier le comportement des graines traitées différemment lors de la germination.
- ✓ Sélectionner le meilleur explant élite et la balance hormonale la plus optimale.
- ✓ Définir et valider l'explant élite et la balance hormonale la plus optimale.

Ce présent travail comporte trois différents chapitres :

- **Chapitre I** : Etude bibliographique ; mets en évidence le but et les objectifs de la micropropagation *in vitro*, ainsi qu'une étude approfondie de *Moringa oleifera*, présentant les multiples avantages et vertus ;
- **Chapitre II** : Matériels et méthodes ; présente les manipulations menées dans le but de déduire les conditions optimale de la germination *in vitro* des graines de *Moringa oleifera* ;
- **Chapitre III** : Résultats et discussion ; indique les observations retenues lors de l'essai de la germination *in vitro*.

Remarque : le nom *Moringa oleifera* reflète au l'espèce, tandis que le Moringa au l'arbre.

I. Culture *in vitro* et micropropagation

1) Généralité sur la culture *in vitro*

A. Définition

La culture *in vitro* est une technique de production de cellules, des tissus ou d'organes en dehors de tout organisme animal ou végétal, sur un milieu nutritif et dans des conditions contrôlées (Cézard, F 2009).

La culture *in vitro* végétale est une culture d'explants de plantes, sur un milieu synthétique dans : des conditions stériles, un environnement contrôlé et dans un espace réduit. C'est un mode de reproduction asexué artificiel, comprenant un ensemble de méthodes qui font intervenir, d'une part des éléments d'asepsie, et d'autre part la mise en place d'un environnement parfaitement contrôlé : milieu défini pour chaque espèce végétal, conditions optimales, de température, photopériode, d'humidité... (Starr, C *et al.*, 2012).

B. Historique

Dès 1902, Haberland, un biologiste allemand, a observé les potentialités naturelles de multiplication végétative (bouturage). Suite à ses travaux, il énonce le premier grand principe de totipotence qui ouvrira la voie de la micropropagation des végétaux. En 1934, White réussit la culture des racines de tomates sur un milieu contenant de l'eau, des sels minéraux, un extrait de levure, du sucre et une hormone végétale, la seule connue à l'époque « l'auxine ».

Après 5 ans en 1939, Gautheret a marqué le vrai démarrage de la culture *in vitro* par l'obtention à partir de tissu de carotte, un amas cellulaire dédifférencié « cals » qui peut être cultivé indéfiniment dans le temps.

En 1962 Murashige et Skoog étudient de la multiplication végétative du tabac et mettent au point le premier milieu de base pour la culture *in vitro*. Ce milieu contient des sels minéraux, des sucres, des vitamines B, des auxines et des cytokinines. Ce milieu miracle rend possible la culture et la prolifération de méristèmes de tiges jusqu'alors réfractaires à la multiplication végétative *in vitro*. Les événements de la mise au point de la culture *in vitro* sont présentés dans le tableau suivant :

Tableau 1 : Les grandes étapes de l'avènement de la culture *in vitro*.

Année	Chercheur	L'événement
1902	G.HABERLANDT	énonce le concept de la totipotence cellulaire végétale.
1922	W.J. ROBBINS/ W. KOT-TE	L'obtention croissance de pointes de racines.
1926	E. KUROSAWA	La découverte l' action de la gibbérelline sur la croissance.
1934	P.R. WHITE	La réussite d'une culture de racines.
1935	R.J. GAUTHERET	La multiplication des cellules.
1936	O.ORSOS	L'induction. des cals et des organes.
1939	R.J. GAUTHERET	La réussite des cultures indéfinies de tissus végétaux.
1941	A.C. BRAUN	Première étude sur les tumeurs végétales ou crown-gall.
1944	R. BUVAT	La mise en évidence du phénomène de dédifférenciation.
1946	E. BALL	La régénération de plants de lupin et de capucine à partir d' apex de grande taille.
1949	P. LIMASSET et P. CORNUET	La découverte de l' absence de virus dans les méristèmes.
1952	G. MOREL et C. MARTIN	La régénération des plantes entières saines de <i>dahlia</i> , variété " <i>le Rêve</i> " indemnes de virus à partir de culture de méristèmes de plants infectés par trois virus différents.
1954	W.H. MUIR <i>et al</i>	L'obtention de premières cultures de cellules isolées à partir de cals.
1955	C.O. MILLER <i>et al</i>	Découvrir que les cytokinines induisent des divisions cellulaires dans des cultures de tissus.
1957	F. SKOOG et C. MILLER	La régénération des racines et des tiges à partir de cals sous influence d' auxine et de cytokinine.
1958	F.C. STEWART et J. REINERT	L'obtention des embryons somatiques
1962	T. MURASHIGE et F. SKOOG	Mettre au point pour des cultures de tissus de tabac le fameux milieu de culture M.S contenant des éléments minéraux, des vitamines du groupe B, du sucre, auxine et cytokinine.
1964	S. GUHA et S.C. MAHESHWARI	L'obtention des plantes haploïdes de <i>Datura innoxia</i> Mill à partir de culture d'anthères.
1967	B. KAUL et E.J. STABA	La production des métabolites secondaires.
1971	I. TAKEBE <i>et al</i>	La régénération des plantes entières de <i>Nicotiana tabacum</i> à partir de protoplastes.
1972	P.S. CARLSON	L'obtention du premier hybride somatique interspécifique par fusion de protoplastes entre différentes espèces de tabac.
	W.R. SHARP	L'obtention des plantes haploïdes de tomates par culture de pollen isolé.
1975	K.K.PANDEY	L'utilisation du pollen irradié de tabac pour réaliser des croisements interspécifiques.
1976	L.H. SAN NOEUM dans l'équipe du Pr. DEMARLY à Orsay	La première culture d'ovaires d'orge non fécondés.

1983	M. Van MONTAIGU <i>et al</i>	La création des premières plantes transgéniques transformées par <i>Agrobacterium tumefaciens</i> .
------	---------------------------------	--

Depuis le début du XXème siècle avec les travaux d'Haberlandt, de nombreux chercheurs ont œuvré et continuent à travailler afin d'améliorer les techniques mises au point par les pionniers dans les différentes techniques de cultures *in vitro*. L'objectif étant d'utiliser ces outils sur le plus grand nombre d'espèces possibles et avec le meilleur rendement, ceci à des fins d'amélioration des plantes au service de l'homme et de son environnement [net1].

C. Principe

La culture *in vitro* se base sur le principe de la totipotence cellulaire, une caractéristique propre aux végétaux. Elle peut se définir comme la propriété des cellules végétales vivantes, prélevées sur un organe quelconque de la plante, de pouvoir reconstituer un individu identique à la plante mère. Pour cela, il faut qu'elles soient placées dans des conditions appropriées, en passant éventuellement par une étape de dédifférenciation c'est-à-dire que les cellules puissent redevenir des cellules simples, non spécialisées et se différencier ensuite pour donner à nouveau les différents types de cellules spécialisées (Cornu, D et Boulay, M 1986).

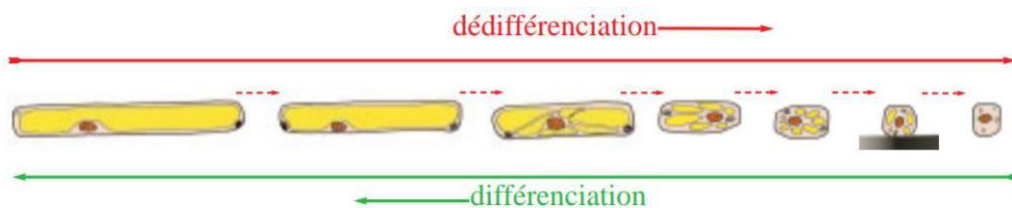


Figure 1 : Illustration de la totipotence.

D. Buts

Les applications de la culture *in vitro* sont nombreuses aujourd'hui tant dans le domaine économique qui s'intéresse maintenant à la micropropagation des plantes comme *Moringa oleifera* qui présentent un intérêt nutritionnel, médicinal et pharmacologique ; que dans celui de la recherche (notamment en amélioration des plantes), ou encore pour conserver la diversité variétale et sauvegarder des espèces menacées (Ghomari, S 2015).

La culture *in vitro*, peut être utilisée pour le but de:

- ✓ Reproduire de façon identique, une espèce et la multiplier en grande quantité, et à moindre coût pour la mettre sur le marché dans les plus courts délais. On parle d'une micropropagation rapide.
- ✓ Préserver des espèces anciennes et menacées, pour conserver la biodiversité.
- ✓ Elaborer de nouvelles variétés de plantes plus rapidement.
- ✓ Assainir des plantes virosées et conserver des plantes saines (Agnès, B *et al.*, 2013).

E. Conditions de la culture *in vitro*

1. Stérilisation

a) Définitions

Selon la Norme AFNOR NFT 72-101 et (Chambon, M *et al.*, 1999) la stérilisation se définit comme la mise en œuvre d'un ensemble de méthodes et de moyens visant à détruire tous les micro-organismes portés par des milieux inertes contaminés. Le maintien des cultures en conditions aseptiques sous entend la stérilisation des milieux de culture, d'instruments de manipulation et de dissection, d'eau de rinçage... etc. l'acquisition d'un équipement permettant la stérilisation est donc indispensable au laboratoire de la culture *in vitro*.

b) Méthodes de stérilisation

En effet, chaque méthode de stérilisation utilise un mécanisme d'action différent pour éliminer les micro-organismes viables en les classant de la manière suivante :

i. Méthodes physiques

Stérilisation de manière physique quelque chose s'effectue de deux façons : la stérilisation à la chaleur ou par les rayonnements.

❖ La stérilisation à la chaleur :

La stérilisation à la chaleur sèche est généralement utilisée pour les substances sensibles à la chaleur humide comme les poudres. Cette méthode est préférentiellement utilisée pour les matériaux de verre et de métal en dénaturant les enzymes et les acides nucléiques par oxydation [net 02] par contre la stérilisation par la chaleur humide utilise la vapeur d'eau saturée sous pression comme agent stérilisant; la chaleur associée à l'humidité provoque la destruction des germes avec ses formes de résistances. C'est le mode de stérilisation des milieux de culture le plus utilisée en culture *in vitro* [net 03].

- ❖ La stérilisation par les rayons : est utilisée au laboratoire pour la décontamination d'air et paillasse situées sous la hotte de protection n'agit que de façon directe.

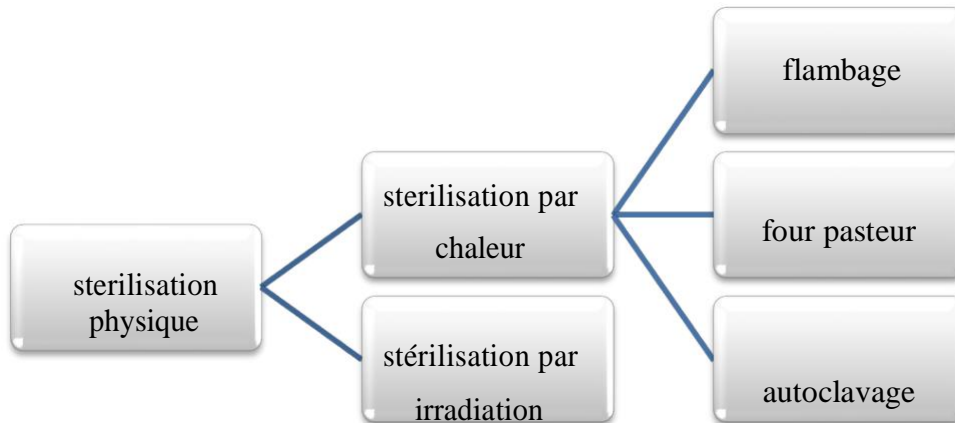


Figure 2 : Illustration de méthodes de stérilisation physiques.

ii. Méthodes chimiques

Stérilisation de manière chimique s'effectue de deux façons, la stérilisation au gaz à l'aide d'agents chimiques ou la stérilisation chimique à froid, prenant l'exemple des dérivés du phénol, les alcools, les oxydants...

iii. Méthodes mécaniques

La filtration est utilisée pour les milieux sensibles à la chaleur, mais n'est possible que lorsque la viscosité de ces milieux est faible.

2. Milieux de culture

a) Définitions

Toutes les cellules qu'elles soient, eucaryotes (animales, végétales, fongiques) ou procaryotes (bactéries) ont des besoins nutritifs plus au moins nombreux. Dans le cadre de la culture *in vitro* le milieu de culture se définit comme un support synthétique adapté dans sa composition à la technique, l'explant, l'objectif et l'espèce, voire le cultivar. En le modifiant chaque 3 ou 4 semaines et au cours des différentes étapes de production.

Parmi les milieux de cultures mis au point au cours de la recherche Murashige, Skoog et Gamborg jouent encore un rôle vital dans la recherche sur la culture des tissus végétaux.

En 1962, Murashige et Skoog mettent au point le premier milieu de base pour la culture *in vitro*. Ce milieu contient des sels minéraux, des sucres, des vitamines B, des auxines et des cytokinines. Il rend possible la culture et la prolifération de méristèmes de tiges jusqu'alors réfractaires à la multiplication végétative *in vitro*.

Le milieu Gamborg B5 a été créé par Gamborg O.L (1968) pour la culture de cals et de cellules de Glycine max, famille *Fabaceae*. C'est un mélange nutritif de sels inorganiques, de vitamines et de glucides. Ce milieu est largement utilisé pour la culture *in vitro* des cellules végétales, des tissus et des organes.

Dans 70% des cultures, le milieu Murashige et Skoog (MS) est utilisé comme milieu de base pour tout type de culture *in vitro*. Ce milieu est essentiellement conseillé pour le déclenchement de l'organogenèse, en particulier pour la néoformation de bourgeons, il s'est révélé nettement supérieur à d'autres milieux (Margara, F 1989).

b) Compositions

Les principaux constituants d'un milieu de culture sont généralement représentés par : les macro et les micro-éléments, les sources carbonée et azotée, les vitamines et régulateurs de croissance (Vidalis , H *et al.*, 1989).

i. Les éléments minéraux :

Tableau 2 : Les éléments minéraux contenat dans le milieu de culture.

Les macroéléments	Les microéléments
Interviennent en grande quantité. Il s'agit de 6 éléments présents à des concentrations élevées tels que l'azote (N), le calcium (Ca), le potassium (K), le soufre (S), le magnésium (Mg) et le phosphore (P).	Appelés parfois oligo-éléments, et bien qu'ils ne soient nécessaires à la plante qu'en faibles concentrations, leur rôle est essentiel. Les principaux d'entre eux sont le fer (Fe), le cuivre (Cu), le zinc (Zn), le manganèse (Mn), le molybdène (Mo), le bore (B) et le chlore (Cl), le cobalt (Co), le nickel (Ni)... etc.

ii. Les éléments organiques :

Tableau 3 : Les éléments organiques constituants dans les milieux de culture.

Les sucres	Les vitamines	Les acides aminés
Dans la nature, les sucres sont photosynthétisés à partir du gaz carbonique atmosphérique et de l'eau du sol. Dans la culture <i>in vitro</i> de tissus végétaux, l'assimilation chlorophyllienne est nulle ou insuffisante pour assurer la survie et le développement de l'explant. Alors, on ajoute des sucres, le plus souvent du saccharose, aux milieux de culture pour fournir à l'explant une source de carbone.	L'emploi de diverses vitamines favorise fréquemment le développement des cultures <i>in vitro</i> : elles appartiennent essentiellement au groupe B.	Il a parfois été observé que l'apport d'acides aminés favorisait la prolifération.

iii. Les hormones de croissances :

Appelés généralement hormones végétales, elles induisent les phénomènes de croissance et de néoformation des organes. On trouve ces substances de croissances naturellement dans toutes les plantes ; cependant, on a pu synthétiser artificiellement des molécules possédant les mêmes propriétés. Les hormones utilisées sont principalement les auxines et les cytokinines, car ces hormones sont capables d'orienter les explants vers la formation de nouveaux organes. Les composants des deux milieux Murashing Skoog et Gamborg (Annexe01).

c) Les types de milieux de culture

Dans chaque spécialité, il ya différents types de milieux de culture comme par exemple en microbiologie, il ya le milieu sélectif, le milieu minimum... etc. Par contre les milieux classiques de culture des tissus végétaux étaient développés par des pionniers, les voici :

- Milieu de Chu (N6).
- Milieu de DKW/Juglans.
- Milieu de Gamborg's B-5.
- Milieu de Haogland's2.
- Milieu de McCrown's woody plant.
- Milieu de Murashinge et Skoog (MS).
- Milieu de Schenk et Hildebrandt.
- Milieu de Quoirin et Lepoivre.
- Milieu de White

d) Modes de stérilisation des milieux

i. Chaleur humide

La qualité nutritive des milieux de culture permet un essor rapide de la croissance des micro-organismes qui entre en compétition avec la croissance des végétaux. Une seule bactérie présente dans un tube à culture donnera naissance, en moins d'une ou deux semaines, à une colonie de bactéries visible à l'œil nu. Il est donc impératif d'éliminer, par stérilisation des milieux, tous les micro-organismes.

La méthode de choix pour la stérilisation dans la plupart des laboratoires est l'autoclavage; à l'aide de vapeur pressurisée pour chauffer le matériau à stériliser. Il s'agit d'une méthode très efficace qui tue tous les microbes, spores et virus, bien que, pour certains insectes spécifiques, en particulier les températures élevées de 121 C° et une pression de 15 lb pendant 15 à 20 minutes. Seule une température aussi élevée permettra la destruction de bactéries résistantes (CIDES 1999).

L'autoclavage détruit les microbes par hydrolyse et coagulation des protéines cellulaires, qui est efficacement réalisée par la chaleur intense en présence d'eau. La vapeur pressurisée a une forte chaleur latente à 100°C, il contient 7 fois plus de chaleur que l'eau à la même température. Cette chaleur est libérée au contact de la surface plus froide du matériau à stériliser, ce qui permet une livraison rapide de chaleur et une bonne pénétration des matériaux denses [net3].

ii. Chaleur sèche (Flambage, Etuve)

Au lieu de l'hydrolyse des protéines, la chaleur sèche a tendance à tuer les microbes par l'oxydation des composants cellulaires. Cela nécessite plus d'énergie que l'hydrolyse protéique de sorte que des températures plus élevées sont nécessaires pour une stérilisation efficace par la chaleur sèche. Par exemple, la stérilisation peut normalement être réalisée en 15 minutes par autoclavage à 121C°, alors que le chauffage à sec aurait généralement besoin d'une température de 160C° pour stériliser dans un laps de temps similaire.

e) Explant utilisé

i. Le choix de l'explant

Le choix de l'explant sera en fonction de la technique utilisée, de l'objectif et de l'espèce travaillée. Comme il dépend de la totipotence des cellules prélevées. Ces mécanismes de « vieillissement » sont dus à des modifications de la structure des méristèmes. Ceux-ci peuvent être, pour le bourgeonnement axillaire, des noeuds (2 à 5 cm de long), jusqu'à des méristèmes (0,1 à 0,2 mm). Tous possèdent un méristème caulinaire préexistant, mais il est possible, dans le cas du bourgeonnement adventif, d'induire la formation de méristèmes sur d'autres organes tels que feuilles, cotylédons, hypocotyles (Cornu, D et Boulay, M 1986).

ii. Sélection de la plante mère

Puisque le résultat est une copie conforme de la plante mère l'âge et l'état sanitaire de cette plante conditionne la nature de l'explant.

- Si le plant-mère est malade, virosé, alors il faudra prélever un explant constitué de cellules méristématiques, ce type d'explant est appelé indifférencié.
- Si le plant-mère est en santé, alors d'autres types d'explants pourront être prélevés, ces explants sont appelés différenciés.

iii. Age de l'explant

Généralement dans les cultures *in vitro*, les explants les plus jeunes (embryons immatures, jeunes feuilles, méristèmes etc.) sont les plus privilégiés. Leur état juvénile favorise plus de possibilités de régénération (Vidalis, H *et al.*, 1989). Souvent, ce sont les tissus provenant d'embryons qui expriment le plus souvent, d'une manière nette et reproductible, l'aptitude à la régénération, suivis de loin par cotylédons (Saadi, A et Hamdani, F 2007).

iv. Taille de l'explant

Plus la taille est importante et plus les équilibres endogènes sont déterminants et les conditions extérieures seront influentes. La taille choisie variera selon la nature de l'explant. Si l'explant est de nature reproducteur, le prélèvement devrait engendrer l'organe en sa totalité (un nœud, un apex, ou un bourgeon entier). Mais dans le cas d'un

tissu différencié (feuilles, tige, racines, inflorescence...) des fragments de 5 à 10 mm suffiront (Vidalis, H *et al.*, 1989; Saadi et Hamdani, 2007).

v. Périodes de croissance de l'explant

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

Idem pour la période de l'année dans laquelle on se situe : réapparition d'un fonctionnement de type juvénile au début de chaque poussée annuelle, ou même de chaque réitération. Ou encore « retour en arrière » lors de la floraison : c'est la régénération plus ou moins complète du potentiel morphogénétique initial, et celle-ci précède la différenciation des organes floraux.

vi. Qualité de l'explant

On pourra donc intervenir sur la qualité de l'explant : en fonction de l'âge du pied-mère, de l'époque de prélèvement, de sa localisation sur le pied-mère, aussi de sa taille et de sa nature.

vii. Stérilisation de l'explant

La quantité du sucre apportée à la plante dans le milieu de culture *in vitro* pour se développer est suffisante pour permettre également aux champignons et bactéries de se multiplier, et ce, encore plus rapidement que le végétal ! Il est donc nécessaire de désinfecter tout le matériel utilisé pour ne pas les introduire dans la culture, y compris les fragments de plantes, et de travailler en conditions stériles. Ce matériel de départ peut provenir de parties très variées de la plante et subir une désinfection ou bien une stérilisation chimique à froid avec des solutions comme avec une solution de chlore actif (eau de javel, l'alcool, phénol et ses dérivés...)

f) Régulateurs de croissance

i. Définition

Les régulateurs de croissances sont des substances organiques secrétées par des cellules végétales endogènes localisées essentiellement au niveau des feuilles. Ce sont des phytohormones qui agissent à faibles concentrations sur d'autres cellules en tant que molécules de signal.

Les hormones végétales permettent de contrôler les principaux mécanismes physiologiques des plantes vertes. Les auxines, les cytokinines, les gibbérellines, l'éthylène et l'acide abscissique permettent de contrôler les principaux mécanismes physiologiques des plantes vertes, elles sont impliquées dans tous les stades de la croissance et développement des plantes.

En effet, ils jouent un rôle important dans la fécondation et la formation de l'embryon pendant la pollinisation. De plus, ils permettent de bien diriger la floraison, la fructification et la sénescence. C'est pourquoi on les appelle les régulateurs de croissance. Mis à part les processus de croissance et de développement des plantes, les phytohormones agissent également sur la division, l'élongation et la différenciation cellulaire. Ils peuvent aussi participer à la régulation des métabolismes primaires et secondaires de la plante.

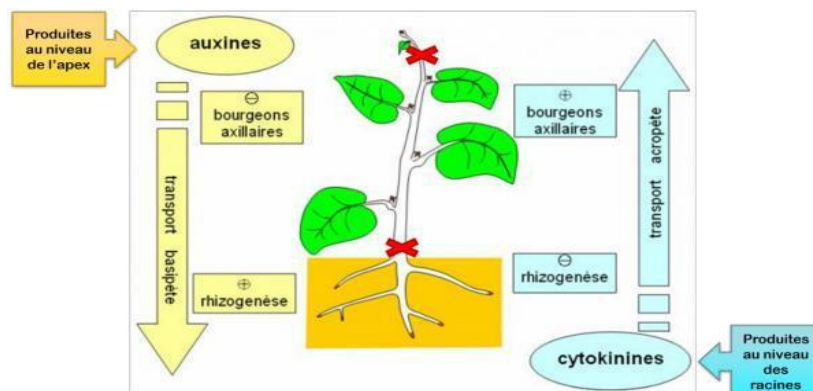


Figure 3 : Les niveaux de production de phytohormones et ses directions de transport.

ii. Types et rôle des phytohormones

Un résumé de tout les types des phytohormones et leurs rôles est présenter dans le tableau suivant :

Tableau 4 : Les types et les rôles de phytohormones.

Type	Rôle
Auxines	<ul style="list-style-type: none"> • favorisent l'allongement cellulaire des coléoptiles. • la dominance apicale. • la formation de racines adventices. • la fructification et la différenciation du tissu conducteur de la tige • Préviennent l'abscission des feuilles en réduisant la sensibilité des cellules à une autre hormone, l'éthylène • Les auxines sécrétées par le bourgeon apical empêchent le développement des bourgeons axillaires.
Cytokinines	<ul style="list-style-type: none"> • Activation de la production de chlorophylle. • Activation de l'ouverture des feuilles. • Favorisent la croissance cellulaire. • Favorisent la formation de jeunes pousses. • Favorisent le déchargement de composés sucrés par le phloème. • Retardent la sénescence foliaire. • Conjuguées à l'auxine, activent la division cellulaire (l'auxine favorise la duplication de l'ADN ; les cytokinines permettent la séparation des chromosomes). • Impliquées dans les morphogénèses. • Stimulent le métabolisme des cellules de jeunes pousses (qui ne sont pas à leur niveau de métabolisme maximal) en réponse à une augmentation de l'eau et des substances minérales disponibles.
Gibbérellines	<ul style="list-style-type: none"> • Agissent essentiellement sur les cellules des entrenœuds qu'elles allongent. • Contribuent à la levée de la dormance des graines et au débourrement des bourgeons (vernalisation). • S'opposent aux effets de l'acide abscissique. • Décaler la mesure du temps chez les végétaux. • Induisent une masculinisation des fleurs et stimulent la croissance du fruit. • À la différence des auxines, les gibbérellines n'inhibent ni stimulent la croissance des racines. • Commercialement, les gibbérellines sont employées pour faire grossir les grains de raisin sans pépin, ou pour retarder la maturité des agrumes.
Acide abscissique (ABA)	<ul style="list-style-type: none"> • Stimule plutôt la production de protéines de réserve de la graine. • Répondable de la dormance et inhibition de germination • Répondable de la défense contre différents stress • Responsable de l'inhibition de la croissance cellulaire et de la germination des graines, et provoque, en cas de sécheresse, la fermeture des stomates.

Éthylène	<ul style="list-style-type: none"> • Module de nombreux métabolismes (réponses des plantes aux stress biotiques et abiotiques). • Provoque une triple réponse aux contraintes physiques, lorsqu'une plante rencontre un obstacle, elle le contourne. Cette réaction est due à l'éthylène qui ralentit l'allongement des cellules, provoque ensuite un épaississement de la tige puis une modification de son orientation qui passe de verticale à horizontale. • Stimule l'apoptose (par exemple, lors de la mort des cellules du xylème). • Provoque l'abscission des feuilles et la maturation des fruits.
-----------------	--

2) Micropropagation

A. Définition

Les plantes se multiplient par semis ou par multiplication végétative qui est exploitée depuis des siècles par les horticulteurs et jardiniers : bouturage, marcottage, greffage... La micropropagation *in vitro* dérive de ce phénomène naturel, elle apporte un progrès considérable par rapport aux méthodes traditionnelles avec un taux de multiplication de 100 à 1000 fois plus élevé et en un temps plus réduit (Ochette, C 2005).

B. Caractéristiques et buts

La technique consiste à cultiver des explants végétaux stérilement, sur un milieu artificiel et dans un environnement contrôlé. Elle peut être réalisée à l'aide de nœuds ou de pousses axillaires, généralement on vise à proliférer des bourgeons axillaires préexistants sur l'explant mère en exploitant, avec cette technique, la propriété de totipotence des cellules végétales, c'est-à-dire le fait que la cellule végétale ait la capacité de régénérer une plante entière dans des conditions contrôlés *in vitro*. Ceci offre une parfaite garantie de conformité génétique et une bonne stabilité des caractères au cours des repiquages successifs (Demol, J *et al.*, 2008). Suite aux subcultures successives, on obtient alors des plantes identiques à la plante de départ et que l'on peut multiplier à l'infini.

L'application de la technique micropropagation des plantes ligneuses ; fruitiers, forestiers et d'ornement permet l'amélioration de leurs capacités d'enracinement notamment sur le porte greffe reconnue difficile (Soltener, D 2005). Cette technique

permet la multiplication végétative de plusieurs plantes alimentaires, médicinales, horticoles, agroforestières (Bretau, A 2006).

D'un point de vue pratique, ce système de production de semences représente sans nul doute une alternative intéressante et efficace pour constituer rapidement un stock de matériel de qualité sanitaire irréprochable. Il peut être aisément intégré dans le cadre d'un approvisionnement en plants de base de haute qualité destiné à la production de semences certifiées (Changins, 2011).

C. Les étapes de la micropropagation

1. Intiation

La micropropagation commence par la sélection et le nettoyage de matériel végétal à se propager pour la production de plantes saines se qui délimite le calendrier de production. La littérature fournit souvent les premières informations essentielles sur les facteurs critiques au départ d'une culture, parmi les :

- Le choix de plante mère.
- Le choix du fragment végétal à mettre en culture (en croissance active, sans stress et en bon état sanitaire)
- Une description de l'explant mis en culture.
- Le protocole de stérilisation de surface adéquate garantissant la survie de l'explant tout en assurant l'asepsie.
- La découpe de l'explant et sa position sur la gélose.
- Le choix du milieu de culture qui est parfois nécessaire d'ajuster légèrement par la suite suivant la réponse de l'explant.

Dans plus de 50 % des cas, les premiers essais de mise en culture sont très satisfaisants et demandent très peu ou pas d'ajustements. Pour certains cas, la difficulté réside dans la désinfection des végétaux ou dans l'ajustement de l'équilibre hormonal. Mais selon tous les auteurs, théoriquement tous les végétaux quels que soient leur espèce ou leur cultivar, peuvent être cultivés *in vitro* (CIDES 1999).

2. Multiplication (durée 4 à 5 semaines)

Cette étape s'effectue au repiquage des plantules obtenues au stade précédent. On veut ici accroître le nombre de plants d'un facteur de 4 à 5 à chaque cycle chez les ligneux, et d'un facteur de 4 à 12 chez les herbacées.

Le milieu nutritif utilisé est souvent identique à celui du premier se qui diffère est la balance hormonale (équilibre auxine-cytokinine) (CIDES 1999).

Au stade de la multiplication, les cytokinines sont généralement présentes en plus grande concentration dans le milieu que les auxines. Ceci s'explique d'un point de vue physiologique par le fait que les cytokinines s'opposent à la dominance apicale donc stimulent la croissance de nouvelles tiges. Encore une fois, la littérature fournie généralement les informations nécessaires nous permettant de fixer notre choix sur une formulation appropriée.

3. Enracinement (durée de 2 à 4 semaines)

A cette étape il y a l'induction et le développement des racines adventives à la base des pousses. La formation de racines peut être facilitée par l'utilisation d'un milieu de culture généralement avec les mêmes sels minéraux et vitamines mais en quantités réduites, avec la rareté ou l'absence de cytokines car la différence majeure se situe principalement au niveau de l'équilibre hormonal qui se fera cette fois en faveur des auxines, et notamment dans une concentration allant de 0,01 à 10 ppm. Les auxines les plus fréquemment utilisés sont : IBA (acide indolbutirrico) et IAA (Indole-3-acétique) [net 6].

Il arrive parfois que des espèces présentent un système racinaire plus ou moins développé au stade de la multiplication, dans ce cas il serait avantageux de faire des essais pour le passage immédiat en acclimatation.

4. Acclimatation (durée de 3 à 4 semaines)

Si le système racinaire est bien développé, le plant est prêt pour la phase d'acclimatation qui consiste à adapter progressivement les microplantules pour être transférées au sol. Cette phase commence par le transfert des semis *in vitro* à *in vivo* dans des pots de tourbe et de perlite qui garantissent une bonne rétention d'eau, les parties aériennes sont ensuite recouvertes de manière à les maintenir dans un environnement qui avoisine les 100 % d'humidité relative.

L'acclimatation est une phase très délicate, au cours de laquelle on obtiendra l'évolution vers l'autotrophie qui se fait par la réduction de l'humidité, donc les risques de dessèchement sont très élevés. On doit attendre la croissance de nouvelles feuilles fonctionnelles avant d'enlever progressivement la pellicule de recouvrement, pour être prêtes à la culture en serre et en plein champ.

D. Les difficultés de la micropropagation

Puisque le succès d'un protocole est lié au génotype de la plante (Zhang, J *et al.*, 2017), beaucoup de protocoles sont réalisés et diversifiés par rapport à : la stérilisation des graines, lever de dormance, l'explant choisi et les combinaisons hormonales nous ont mis en face d'une situation problème qu'est la réalisation de plusieurs tests pour obtenir un protocole de micropropagation de *Moringa oleifera* propre au génotype présent en Algérie.

La micropropagation nécessite plusieurs étapes, chacune d'elles nécessite ses propres exigences ; d'où la nécessité de tester plusieurs protocoles de stérilisation de graine et plusieurs méthodes pour la levé de dormance.

L'obtention d'une combinaison hormonale adéquate pour la micropropagation demande beaucoup d'effort, la diversité des explants ainsi que la présence d'hormones endogènes rends cette étape très compliqué à mettre au point (Kumar, N et Reddy, M. P 2011).

E. Les derniers résultats obtenus de la micropropagation

Toute à commencer par le concept de la totipotence des cellules végétales en 1902 avec l'évolution des techniques de culture *in vitro* ont engendré de nouvelles perspectives dans l'agriculture moderne entre autre la micropropagation.

Le type, l'âge, la position et le génotype de l'explant conditionnent la réussite du protocole de micropropagation ; prenant l'exemple l'étude réalisée par (Zhang, J *et al.*, 2017) qui ont testé plusieurs paramètres en utilisant les feuilles du *Moringa oleifera* comme explant, leurs résultats ont montré que l'orientation vers le milieu des extrémités distales des feuilles du génotype M-17 en son deuxième stade de développement étaient bien meilleurs.

Après la première application des TCL (Thin Cell-Layer) au tabac en 1943, et après 45 ans de leur utilisation dans la culture des tissus végétaux, il s'est avéré que les TCL sont des outils efficaces pour la culture *in vitro* de dizaines espèces végétales. Ils sont définis comme des couches de cellules végétales minces d'une épaisseur généralement de 0,5 à 1 mm. Les résultats d'une étude faite par Bhattacharyya, P *et al.*, 2018) sur l'orchidée médicinale *Dendrobium aphyllum* Roxb en

utilisant ce type d'explant ont confirmé son efficacité pour le développement d'un protocole de micropropagation rapide et stable pour une utilisation commerciale durable ainsi que la conservation des bio-ressources médicinales dans un laps de temps limité.

Non seulement le type du milieu de culture affecte les résultats de la micropropagation mais aussi la concentration de saccharose, il s'est avéré qu'elle a un effet. L'étude sur *Iris tingitana* par Taha, L *et al.*, (2019) a montré que le milieu de culture MS complété avec 30g/l de saccharose a favorisé la multiplication d'explants (bulbes) mais l'augmentation de la concentration de celui-ci à 90 ou 120 g/l a conduit au diamètre plus élevé des bulbes obtenus.

Dans la phase d'acclimatation (Di-Gaudio, A *et al.*, 2020) ont utilisé le système hydroponique dans leur protocole de micropropagation d'eucalyptus ce qui a permis d'obtenir des semis plus rapidement que les protocoles d'acclimatation classiques et avec un taux de réussite acceptable. Cette étude a ouvert une nouvelle stratégie pour améliorer la dynamique de production et mieux organiser la fabrication des semis.

II. Moringa oleifera : vertus et utilisations

Moringa oleifera est un arbre tropical originaire d'Inde et courant en Afrique à usages multiples servant de haie ou d'ombrage, parfois de plante médicinale ou alimentaire de cueillette. Cet arbre est passé en une décennie du statut de plante marginale, voire inconnue, à celui de nouvelle ressource alimentaire et économique pour les pays du Sud. Le Moringa connaît aujourd'hui un intérêt grandissant au niveau mondial, en raison de ses vertus exceptionnelles environnementales, médicinales, industrielles et nutritionnelles. Chaque partie de cette plante est utilisée pour différentes utilisations grâce à sa richesse exclusive des taux en protéines, lipides, acides aminés, calcium, magnésium, fer et des propriétés organoleptiques en fonction de son lieu d'origine.

1) Fiche technique de *Moringa oleifera*

A. Classification botanique

Règne	Plantae
Sous-règne	Tracheobionta
Division	Magnoliophyta
Classe	Magnoliopsida
Sous-classe	Dilleniidae
Ordre	Capparales
Famille	Moringaceae
Genre	<i>Moringa</i>
Espèce	<i>Moringa oleifera</i>

Moringa appartient à une famille monogénérique dont on connaît 14 espèces. Neuf d'entre elles sont africaines, deux malgaches, deux indiennes et une en Arabie. Les espèces les plus courantes sont: *Moringa oleifera*, *Moringa stenopetala*, *Moringa conxanensis*, *Moringa Drouhardii*, *Moringa Longituba* et *Moringa Peregrina* (Malo, T 2014).

B. Description botanique

Moringa est un arbre pérenne, à croissance rapide, qui peut atteindre 7 à 12 mètres de hauteur et dont le tronc mesure 20 à 40 cm de diamètre.

Tronc

Le tronc est généralement droit, mais il est parfois très peu développé. En général, il atteint 1,5 à 2 mètres de haut avant de se ramifier, bien qu'il puisse parfois atteindre les 3 mètres.



Figure 4 : le tronc de *Moringa oleifera*



Figure 5 : la feuille de *Moringa oleifera*

Feuilles

Les feuilles, alternes et bi ou tripennées, se développent principalement dans la partie terminale des branches. Elles mesurent 20 à 70 cm de long, sont recouvertes d'un duvet gris lorsqu'elles sont jeunes, ont un long pétiole avec 8 à 10 paires de pennes composées chacune de deux paires de folioles opposés, plus un à l'apex, ovales ou en forme d'ellipse, et mesurant 1 à 2 cm de long.

Fleurs

Les fleurs mesurent 2,5 cm de large et se présentent sous forme de panicules axillaires et tombantes de 10 à 25 cm. Elles sont généralement abondantes et dégagent une odeur agréable. Elles sont blanches ou couleur crème, avec des points jaunes à la base. Les sépales, au nombre de cinq, sont symétriques et lancéolés. Ils sont minces et spatulés, symétriques à l'exception du pétale inférieur, et entourent cinq étamines.



Figure 6 : la fleur de *Moringa oleifera*



Figure 7 : les fruits de *Moringa oleifera*

Fruits

Les fruits forment des gousses à trois lobes, mesurant 20 à 60 cm de long, qui dépendent des branches. Lorsqu'ils sont secs, ils s'ouvrent en trois parties. Chaque gousse contient entre 12 et 35 graines.

Graines

Les graines sont rondes, avec une coque marron semi-perméable. La coque présente trois ailes blanches qui s'étendent de la base au sommet à 120 degrés d'intervalle. Un arbre peut produire 15000 à 25000 graines par an. Une graine pèse en moyenne 0,3 g et la coque représente 25% du poids de la graine.



Figure 8 : les graines de *Moringa oleifera*



Figure 9 : la racine de *Moringa oleifera*

Racines

tubéreuses à odeur piquante caractéristique, dotées de racines latérales plutôt clairsemées.

Les arbres cultivés à partir de graines développent une profonde racine pivotante robuste avec un système à large diffusion composée d'épaisses racines latérales tubéreuses. La racine pivotante ne se développe pas sur les arbres reproduits à partir de boutures.

C. Origine et répartition

L'arbre *Moringa* (*Moringa oleifera* Lam.), originaire des frontières entre l'Inde, le Pakistan et le Népal, est largement cultivé dans d'autres parties des tropiques de l'ancien et du nouveau monde, notamment l'Asie, l'Afrique, l'Amérique du Sud et Centrale (Ravindra, C *et al.*, 2016). On le retrouve sur trois continents et dans plus de cinquante pays tropicaux et subtropicaux à saison sèche marquée, voir en zone aride (Afrique, Arabie, Sud-est asiatique, Iles du pacifique, Amérique du sud). Dans ces pays, il est utilisé comme plante médicinale et alimentaire (Malo, T 2014).

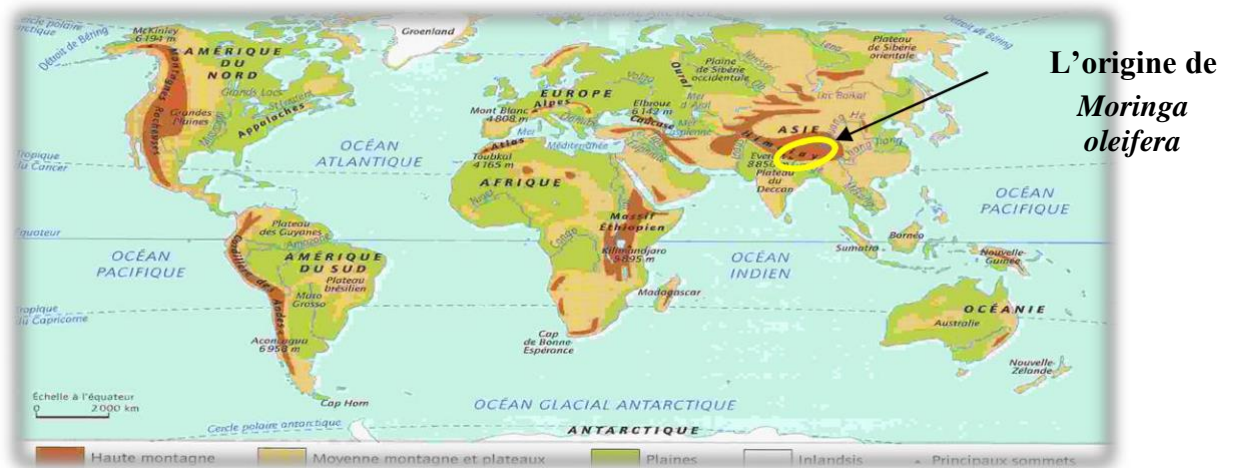


Figure 10 : Carte géographique montre l'origine de *Moringa oleifera*.

1. Ecologie : préférences et tolérances environnementales

Le *Moringa* peut se planter par semis, en repiquage, en plein champ ou encore par boutures. Le semis se fait à mi- ombre, en situation pas trop chaude après un trempage

des graines dans l'eau pendant 24 heures. Le taux moyen de germination est de 70% avec une durée de germination comprise entre 4 à 10 jours.

La croissance de l'arbre, la floraison et la production de fruits sont influencées par l'écartement entre les pieds et le mode de récolte des feuilles.

Le *Moringa oleifera* se développe en milieu aride ou semi-aride mais il peut se trouver aussi dans les zones très arides comme le Sahara et peut s'adapter aux différents types de sols.

Tableau 5 : Conditions requises pour la culture de *Moringa oleifera*.

Paramètre	Valeur/Fourchette
Climat	Tropical ou subtropical
Altitude	0-2000 m
Température	25-35°C peut vivre à 45° dans l'ombre
Pluviométrie	250 mm-2000 mm Irrigation nécessaire pour la production de feuilles si pluviométrie < 800 mm
Type de sol	Limoneux, sableux ou sablo-limoneux
pH du sol	Légèrement acide à légèrement alcalin (pH: 5 à 9)

2. Récolte et rendement

La récolte des graines se fait 2 fois par an en Avril-Mai et Septembre-Octobre ; lorsque les fruits deviennent bruns et secs par contre les feuilles peuvent être cueillies plusieurs fois dans l'année.

Le rendement est fortement influencé par la densité de semis, l'irrigation, la fertilisation, le traitement phytosanitaire et l'entretien de la culture.

L'irrigation goutte à goutte permet de doubler les rendements des variétés annuelles et un apport de 4 litres/jour permet d'augmenter les rendements de 57% par rapport aux plantations pluviales (Rajakrishnamoorthy *et al.*, 1994 cités par Rajangam, J *et al.*, 2001)

2) L'utilisation et le potentiel multidimensionnel de *Moringa oleifera*

A. Potentiel de bioremédiation

L'utilisation de *Moringa oleifera* comme purificateur d'eau a été une pratique courante pendant des décennies, et la recherche dans cette direction a révélé le potentiel important de bioremédiation de différentes composantes de l'Arbre.

L'activité coagulante de différents extraits et protéines purifiées a été comparée à celle du coagulant le plus couramment utilisé qui est le sulfate d'aluminium et par conséquent, l'utilisation de *Moringa oleifera* avec ces coagulants chimiques est encouragée pour les traitements de l'eau turbide (Pritchard, M *et al.*, 2010), ainsi que l'utilisation de ses extraits de fleurs pour la désinfection des déchets (Moura, T *et al.*, 2011).

Non seulement les graines pour lesquelles la plupart des articles (60 à 90%) rapportent pour l'élimination des métaux, mais aussi les feuilles, l'écorce et les gousses montrent la grande polyvalence de cette plante. L'écorce de *Moringa oleifera* peut être utilisée comme sorbent alternatif pour l'élimination des ions métalliques des eaux contaminées (Shinomol, G *et al.*, 2016)

Ces études mettent non seulement en évidence le potentiel de *Moringa oleifera* en tant que coagulant et biosorbent amical pour la bioremédiation de l'eau et les terres polluées, mais pour le développement de coagulants, de flocculants et de biosorbents commercialement viables pour l'assainissement des xénobiotiques.

B. Valeur nutritionnelle

Cette plante est unique comme il est très rare de trouver un profil nutritif aussi diversifié chez une seule espèce végétale (Razis, A *et al.*, 2014). Elle sert de complément alimentaire durable et économiquement sain, pour combattre la malnutrition, en particulier dans les pays en voie de développement. Il est également utilisé pour renforcer la sécurité alimentaire, favoriser le développement rural et soutenir des terres durables.



Figure 11 : Carte géographique du monde où se trouve le *Moringa oléifera*.

Les feuilles de la plante sont également significatives en termes de leur utilisation comme un supplément nutritionnel pour le combat de la malnutrition (Fahey, J. W 2005; Seshadri et Nambiar, 2003; Thurber et Fahey, 2009). Selon Botany of the Plant Industry ainsi que Trees of Life (une ONG), « les feuilles de *Moringa oléifera* possèdent : 4 fois plus de calcium et deux fois plus de protéines que le lait, 7 fois plus de Vit. C que les oranges, 3 fois plus de potassium et de fer que la banane et les épinards respectivement et 4 fois plus de Vit. A que des carottes (Thurber, M et Fahey, J 2009). Le tableau suivant montre la valeur nutritionnelle des feuilles de 100g de *Moringa oleifera*.

Tableau 6 : Représente les vitamines et les minéraux pour 100 gramme de feuilles de *Moringa oleifera*.

Vitamines and Minéraux	Feuilles fraîches	Feuilles sèches
Vitamin A	6.78 mg	18.9 mg
Thiamin (B1)	0.06 mg	2.64 mg
Riboflavin (B2)	0.05 mg	20.5 mg
Niacin (B3)	0.8 mg	8.2 mg
Vitamin C	220 mg	17.3 mg
Calcium	440 mg	2003 mg
Calories	92 cal	205 cal
Carbohydrates	12.5 g	38.2 g
Copper	0.07 mg	0.57 mg
Lipides	1.70 g	2.3 g
Fibres	0.90 g	19.2 g
Fer	0.85 mg	28.2 mg
Magnésium	42 mg	368 mg
Phosphore	70 mg	204 mg
Potassium	259 mg	1324 mg
Protéine	6.70 g	27.1 g
Zinc	0.16 mg	3.29 mg

L'utilisation de la poudre des feuilles de Moringa pour l'enrichissement alimentaire a été rapportée par de nombreuses études (Arise, A *et al.*, 2014; Haneen, M 2015; Abioye et Aka, 2015; Nour et Ibrahim 2016). Cependant, les protéines, les lipides et les minéraux contenus dans les graines de moringa ont été signalés significativement plus élevés que celles des feuilles de moringa (Gopalakrishnanb, L *et al.*, 2016).

Le tableau ci-dessous représente une étude comparative entre la qualité de la vitamine E, lipides et protéines dans les extraits des graines et des feuilles de *Moringa oleifera* d'île caribéenne (Jozef, F *et al.*, 2019).

Tableau 7 : La quantité de vitamine E, lipides et protéines dans les extraits des graines et des feuilles de moringa de l'île caribéenne.

	Vitamine E (mg/kg)	Lipides (%)	Protéines (%)
Feuilles	178.10 - 1.55	12.48 - 0.62	20.54 - 0.85
Graines	220.61 - 1.80	31.85 - 1.54	35.13 - 1.25

Le *Moringa oleifera* représente un cas exceptionnel dans le règne végétal, Elle contient tous les acides aminés essentiels en teneur équilibré, stable et dans un état biologiquement disponible pour l'Homme (Tableau 8). En rejetant l'hypothèse que les graines de soja sont la seule source des protéines végétales de valeur.

Tableau 8 : Acides aminés dans 100 grammes de feuilles séchées.

Acides amines (mg)	Poudre de feuille
Arginine	1325
Histidine	613
Isoleucine	825
Leucine	1950
Lysine	1325
Méthionine	350
Phénylalanine	1388
Thréonine	1188
Tryptophane	425
Valine	1063

C. Valeur pharmaceutique

Il ya déjà quelques siècles, l'utilisation de *Moringa oleifera* dans la médecine traditionnelle se basait essentiellement sur des qualités qui lui étaient bien propres (Ramachandran, C *et al.*, 1980). Parmi les vertus médicinales de cet arbre, on compte les activités : anti-inflammatoires, antimicrobienne et diurétiques, elles servent également d'antidote (émétique, purgative), stimulent tonique, vermifuge (médecine anthelminétique) aussi comme vésicant (Fatima *et al.* ,. 2014 ; Mehta, S *et al.*, 2011 ; Patel, J *et al.*, 2010). Populairement utilisé comme médicament pour l'anémie, l'arthrite,

les rhumatismes l'asthme, maux de tête et gencives endoloris... (Mehta, S *et al.*, 2011 ; Pandey, A *et al.*, 2012 ; Razis, A *et al.*, 2014).

Des études de désintégration ont montré que le taux proportionnel de la libération de médicaments peut être suivi par la variation de la concentration de gomme Moringa dans la formulation des comprimés (Basawaraj, S *et al.*, 2010; Panda, S *et al.*, 2008). L'efficacité de la gomme de *Moringa oleifera* a été évaluée par (Shah, D *et al.* 2011) et ont conclu que la gomme obtenue de cette dernière sert d'excellente source naturelle d'excipient pharmaceutique basé sur divers paramètres physico-chimiques. Ainsi, ses exsudats peuvent agir fortement en tant que substitut naturel non toxique des excipients toxiques et synthétiques, ce qui a permis l'amélioration de l'efficacité thérapeutique du médicament tout en gardant le taux de stabilité, de dissolution et de désintégration de celui-ci. Les dernières études sur cet arbre montrent ses innombrables conditions médicales de sa riche composition phytochimique, en voici les plus importantes:

1. Activité antioxydante

Des études *in vitro* et *in vivo* ont signalé des activités antioxydantes à partir des extraits de différentes parties de cet arbre miracle. La teneur élevée en phénolique y contribue c'est-à-dire les composés phénoliques stabilisent les produits radicaux dans les cellules en faisant un don ou en acceptant des électrons agissant comme antioxydants.

Ndhala, A *et al.* (2014) ont étudié les propriétés phytochimiques, les activités antioxydantes et antimicrobiennes de *Moringa oleifera* à partir de 13 différents cultivars à travers le monde. Il a été constaté qu'il avait différents profils de celles-ci : en Thaïlande, il était cinq fois plus fort dans l'inhibition de l'activité de récupération radicale DPPH par rapport à l'acide ascorbique.

2. Activité antivirale

Un extrait aqueux des feuilles de *Moringa oleifera* a activé l'immunité cellulaire chez les souris qui ont été infectées par le HSV-1 (l'herpès) en réduisant la concentration de virus et en limitant le développement de lésions cutanées herpétiques (Kurokawa, M *et al.*, 2016). *Moringa oleifera* a également montré l'inhibition contre le virus de la maladie du pied et de la bouche à des concentrations de 1–50 µg/mL (Younus, L *et al.*, 2016).

3. Activité antimicrobienne

Activités antibactériennes de différents composants de la plante, y compris les feuilles, les graines et les gousses ont été signalées contre plusieurs bactéries comme *E.coli*, *S.Streptococcus*, *V.cholera*... comme les entéropathogènes et les bactéries des plaies. Les extraits d'acétate, d'acétone et d'éthanol de graines *Moringa oleifera*, racines, feuilles et leur mélange, ont été évalués pour leur activité antibactérienne et antifongique dentaire.

L'extrait éthanoliques des feuilles de *Moringa oleifera* a été formulé dans le bain-bouche et le dentifrice, les résultats révèlent que le dentifrice a montré l'inhibition de *Streptococcus aureus*, *S. mutans*, et *C.albicans*, mais le bain-bouche n'a montré que l'activité antimicrobienne (Elgamily, H *et al.*, 2016).

4. Activité anti-inflammatoire

La réponse inflammatoire après l'administration d'un extrait des feuilles de *Moringa oleifera* a été observée sur les souris atopites dermatites et les kératinocytes humains (Choi, E *et al.*, 2016). Une étude comparative des effets anti-inflammatoires d'extrait de graines de moringa contenant de le moringa isothiocyanate-1 (MIC-1) avec un curcumoid enrichi d'extrait de curcuma, et la curcumine encore enrichie dans son phytochimique primaire. Les résultats montrent que l'extrait de graines de moringa et son isocyanate majeur MIC-1 présentaient de fortes propriétés anti-inflammatoires et antioxydantes *in vivo* et *in vitro*, ce qui est en fait des sources botaniques prometteuses pour l'atténuation des troubles chroniques (Asha, J *et al.*, 2017).

5. Activité cardio-protectrice

L'activité antioxydante de l'extrait butanolique des feuilles de *Moringa oleifera* a aidé à réduire la nécrose cardiaque et le stress oxydatif chez les rats induits par l'isoprotérenol (Panda, S 2015), l'activité cardio-protective des feuilles est médiée par ses effets de conservation antioxydante, antiperoxyatifs et myocardes. Abdulazeez, A *et al.* (2016) ont signalé que l'effet de tension artérielle des alcaloïdes et des flavonoïdes présents dans les graines et les feuilles est dû à leur effet inhibiteur sur les enzymes de conversion de l'angiotensine.

Randriamboavonjy, J *et al.*, (2016) font une autre étude sur des rats hypertendus spontanés en concluant que l'extrait des graines présentait des activités antifibrotiques et antihypertrophiques qui ont aidé à protéger la fonction cardiaque chez les rats d'hypertension.

6. Effet neuro-protecteur

Hannan, M. *et al.*, (2014) ont révélé que les feuilles exercent un effet neuro-protecteur en favorisant la survie et l'excroissance neurite. Des extraits de feuilles ont également signalé un effet protecteur contre la maladie d'Alzheimer en modifiant les niveaux de monoamine cérébrale et l'activité électrique (Ganguly, R et Guha, D 2008).

7. Régulation de la prolifération cellulaire

Basant sur des études antérieures (Al-Asmari, A *et al.*, 2015 , Nurul, A *et al.*, 2016), *Moringa oleifera* a été confirmé pour inhiber sélectivement la prolifération de différentes lignées cellulaires, y compris le cancer du poumon, carcinome hépatocellulaire humain, cancer du sein et cancer du côlon.

8. Traitement des troubles métaboliques

La présence d'insuline comme les protéines végétales dans des extraits des feuilles ont été récemment signalées pour le traitement du diabète (Paula, P *et al.*, 2016). Stohs et Hartman (2015), ont signalé la présence d'un nouveau composé : la niaziridine qui améliore l'absorption gastro-intestinale des vitamines et des nutriments.

9. Autre services publics et économiques

Outre les propriétés discutées ci-dessus, l'arbre est non seulement important à partir de perspectives médicinales et nutritionnelles, mais a également une vaste gamme d'autres potentiels utilitaires dans les services publics et économiques tels que la valeur des aliments pour animaux et comme une source de gaz naturel.

Récemment, les enzymes de coagulation du lait ont été purifiées et caractérisées à partir de graines et ont été employées avec succès dans la fabrication du fromage. En plus des utilisations culinaires, l'huile obtenue à partir des graines a également été utilisée comme : pansement des cheveux, fabrication de savon et de parfums. Le

tourteau de graine restant après l'extraction d'huile est couramment utilisé comme bio-fertilisant en raison de sa riche teneur en nutriments.

a) Le moringa comme source de biogaz

L'arbre a également été signalé comme une matière première efficace pour les biocarburants tels que le biogaz (Foidl, N *et al.*, 2001) et le biodiesel (Kafuku et Mbarawa, 2010; Rashid, U *et al.*, 2008). Les plantes de Moringa (âgés de 30 jours environ) sont broyées avec de l'eau, les fibres sont séparées par filtration sur des mailles de 5 mm, la fraction liquide est ensuite ajoutée à un réacteur à biogaz. Pour une alimentation moyenne de 5,7 g de matières solides volatiles, la production de gaz s'élève à 580 litres/kg de solides volatils. La teneur moyenne en méthane du gaz produit est de 81%.

b) Le moringa comme source de fourragère

Le Moringa est une source de fourrage particulièrement intéressante en terme économique qu'en termes de productivité, compte tenu des problèmes que connaissent les éleveurs dans la saison sèche. Il présente un avantage net de produire une grande quantité de matière fraîche à l'unité de surface par rapport à d'autres plantes fourragères.

Les excellentes qualités nutritives du Moringa font une source de fourrage de très bonne qualité et facilement accessible pour les bovins. La richesse des feuilles et des gousses en protéines, acides aminés, lipides et vitamine affecte positivement sur le rendement, la qualité et la quantité du lait en plus de la croissance des vaches laitières, chèvres et d'agneaux. Le coût de la production de bœuf et de la qualité nutritionnelle des rugosités ont été estimés comme optimal lorsque *Moringa oleifera* a été utilisé comme aliment, servant ainsi de fourrage économique pour les bovins (Foidl, N *et al.*, 2001; Roy, B *et al.*, 2016).

Un essai d'engraissement des bovins à l'aide de Moringa : Des essais ont été menés durant 35 jours avec un troupeau de 24 animaux.

Tableau 9 Gains de poids chez les bovins nourris à satiété pendant la nuit d'herbe de pâturage fraîchement coupé ou de Moringa haché pendant 35 jours.

Groupe	Gains (g/jour)	Gain moyen (g/jour)
Herbe (3 x 4 animaux)	750 – 980	950
Moringa (3 x 4 animaux)	1150 – 1450	1250

Le gain de poids est très supérieur dans le groupe expérimental nourri de Moringa par rapport au groupe témoin nourri d'herbe de pâturage (Tableau). Les autres conditions (sels minéraux, eau etc.) sont identiques pour les deux groupes.

3) Micropropagation et *Moringa oleifera*

Les terres cultivables et la nécessité de vastes superficies de terres agricoles pour la culture de masse de *Moringa oleifera* sont rares ce qui résultent des préoccupations majeures en raison de l'augmentation de la population et l'industrialisation, en plus la sensibilisation de cet arbre au gel et aux insectes comme les mouches et les pucerons rend presque impossible de le cultiver dans des terres ouvertes de zones tempérées (Fârster, N *et al.*, 2013).

L'un des principaux inconvénients qui freine habituellement la commercialisation de ces végétaux remarquable est les fluctuations dans les constituants métaboliques en raison de conditions environnementales incohérentes, les conditions de récolte et d'autres variations qui, à leur tour, provoque des difficultés dans la normalisation des formulations commerciales. En outre, la répartition géographique de l'arbre entraîne également des variations de caractéristiques génétiques en raison de différentes conditions climatiques (Bhatia, A *et al.*, 2013; Chatterjee, A *et al.*, 2010). Pour ces raisons et plus, l'homme a inventé les biotechnologies qui marquent de plus en plus leur présence au sein de nombreux secteur.

Prenant de plus en plus leur présence au sein de nombreux secteur et surtout dans le marché pharmaceutique et alimentaire, grâce à sa composition exclusive de divers métabolites, la production à grande échelle de *Moringa oleifera* est nécessaire en raison de son importance nutritionnelle et médicinale. Par conséquent, la micropropagation était une condition préalable essentielle à la propagation de l'arbre d'élite. Plusieurs recherches sont mises en place pour l'optimisation d'un protocole de la propagation *in vitro* de *Moringa oleifera*.

Le tableau ci-dessous résume 6 études pour mettre en évidence un protocole de micropropagation de *Moringa oleifera*.

Tableau 10 Un résumé de 6 références, les produits de stérilisation de graines, milieu de culture et le type d'explant choisi pour l'étude.

Référence	Stérilisation des graines	Milieu utilisé	Type d'explant
Eufrocino C. Marfori 2010	95% ethanol+ flambage 30 s. (gousse)	Murashige and Skoog (1962) (MS)	Vitroplants âgés de 4 semaines composés de 6 à 7 nœuds
R. K. Saini <i>et al.</i> , 2012	chlorure mercurique 0.1% hypochlorite sodium 20%		Segments nodals
J.A. Avila-Treviño 2016	Hi-cleen+ Tween 20 ethanol 70% l'eau de javel 10%	Murashige and Skoog (1962) (MS)	Tiges et feuilles
I. R. Ibrahim et S. K. M. Ameen 2017			Segments nodals
Zhang Jun-jie <i>et al.</i> , 2017	Ethanol 75% chlorure mercurique		Feuilles (stage2)
ZULALIYA JEMAL 2017	Ethanol 70% Hypochlorite de calcium (CaCl ₂ O ₂) 10%		L'extrémité des tiges
Suresh Chand, Ashu Pandey et Oshin Verma 2019	Solution tween-20 hypochlorite de sodium 20% ethanol 70% chlorure mercurique	Le milieu WPM	Segments nodals

Les combinaisons hormonales

Les combinaisons hormonales donnant des résultats optimales résumées dans le tableau ci-dessous.

La micropropagation se réalise en plusieurs étapes (chacune a ses exigences), la raison d'insister sur ces deux étapes (multiplication, enracinement) est la difficulté de déterminer la balance hormonale qui stimule l'organogénèse d'explant cultivé à son optimale. Basant sur les tableaux 10 et 11, on remarque que l'explant le plus utilisé pour la micropropagation de *Moringa oleifera* est le segment nodal. Le meilleur pourcentage de résultat de celui-ci est donné par la combinaison hormonale suivante :

multiplication avec 73.33% par WPM + 4.44 μ M BA; **enracinement** avec 86.6% WPM + 2.46 μ M IBA.

Par contre les feuilles ont donné le pourcentage le plus élevé avec **multiplication** de 93.33% et **enracinement** de 90% en employant ces combinaisons MS + 0,8 mg/L +BA, 0,2 mg/L+ KT + 0,05 mg/L NAA et MS avec 0,1 mg/L NAA.

Tableau 11 : Les compositions hormonales optimales.

	Multiplication	Enracinement
Eufrocino C. Marfori 2010	MS + 2,5 μ M BAP	MS + 0,5 μ M IAA MS + 0,05 μ M IBA
R. K. Saini et al., 2012	MS + 4.44 μ M	MS + 2,85 μ M IAA + 4,92 μ M IBA
I. R. Ibrahim et S. K. M. Ameen 2017	MS + 2 mg/L BA + 0.1 mg/L IAA	MS/2 + 1 mg/L IBA
J.A. Avila-Treviño 2016	Tige / feuille: MS + 1 mg/ L BA + 0,2 mg/ L AIA	
Zhang Jun-jie et al., 2017	MS+ 0,8 mg/L +BA, 0,2 mg/L+ KT + 0,05 mg/L NAA	MS + 0,1 mg/L NAA
ZULALIYA JEMAL 2017	MS+ 1,0 mg/l BAP + 0,5 mg/l IBA	MS + 0,25 mg/l NAA
Suresh Chand, Ashu Pandey et Oshin Verma 2019	WPM + 4,44 μ M BA	WPM + 2,46 μ M IBA

Difficultés liées à la micropropagation de *Moringa oleifera*

- La micropropagation de *Moringa* a besoin de multiples études pour qu'elle soit plus déterminée.
- Pour une micropropagation bien réussite de *Moringa oleifera*, il faut que le type : du milieu optimal, de la source des explants et celui de la cytokinine soit également bien déterminé (Hassaein, A et al., 2019).
- La détermination du type des régulateurs de croissance est nécessaire afin de stimuler l'organogénèse de l'explant cultivé *in vitro* pour l'établissement du protocole de culture tissulaire (Parzymies, M et Dabsk, M 2012).

- La variation du génotype de la plante est liée au succès d'un protocole donné de la micropropagation (Zhang, J *et al.*, 2017) .
- A partir d'un matériel végétal cultivé *in vitro*, on obtenait des explants bien meilleurs que d'autres obtenus à partir de semis de culture du sol. Les variations dans la production et les valeurs nutritionnelles ont été entraînées par les variations génotypiques et phénotypiques à partir d'arbres propagés par les graines (Riyadhong, T *et al.*, 2010 ; Salem, J 2016).
- L'application des techniques *in vitro* étant des outils efficaces de micropropagation végétative du Moringa est retardée par la vitrification et la variation somaclonale (Hassanein, A. M *et al.*, 2008 ; Mirzai, F *et al.*, 2015; Salem, J 2016, Hassanein, A *et al.*,2018).
- La réponse de différents types d'explant à la même condition de culture varie en raison de la différence dans les hormones végétales endogènes qu'ils possèdent (Kumar, N et Reddy,M. P 2011).

1) Matériel végétal :

Un nombre de 176 graines de *Moringa oleifera* ont été testé *in vitro* pour leur aptitude à germer, ces graines sont issues d'une sélection du laboratoire GBBV (Génétique Biochimie et Biotechnologie végétale) à l'Université des Frères Mentouri Constantine 1, où l'expérience a été réalisée.

Pour se faire les graines ont été débarrassées de leurs parois externes puis confrontées à différents modes de scarification et de stérilisation.

2) Mise en place pour la germination *in vitro* :

La graine désigne l'organe de dissémination de la plante provenant de la maturation de l'ovule fécondé, une semence. Une graine est une structure unitaire de dissémination contenant un embryon, des substances de réserve et protégée par un ou plusieurs téguments.

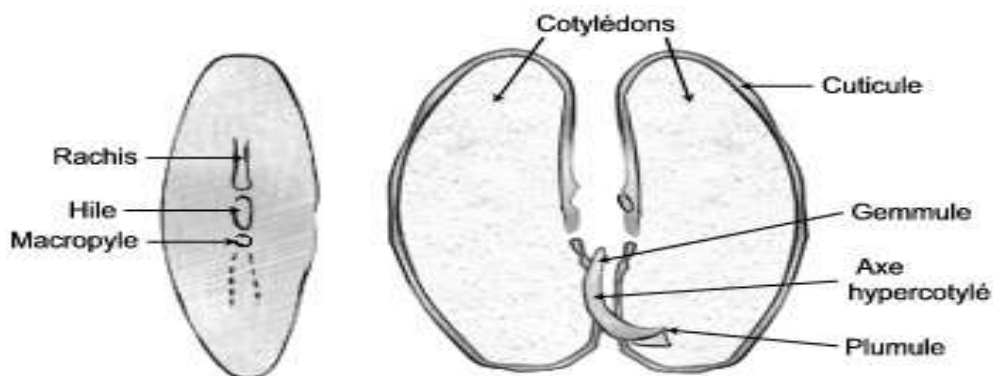


Figure 12 : Schéma descriptif de la graine.

La classification des graines se fait en fonction de plusieurs critères :

- La teneur en eau : il ya les graines sèches (céréales) et les graines aqueuses (fruits des arbres, légumes).
- La proportion et la répartition des tissus : il ya les graines à périsperme (betterave), les graines à albumen (blé) et les graines sans albumen ou exalbuminées (haricot).
- L'enveloppe : il ya : les graines nues (haricot), fruits simples nus (blé), fruits simples vêtus (avoine) et fruits composés (betterave).

a) Définition de la germination

La germination est définie comme une phase transitoire entre le stade de la graine sèche et l'apparition de la radicule (Bewley, J et Black, M 1994). Cette phase nécessite en premier lieu l'imbibition des tissus. Si les conditions physiologiques sont favorables (absence de dormance primaire) ainsi que les conditions environnementales (disponibilité en oxygène, température adéquate), la germination est possible.

b) Les étapes de la germination

Il est possible de suivre cette phase par mesure de la prise d'eau des graines. On distingue alors trois étapes :

- ✓ La première correspond à une imbibition rapide au cours de laquelle les tissus se réhydratent rapidement. Cette étape est marquée par une forte reprise de l'activité métabolique. Les structures et les enzymes nécessaires à cette reprise d'activité sont supposées avoir résisté à la déshydratation et être présentes dans les graines sèches (Bewley, J 1997).
- ✓ La deuxième étape se caractérise par un ralentissement de la prise d'eau et de l'activité respiratoire. C'est à ce stade que se préparent les événements métaboliques associés à l'allongement de la radicule. L'émergence de la radicule clôt cette deuxième étape et coïncide avec la perte de la tolérance à la dessiccation.
- ✓ La troisième et dernière phase correspond à l'allongement de la radicule, une nouvelle absorption d'eau et une intensification de l'activité respiratoire due à la biogénèse de mitochondries. Cette dernière phase, dite de croissance, amorce la mobilisation des réserves et le développement de la plantule ; elle n'est pas considérée comme faisant partie de la germination au sens strict Figure 13.

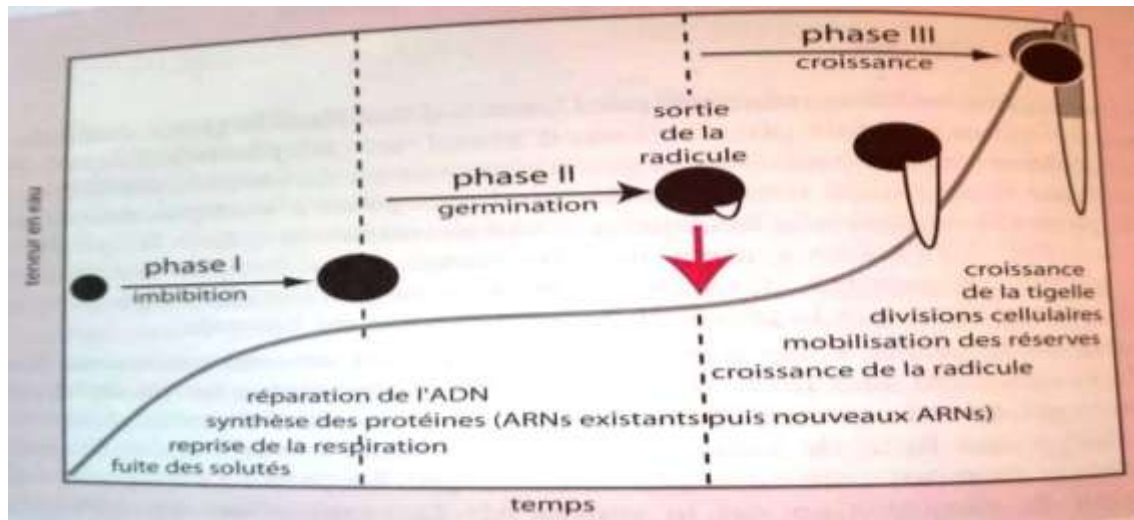


Figure 13 : Evolution de la teneur en eau et les événements métaboliques associés à la germination des graines.

c) L'importance de la germination

La graine n'est germée que lorsque la radicule est percée et ceci n'est possible que dans la présence d'eau et d'oxygène permettant par la suite l'activation des processus respiratoires et mitotiques. La bonne absorption d'eau par la graine rend mobile et active les phytohormones hydrosolubles en stock dans la graine en résultant une forte activité métabolique, où les réserves de la graine sont transformées pour qu'elles soient utilisées par la plantule. Ce qui reflète la relation positive entre la germination et la croissance de la plante (Nicholas, K ; Peter, C 2019). Donc le succès des plantes est lié au contrôle de la germination en réponse aux conditions environnementales (Wang, L *et al.*, 2018).

d) Méthodes de levée la dormance et stérilisation des graines :

i. Définition et méthodes de levée de dormance :

La dormance est une caractéristique spécifique des graines qui peut se définir comme le blocage de la germination d'une graine intacte et viable malgré les conditions environnementales favorables (Finch, S et Leubner, M 2006). C'est un état physiologique durant lequel les fonctions biologiques de la plante sont ralenties avec un processus régulé par les hormones végétales en particulier par l'acide abscissique. La dormance peut concerner la graine ou les bourgeons (Hilhorst 2007). Lorsque l'inaptitude à germer est due à une cause interne de la graine, elle est dite en dormance ; la dormance peut être due :

- À l'**embryon**, ce qui permet d'anticiper l'arrivée des conditions extérieures défavorables à la plantule, fragile, ne pourra pas survivre.
- Au **tégument**, c'est-à-dire l'enveloppe de la graine, qui constitue une barrière (physique et chimique) empêchant l'embryon d'avoir accès à l'eau et à l'oxygène pour se développer (Soltner, 2001).

Il ya 3 méthodes pour lever la dormance : physique, chimique et mécanique

- ✓ **Méthodes physiques** : se sont des prétraitements destinés à lever la dormance tégumentaire ou embryonnaire ; pour les rendre perméables sans les endommager, soit avec le trempage des graines dans l'eau froide du robinet ; puis, les placer à une température ambiante pendant 24 à 48 heures (Wahbi, L *et al.*, 2010). Soit avec le trempage des graines dans l'eau bouillante (100°C), puis les laisser (environ 12h) jusqu'au retour à la température ambiante (Wahbi, L *et al.*, 2010).
- ✓ **Méthodes chimiques** : se sont des prétraitements destinés à lever la dormance tégumentaire ou embryonnaire par le contact des graines : avec l'acide sulfurique (96% à 98%) pendant 15 minutes, puis les laver à l'eau (Hiltner, 1902) ; ou dans une solution de 100 ppm avec l'acide gibbérellique pendant 24h (Côme et Corbineau, 1984).
- ✓ **Méthode mécanique** (scarification) où les graines sont frottées pour réduire l'épaisseur du tégument (Deymie 1984).

Pour lever la dormance des graines de *Moringa oleifera*, on a utilisé 2 méthodes séparément : d'une part, la scarification (méthode mécanique) ; d'autre part, le trempage dans l'eau pendant 24h (méthode physique).

- **Scarification** : c'est la méthode la plus directe qui consiste à couper, percer ou limer le tégument de chaque graine avant d'être semis, afin d'y faire un petit trou. 48 graines de *Moringa oleifera* sont traitées par cette méthode.
- **Trempage dans l'eau** : c'est un traitement choisi pour traiter 42 graines, par voie humide, qui permet de combiner les effets du ramollissement des téguments durs et du lessivage des inhibiteurs chimiques.

ii. Protocole de stérilisation des graines :

Deux séries d'expérimentation pour la stérilisation des graines de *Moringa oleifera* ont été réalisées :

❖ **La première série avec un seul protocole :**

Après décortication de 40 graines, ces dernières, ont été lavées 3-4 fois par l'eau distillée. Ensuite tremper pendant 15 min dans une solution de 0,1% (v/v) de tween-20 (détergent non ionique), suivies par la solution 20% d'hypochlorite de sodium puis rincer pendant 1 min par l'éthanol 70%. 3 rinçages à l'eau distillé est obligatoire avant de les tremper pour une dernière fois dans une solution de 0.1% de chlorure mercurique pendant 20 mn. Plusieurs rinçages à l'eau distillé stérile est obligatoire avant la mise en culture.

Le chlorure mercurique un composé chimique $HgCl_2$ est l'une des formes les plus toxiques du mercure. Donc, il faut faire très attention lors de leur de la préparation de son solution et leur utilisation pour la stérilisation chimique.

❖ **La deuxième série avec trois protocoles de stérilisation :**

➤ **Protocole I : stérilisation par l'hypochlorite de calcium**

La surface de 45 graines décortiquées a été stérilisée par l'éthanol 70% pendant 9 min. Puis, dans la solution de 10% d'hypochlorite de calcium $Ca(ClO)_2$ pendant 30 mn. Ensuite, les graines ont été rincées par l'eau distillée stérile plusieurs fois (Jemal, Z 2017).

➤ **Protocole II : stérilisation par combinaison de chlorure mercurique et l'hypochlorite de sodium**

Après la décortication de 43 graines, elles ont été stérilisées par immersion dans 0,1% de chlorure mercurique (w/v) pour 2 min ; puis, dans la solution de 20 % d'hypochlorite de sodium (v/v) pour 10 min, suivi de plusieurs rinçage à l'aide d'eau distillée stérile (Saini, R *et al* 2012).

➤ **Protocole III : stérilisation par chlorure mercurique**

Après avoir enlevé l'enveloppe de 49 graines, la stérilisation des graines est commencée par l'éthanol 75% (5 secondes). Puis, par la solution de 0.1% de chlorure mercurique, pendant 15 min, suivit par plusieurs rinçages à l'eau distillée stérile (Zhang, J *et al* 2017).

Trois prétraitements de germination ont été étudiés :

- Le trempage des graines dans l'eau pendant 24h.
- La scarification des graines ainsi que.

- L'influence de la lumière.

Un essai de 3 protocoles de stérilisation est fait avec les trois prétraitements de graines et le témoin.

Tableau 12 : Récapitulatif de l'essai.

Protocole 01						Protocole 02						Protocole 03					
Témoin		Scarifiée		Trempee		témoin		Scarifiée		trempee		Témoin		Scarifiée		trempee	
obs	Lum	Obs	lum	Obs	Lum	obs	lum	obs	lum	obs	lum	obs	lum	obs	Lum	obs	lum
	7	7	8	8	7	6	7	8	7	8	7	8	8	7	8	8	7

e) Stérilisation et préparation du plan de travail

- ✓ Avant chaque manipulation (de préférence avant un jour), tous les instruments doivent être mis à l'étuve pour une stérilisation à sec à une température de 180°C pendant deux heures de temps. Les instruments métalliques (pinces, scalpels) enrobés avec du papier d'aluminium par contre les verreries (becher, plaques) sont enrobés avec du papier journal deux fois. Ainsi, il faut préparer des bocaux d'eau distillée stérile.

Au moment de la manipulation, toutes les précautions sont prises pour ne pas introduire de bactéries ou de moisissures dans le flacon.

- ✓ La hotte à flux laminaire qui est le plan de travail est désinfectée à l'eau de javel, sans oublier les paillasses, le bec bunsen, sol... Ensuite, on allume le bec bunsen et la hotte pendant 30 minutes avant manipulation.
- ✓ Eviter les courants d'air.
- ✓ Les manipulations se font toujours près d'une flamme (bec Bunsen) qui crée une atmosphère stérile dans un rayon d'environ 15 cm.
- ✓ Le matériel végétal à cultiver doit être manipulé avec des instruments stériles.
- ✓ Au cours de la manipulation, on stérilise les instruments par l'alcool 70%. Puis, les faire passer à la flamme du bec bunsen. Les flacons doivent être placés le plus près possible de la flamme ainsi que leur encolure.

f) Stérilisation du milieu de culture

Le milieu Murashige et Skoog (1962) (MS) a été utilisé tout au long d'expérimentations de recherche. Pour préparer un litre de milieu MS, dans une erlenmeyer d'un litre on verse approximativement 600 ml d'eau distillée stérile puis 50ml de macro-

éléments, 10ml de micro-éléments, 10ml de vitamines, 0.1g de myo-inositol ensuite on mesure le Ph de la solution et on l'ajuste à 5.8 à l'aide de solution de soit NaOH 1N ou bien HCl 1N en s'assurant la stabilité de la valeur désirée et on ajoute 30g de saccharose et 8g d'agar et on ajuste le volume à 1 litre puis on chauffe le milieu. On partage le milieu dans les tubes de façon chaque tube contient environ 15ml et on les stérilise à l'autoclave durant 20 min à 15lb de pression (121C°) ensuite on les laisse refroidir pour faire la mise en culture

3) Paramètres étudiés :

a) **Temps nécessaire de germination**

Le temps nécessaire pour l'émergence de la radicule.

b) **Taux de germination**

Une graine est considérée germée lorsqu'il y a eu émergence de la radicule. En effet, le taux de germination est calculé par la formule suivante :

$$\text{taux de germination en \%} = \frac{\text{Nombre de graines germées}}{\text{Nombre de graines testées}} \times 100$$

c) **Vitesse de germination**

Elle permet d'exprimer l'énergie de germination responsable de l'épuisement des réserves de la graine. La vitesse de germination peut s'exprimer par la durée médiane de germination (Scott, D et al., 1984) ou par le temps moyen de germination (T₅₀) (le temps au bout duquel on atteint 50% des graines germées) (Come,D1970).

$$(T_{50}) = T_1 + (0.5 - G_1 / G_2 - G_1) \times (T_2 - T_1)$$

G1 = pourcentage cumulé des graines germées dont la valeur est la plus proche de 50% par valeur inférieure.

G2 = pourcentage cumulé des graines germées dont la valeur est la plus proche de 50% par valeur supérieure.

T1= le temps de la germination des graines dont la valeur est la plus proche de 50% par valeur inférieure.

T2= temps de la germination des graines dont la valeur est la plus proche de 50% par valeur supérieure.

d) Taux de contamination

Pour connaître l'efficacité du protocole de stérilisation employée, on doit calculer le taux de contamination.

$$\text{Taux de contamination en \%} = \frac{\text{Nombre de graines contaminées}}{\text{Nombre de graines testées}} \times 100$$

4) Micropropagation de *Moringa oleifera*

Afin de déterminer l'explant et la combinaison hormonale adéquate pour la micropropagation de *Moringa oleifera*, plusieurs types d'explants ont été testés sur différentes combinaisons hormonales.

Pour réaliser cette étape le milieu de travail (hotte à flux laminaire) doit être strictement stérile en évitant toute sorte de courant d'air.



Figure 14: Manipulation lors de la phase de la multiplication.

1. L'extrémité des tiges

La culture *in vitro* de l'extrémité des tiges peut être décrite comme la culture de la partie terminale (0,1-1,0 mm) d'une pousse comprenant le méristème (0,05-0,1 mm) ainsi que des feuilles

primordiales. Ce type d'explant excisé peut être cultivé aseptiquement sur un milieu nutritif simple solidifié d'agar et sous l'état approprié se développera directement dans une petite pousse feuillue ou plusieurs pousses. Alternativement, le méristème forme un petit cal sur lequel un grand nombre de shoot primordial se développera.



Figure 15 : La culture des extrémités des tiges.

Les extrémités des tiges des semis germés ont été excisées et cultivées sur le milieu MS avec 3% de saccharose (w/v) fortifié avec 0.5 mg/l NAA et solidifié avec 8 g/l, après ajustement du pH à 5,8. Trois explants cultivés sont mis dans chaque bocal de verre contenant 30 ml de milieu, et maintenus sous la lumière à 25 ± 2 ° C.

2. Le segment nodal

Le segment nodal est une partie de la plante d'où une ou plusieurs feuilles émergent, formant souvent un léger gonflement. Ce type d'explant été largement utilisé dans la culture *in vitro*.



Figure 16 : La culture *in vitro* des segments nodaux.

Pour étudier le développement de ce dernier, les segments nodaux ont été excisés et cultivés sur le milieu MS avec 3% de saccharose (w/v) et 2 mg/l BA+ 0.1 mg/l IAA mg/l NAA et solidifié avec 8 g/l après ajustement du pH à 5,8.

Les feuilles

L'organe responsable de la photosynthèse de *Moringa oleifera* été utilisé comme un explant pour l'induction du cal qui sera par la suite dirigé pour la régénération de la plante.

En étudiant son développement, 4 feuilles ont été cultivées par tube de verre contenant 30 ml de milieu de culture MS + 0.8mg/l



Figure 17 : La culture *in vitro* des feuilles.

BA+0.2g/l KT+0.05m/g NAA et 3% de saccharose, solidifié par 8g/l d'agar après l'ajustement du Ph à 5.8. Les cultures ont été maintenues sous la lumière à 25 ± 2 ° C.

I. Etude de la germination *in vitro* chez *Moringa oleifera*

1. Choix des graines

Le choix des graines a été effectué sur la base d’une sélection morphologique, les graines de grande taille et de couleur marron foncée ont fait l’objet de notre choix. En effet, plus la graine est grande et foncée plus le stade de maturité est avancé et plus le taux de la germination est important. Cela a été démontré par l’observation (Negi, S 1977), qui prouve qu’en plein de maturité, les graines de *Moringa oleifera* ont une coque brunes foncé et trigones d’environ 1 cm de diamètre, avec trois ailes de papier blanchâtres sur les angles.

2. Méthodes pour levée de dormance des graines

Les résultats de cet essai sont présentés dans les différents tableaux et figures qui suivent montrant les délais de levée, les graines germées et le taux de germination par traitement.

a. Test de germination préliminaire (sans-prétraitement)

Le tableau 13 et la figure 18 montre les résultats du test préliminaire de germination de *Moringa oleifera*

Tableau 13 : Les résultats du test préliminaire de germination de *Moringa oleifera*.

Jours	1	5	12	14	19
Graines germée	0	3	16	18	22
Taux de germination	0,00%	6,82%	36,36%	40,91%	50,00%

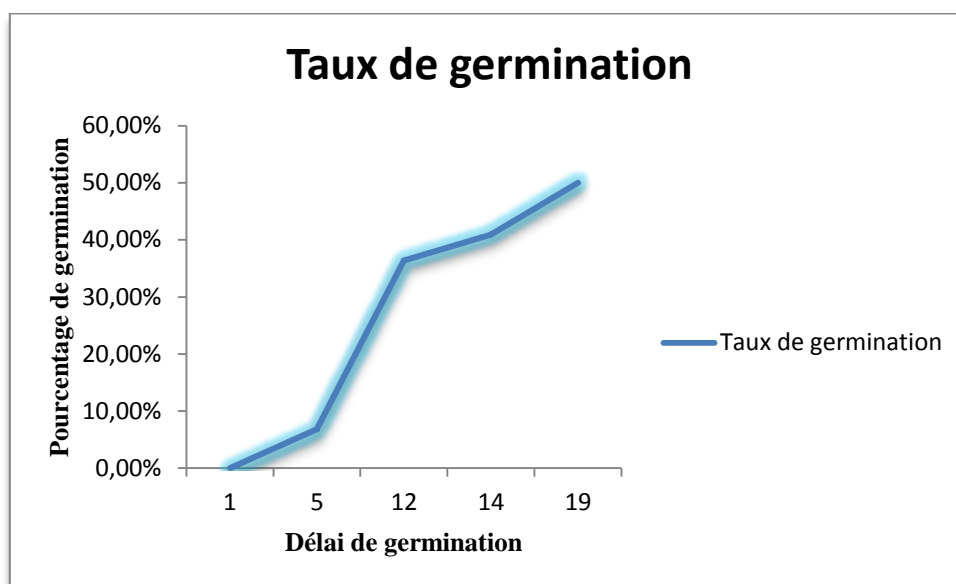


Figure 18 : Evolution du taux de la germination préliminaire.

Le semis des graines sans prétraitement donne un taux maximal de germination de 50%. On observe que la germination commence dès le 5^{ème} jour après semis avec 3 graines germées et un développement rapide entre le 5^{ème} et le 12^{ème} jour avec 36,36% de graines germées. Ensuite, il y a une diminution du rythme d'évolution pendant 2 jours entre 14 et 16 jours. Puis, il augmente de nouveau pour atteindre le taux maximal de 50% de graines germées après 19 jours de semis. La vitesse de la germination des graines préliminaire est de 0.19.

b. Test de germination des graines scarifiées.

L'utilisation de scarification comme un prétraitement pour lever la dormance des graines de *Moringa oleifera* donne un taux de germination maximal de 72,92 % avec une vitesse de germination de 7,30. Le tableau 11 montre les résultats du test préliminaire de germination des graines scarifiées de *Moringa oleifera*

Tableau 14 : Les résultats du test de germination des graines scarifiées de *Moringa oleifera*.

jours	0	5	12	14	19
Graines germées	0	6	28	29	35
Taux de germination	0,00%	12,50%	58,33%	60,42%	72,92%

Six graines scarifiées commencent à germer le 5^{ème} jour de semi avec un taux de 12.5 %. Le pic de germination se fait entre le 5^{ème} et le 12^{ème} jour avec 28 graines. Puis, on remarque qu'elle ralentit entre le 12^{ème} et le 14^{ème} jour avec 29 graines germées et reprend de nouveau son rythme dans les 5 derniers jours de l'expérimentation Figure 19.

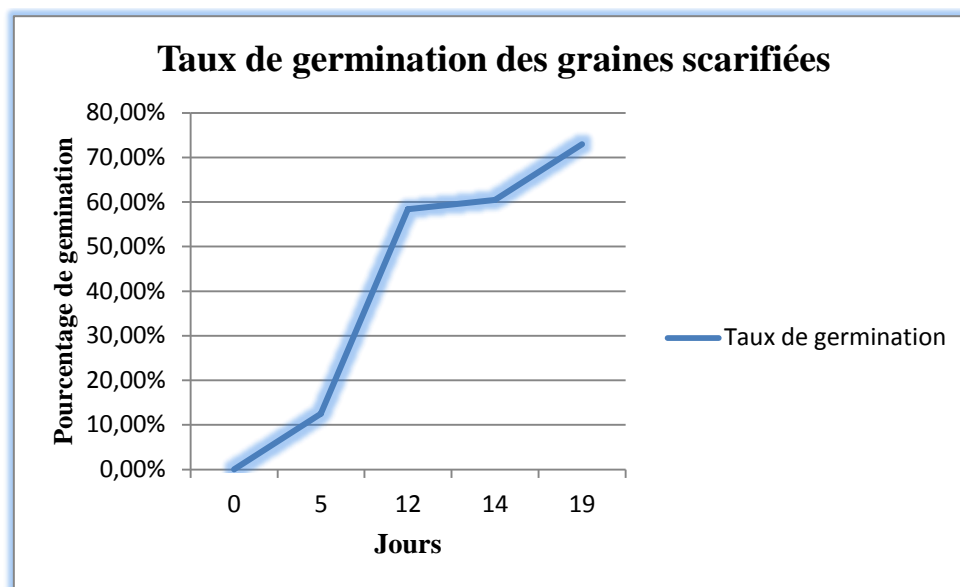


Figure 19 : L'évolution du taux de germination des graines scarifiées.

c. Test de germination des graines trempées dans l'eau pendant 24h

Le tableau suivant résume les résultats de la germination des graines trempées :

Tableau 15 : La germination des graines trempées pendant 24 h.

jours	0	5	12	14	19
Graines germées	0	5	14	16	20
Taux de germination	0,00%	11,90%	33,33%	38,10%	47,62%

Le prétraitement de trempage des graines de *Moringa oleifera* dans l'eau pendant 24h résulte d'une vitesse de germination de 0.19. L'évolution de la germination commence par 11.90 % de graines germées le 5^{ème} jour ; et se développe rapidement pour atteindre le 12^{ème} jour 38.10 % de graines germées et arrive à un taux maximal de 47.62% après 19 jours de semi figure 20.

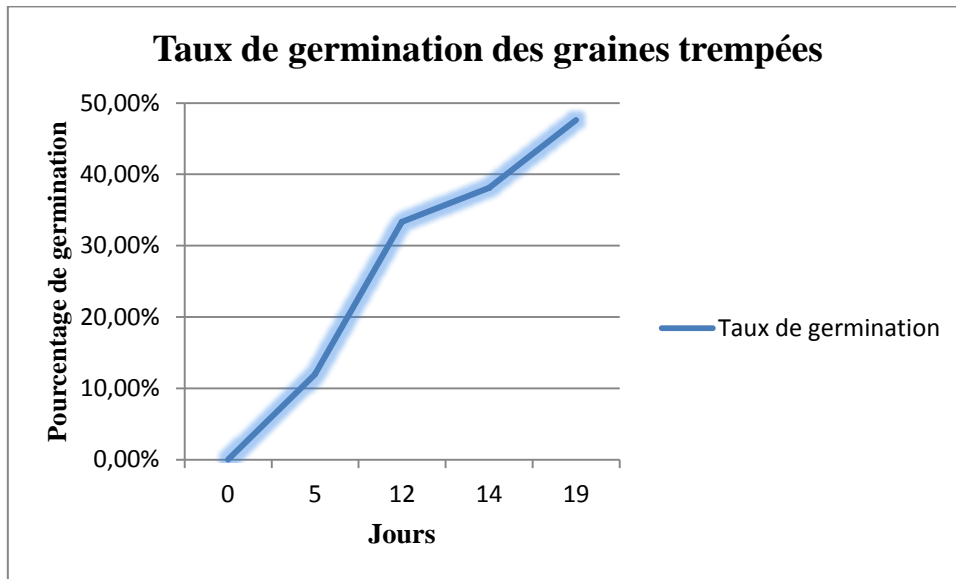


Figure 20 : L'évolution du taux de germination des graines trempées dans l'eau pendant 24h.

En comparant les résultats des trois méthodes testées pour lever la dormance des graines de *Moringa oleifera* il s'est avéré que la scarification donne le pourcentage de germination le plus élevé avec 72.92% suivi par les graines non traitées avec 50% et les graines trempées avec 47.62% figure 21.

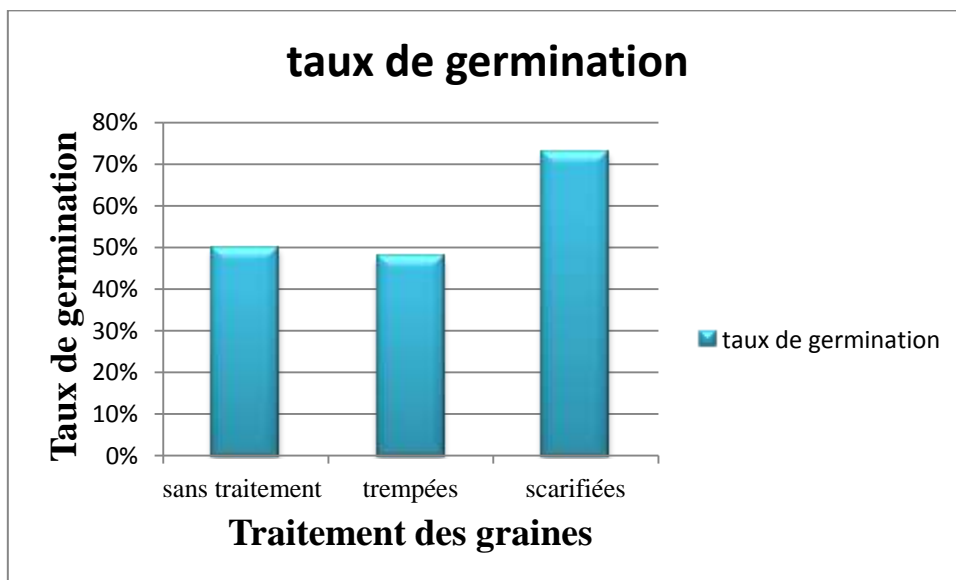


Figure 21 : Comparaison entre les méthodes de levé la dormance des graines de *Moringa oleifera*.

3. Méthode de stérilisation des graines

a. Test de germination du protocole de stérilisation I

La vitesse de germination en utilisant la stérilisation avec l'hypochloride de sodium est de 0.30. Le tableau suivant résume les résultats de la germination des graines stérilisées par l'hypochlorite de calcium.

Tableau 16 : La germination avec le premier protocole de stérilisation.

Jours	0	5	12	14	19
Graines germées	0	1	8	10	14
Taux de germination	0,00%	2,22%	17,78%	22,22%	31,11%

L'évolution de germination lors de l'utilisation du premier protocole de stérilisation débute par une seule graine germée donc un taux très faible de 2.22 % après 5 jours de semi. La germination augmente rapidement du cinquième au douzième jour avec 8 graines germées pour arriver à son taux maximal de 31.11% après 19 jours par rapport au début de l'expérience figure 22.

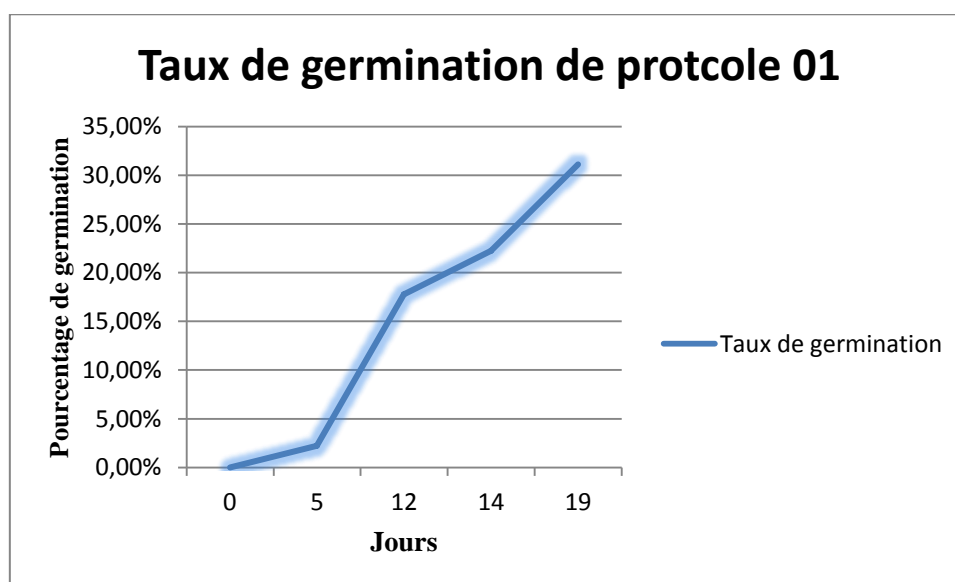


Figure 22 : L'évolution de la germination en utilisant le premier protocole de stérilisation.

b. Test de germination pour le protocole de stérilisation II

La vitesse de la germination en utilisant un protocole de stérilisation par combinaison de chlorure mercurique et l’hypochlorite de sodium est de 6.14. Le tableau suivant résume ces résultats :

Tableau 17 : La germination avec le deuxième protocole de stérilisation.

Jours	0	5	12	14	19
Graines germées	0	9	26	27	30
Taux de germination	0,00%	20,93%	60,47%	62,79%	69,77%

La germination en utilisant le 2^{ème} protocole de stérilisation a un taux maximal de 69.77% obtenu après 19 jours d’expérimentation. La germination a commencée par 9 graines après 5 jours de semi. Le pic d’évolution est entre le 5^{ème} et le 12^{ème} jour avec 60.47% de graines germées puis le rythme se stabilise figure 23.

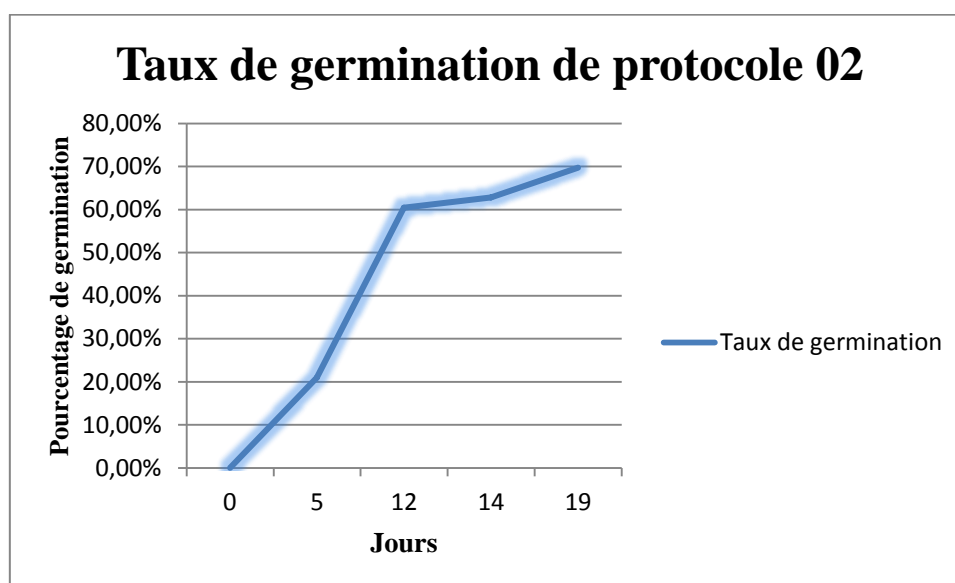


Figure 23 : L'évolution de la germination avec le deuxième protocole de stérilisation.

c. Test de germination du protocole de stérilisation III

La vitesse de la germination lors de ce protocole est de 6.13, le suivant résume les résultats de la germination des graines stérilisées par chlorure mercurique :

Tableau 18 : La germination avec le troisième protocole de stérilisation.

Jours	0	5	12	14	19
Graines germées	0	4	24	26	33
Taux de germination	0,00%	8,16%	48,98%	56,52%	67,35%

Le troisième protocole de stérilisation donne un taux de germination maximal de 67.35%. Le pic de l'évolution est entre le 5^{ème} et le 12^{ème} jour de semi avec 56.52% de graines germées. Le rythme, par la suite, diminue entre le 12^{ème} et le 14^{ème} jour avec 26 graines germées pour arriver à son maximum au 19^{ème} jour avec 33 graines germées

Figure

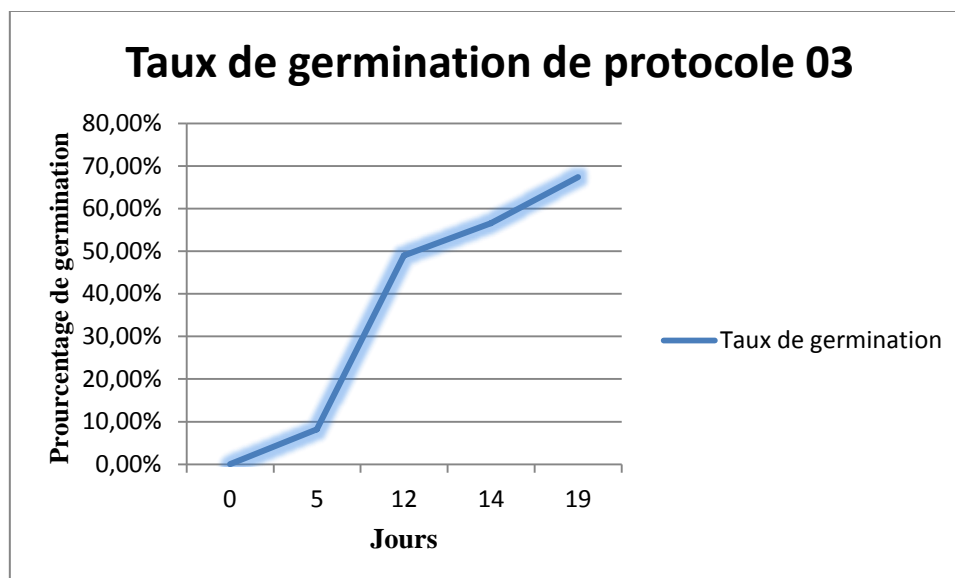


Figure 24 : L'évolution de germination du troisième protocole de stérilisation.

La comparaison de protocoles de stérilisation montre que la stérilisation par combinaison de chlorure mercurique et l'hypochlorite de sodium donne le meilleur taux de germination avec 69.77% figure 25.

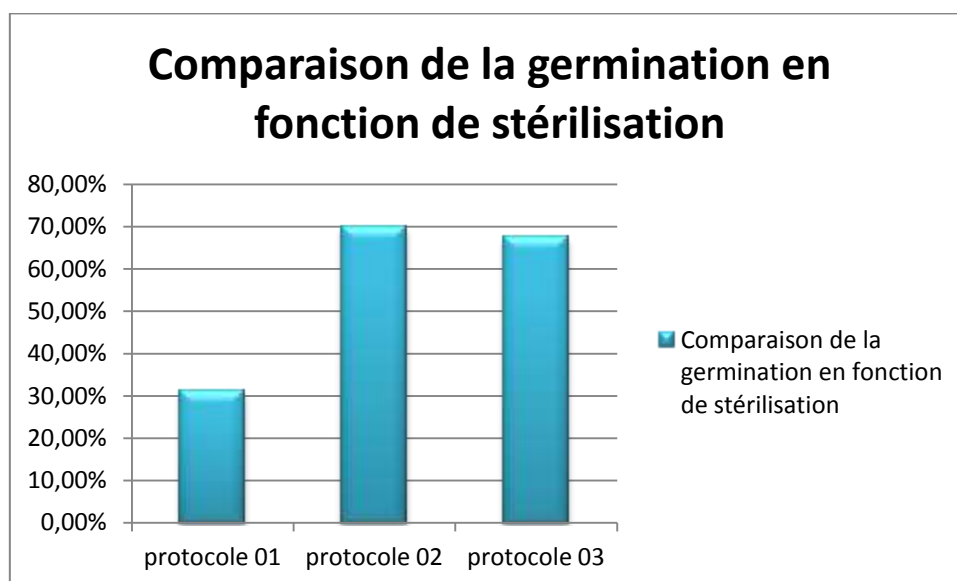


Figure 25 : Comparaison de la germination en fonction de protocole de stérilisation.

d. Taux de contamination de chaque protocole

On mesure l'efficacité d'un protocole de stérilisation par le taux de contamination. Le taux de contamination le plus élevé est celui du premier protocole de 68.88 %. Puis du troisième protocole avec un taux de 30.61 %. Et enfin celui du deuxième avec 13.95%. Donc le protocole le plus efficace est la stérilisation par combinaison de chlorure mercurique et l'hypochlorite de sodium figure 26.

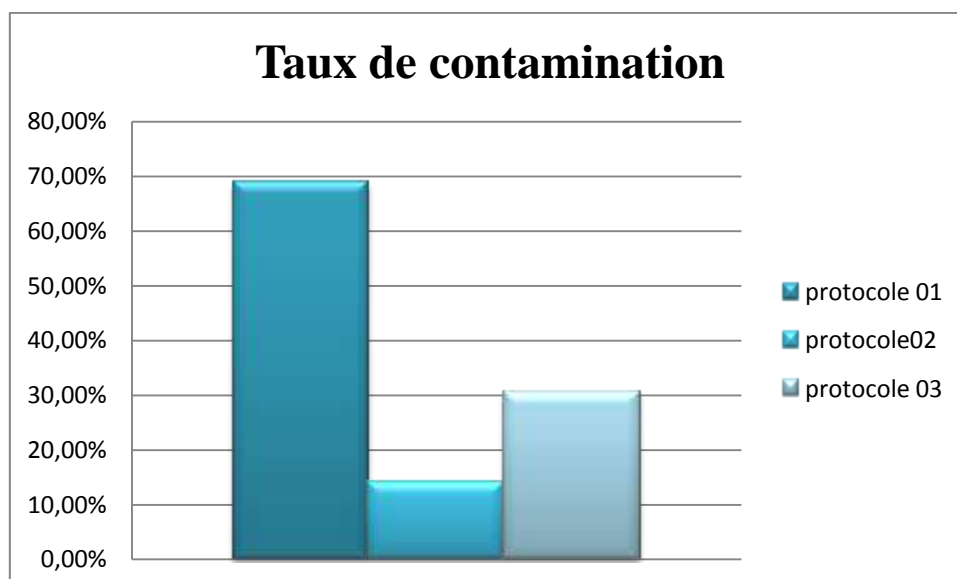


Figure 26 : Taux de contamination de chaque protocole.

4. Conditions lumineuses de germination

a. Test de germination en conditions lumineuses

Le tableau suivant résume les résultats de la germination en présence de la lumière :

Tableau19 : La germination en présence de la lumière.

Jours	0	5	12	14	19
Graines germées	0	8	33	34	36
Taux de germination	0,00%	11,59%	47,83%	49,28%	52,17%

En présence de lumière, on note que 8 graines germées après 5 jours de semi puis les graines de Moringa germent avec un taux moyen de 47.83% après 12 jours de semi ensuite le rythme se stabilise en valeur maximale de 52.17 % au 19^{ème} jour figure 27.

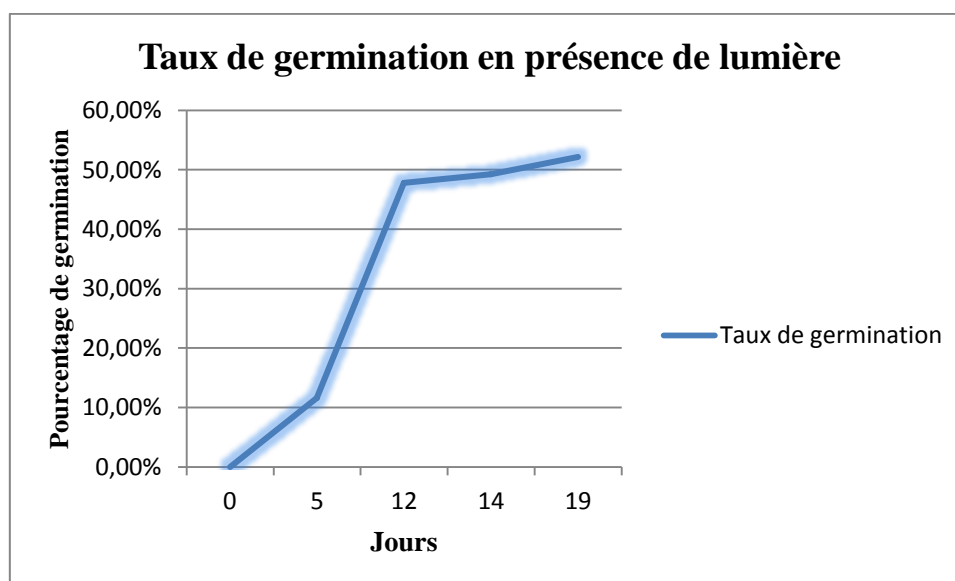


Figure 27 : Taux de germination en présence de lumière.

b. Test de germination en condition obscure

Le tableau suivant résume les résultats de la germination en absence de la lumière :

Tableau 20 : La germination en absence de la lumière.

Jours	1	5	12	14	19
Graines germées	0	6	25	29	41
Taux de germination	0,00%	8,96%	37,31%	43,28%	61,19%

A l'obscurité, on observe que la germination débute au 5^{ème} jour avec 6 graines germées et atteint au 12^{ème} jour un taux de 37.31% de graines germées. Puis, au jour 14 environ 43.28 %, pour arriver à son taux maximal de 61.19 % au jour 19 figure 28.

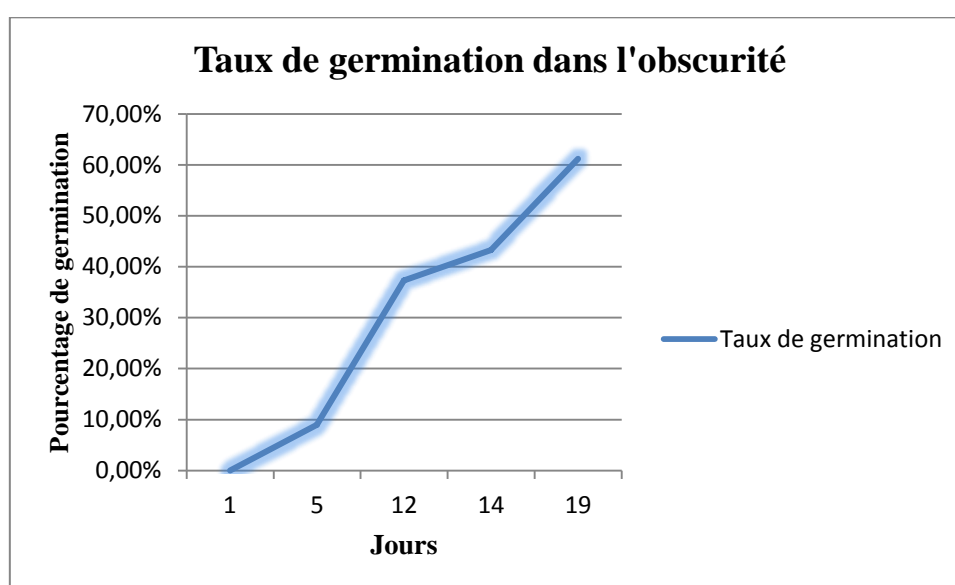


Figure 28 : Taux de germination dans l'obscurité.

En comparant la germination en fonction de la lumière on note que la germination est plus importante en absence de la lumière figure 29.

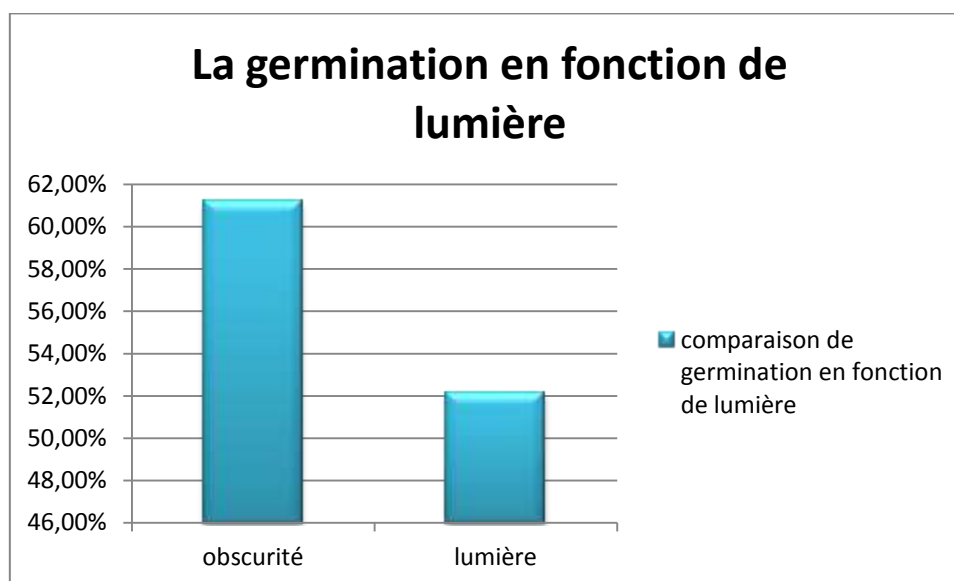


Figure 29 : Comparaison de la germination en fonction de lumière.

Discussion

Les graines de *Moringa oleifera* décortiquées, de l'écotype Algérien, ont été utilisées comme matériel végétal de départ. Pour la mise en évidence d'un protocole de micropropagation *in vitro* afin d'obtenir des explants bien meilleurs que ceux obtenus à partir de semis de culture du sol (Riyadhong, T *et al.*, 2010 ; Salem, J 2016). Donc étudier et améliorer leur germination l'étape qui conditionne le développement de la plante. Ce qui fait, c'est la reprise des activités de l'embryon comme étant un processus physiologique qui correspond à l'étape avec laquelle une semence en vie ralentie se réveille, et donne naissance à une plantule suite à des mécanismes de dormance étant libérés par des déclenchements appropriés (Seemanthine, B 1964 ; Leubner, G 2006). C'est un phénomène influencé par des facteurs aussi bien internes, qu'externes, notamment la lumière, la présence de l'eau, la température, la perméabilité des enveloppes de la graine, le génome, l'âge de la graine, la nature du substrat etc. (Seynes, J 2006). Etudier l'influence de l'un ou de ces paramètres revient à rechercher les conditions idéales d'une bonne germination (Kalinganire, A *et al.*, 2007). Plusieurs méthodes sont recensées pour le prétraitement d'une semence avant la germination, à savoir la scarification, l'imbibition, le trempage dans l'eau chaude etc. (FAO1992, Nambiar, V *et al.*, 2005).

Notre étude concerne trois facteurs essentiels notamment la scarification des graines, le trempage dans l'eau, pendant 24h, et l'influence de la lumière, qu'elle est faite sur des graines décortiquées.

Dans notre étude, les résultats obtenus ont été en faveur de la scarification avec un taux de 72.92% suivi par le trempage dans l'eau avec 47.62%. Cette différence s'explique par l'exposition directe de la graine au milieu de culture mène à l'augmentation de l'absorption d'eau par ses téguments. Le résultat obtenu sont en accord avec ceux obtenus par Quashie, M *et al.*, (2009) qui ont trouvés que l'amélioration de la germination était due à la fragilisation des téguments et les rendant ainsi perméables. L'activité hormonale intense des téguments de la graine décortiquée inhibe sa germination Njehoya, C *et al.* (2014).

Concernant l'effet de la lumière, la germination des graines *Moringa oleifera* en est influencée, c'est-à-dire les résultats ont montré qu'en présence de la lumière, le taux de germination est de 52.17 %. En absence de celle-ci, le taux est de 61.19 %. Alors, même si la lumière favorise une germination précoce, ce sera une question de vitesse vis-à-vis au temps. Ce qui a été prouvé par Quashie, M *et al.*, (2009) que le taux de germination *in vitro* ou en serre est moins conséquent en présence de la lumière que celui obtenu à l'obscurité.

Quelque soit le traitement de la graine, l'évolution de la germination est importante entre le 5^{ème} et le 12^{ème} jour. Elle ralentit pendant 2 jours. Puis, reprend le rythme du 14^{ème} au 19^{ème} jour.

La comparaison des taux de contamination montre que le protocole 02 est le plus efficace avec un taux de contamination de 13.95 %. Ce qui est similaire avec les résultats de Saini, R *et al.*, (2012).

L'étude de la germination *in vitro* des graines est une étape cruciale pour la mise en évidence d'un protocole de micropropagation *in vitro* de *Moringa oleifera* sur le génotype Algérien. Même si le début de la germination est marqué le 5^{ème} jour il ya une hétérogénéité de résultats, due de l'interaction de différent paramètres.

Le 2^{ème} protocole de stérilisation (stérilisation avec une combinaison de chlorure mercurique et l'hypochlorite de sodium est le plus efficace ce qui est prouvé par les taux de contamination de 13.95%, comme il a un impact positive sur la germination prouvé par le taux le plus élevé de 69.77 %.

La germination rapide des graines scarifiées révèle que la scarification est le meilleur prétraitement pour favoriser l'absorption de l'eau par les téguments.

Le délai de cette germination est contrôlé par la lumière vis-à-vis de l'obscurité qui la rend plus rapide.

Perspectifs

Moringa oleifera est une plante incroyable avec énormément de vertus, considérée comme une réelle opportunité pour améliorer la santé et réduire la malnutrition dans les communautés pauvres.

Savoir micropropager cette plante *in vitro* ouvert la porte à une multiple utilisation industrielle ce qui est le but de cette recherche, les différentes combinaisons hormonales utiliser dans cette étude ont été distinctes pour un explant donné donc changer une concentration ou une hormone donne différent résultats ce qui s'applique sur le changement des conditions de la micropropagation elle-même et de même les méthodes de lever la dormance des graines.

Liste de références bibliographiques

- [net1] Technivit laboratoire. L'historique de la culture in vitro page consulté le 17/06/2020 Adresse URL: <https://technivit.pagesperso-orange.fr/historique.htm>.
- [net2] <http://certoclav.com/de/support/knowledge/show/methodes-de-sterilisation-physiques-et-chimiques-1.htm> consulté le 15/06/2020.
- [net 3] <https://bitesizebio.com/853/5-laboratory-sterilisation-methods> consulté le 12/06/2020.
- [net4] <https://blog.vegenov.com/2020/03/culture-in-vitro-retour-aux-bases/> consulté le 10/06/2020.
- [net5] <https://www.cannaweed.com/guides/culture-avancee/experiences-articles-scientifiques-et-publications/rôle-des-hormones-sur-la-croissance-et-le-développement-r306/> consulté le 12/06/2020.
- [net6] <https://boowiki.info/art/techniques-botaniques/micropropagation.html> consulté le 21/06/2020.
- A.KALINGANIRE, A. UWAMARIYA, K. BREHIMA et M. LARWANOU, ICRAF et World Agroforestry Centre (2007a). 6-9
- Abdull Razis, A. F., Ibrahim, M. D., & Kntayya, S. B. (2014). Health benefits of *Moringa oleifera*. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*, 15(20), 8571-8576.
- Abdullah, E. N., HASSANEIN, A., SALEM, J., & FAHEED, F. (2019). Some important aspects in *Moringa oleifera* Lam. micropropagation. *Acta agriculturae Slovenica*, 113(1), 13-27.
- Abioye, V. F., & Aka, M. O. (2015). Proximate composition and sensory properties of moringa fortified maize-ogi. *J. Nutr. Food Sci. S*, 12, 1-4.
- Agnès B., Hélène R. et F. Louise. 2013. La culture *in vitro* en TPE. <http://culture-in-vitro-tpe.e-monsite.com/>
- Akossiwoa A. M., Yawa A. et Tchezoum. 2009. Étude de la germination de *Moringa oleifera* LAM», *Afrique Science*, Vol,5, N°3.
- Al Ameri, S. A., Al Shaibani, F. Y., Cheruth, A. J., Al-Awad, A. I., Al-Yafei, M. A., Karthishwaran, K., & Kurup, S. S. (2014). Comparative phytochemical analysis of *Moringa oleifera* and *Moringa peregrina*. *Pharmacologyonline*, 3, 216-21.

- Al-Asmari, A. K., Albalawi, S. M., Athar, M. T., Khan, A. Q., Al-Shahrani, H., & Islam, M. (2015). Moringa oleifera as an anti-cancer agent against breast and colorectal cancer cell lines. *PloS one*, *10*(8), e0135814.
- Arise, A. K., Arise, R. O., Sanusi, M. O., Esan, O. T., & Oyeyinka, S. A. (2014). Effect of Moringa oleifera flower fortification on the nutritional quality and sensory properties of weaning food. *Croatian journal of food science and technology*, *6*(2), 65-71.
- Avila-Treviño, J. A., Muñoz-Alemán, J. M., Pérez-Molphe-Balch, E., Rodríguez-Sahagún, A., & Morales-Domínguez, J. F. (2017). In vitro propagation from bud and apex explants of Moringa oleifera and evaluation of the genetic stability with RAMP marker. *South African Journal of Botany*, *108*, 149-156.
- B. SEEMANTHINE, South Indian horticulture, *12* (1964) 1-7.
- Basawaraj, S.P., Srinivas, R.S., Upendra, K., Prakassh, G.K., 2010. Evaluation of *Moringa oleifera* gum as a binder in tablet formulation. *International Journal of Research in Ayurveda and Pharmacy* *1*, 590-596.
- Bewley, J. D., & Black, M. (2013). *Seeds: physiology of development and germination*. Springer Science & Business Media.
- Bhattacharyya, P., Paul, P., Kumaria, S., & Tandon, P. (2018). Transverse thin cell layer (t-TCL)-mediated improvised micropropagation protocol for endangered medicinal orchid *Dendrobium aphyllum* Roxb: an integrated phytomolecular approach. *Acta Physiologiae Plantarum*, *40*(8), 137.
- Bretaudeau, A. (2006). Les techniques de culture in vitro et la micropropagation des espèces végétales. *IPR/Kolibougou Koulikoro BP*, *6*.
- Cézard, F. (2009). *Biotechnologies en 26 fiches*. Dunod.
- Chambon, M., Bailly, J. L., & Peigue-Lafeuille, H. (1999). Antiseptiques, désinfectants chimiques et virus en secteur médical. *Virologie*, *3*(5), 367-78.
- Chand, S., Pandey, A., & Verma, O. (2019). In vitro regeneration of Moringa oleifera Lam.: A medicinal tree of family Moringaceae. *Indian Journal of Genetics and Plant Breeding (The)*, *79*(3), 606-613.
- Changins, 2011. Des semences de pomme de terre in vitro à récolter en boîte de culture « Agrobox ».

- Choi, E. J., Debnath, T., Tang, Y., Ryu, Y. B., Moon, S. H., and Kim, E. K. (2016). Topical application of *Moringa oleifera* leaf extract ameliorates experimentally induced atopic dermatitis by the regulation of Th1/Th2/Th17 balance. *Biomed. Pharmacother.* 84, 870–877. doi: 10.1016/j.biopha.2016.09.085
- Come et Corbineau, 1984: Primary dormancy sets in during seed development
- Cornu, D., & Boulay, M. (1986). La multiplication végétative: techniques horticoles et culture in vitro. *Revue Forestière Française*.
- Demol J., Baudoin J.P. et B.P. Louant. 2008. Amélioration des plantes : application aux principales espèces cultivées en régions tropicales, Ed presse agronomique de Gembloux, la Belgique, p 581.
- Deymie, 1984: Factors affecting germination such as dormancy of germination capacity are basic quality traits
- Di-Gaudio, A. V., Tubert, E., Laino, L. E., Chaín, J. M., Pitta-Alvarez, S. I., Amodeo, G., & Regalado, J. J. (2020). A new and rapid micropropagation protocol for *Eucalyptus grandis* Hill ex Maiden. *Forest Systems*, Volume 29, Issue 1, eSC04.
- Elgamily, H., Moussa, A., Elboraey, A., EL-Sayed, H., Al-Moghazy, M., & Abdalla, A. (2016). Microbiological assessment of *Moringa oleifera* extracts and its incorporation in novel dental remedies against some oral pathogens. *Open access Macedonian journal of medical sciences*, 4(4), 585.
- ELKHIDIR, M., IBRAHIM, H. M., NOUR, M. O. M., IBRAHIM, A. O. S., & OSMAN, R. E. (2016). STUDIES ON ANTIMICROBIAL ACTIVITY AND SYNERGISTIC EFFECT OF *Jatropha curcas* L. AND *Moringa oleifera* LAM. *Journal of International Research in Medical and Pharmaceutical Sciences*, 19-27.
- Fahey, J. W. (2005). *Moringa oleifera*: a review of the medical evidence for its nutritional, therapeutic, and prophylactic properties. Part 1. *Trees for life Journal*, 1(5), 1-15.
- Fejér, J., Kron, I., Pellizzeri, V., Pľuchtová, M., Eliašová, A., Campone, L., ... & Konečná, M. (2019). First report on evaluation of basic nutritional and antioxidant properties of *Moringa oleifera* Lam. from Caribbean Island of Saint Lucia. *Plants*, 8(12), 537.

- Finch-Savage, W. E., & Leubner-Metzger, G. (2006). Seed dormancy and the control of germination. *New phytologist*, 171(3), 501-523.
- Foidl, N., Makkar, H. P. S., & Becker, K. (2001). The potential of *Moringa oleifera* for agricultural and industrial uses. *The miracle tree: The multiple attributes of Moringa*, 45-76.
- FOOD AND AGRICULTURAL ORGANIZATION, "Etudes FAO forêts 20/2" (1992).
- Förster, N., Mewis, I., & Ulrichs, C. (2013). *Moringa Oleifera*—Establishment and Multiplication of Different Ecotypes In Vitro. *Gesunde Pflanzen*, 65(1), 21-31. <https://doi.org/10.1007/s10343-013-0291-8>
- G. LEUBNER, "SeedBiology". Ed. University of Freiburg, Germany Seed Biology Place, (2006)
- Ganguly, R., & Guha, D. (2008). Alteration of brain monoamines & EEG wave pattern in rat model of Alzheimer's disease & protection by *Moringa oleifera*. *Indian Journal of Medical Research*, 128(6).
- George, K. S., Revathi, K. B., Deepa, N., Sheregar, C. P., Ashwini, T. S., & Das, S. (2016). A study on the potential of *Moringa* leaf and bark extract in bioremediation of heavy metals from water collected from various lakes in Bangalore. *Procedia Environmental Sciences*, 35, 869-880.
- Gopalakrishnan, L., Doriya, K., & Kumar, D. S. (2016). *Moringa oleifera*: A review on nutritive importance and its medicinal application. *Food science and human wellness*, 5(2), 49-56.
- Gopalakrishnan, L., Doriya, K., & Kumar, D. S. (2016). *Moringa oleifera*: A review on nutritive importance and its medicinal application. *Food science and human wellness*, 5(2), 49-56.
- Hannan, M.A., Kang, J.Y., Mohibullah, M., Hong, Y.K., Lee, H., Choi, J.S., Choi, I.S., Moon, I.S., 2014. *Moringa oleifera* with promising neuronal survival and neurite outgrowth promoting potentials. *J. Ethnopharmacol.* 152, 142-150.
- Hassanein, A. M., Ahmed, A. M., & Soltan, D. M. (2008). Study of somaclonal variation and gene expression as influenced by long term culture in sorghum. *Current Opinion in Biotechnology*, 4, 13-20.
- Hassanein, A.M., Salem, J.M., Faheed, F.A., & El-nagish A. (2018). Effect of anti-ethylene compounds on isoenzyme patterns and genome stability during

- long term culture of *Moringa oleifera*. *Plant Cell ,Tissue and Organ Cultutre*, 132(1), 201-212. <https://doi.org/10.1007/s11240-017-1326-0>
- Ibrahim, I. R., & Ameen, S. K. M. (2017). IN VITRO PROPAGATION OF MORINGA OLEIFERA. *The Iraqi Journal of Agricultural Science*, 48(4), 1089.
 - J. SEYNES (DE), "De la germination". Ed. Baillères J-B, (1863 R 2006).
 - Jaja-Chimedza, A., Graf, B. L., Simmler, C., Kim, Y., Kuhn, P., Pauli, G. F., & Raskin, I. (2017). Biochemical characterization and anti-inflammatory properties of an isothiocyanate-enriched moringa (*Moringa oleifera*) seed extract. *PloS one*, 12(8), e0182658.
 - Jaouadi, W., Hamrouni, L., Souayeh, N., & Khouja, M. L. (2010). Étude de la germination des graines d'*Acacia tortilis* sous différentes contraintes abiotiques. *BASE*.
 - Jemal, Z. (2017). Micro propagation of *Moringa oleifera* from shoot tip explants. *Published MSc thesis. School of Graduate Studies, Addis Ababa University, Ethiopia*.
 - Jun-jie, Z., Yue-sheng, Y., Meng-fei, L., Shu-qi, L., Yi, T., Han-bin, C., & Xiao-yang, C. (2017). An efficient micropropagation protocol for direct organogenesis from leaf explants of an economically valuable plant, drumstick (*Moringa oleifera* Lam.). *Industrial Crops and Products*, 103, 59-63.
 - Kafuku, G., & Mbarawa, M. (2010). Alkaline catalyzed biodiesel production from moringa oleifera oil with optimized production parameters. *Applied Energy*, 87(8), 2561-2565.
 - Karim, N. A. A., Ibrahim, M. D., Kntayya, S. B., Rukayadi, Y., Hamid, H. A., & Razis, A. F. A. (2016). *Moringa oleifera* Lam Targeting Chemoprevention. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*, 17(8), 3675-3686.
 - Kortessis, N., & Chesson, P. (2019). Germination variation facilitates the evolution of seed dormancy when coupled with seedling competition. *Theoretical population biology*, 130, 60-73.
 - Kumar, N., & Reddy, M. P. (2011). In vitro plant propagation: a review. *Journal of Forest and Environmental Science*, 27(2), 61-72.
 - Kurokawa, M., Wadhwani, A., Kai, H., Hidaka, M., Yoshida, H., Sugita, C., ... & Hagiwara, A. (2016). Activation of cellular immunity in herpes simplex virus

- type 1-infected mice by the oral administration of aqueous extract of *Moringa oleifera* Lam. leaves. *Phytotherapy Research*, 30(5), 797-804.
- Malo, T. (2014). Effet de la fertilisation sur la croissance et la production de *Moringa oleifera* local et *Moringa oloeifera* PKM-1 dans la région des cascades.
 - Marfori, E. C. (2010). Clonal micropropagation of *Moringa oleifera* L. *Philipp Agric Sci*, 93(4).
 - Margara F. 1989. Bases de multiplication végétative : les méristèmes et l'organogenèse. Ed INRA Paris 262p.
 - Mehta, S., Rai, P. K., Rai, N. K., Rai, A. K., Bicanic, D., & Watal, G. (2011). Role of spectral studies in detection of antibacterial phytoelements and phytochemicals of *Moringa oleifera*. *Food biophysics*, 6(4), 497-502.
 - Mirzai, F., Uliaie, E.D., & Hagh, A.B. (2015). Stimulation Effect of AgNO₃ and CoCl₂ as Ethylene Inhibitors on in-Vitro Organogenesis of Sunflower (*Helianthus annuus* L.). *Journal of Agricultural Science*, 25(2), 113-118.
 - Mouminah, H. H. (2015). Effect of dried *Moringa oleifera* leaves on the nutritional and organoleptic characteristics of cookies. *Alexandria science exchange journal*, 36(4), 297-302.
 - Moura, M. C., Pontual, E. V., Gomes, F. S., Napoleão, T. H., Xavier, H. S., Paiva, P. M., & Coelho, L. C. B. B. (2011). Preparations of *Moringa oleifera* flowers to treat contaminated water. *Advances in environmental research*, 21, 269-285.
 - Murashige T. et F. Skoog. 1962. A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiol Plant.*, 15, 473-497.
 - Ndhlala, A. R., Mulaudzi, R., Ncube, B., Abdelgadir, H. A., Du Plooy, C. P., & Van Staden, J. (2014). Antioxidant, antimicrobial and phytochemical variations in thirteen *Moringa oleifera* Lam. cultivars. *Molecules*, 19(7), 10480-10494.
 - Njehoya, C. A., Bourou, S., Awono, P. K., & Bouba, H. (2014). Évaluation du potentiel de germination de *Moringa oleifera* dans la zone soudano-guinéenne du Cameroun. *Journal of Applied Biosciences*, 74, 6141-6148.
 - Ochette C. 2005. Growth, quality and biotechnology, WFP publisher.finland.

- Olagbemide, P. T., & Philip, C. N. A. (2014). Proximate analysis and chemical composition of raw and defatted *Moringa oleifera* kernel. *Advances in Life Science and Technology*, 24, 92-99.
- Panda, D.S., Choudhury, N.S.K., Yedukondalu, M., Si, S., Gupta, R., 2008. Evaluation of gum of *Moringa oleifera* as a binder and release retardant in tablet formulation. *Ind. J. Pharm. Sci.* 70,614-618.
- Panda, S. (2015). Butanolic fraction of *Moringa oleifera* Lam.(Moringaceae) attenuates isoprotrenol-induced cardiac necrosis and oxidative stress in rats: an EPR study. *EXCLI journal*, 14, 64.
- Pandey, A., Pandey, R. D., Tripathi, P., Gupta, P. P., Haider, J., Bhatt, S., & Singh, A. V. (2012). *Moringa oleifera* Lam. *Sahijan*)-A Plant with a Plethora of Diverse Therapeutic Benefits: An Updated Retrospection. *Medicinal and Aromatic Plants*, 1(1), 1-8.
- Parzymies, M., & Dąbski, M. (2012). The effect of cytokinin types and their concentration on in vitro multiplication of *Clematis viticella* (L.) and *Clematis integrifolia* 'Petit Faucon'. *Acta and Prophylactic Properties. Part 1. Trees for life Journal*, 1(5).
- Patel, J.P., Bharat, G and Patel, K. (2010). Evaluation of invitroSchizonticidal Properties of Acetone Extract of some Indian Medicinal Plants. *Advances in Biological Research* 4 (5): 253-258, 2010. ISSN 1992-0067. IDOSI Publications
- Paula, P. C., Oliveira, J. T., Sousa, D. O., Alves, B. G., Carvalho, A. F., Franco, O. L., et al. (2016). Insulin-like plant proteins as potential innovative drugs to treat diabetes-The *Moringa oleifera* case study. *N. Biotechnol.* 39, 99–109. doi: 10.1016/j.nbt.2016.10.005
- Pourrat, F. (1996). Parlons un même langage. *Revue d'Orthopédie Dentofaciale*, 30(2), 169-170.(la Norme AFNOR NFT 72-101)
- Pritchard, M., Craven, T., Mkandawire, T., Edmondson, A. S., & O'Neill, J. G. (2010). A comparison between *Moringa oleifera* and chemical coagulants in the purification of drinking water—An alternative sustainable solution for developing countries. *Physics and Chemistry of the Earth, Parts A/B/C*, 35(13-14), 798-805.
- Rajangam, J., Azahakia Manavalan, R. S., Thangaraj, T., Vijayakumar, A., & Muthukrishan, N. (2002). Status of production and utilisation of *Moringa* in Souther India. CIRAD.

- Ramachandran, C., Peter, K. V., & Gopalakrishnan, P. K. (1980). Drumstick (*Moringa oleifera*): a multipurpose Indian vegetable. *Economic botany*, 276-283.
- Randriamboavonjy, J. I., Loirand, G., Vaillant, N., Lauzier, B., Derbré, S., Michalet, S., ... & Tesse, A. (2016). Cardiac protective effects of *Moringa oleifera* seeds in spontaneous hypertensive rats. *American journal of hypertension*, 29(7), 873-881.
- Rashid, U., Anwar, F., Moser, B. R., & Knothe, G. (2008). *Moringa oleifera* oil: a possible source of biodiesel. *Bioresource technology*, 99(17), 8175-8179.
- Ravindra C., Joshi B. ; Vasantharaj D., Rashmi K. 2016 - A review of the insect and mite pests of *Moringa oleifera* Lam. *Agriculture for Development*, 29 (2016)
- Razis, A.F.A., Ibrahim, M.D., Kntayya, S.B., 2014. Health benefits of *Moringa oleifera*. *A. Pac. J. Can. Prev.* 15, 8571-8576
- Riyathong, T., Dheeranupattana, S., Palee, J., & Shank, L. (2010). Shoot Multiplication and Plant Regeneration from *In vitro* cultures of drumstick tree (*Moringa oleifera* Lam.). In: *Proceedings of the 8th International Symposium on Biocontrol and Biotechnology*. King Mongkut's Institute of Technology Ladkrabang and Khon Kaen University, Nongkhai Campus, Thailand, 99–104
- Roloff A., Weisgerber H., Lang U., Stimm B., 2009 - *Moringa oleifera* Lam., 1785 : *Enzyklopädie der Holzgewächse – 40. Erg.Lfg.* 6/05 . WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim ISBN: 978-3-527-32141-4
- Roy, B. K., Bashar, M. K., Hossain, S. M. J., Huque, K. S., & Makkar, H. P. (2016). Performance evaluation of moringa oleifera and available roughages (maize and australian sweet jumbo) on feeding values of growing BLRI Cattle Breed-1 (BCB-1) bulls. *Journal of Experimental Agriculture International*, 1-9.
- Saadi, A., & Hamdani, F. Z. (2007). Régénération in vitro du *Scorpiurus muricatus* ssp. *subvillosus* via la caulogénèse. *BASE*.
- Saini, R. K., Shetty, N. P., Giridhar, P., & Ravishankar, G. A. (2012). Rapid in vitro regeneration method for *Moringa oleifera* and performance evaluation of field grown nutritionally enriched tissue cultured plants. *3 Biotech*, 2(3), 187-192.
- Salem, J. M. (2016). In vitro propagation of *Moringa oleifera* L. under salinity and ventilation conditions. *Genetics and Plant Physiology*, 6(1-2), 54-64.

- Seshadri, S., & Nambiar, V. S. (2003). Kanjero (*Digera arvensis*) and drumstick leaves (*Moringa oleifera*): nutrient profile and potential for human consumption. *World review of nutrition and dietetics*, 91, 41-59.
- Shah, D.P., Jain, V.C., Dalvadi, H.P., Ramani, V.D., Patel, K.G., Saralai, M.G., Jani, G.K., 2011. A Preliminary Investigation of *Moringa Oleifera* Lam Gum As a Pharmaceutical Excipient. *International Journal of Pharmacy Research and Technology* 1, 12-16.
- Shih, W. H., Chang, H. L., & Shen, Z. (1994). Conversion of class-F fly ash to zeolites. *MRS Online Proceedings Library Archive*, 371.
- Soltener D. 2005. Les grandes productions végétales. Collection Scientifique des technologies agricoles 20eme édition, p 472.
- Starr, C., Taggart, R., & Evers, C. (2012). *Biology: The unity and diversity of life*. Cengage Learning.
- Stohs, S. J., & Hartman, M. J. (2015). Review of the safety and efficacy of *Moringa oleifera*. *Phytotherapy Research*, 29(6), 796-804.
- Taha, L. S., Youssef, N. M., Ibrahim, E. A., & Ghareeb, Z. F. (2019). AN ADEQUATE MICROPROPAGATION PROTOCOL FOR IRIS TINGITANA BULBLETS PRODUCTION AND CHEMICAL COMPOSITION. *Plant Archives*, 19(2), 2671-2676.
- Thurber, M. D., & Fahey, J. W. (2009). Adoption of *Moringa oleifera* to combat under-nutrition viewed through the lens of the “Diffusion of Innovations” theory. *Ecology of food and nutrition*, 48(3), 212-225.
- V. NAMBIAR, R. MEHTA and DANIEL, J. of Food Sci. and Technology, 42(6) (2005) 312-315.
- Vidalis H., Augé R., Beauchesne G., et al. 1989. La culture in vitro et ses applications horticoles. Lavoisier, Tec et Doc (ed). 7- 24.
- Wahbi J, Lamia H., Naoufel S., Mohamed LK ., 2010- Étude de la germination des graines d’Acacia tortilissous différentes contraintes abiotiques, 652p
- Wang, L., Waters, M. T., & Smith, S. M. (2018). KARRIKIN-KAI2 signalling provides *Arabidopsis* seeds with tolerance to abiotic stress and inhibits germination under conditions unfavourable to seedling establishment. *New Phytologist*, 219(2), 605-618.

- Younus, I., Siddiq, A., Ishaq, H., Anwer, L., Badar, S., & Ashraf, M. (2016). Evaluation of antiviral activity of plant extracts against foot and mouth disease virus in vitro. *Pak. J. Pharm. Sci*, 29(4), 1263-1268.

Annexe 01 : la composition des milieux des deux milieux Murashige Skoog et Gamborg.

Tableau 1 les composants des deux milieux, MS et Gamborg.

Le milieu Murashige Skoog (MS)		Le milieu Gamborg	
Macro-éléments	Quantités (mg/l)	Macro-éléments	Quantités (mg/l)
KNO3	1900	KNO3	2500.00
NH4NO3	1650	(NH)42SO4	134.00
CaCl2	332,3	CaCL2	113.23
MgSO4, 7H2O	370	MgSO4	121.56
KH2PO4	170	NaH2PO4	130.44
Micro-éléments	Quantités (mg/l)	Micro-éléments	Quantités (mg/l)
MnSO4, 4H2O	22,30	MnSO4.H2O	10.00
ZnSO4, 7H2O	8,60	ZnSO4, 7H2O	2.00
H3BO3 (Ac borique)	6,20	H3BO3	3.00
KI	0,83	KI	0.75
Na2MO4, 2H2O	0,25	Na2MO4, 2H2O	0.25
CuSO4, 5H2O	0,025	CuSO4, 5H2O	0.025
CaCl2, 6H2O	0,025	CoCl2, 6H2O	0.025
Vitamines	Quantités (mg/l)	Vitamines	Quantités (mg/l)
Glycine	2.00		
Myo-inositol	100	Myo-inositol	100
Acide nicotinique	0.50	Acide nicotinique	11.00.00
Pyridoxine HCl	0.50	Pyridoxine HCl	1.00
Thiamine HCl	0.10	Thiamine hydrochloride	10.00
FeEDTA	Quantités (mg/l)	FeEDTA	Quantités (mg/l)
Na2FeEDTA	37,3	FeNaEDTA	36.70
FeSO4, 7H2O	27,8		
Gélifiant	Quantité (g/l)	Gélifiant	Quantité (g/l)
Agar-agar	8	Agar-agar	8

Optimisation d'un protocole de micro propagation chez *Moringa oleifera*

Mémoire de fin de cycle pour l'obtention du diplôme de Master en Biotechnologie et Génomique Végétale

Résumé :

Grâce à sa richesse exclusive, le *Moringa oleifera* connaît aujourd'hui un intérêt grandissant au niveau mondial, en raison de ses vertus exceptionnelles dans les domaines médicinales, industrielles et nutritionnelles. Dans ce sens, des essais ont été menés pour l'optimisation d'un protocole de micropropagation de la plante, l'étude a été consacrée à la première étape de développement de la plante de « la germination » cette étape définira la réussite de la multiplication *in vitro*.

Pour cela, plus de 170 graines ont été confrontés à différents protocoles de stérilisation, de scarification et condition de culture ; afin de définir les conditions optimales pour la germination *in vitro*. Les taux de contamination montrent que le protocole combiné de chlorure mercurique et hypochloride de sodium résulte le meilleur protocole de stérilisation des graines parmi les protocoles testés avec un taux de contamination de 13.95% par rapport à stérilisation avec chlorure mercurique et à stérilisation à hypochloride de sodium qui ont un taux de contamination de 30.61% et 68.88% successivement. Ainsi que les taux de germination révèlent que : d'une part, le levé de dormance est bien meilleur par la scarification avec un taux de 72.92% ; d'autre part, l'obscurité influence positivement à la germination *in vitro* avec un taux de 61.19%.

Mots clés *Moringa oleifera*, micropropagation, germination, stérilisation, levée de dormance.

Laboratoire de recherche : Génétique Biochimie et Biotechnologie Végétale (GBBV) de l'Université des Frères Mentouri Constantine 1.

Jury d'évaluation :

Président : BENBELKACEM A (Grade - UFM Constantine),
Encadrant : BENABDELHAFID Z (Grade - UFM Constantine),
Examinatrice : LOUALI Y (Grade - UFM Constantine).

Date de soutenance : 08/07/2020