

République Algérienne Démocratique et Populaire

Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique

Université A. MIRA – Bejaia

**Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie**

**Département de Biologie Physico-Chimique**

**Filière : Sciences biologiques**

**Spécialité : Pharmaco-toxicologie**



جامعة بجاية  
Tasdawit n Bgayet  
Université de Béjaïa

**Réf : .....**

## **Mémoire de Fin de Cycle** **En vue de l'obtention du diplôme de Master**

### ***Thème***

**Application de la culture cellulaire végétale en suspension dans la production  
pharmaceutique**

**Présenté par :**

\* MILA Nabila

\* MOKRANI Djamila

**Soutenu le : 21/06/2023**

**Devant le jury composé de :**

Mme SADAoui K

MCA

Encadrante

Mme KASMI S

MAA

Examinatrice

Mr BOUDJOUAN F

MCA

Président

**Année universitaire : 2022 / 2023**

# **Dédicaces**

## ***A mon père mon Héro***

*A la personne qui me fait un abri quand j'ai peur de la nuit. A l'homme de ma vie, mon exemple éternel, celui qui s'est toujours sacrifié pour me voir réussir. Tu as toujours été à mes côtés pour me soutenir et m'encourager. Tu m'as enseigné la patience, la persévérance. Je me sens forte, je me sens reine quand je suis à côté de toi.*

## ***A ma chère maman***

*Quoi que je fasse ou que je dise, je ne saurai point te remercier comme il se doit. Ton affection me couvre, ta bienveillance me guide, et ta présence à mes côtés a toujours été ma source de force pour affronter les différents obstacles. Tu es celle qui m'a donné la vie, et qui m'a aimé inconditionnellement. Pour toutes ces années passées à mes côtés, tu es la meilleure des mamans.*

## ***A mes sœurs***

*Dima ma camomille, celle qui me donne l'espoir, qui me reconforte, qui me rend plus forte. Aya ma douce, la lumière de ma vie, celle qui m'a toujours soutenu, ma véritable amie. Vous êtes le meilleur don de Dieu.*

## ***Nemo***

*Mon meilleur compagnon de vie, mon plus beau cadeau, mon chat qui est beaucoup plus qu'un animal, un ami, une famille. Peu importe mon humeur il suffit juste d'être à tes côtés.*

*A ma chère tante, ma deuxième maman que j'aime trop, et à son mari.*

*Tahar, Cherif, Massi, Salim et Halim, vous êtes les meilleurs frères.*

*A la personne qui a partagé ce travail avec moi, ma chère Djidji.*

*A tous mes amis, pour tous les bons moments que nous avons partagés ensemble.*

*A tous ceux qui me sont chers.*

*Que dieu le tout puissant vous protège de tout mal.*

**JE VOUS AIME**

*Nabila*

# *Dédicaces*

*Tout d'abord je remercie Allah le tout puissant pour m'avoir donné la force nécessaire et le courage pour mener à bien ce travail.*

*Je dédie ce modeste travail, à mes très chers parents qui n'ont épargné aucun effort pour m'instruire et qui ont fait preuve de beaucoup de compréhensions et de patience, qu'ils trouvent ici le témoignage de mon profond respect et ma reconnaissance qu'Allah les protège et les garde pour nous.*

*A mon Chère frère Djamel Eddine, à qui je souhaite la réussite dans ses études.*

*A mon adorable petite sœur Maroua que j'aime tant.*

*A tous mes tantes et oncles, à qui je leurs souhaite une longue vie heureuse.*

*A tous les cousins, cousines et les amis que j'ai connu jusqu'à maintenant.*

*A mes grands-mères, mes grands-pères qui nous ont quitté trop tôt.*

*A ma chère binôme Nabila, ainsi qu'à toute sa famille et surtout Dima.*

*A toute ma famille proche et loin que soit elle. Et pour toutes les personnes qui m'ont soutenu jusqu'à la fin.*

*A toute la promotion pharmacologie toxicologie 2022/2023.*

*Djamila*



# Remerciements

## *Nous remercions le bon DIEU*

*Ce mémoire représente bien plus que de simples travaux. Ce mémoire est la finalité de cinq longues années d'études, c'est le fruit des efforts fournis par plusieurs personnes que nous ne pourrions oublier de remercier.*

*Il nous est agréable d'exprimer nos sincères remerciements et notre profonde gratitude à notre promotrice Mme SAADAoui K de nous avoir guidées au cours de ce travail. Nous lui exprimons notre reconnaissance pour son soutien, son aide, ses précieux conseils qui nous ont aidés dans l'élaboration de ce travail.*

*Nous adressons également nos sincères remerciements à Mr BOUDJOUAN F d'avoir accepté de présider le jury.*

*Merci à vous Mme KASMI S de nous avoir fait l'honneur d'examiner ce mémoire.*

*Notre gratitude va particulièrement à tous nos enseignants du département de biologie physico-chimique, et de toute la faculté des sciences de la nature et de la vie.*

*Nous remercions également toutes personnes qui ont, de près ou de loin, contribué à la réalisation de ce mémoire.*

**Nabila et Djamila**

# Sommaire

Liste des tableaux

Liste des figures

Liste des abréviations

Introduction. ....1

**Chapitre I : Culture cellulaire végétale.**

1. Définition. ....2

2. Historique. ....2

3. Application de la culture *in vitro*. ....5

4. Types de la culture *in vitro*. ....6

5. Conditions. ....8

6. Avantages et inconvénients de la culture *in vitro*. ....12

**Chapitre II : Culture cellulaire végétale en suspension.**

1. Définition. ....14

2. Historique. ....15

3. Unité de la culture en suspension. ....16

4. Types de la culture en suspension. ....16

5. Conditions. ....18

6. Culture en suspension dans le pharmaceutique. ....21

7. Culture en suspension dans l'agroalimentaire. ....21

8. Culture en suspension dans la cosmétologie. ....22

**Chapitre III : Etude de cas *Clinopodium vulgare L in vitro*.**

1. Analyse phytochimiques. ....26

2. Discussion générale de l'étude. ....29

Conclusion. ....30

Références bibliographiques

Résumé

## *Liste des tableaux*

<b>Tableau I : Historique de la naissance de la culture cellulaire végétale <i>in vitro</i>. .....</b>	<b>3</b>
<b>Tableau II : Fonctions physiologiques des éléments les plus importants pour la croissance des végétaux. ....</b>	<b>12</b>
<b>Tableau III : Composition du milieu recommandé pour la culture de cellules mésophylles isolées de <i>Calystegia sepium</i> d'après Rissini (1972). ....</b>	<b>19</b>

## *Listes des figures*

<b>Figure 1 : Différents types de la culture cellulaire végétale <i>in vitro</i>.....</b>	<b>6</b>
<b>Figure 2 : Schéma d'une hotte à flux laminaire. ....</b>	<b>9</b>
<b>Figure 3 : Fonction de la lumière en tant qu'éléciteur d'importants métabolites secondaires dans diverses cultures de plantes <i>in vitro</i>. ....</b>	<b>10</b>
<b>Figure 4 : Initiation d'une culture en suspension à partir d'un cal. ....</b>	<b>14</b>
<b>Figure 5 : Premier exemple de technique de culture unicellulaire schématisé d'après les travaux de Muir <i>et al.</i> (1954). ....</b>	<b>15</b>
<b>Figure 6 : Courbe de croissance de la culture en suspension discontinue. ..</b>	<b>17</b>
<b>Figure 7 : Structure chimique du bakuchiol. ....</b>	<b>23</b>
<b>Figure 8 : Micropropagation de <i>Clinopodium vulgare L.</i> sur milieu MS avec différents PGR. ....</b>	<b>24</b>
<b>Figure 9 : Culture <i>in vitro</i> de <i>Clinopodium vulgare L.</i> ....</b>	<b>25</b>
<b>Figure 10 : Altérations cytomorphologiques induites par l'extrait de cultures <i>in vitro</i> de <i>C. vulgare</i> dans les cellules de carcinome colorectal HT- 29. ....</b>	<b>27</b>
<b>Figure 11 : Altérations cytomorphologiques induites par l'extrait de cultures <i>in vitro</i> de <i>C. vulgare</i> dans les cellules de carcinome colorectal HT- 29. ....</b>	<b>28</b>

## *Liste des abréviations*

**2,4-D** : Acide 2,4-dichlorophénoxyacétique.

**ACS** : Cellules cancéreuses gastriques.

**ADN** : Acide désoxyribonucléique.

**AO** : Acridine orange.

**B1** : 6-benzylaminopurine.

**IBA** : Acide indole-3-butyrique.

**BAP** : Benzylamino purine.

**BE** : Bleu d'Evan.

**DAPI** : 4',6-diamidino-2-phénylindole.

**DEL** : Diodes électroluminescentes.

**DMEM** : Milieu Eagle modifié du Dulbecco.

**EAG** : Equivalent acide gallique.

**EB** : Bromure d'éthidium.

**FDA** : Diacétate de fluorescéine.

**HeLa** : Carcinome cervical.

**HEPA** : Filtre à air à haute efficacité.

**HT-29** : Cellules de carcinome colorectal.

**ip1** : 2-isopentényl.

**K1** : Kinétine.

**LSD** : Test de Différence Significative Minimale.

**MMP** : Potentiel de la Membrane Mitochondriale.

**MS** : Milieu de culture Murashige et Skoog.

**MTT** : Bromure de 3-[4,5-diméthylthiazol-2yl]-2,5-diphényl-tétrazolium.

**Na-EDTA** : Sel de sodium de l'acide éthylène diamine tétra acétique.

**ORAC** : Activité de la capacité d'absorption des radicaux oxygène.

**PGR** : Régulateurs de croissance des plantes.

**pH** : Potentiel hydrogène.

**PS** : Poids sec.

**ERO** : Espèces réactives de l'oxygène.

**TTC** : Chlorure de 2,3,5-triphényl-tétrazolium.

**U87MG** : Uppsala 87 Malignant Glioma.

**UV** : Ultrat Violet.

**Z1** : Zéatine.

# ***Introduction***

# ***INTRODUCTION***

---

Les plantes sont des organismes uniques capables de créer leur propre nourriture par photosynthèse et de fournir de l'oxygène à l'atmosphère. Elles sont également d'importantes sources de nourriture et de composés thérapeutiques pour tous les autres organismes vivants (**Barbulova et al., 2014**).

Les plantes se distinguent par leur grande polyvalence synthétique, le spectre des structures chimiques synthétisées par le règne végétal est plus large que celui de tout autre groupe d'organismes, ce qui fait des plantes la plus grande source de remèdes naturels dans les industries pharmaceutiques, alimentaires et cosmétiques (**Barbulova et al., 2014**).

Les méthodes de production peuvent varier selon le type de métabolites secondaires et les besoins de la firme, mais différentes possibilités existent pour produire ces molécules. (**Beuel et al.,2021**).

L'utilisation des biotechnologies basées sur la culture de cellules végétales *in vitro* principalement les cultures de cellules végétales en suspension (**Beuel et al.,2021**), constituent une solution prometteuse, durable et respectueuse de l'environnement et de surmonter les problèmes liés à la culture traditionnelle des plantes médicinales y compris les variations de la qualité des récoltes liées à la sécheresse ou aux inondations, les maladies ou des attaques de ravageurs sur les plantes permettant un meilleur contrôle de la qualité et des rendements plus élevés (**Motolinía-Alcántara et al.,2021**).

Quel est la différence entre la production des molécules à partir de cultures végétales en suspension et la plante sauvage ?

Pour toutes ces raisons, notre travail s'inscrit dans le cadre d'une recherche bibliographique afin de comprendre ce type de méthodes qui trouvent, de nos jours, une grande importance dans l'industrie pharmaceutique et en cosmétologie.

Notre document est organisé en trois parties, dont **i)** le premier chapitre qui est consacré à la compréhension générale d'une culture cellulaire végétale, **ii)** tandis que le deuxième chapitre était consacré à la culture cellulaire végétale en suspension, et enfin **iii)** le dernier chapitre qui s'est intéressé à l'étude d'un cas de culture cellulaire végétale en suspension et son application dans le domaine pharmaceutique, une recherche très récente de l'année en cours.

# *Chapitre I*

## **1. Définition**

La culture végétale *in vitro* est une technique de biotechnologie végétale qui aide à comprendre la croissance et le développement des plantes au niveau cellulaire. La culture cellulaire végétale *in vitro* se définit par la multiplication de cellules, tissus et organes végétaux cultivées dans un milieu de culture artificiel et avec des conditions environnementales bien contrôlés et aseptique (**Hussain et al., 2012**).

Cette technique repose principalement sur la capacité d'une cellule unique à exprimer l'intégralité de son génome par division cellulaire (**Hussain et al., 2012**) pour former des plantes complètes à nouveau. Cette idée de manipuler des plantes a fait naître de nombreuses possibilités d'étude et d'utilisation ; ces possibilités, à leur tour, ont été les stimulants de longue date de la recherche et du développement dans ce domaine (**Trigiano et al., 2004**).

## **2. Historique**

Le chercheur Autrichien « **Gottlieb Haberlandt** » a réussi à maintenir en vie des cellules de feuilles isolées pendant de longues périodes entre 1898 et 1902, mais elle ne se sont pas diviser car le milieu nutritif simple qu'il utilisait ne contenait pas les éléments végétaux nécessaires.

Au début du 20<sup>ème</sup> siècle, les progrès dans la culture de tissus végétaux se sont poursuivis avec le développement de méthodes de travail stériles (**Evans et al., 2003**).

Dans les années 1930, les vitamines B et l'auxine, deux composants essentiels à la croissance cellulaire ont vu la lumière dans ce domaine (**Trigiano et al., 2004**).

Les premières expériences réussies pour maintenir la croissance et la division cellulaire dans une culture de cellules végétales ont été celles de de White (1934), qui a établi des racines de tomates isolées en culture aseptique. Le milieu de White était simple et ne contenait que du saccharose, des minéraux et de l'extrait de levure qui fournissait des vitamines (**Evans et al., 2003**).

Au début des années soixante (1962), Murashige et Skoog ont développé et formulé un milieu de culture de tissus végétaux qui a été accepté comme le milieu de culture le plus adapté pour tout type de culture végétale (**Jha et Ghosha, 2005**).

Ce n'est que pendant les années 70 que le rôle des régulateurs de croissance des plantes tels que les cytokinines, l'éthylène et l'acide abscissique sont découverts (**Trigiano et al., 2004**).

Le tableau I ci-dessous résume l'histoire de la naissance de la culture cellulaire végétale *in vitro* (**Kumar, 2009**).

**Tableau I** : historique de la naissance de la culture cellulaire végétale *in vitro*.

<b>Chercheur</b>	<b>Année</b>	<b>Contribution</b>
G. Haberlandt	<b>1902</b>	Première culture <i>in vitro</i> de cellules isolées sur des milieux artificiels.
W.J. Robbing W. Kotte	<b>1922</b>	Culture de racines-organs isolées.
P.R. White	<b>1934</b>	Culture de racines de tomates sur de longues périodes.
R.J. Gautheret	<b>1939</b>	Première culture de tissus cambiaux isolés de la carotte.
P. Nobecourt P.R. White	<b>1939</b>	Culture de cals de tabac provenant d'un hybride interspécifique de <i>Nicotiana glauca</i> x <i>N. langsdorfii</i> .
J. Van Overbeck	<b>1941</b>	Découverte de la valeur nutritionnelle de l'endosperme liquide de la noix de coco (lait de coco) pour la culture.
P.R. White, A.C. Braum	<b>1942</b>	Expériences sur la croissance des plantes à partir de tissus exempts de bactéries.
A. Caplan, E.C. Steward	<b>1948</b>	Utilisation du lait de coco pour la prolifération des tissus de carottes et de pommes de terre en culture.
G Morel	<b>1950</b>	Culture de tissus monocotylédones à l'aide de lait de coco.
W.H. Muir	<b>1953</b>	Mise au point d'une technique de culture de cellules isolées.
W. Tubecke	<b>1953</b>	Cultures haploïdes à partir de pollen de gymnosperme ( <i>Ginkgo sps.</i> )
C.O. Miller, F. Skoog	<b>1955</b>	Découverte des cytokinines comme puissants facteurs de division cellulaire.

E. Ball	<b>1955</b>	Culture de tissus de gymnospermes (Sequoia).
F. Skoog, C.O. Miller	<b>1957</b>	Hypothèse sur l'initiation des pousses et des racines dans les cals de culture est régulée par la proportion d'auxine et de cytokinine dans le milieu de culture.
E.C. Cocking	<b>1960</b>	Isolement enzymatique et culture de protoplastes
G. Morel	<b>1960</b>	Développement de la technique de culture des pousses.
G. Morel	<b>1964</b>	Utilisation de la technique modifiée des pousses pour la propagation des orchidées.
S.G. Guha	<b>1966</b>	Le pollen et les anthères cultivés peuvent produire des embryons haploïdes.
S.C. Maheshwari J.P. Nitsch	<b>1974</b>	Culture de microspores de Datura et Nicotiana, pour doubler le nombre de chromosomes et récolter des graines à partir de plantes diploïdes homozygotes en l'espace de 5 mois.
G. Melchers	<b>1978</b>	Production d'hybrides somatiques à partir de la fusion de protoplastes isolés de la pomme de terre et de la tomate.
K.A.Barton W.J. Brill	<b>1983</b>	Insertion de gènes étrangers attachés à un vecteur plasmidique dans des protoplastes nues de plantes.
M.D. Chilton	<b>1983</b>	Production de plants de tabac transformés à la suite de la transformation d'une seule cellule ou de l'insertion de gènes.
H. Kohn	<b>1985</b>	Hybrides somatiques chez le tabac par électro fusion.
E. Sundberg K. Glemelius	<b>1986</b>	Hybrides somatiques chez les Brassicacée.

### 3. Applications de la culture *in vitro*

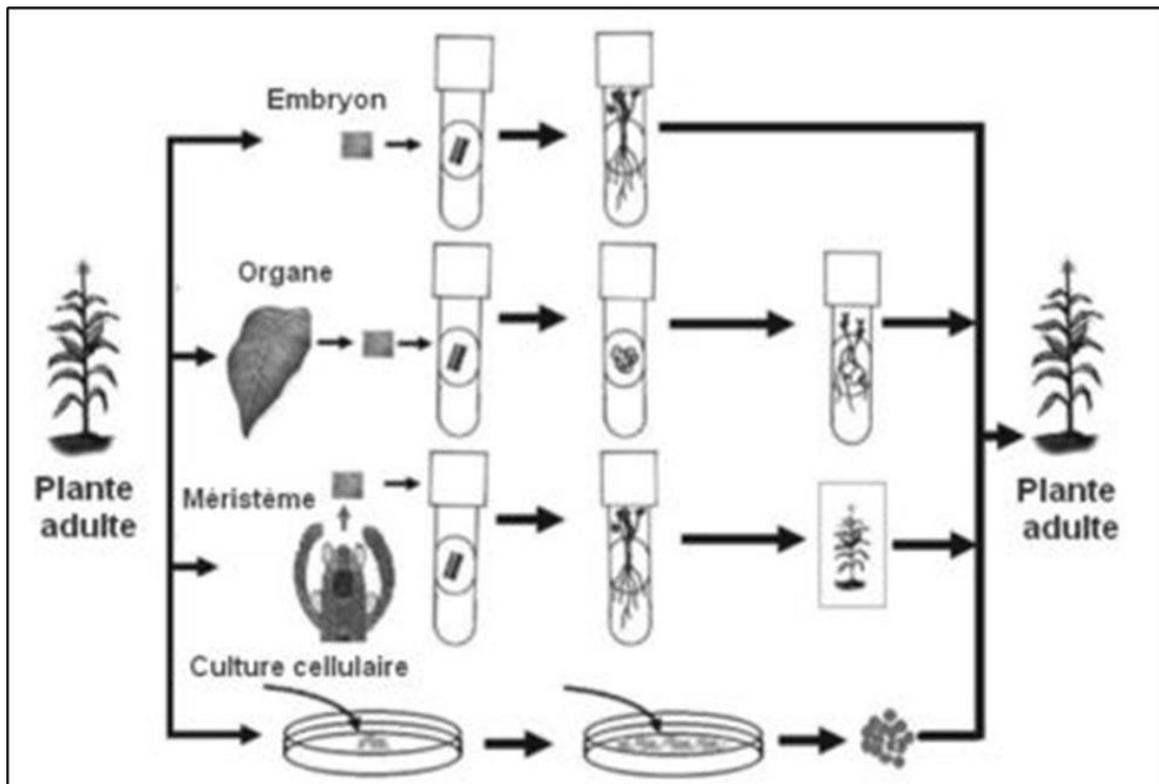
Les cultures de plantes et de cellules *in vitro* ont été utilisées à différentes fins dans différentes disciplines (Yadav et Tyagi, 2006) :

- **L'étude biologique fondamentale** : constitue un système simple et facile à manipuler pour l'étude d'une série de phénomènes. Par exemple, l'utilisation de cultures en suspension pour l'étude de la division cellulaire qui est aujourd'hui très répandue.
- **La production de composés biochimique de haute valeur** : La culture végétale *in vitro* est indépendante des variations des saisons durant toute l'année, grâce aux conditions environnementales bien contrôlées. Les industries pharmaceutiques et cosmétiques utilisent la culture cellulaire végétale pour la production commerciale à grande échelle de métabolites naturels extraits de plantes tels que la morphine (analgésique) et l'atropine (antispasmodique).
- **La multiplication des plantes par micro-propagation** : un domaine qui apporte beaucoup d'avantages économiques en offrant aujourd'hui un moyen rapide de multiplication végétative (asexuée) mais est seulement utilisé pour les plantes ayant une multiplication difficile, cette technique rend aussi possible la production de plantes exemptes de virus en utilisant une partie de méristème apical comme explant.
- **La production de plantes présentant de nouvelles caractéristiques** : Il existe dans la nature des plantes mutantes qui ne ressemblent en rien aux autres membres de leur espèce. Ces plantes peuvent avoir une valeur commerciale en raison, par exemple, de nouvelles combinaisons de couleurs de floraison. Les procédures de culture cellulaire augmentent souvent involontairement la fréquence de ces variations. L'exposition à des produits chimiques ou à des radiations peut entraîner une augmentation des taux de mutation.
- **La production de plantes transgéniques** : Il est possible de transférer des caractéristiques d'une espèce végétale à une autre, telles que la résistance aux insectes, qui ne peuvent être obtenues par les techniques standard de sélection végétale ce qui impose l'utilisation de vecteurs.
- **Sauvegarde du patrimoine végétal** : Grâce à la cryoconservation, qui consiste à congeler de très petites quantités de tissus végétaux à des températures extrêmement basses (-196°C), il est possible de protéger des types de plantes présentant des

caractéristiques génétiques bénéfiques qui n'ont pas encore été exploitées, mais qui sont en danger en raison de la modification de leur habitat naturel.

**4. Types de culture *in vitro***

La culture végétale *in vitro* est très variée et regroupe plusieurs types de cultures qui se diffèrent par l'explant de base (**figure 1**) (Yadav et Tyagi, 2006). Parmi ces quelques cultures :



**Figure 1** : Différents types de la culture végétale *in vitro* (Bhatia et al., 2015).

**4.1. Culture de cals**

Les explants cultivés peuvent se transformer en un cal, un gonflement, une masse désorganisée de cellules, sur un milieu approprié. Toute cellule végétale dotée d'un noyau a de bonnes chances de proliférer pour former un cal si les conditions de culture sont adéquates. Les processus de différenciation cellulaire (changements dans les cellules tout au long du développement et de la spécialisation) qui se produisent dans l'ensemble de la plante sont

inversés lors de la formation de cal. On parle alors de dédifférenciation ou de re différenciation (Yadav et Tyagi, 2006).

#### **4.2. Culture de méristèmes**

Les méristèmes sont des régions de cellules en division active qui donnent naissance à des cellules qui se différencient en nouveaux tissus responsable de l'augmentation de la longueur de la plante (Yadav et Tyagi, 2006). La culture de méristèmes après quelques semaines produit une petite plante portante de 5 ou 6 feuilles dont la tige est ensuite coupée en 5-6 petits fragments qui, dans des conditions favorables, deviennent des plantes adultes (Kumar, 2009).

#### **4.3. Culture d'embryons**

C'est la culture d'embryons immatures ou matures isolés. Les embryons zygotiques sont souvent utilisés comme explants dans la culture de tissus végétaux, par exemple pour initier des cultures de cals (Bhatia *et al.*, 2015).

#### **4.4. Culture de protoplastes**

Un protoplaste est la partie vivante d'une cellule végétale, composée du cytoplasme et du noyau, sans la paroi la paroi cellulaire. Les protoplastes peuvent être isolés à partir d'organes de plantes entières ou de cultures de tissus. La culture de protoplastes est principalement utilisé dans la recherche sur les infections virales des plantes et pour la création d'hybride de cellules végétales en fusionnant des protoplastes (George *et al.*, 2008).

#### **4.5. Culture en suspension**

La culture en suspension cellulaire est constituée de cals qui se multiplient dans un milieu liquide. Le milieu liquide est continuellement agité sur un agitateur orbital. Cette méthode de culture est utilisée par les scientifiques pour étudier la croissance et le développement des cellules. Il s'agit également d'une méthode de culture tissulaire populaire dans de nombreuses industries pour extraire certains composants des cellules végétales (Bhatia *et al.*, 2015).

## 5. Conditions

Elles sont divisées en deux catégories : **Facteurs physiques** (et environnementaux) et **Facteurs chimiques**.

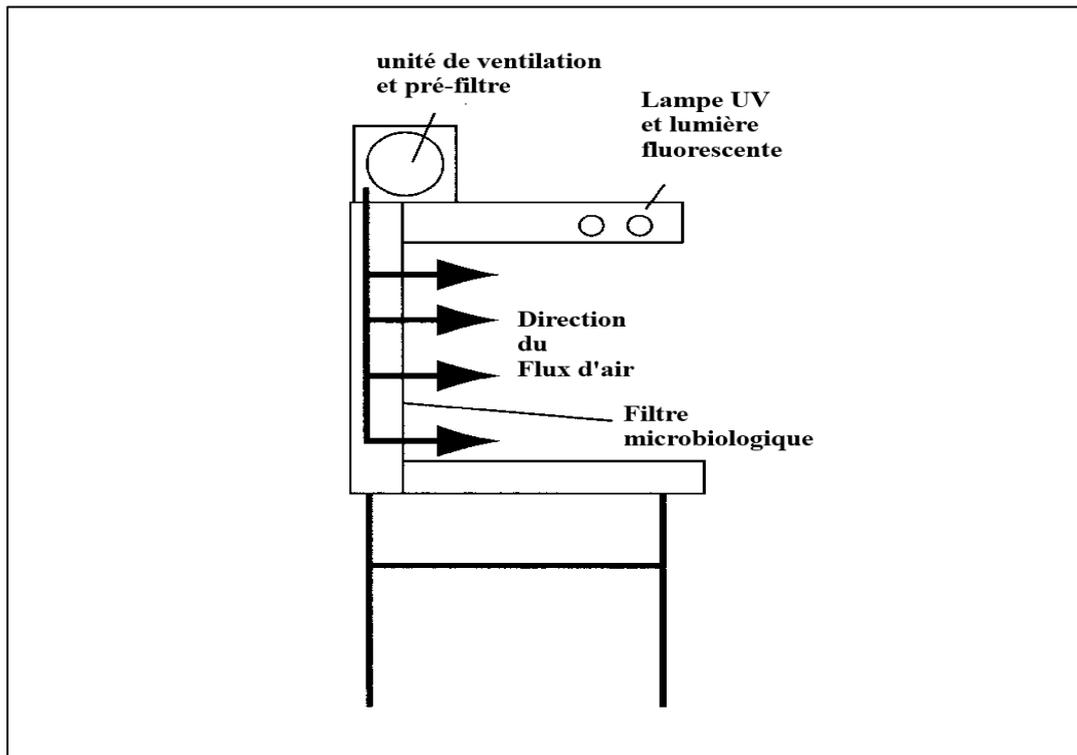
### 5.1. Facteurs physiques

#### 5.1.1. Constituants du laboratoire de la culture *in-vitro*

Les tissus, organes et cellules végétales sont fréquemment utilisés dans la recherche à des fins diverses, notamment la fabrication commerciale de métabolites végétaux et la biotransformation de produits pharmaceutiques (Cassells, 2012) ce qui exige un laboratoire avec la capacité d'établir et de maintenir des conditions aseptiques. Étant donné que les milieux et l'atmosphère dans lesquels le matériel végétal est produit sont également propices à la prolifération des micro-organismes, une méthode aseptique est essentielle pour la pratique de la culture des tissus végétaux (Evans *et al.*, 2003).

Les installations (espaces) de base dont un laboratoire doit disposer pour la culture de tissus sont généralement les suivantes (Evans *et al.*, 2003) :

- **Salle de préparation, de stérilisation et de stockage des milieux.**
- **Une zone de transfert pour les manipulations aseptiques :** Une salle de transfert stérile à l'abri de la poussière serait utile dans les laboratoires où de nombreuses cultures sont traitées régulièrement. Cet espace devrait être équipé de :
  - ✓ **Hotte à flux laminaire stérilisant l'air :** L'air passe d'abord à travers un filtre à poussière, puis à travers un filtre à particules à haute efficacité (HEPA) d'une taille de pore de 0,2  $\mu\text{m}$ , éliminant les bactéries et les spores fongiques. Le flux d'air est ensuite dirigé vers le bas (système à flux vertical) ou vers l'extérieur (système à flux horizontal). La hotte à flux laminaire est généralement éclairée par une lumière fluorescente équipée d'une lampe UV à effet germicide pour stériliser le plan de travail (**figure 2**).



**Figure 2** : Schéma d'une hotte à flux laminaire (Evans *et al.*, 2003).

- Salles de culture ou incubateurs pour le maintien des cultures dans des conditions contrôlées de température, de lumière et d'humidité (Razdan, 2003).

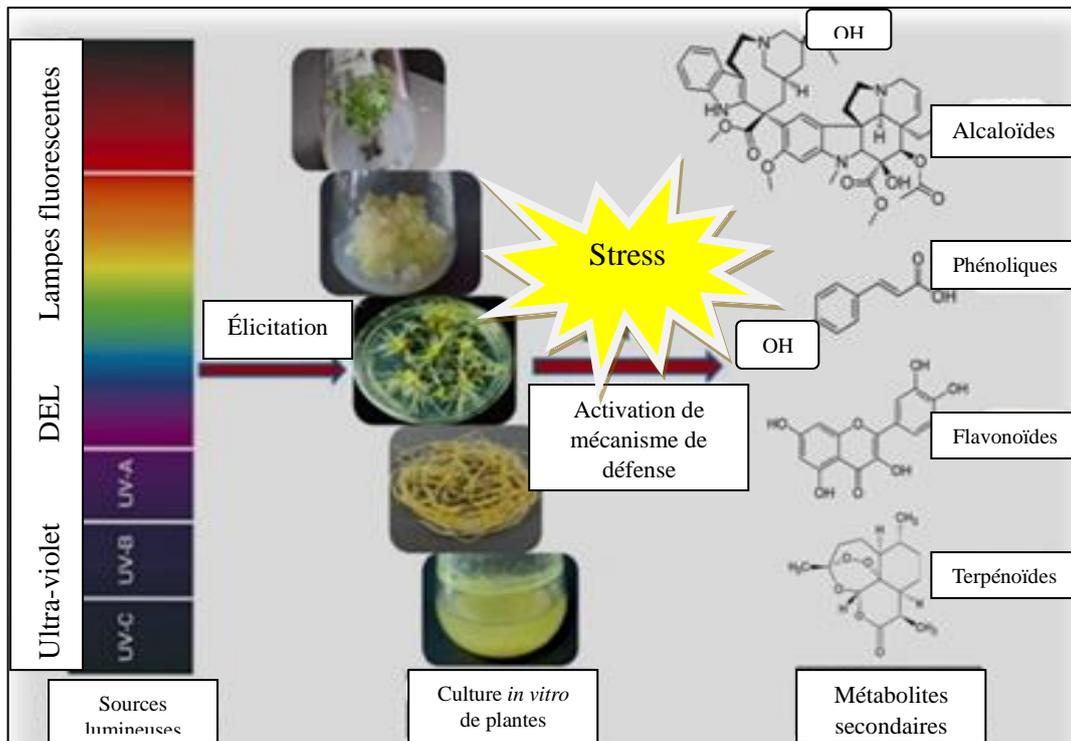
### 5.1.2. Conditions environnementales

La lumière, la température et l'eau sont les principaux facteurs affectant les plantes dans la nature, outre le champ géomagnétique de la terre, magnétique, électro-magnétique affecte aussi leurs croissances et leurs développements (Dobránszki, 2021). Ces facteurs peuvent être un risque d'extinction de la génération végétale et l'incapacité d'obtenir suffisamment de métabolites (Akin, 2020).

Dans une étude, il a été révélé que la qualité de la lumière, la valeur du pH, et l'inclusion de tryptophane ou de phénylalanine comme sources d'azote dans le milieu nutritif ont augmenté la production de métabolites secondaires chez les plantes produites *in vitro* (Akin, 2020).

La lumière a ouvert un nouveau domaine de recherche qui a pour but avoir plus d'avantages économiques pour l'industrie pharmaceutique et nutraceutique. Différentes

sources de lumière comme les ultraviolets, les diodes électroluminescentes (DEL) et les lampes fluorescentes ont été utilisées comme des éliciteurs abiotiques en déclenchant les mécanismes de défense d'une plante et cela affecte le développement, la croissance et la morphogénèse de cette dernière en augmentant la production de quelques métabolites secondaires tels que les alcaloïdes et les flavonoïdes (**Figure 3**) (**Hashim et al., 2021**).



**Figure 3** : La fonction de la lumière en tant qu'éliciteur d'importants métabolites secondaires dans diverses cultures de plantes *in vitro* (**Hashim et al., 2021**).

Une production de métabolites secondaires a été observée lors d'une étude de cultures de cals de *Stevia rebaudiana* en l'exposant à différentes lumières spectrales fluorescentes, une amélioration de la teneur totale en phénols, du potentiel antioxydant total, et de la teneur totale en flavonoïdes a été démontrées sous lumière bleue, leurs niveaux étaient plus élevés que le témoin sous lumière blanche. De ce résultat, on peut conclure que la lumière bleue fonctionne comme un éliciteur potentiel dans les cultures *in vitro*, favorisant la formation de métabolites secondaires (**Hashim et al., 2021**).

## **5.2. Facteurs chimiques**

Le succès d'une culture *in vitro* est largement déterminé par la composition appropriée du milieu de culture. Les nutriments contenus dans les milieux affectent la santé et la croissance des cellules, tissus et organes spécialisés lorsque les explants se différencient et se développent *in vitro* (**Kumar et Mishra, 2016**).

Généralement, les milieux de culture des cellules végétales contiennent six classes de composants, à savoir (**Yadav et Tyagi, 2006**) :

- ✓ **Éléments** généralement requis en grandes quantités : azote, calcium, magnésium, potassium, phosphore, soufre. Ces éléments sont appelés macro-éléments ou macronutriments.
- ✓ **Les éléments** généralement nécessaires en quantités moindres que les macro-éléments. Il s'agit notamment des éléments suivants : le zinc, le cobalt, le cuivre, le manganèse, l'iode. Ils sont appelés microéléments ou micronutriments.
- ✓ **Source de fer** (agent chélateur).
- ✓ **Suppléments organiques** tels que les vitamines.
- ✓ **Source de carbone** (généralement du saccharose).
- ✓ **Régulateurs de croissance** des plantes.

Le tableau II suivant résume des fonctions de quelques éléments nutritifs nécessaires pour la croissance cellulaire (Yadav et Tyagi, 2006).

**Tableau II** : Fonctions physiologiques des éléments les plus importants pour la croissance des végétaux.

Elément	Fonction
<i>Oxygène</i>	Composant commun dans la cellule, accepteur d'électrons.
<i>Carbone</i>	Composant cellulaire commun, forme la structure de base de la plupart des produits biochimiques
<i>Nitrogène</i>	Partie des protéines, des acides nucléiques et des coenzymes.
<i>Soufre</i>	Fait partie de certains acides aminés et de certains coenzymes.
<i>Potassium</i>	Cation inorganique principal.
<i>Magnésium</i>	Cofacteur enzymatique important et élément de la chlorophylle.
<i>Manganèse</i>	Un important cofacteur.
<i>Calcium</i>	Cation cellulaire important et cofacteur enzymatique.
<i>Fer</i>	Partie des cytochromes
<i>Cobalt</i>	Composant de certaines vitamines.
<i>Zinc</i>	Cofacteur enzymatique.

## 6. Avantages et inconvénients de la culture *in-vitro*

### 6.1. Avantages

Parmi ces avantages (Bhatia *et al.*, 2015) :

- Le travail peut être effectué au niveau moléculaire.
- Les travaux fastidieux et laborieux comme le désherbage, la pulvérisation, l'arrosage, etc. sont évités.
- Le matériel végétal, peut être conservée pendant longtemps.
- La production est indépendante de la saison et peut se poursuivre tout au long de l'année.
- Constitue une source continue et fiable de produits phytopharmaceutiques et pourraient être utilisées pour la culture à grande échelle de cellules végétales.

- La culture *in vitro* permet de produire un grand nombre de clones (présentant des caractéristiques souhaitables), des plantes résistantes à la sécheresse, aux inondations et aux maladies, des plantes à haute valeur nutritionnelle et des plantes de de haute qualité avec des rendements améliorés de métabolites secondaires.

## **6.2. Inconvénients**

Parmi ces inconvénients (**Bhatia et al., 2015**) :

- Nécessite beaucoup de procédures coûteuses des installations spécialisées et du personnels avec des compétences avancées.
- Les plantes produites ne fonctionnent pas de manière autotrophe, contrairement aux plantes de champ.
- Parfois, la cal n'apparaît pas avant plusieurs mois et pour certaines plantes, la cal n'apparaît pas.
- Les chances de produire des plantes génétiquement aberrantes peuvent être accrues.
- Les plantules sont plus sensibles à la contamination et à la perte d'eau dans l'environnement extérieur, puisqu'elles sont cultivées à une humidité relative élevée et à température constante.

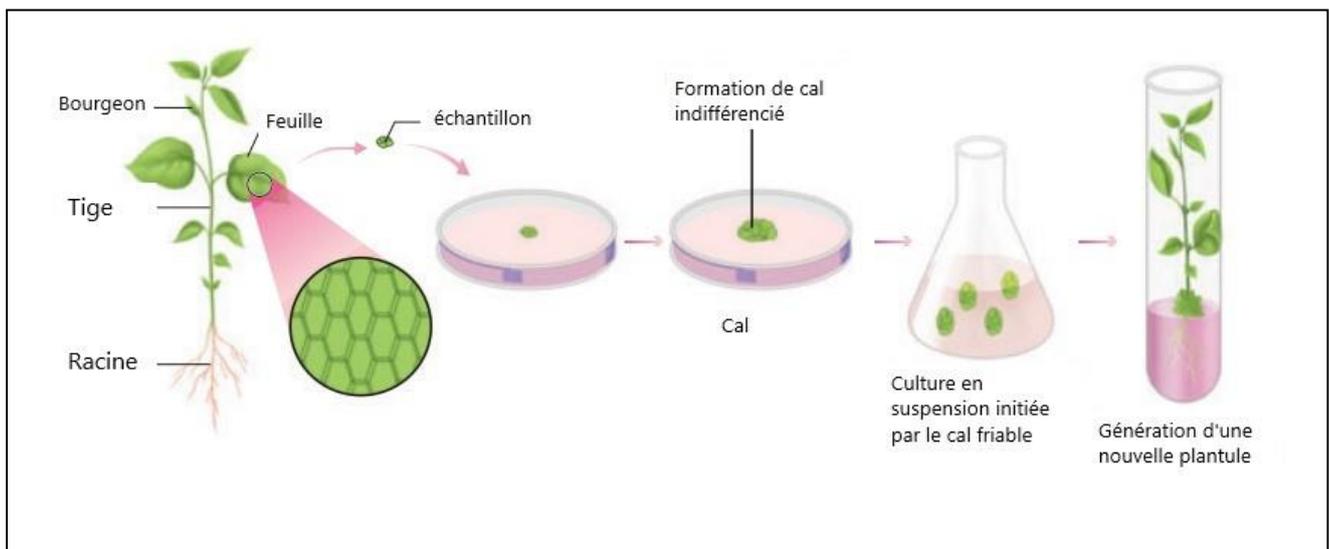
# *Chapitre II*

### 4.1 Définition

La culture végétale en suspension est une culture où les cellules se divisent rapidement en milieu liquide (**Evans *et al.*, 2003**). Largement utilisée en biologie végétale comme un outil pratique pour l'étude de phénomènes, elle convient à l'analyse de processus physiologiques complexes aux niveaux cellulaire et moléculaire grâce au taux élevé de croissance cellulaire (**Moscatiello *et al.*, 2013**).

Pour initier une culture en suspension (**Figure 4**), des morceaux de cals établis, indifférenciés et friables (matériaux de départ le plus courant, pour leur fragmentation rapide) sont introduits dans un milieu liquide dans des flacons ou d'autres fioles appropriées. La solution est ensuite agitée en permanence (30-100 tours/minute) en plaçant les flacons sur un agitateur giratoire/orbital. Le liquide est agité, ce qui provoque la division du tissu en agrégats cellulaires plus petits et en cellules individuelles sous une légère pression. Dans le but de maintenir l'uniformité de la distribution des cellules dans le milieu et favoriser l'échange de gaz au sein de la culture (**Bhojwani et Dantu, 2013**).

En outre, les cultures de cellules végétales en suspension constituent une source précieuse pour la production de métabolites secondaires de grande valeur et d'autres substances d'intérêt commercial (**Moscatiello *et al.*, 2013**).



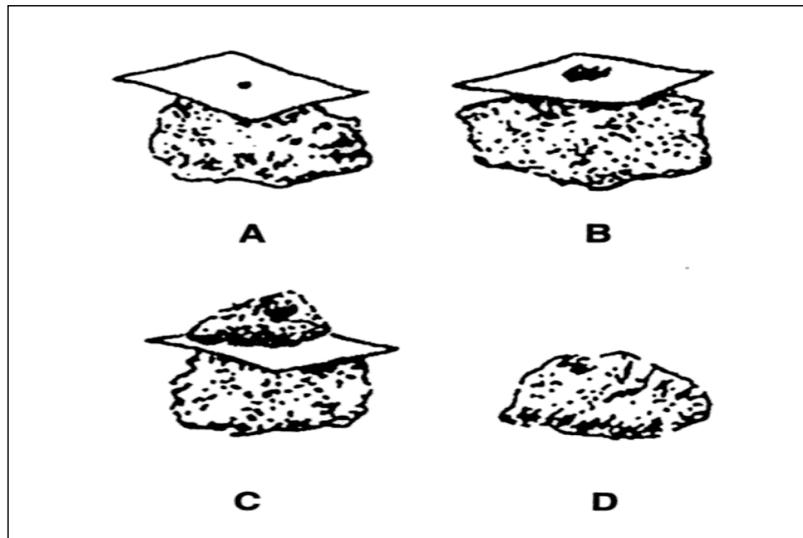
**Figure 4 :** Initiation d'une culture en suspension à partir d'un cal (**Bhatia *et al.*, 2015**).

## 4.2 Historique

La possibilité de cultiver des cellules végétales individuelles dans des milieux liquides était l'un des objectifs des premiers travaux « d'**Haberlandt** » sur les cultures de cellules végétales. Cet objectif a commencé à se concrétiser dans les années **1950** avec les travaux de « **Muir** » (**Bhojwani et Dantu, 2013**).

En **1953**, « **Muir** » a démontré qu'en transférant des tissus de cals de *Tagetes erecta* et *Nicotiana tabacum* dans un milieu liquide et en agitant les cultures sur une machine à agiter, il était possible de diviser le tissu en cellules uniques et en petits agrégats cellulaires (**Pullaiah et al., 2017**).

Plus tard, en 1954 Muir et ses collaborateurs ont également réussi à prélever mécaniquement des cellules individuelles des cultures sous agitation (cultures en suspension) et à les faire se diviser en les plaçant individuellement sur des papiers filtres séparés reposant sur des cultures de cals bien établies (**Figure 5**) qui fournissaient les facteurs nécessaires à la division cellulaire (**Bhojwani et Dantu, 2013 ; Pullaiah et al., 2017**).



**Figure 5** : Premier exemple de technique de culture unicellulaire schématisé d'après les travaux de **Muir et al. (1954)**.

*A : Cellule unique placée sur un petit morceau de papier filtre placé au-dessus d'un tissu de cals ; B : La cellule isolée se multiplie ; C : La division des cellules conduit au développement d'un tissu de cals ; D : Culture de cals régénérée à partir d'une culture d'une seule cellule (Razdan, 2003).*

### **4.3 Utilité de la culture en suspension :**

Les cultures en suspension ont trouvé une large application à la fois pour la recherche et pour l'exploitation commerciale en partie grâce à la croissance rapide de ses cellules. Ces cultures sont utilisées pour plusieurs raisons (**Evans *et al.*, 2003**) :

- Faciles à entretenir et permettent une grande flexibilité dans l'approche expérimentale et idéales pour étudier les différents facteurs et composés qui affectent la croissance et la différenciation.
- Constituent un système utile pour étudier la division et le cycle cellulaire.
- Peuvent être utilisées pour la préparation rapide de protoplastes à haut rendement. Les protoplastes eux-mêmes constituent un système unique pour la recherche fondamentale et appliquée.
- La formation d'embryons somatiques dans les cultures en suspension est idéale pour la production à grande échelle de plantes commerciales.
- Utilisation en tant que système de production de produits chimiques dérivés de plantes.

### **4.4 Types de culture en suspension**

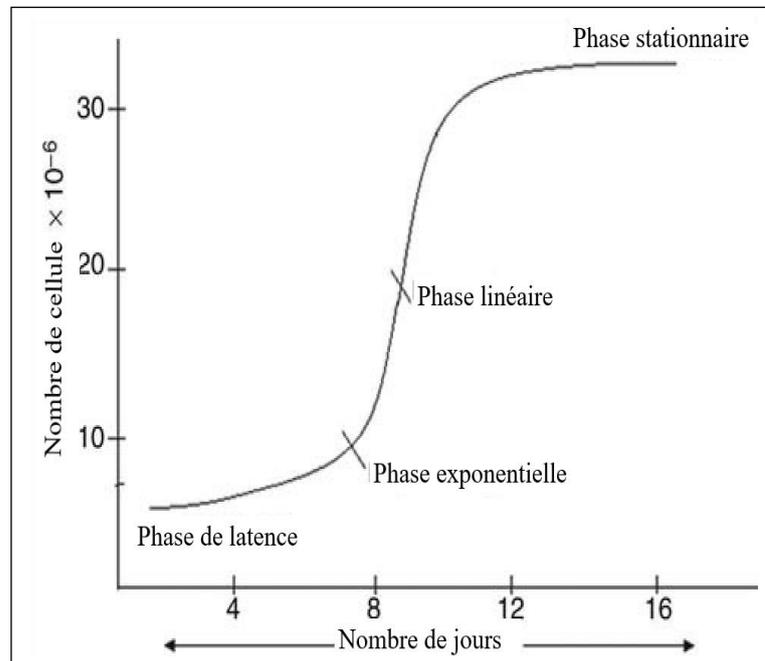
La culture en suspension peut être divisée en 2 types :

#### **4.1. Cultures discontinues**

Les cultures discontinues sont des systèmes dans lesquels les cellules se développent dans un volume fixe de milieu de culture. Pendant l'incubation, il y a une augmentation progressive de la masse cellulaire. La croissance s'arrête en raison de l'épuisement des nutriments contenus dans le milieu. Ces cultures sont en agitation constante à une vitesse de 30-180 rpm sur des agitateurs orbitaux (**George *et al.*, 2008**).

Les cultures par lots sont fréquemment utilisées pour diverses expériences scientifiques, bien qu'elles présentent un certain nombre de limites qui restreignent leur utilisation pour des études approfondies de la croissance et du métabolisme (**George *et al.*, 2008**).

Les cultures discontinues présentent un schéma de croissance sigmoïde (**Figure 6**) sur une courte période.



**Figure 6** : Courbe de croissance de la culture en suspension discontinue (**Bhatia et al., 2015**).

La croissance cellulaire passe par plusieurs phases à savoir (**Bhatia et al., 2015**) :

- **Phase de latence** : La culture connaît d'abord une période d'expansion minimale. Avant la division cellulaire, pendant la phase de latence, les cellules achèvent toutes les synthèses essentielles et s'adaptent aux nouvelles sources nutritionnelles.
- **Phase exponentielle** : au cours de cette phase les cellules se divisent extrêmement rapidement, ce qui entraîne une augmentation du nombre cellulaire. Selon l'espèce, le nombre de cellules double toutes les 20 à 50 heures dans des conditions idéales.
- **Une phase suivante** de division cellulaire rapide entraîne une croissance linéaire de la population de la culture, qui ralentit lorsque des nutriments spécifiques deviennent limités.
- **Phase stationnaire** : le taux de division cellulaire ralentit, la population cellulaire se stabilise et la croissance s'arrête finalement. A mesure que les niveaux de nutriments diminuent. Le nombre de cellules sera maintenu par des caractéristiques et un taux

négligeable de division cellulaire. Les cellules mourront si la phase stationnaire se prolonge trop longtemps.

### **4.2. Cultures continues**

Les suspensions cellulaires peuvent également être cultivées dans des systèmes de culture continue où un état de croissance stable peut être maintenu plus facilement. Un système de culture continue implique un apport continu de milieu frais et un retrait du milieu usagé sans perte de cellules, ce qui permet d'augmenter la biomasse et d'assurer une croissance équilibrée sur une longue période. Ceci est important lorsque les cellules végétales doivent être utilisées pour la production à grande échelle de métabolites primaires ou secondaires. Les systèmes de culture continue sont de deux types : ouverts et fermés (**Jha et Ghosha, 2005**).

- Dans le système de culture continue ouvert, les deux composants sont changés ; le milieu usagé et les cellules sont remplacés périodiquement par l'ajout automatisé de milieu frais à un rythme égal à celui de la formation de nouvelles cellules. La méthode est si précise que les cultures sont maintenues indéfiniment à un taux de croissance sous-maximal constant.
- Le système de culture continu fermé est un processus dans lequel un composant reste inchangé (la masse cellulaire) et où seule la composition du milieu est modifiée en permanence. Dans ces conditions, les cultures se développent de manière exponentielle.

## **4.5 Conditions**

### **5.1. Milieu de culture**

En général, un milieu sur lequel un cal friable à croissance rapide est adapté à la mise en place d'une culture en suspension de cette espèce, à condition qu'il ne contienne pas d'agar (**Tableau III**), Une meilleure dispersion cellulaire peut être obtenue en manipulant le rapport auxine/cytokinine (**Bhojwani et Dantu, 2013**).

Outre le milieu, la densité cellulaire est cruciale pour la croissance des cultures en suspension. Il est préférable de maintenir la densité cellulaire à «  $5 \times 10^4$  cellule  $ml^{-1}$  » voir plus lors du démarrage des cultures en suspension (**Bhojwani et Dantu, 2013**).

**Tableau III** : Composition du milieu recommandé pour la culture de cellules mésophylles isolées de *Calystegia sepium* d'après Rissini 1972.

Constituants	Quantité (mg L <sup>-1</sup> )
<b>Macroéléments</b>	
<b>KNO<sub>3</sub></b>	<b>950</b>
<b>NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub></b>	<b>725</b>
<b>MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O</b>	<b>187</b>
<b>CaCl<sub>2</sub></b>	<b>169</b>
<b>KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub></b>	<b>69</b>
<b>Microéléments</b>	
<b>MnSO<sub>4</sub>.4H<sub>2</sub>O</b>	<b>12.5</b>
<b>H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub></b>	<b>5</b>
<b>ZnSO<sub>4</sub>.4H<sub>2</sub>O</b>	<b>5</b>
<b>NaMoO<sub>4</sub>.2H<sub>2</sub>O</b>	<b>0.125</b>
<b>CuSO<sub>4</sub>.5H<sub>2</sub>O</b>	<b>0.0125</b>
<b>FeSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O</b>	<b>13.9</b>
<b>Na-EDTA</b>	<b>18.6</b>
<b>Vitamines</b>	
<b>Glycine</b>	<b>2</b>
<b>Pyridoxine HCl</b>	<b>0.5</b>
<b>Thiamine HCl</b>	<b>0.5</b>
<b>Biotin</b>	<b>0.05</b>
<b>Acide folique</b>	<b>0.5</b>
<b>Myo-inositol</b>	<b>100</b>
<b>Régulateurs de croissance</b>	
<b>BAP</b>	<b>0.1</b>
<b>2,4-D</b>	<b>1</b>
<b>Sucrose</b>	<b>10,000</b>
<b>pH</b>	<b>5.5</b>

### **5.2. Détermination de la croissance cellulaire**

L'étude de la croissance cellulaire repose sur plusieurs paramètres :

- **Nombre de cellules/mL de milieu** : Le comptage des cellules se fait en pipettant 1 ml de la culture en suspension et en comptant le nombre total de cellules au microscope (chambre de comptage cellulaire) (**Bhatia et al., 2015**).
- **Poids frais des cellules** : Les cellules sont collectées sur un papier filtre circulaire pré-pesé (à l'état humide) dans un entonnoir de Buchner. Les cellules sont ensuite lavées à l'eau pour éliminer le milieu de culture et assécher sous vide, et repesées (**Jha et Ghosha, 2005**).
- **Poids sec des cellules** : Les cellules sont prélevées à l'aide d'un papier filtre préalablement peser, puis elles sont séchées pendant 12 heures à 60° C et refroidies) et pesées à nouveau (**Jha et Ghosha, 2005**).

### **5.3. Tests de viabilité des cellules**

Les cultures de cellules végétales ont été largement utilisées comme modèle pour les études biochimiques et physiologiques ainsi que dans certains processus biotechnologiques, tels que la perméabilisation des cellules, l'immobilisation des cellules ou la culture des cellules dans des bioréacteurs (**Vaňková et al, 2001**). Par conséquent, l'évaluation précise du nombre de cellules viables dans une population est très importante pour éviter l'inclusion de cellules mortes ou peu viables dans les calculs des résultats par cellule ou sur la base du poids frais, ou pour indiquer la densité cellulaire maximale atteignable dans la production.

Une cellule est considérée comme viable si elle a la capacité de croître et de se développer. Les tests de viabilité sont basés sur les propriétés physiques des cellules viables, telles que l'intégrité de la membrane, leur activité métabolique ou la mesure de l'activité d'une enzyme (**Castro-Concha et al, 2006**).

#### **5.3.1. Méthode de la coloration au Bleu d'Evans (BE)**

Le bleu d'Evans est un colorant utilisé pour évaluer l'intégrité des membranes cellulaires. Cette substance traverse les membranes endommagées, colorie l'intérieur des cellules mortes. Ces cellules sont ensuite identifiées par observation microscopique ou par analyse spectrométrique (**Castro-Concha et a.l, 2006**).

### **5.3.2. Méthode MTT/ TTC**

Cette méthode repose sur la mesure de l'activité d'enzymes : telles que les estérases et les réductases. Le MTT (bromure de 3-[4,5-diméthylthiazol-2yl]-2,5-diphényl-tétrazolium) et le TTC (chlorure de 2,3,5-triphényl-tétrazolium) sont des réductases qui acceptent les électrons de la chaîne de transport d'électrons de la mitochondrie. Par conséquent, ces molécules sont transformées en un formazan insoluble dans les cellules vivantes dont les mitochondries sont pleinement fonctionnelles. (Castro-Concha *et al*, 2006).

### **5.3.3. Méthode Diacétate de fluorescéine (FDA)**

Le diacétate de fluorescéine (FDA) est un substrat fluorogène qui peut traverser la membrane cellulaire, est hydrolysé par des estérases intracellulaires, qui coupent ensuite le groupe diacétate pour produire la substance hautement fluorescente qu'est la fluorescéine, (Castro-Concha *et al*, 2006) qui devient verte lorsqu'elle est exposée à la lumière UV. La fluorescéine s'accumule principalement dans le cytoplasme des cellules intactes parce qu'elle n'est pas librement perméable à travers la membrane plasmique, mais elle est perdue dans les cellules mortes et brisées. (Bhojwani et Dantu, 2013).

## **4.6 Culture en suspension dans le pharmaceutique**

Les protéines thérapeutiques ont révolutionné la médecine moderne et sont actuellement utilisées pour traiter plusieurs maladies comme le diabète, l'hépatite, l'anémie, et le cancer. Ce groupe de protéines comprend principalement des vaccins, des anticorps, et plusieurs protéines dérivées du sérum. (Xu *et al.*, 2011).

Dans une étude, une culture cellulaire en suspension du tabac a été réalisé sur deux lignées cellulaires à croissance rapide « Tobacco BY2 » et « Nicotiana tabacum-1 » a montré une production à grande quantité de protéines pharmaceutiques, notamment des anticorps, des vaccins, des hormones (Xu *et al.*, 2011).

## **4.7 Culture en suspension dans l'agroalimentaire**

La culture végétale en suspension à devenu la source potentielle pour la production des métabolites secondaire important dans l'industrie alimentaire tels que « **les ginsénosides** » utilisé comme additif alimentaire dans l'amélioration et la maintenance d'une productivité élevée (Eibl et Eibl, 2007).

Différentes cultures végétales du ginseng américain ont été réalisées en respectant les facteurs chimiques et environnementaux. Les résultats ont montré que la culture en suspension est la culture la plus favorable pour la production à grande échelle de ce métabolite ginsénosides par rapport à d'autres méthodes de cultures végétales (**Qiang et al., 2020**).

### **4.8 La Culture en suspension dans la cosmétologie**

Les cultures cellulaires sont capables de synthétiser un large éventail de composés phytochimiques qui sont utilisés pour la production pharmaceutique, alimentaires et comme ingrédients cosmétiques. (**Krasteva et al., 2020**).

Actuellement, la plupart des gens préfèrent utiliser des produits cosmétiques bio, et ces dernières années on a vu une augmentation du produits cosmétiques obtenus par la technologie de la culture cellulaire végétale (**Krasteva et al., 2020**).

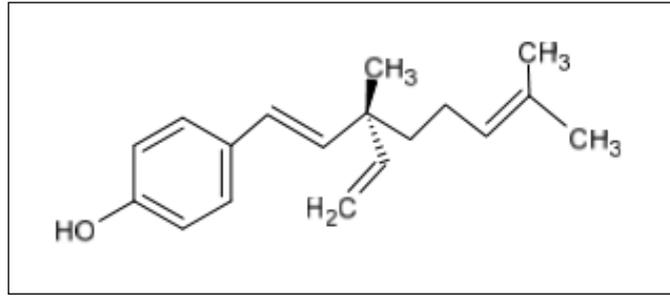
*L'Aloe-vera L* est une plante commerciale et médicinale importante en raison de ces métabolites secondaires. Le gel clair et le latex jaune sont les deux principales sources de cette plante obtenue à partir des grandes cellules parenchymatiques de la feuille.

L'**aloïne** est le métabolite secondaire le plus important dans cette plante, constitué dans le latex, il a un usage dermatologique avec des propriétés antigéniques et antibactériennes (**Raie et al., 2014**).

Lors d'une étude de culture en suspension de l'*Aloe vera L*, des éliciteurs abiotiques sont utilisés pour stimuler la concentration de ces métabolites secondaires et augmenter le volume de la culture. L'un de ces éliciteur est le saccharose qui à renforcer la production de l'aloïne jusqu'à atteindre la teneur la plus élevée qui était de 76.3% dans 168 heures.

La culture cellulaire en suspension est le meilleur système de culture pour avoir la plus grande quantité de ce métabolite, l'aloïne le composé actif de l'*Aloe vera L*, qui a une capacité anti-ulcéreuse, antibactériennes, capacité de guérison des brûlures de la peau et propriétés des lésions cutanées (**Raie et al., 2014**).

L'étude récente menée par **Nizam et al. (2023)** sur une culture cellulaire en suspension de l'espèce végétale *Psoralea corylifolia L* a montré sa capacité de traiter des affections cutanées, et cela grâce au « Bakuchiol » (**Figure 7**) le composé actif extrait de cette plante.



**Figure 7 :** Structure chimique du bakuchiol (**Barna *et al.*, 2023**).

Il a été démontré que le bakuchiol est une molécule qui fonctionne en présence de la vitamine C pour réguler les gènes impliqués dans la fonction de la barrière cutanée et la production de la matrice extracellulaire ainsi que la jonction dermo-épidermique. Il améliore l'activité des cellules fibroblastiques humaines et il inhibe l'expression des métalloprotéinases, cela aide à prévenir le vieillissement cutané (**Nizam *et al.*, 2023**).

Cette étude a permis au bakuchiol d'être un traitement anti-âge efficace pour les personnes de tous types de peau (**Nizam *et al.*, 2023**).

# *Chapitre III*

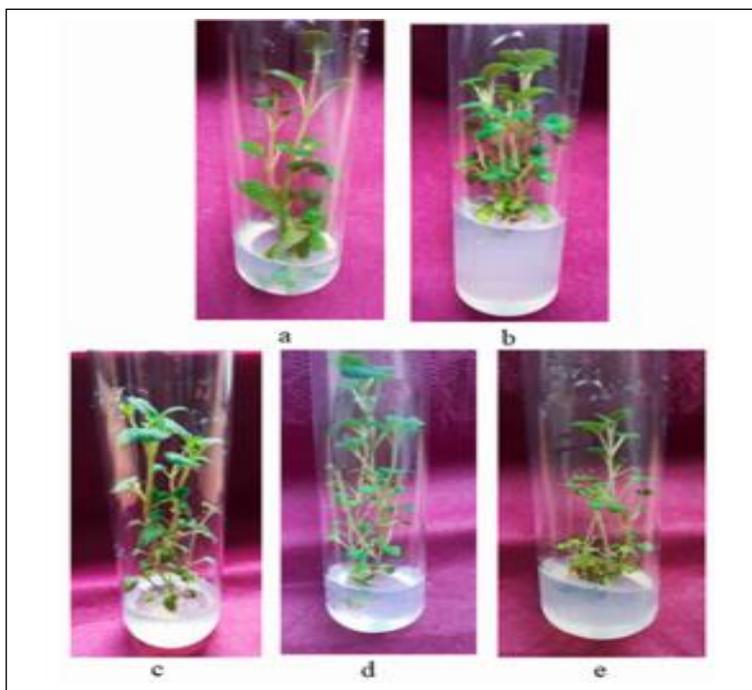
### Cas d'étude

#### Comparaison de l'activité anti-tumorale et antioxydante des extraits de la plante *Clinopodium vulgare L* cultivé avec l'espèce sauvage

Les plantes médicinales sont devenues la source principale des nouveaux médicaments, et l'utilisation de ces composés actifs comme remèdes surs et non toxiques ne cesse de croître.

*Clinopodium vulgare L.* est l'une de ces plantes, utilisée pour ses propriétés anti-inflammatoire et antibactérienne grâce à ses composés actifs tels que les polyphénols, les flavonoïdes, les acides phénols carboxyliques et les glycosides triterpénoïdes. Sa composition chimique a aussi montré une activité cytotoxique contre la plupart des lignées cellulaires cancéreuse (Petrova *et al.*, 2023).

Petrova et ses collaborateurs ont réalisé une culture *in vitro* en collectant des graines de *Clinopodium vulgare L.*, utilisées comme matériel végétal. Les graines ont été lavées à l'eau, stérilisées avec de l'alcool éthylique à 70%, désinfectées et placées dans des boîtes de Pétri de 9 cm. Les graines ont été mises à germer sur un milieu de base « Murashige et Skoog » (MS) (Figure 8). Le taux de germination atteint était de 95% au 21ème jour.



**Figure 8** : Micropropagation de *Clinopodium vulgare L.* sur milieu MS avec différents PGR : (a) milieu MS témoin, (b) B1, (c) Z1, (d) K1 et (e) iP1 (Petrova *et al.*, 2023).

PGR : Régulateurs de Croissance de plantes.

B1 : 6-benzylaminopurine (BAP).

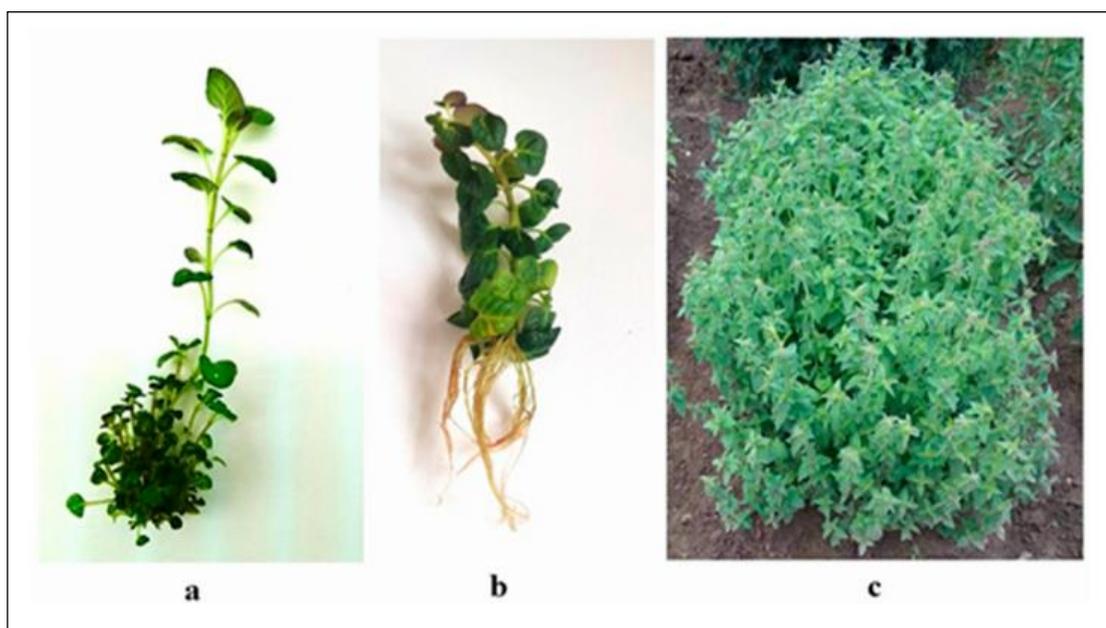
Z1 : Zéatine.

K1 : Kinétine.

ip1 : 2-isopentényl.

Des explants (extrémités des pousses de taille de 6 à 8 mm, et segments nodaux de taille de 8 à 10 mm) ont été cultivés, dans des tubes de culture, sur du milieu MS pur supplémenté avec une cytokinine et une auxine pendant 4 semaines. Après enracinement, les plantes sont transférées et plantées à l'extérieur dans des parcelles expérimentales (**Figure 9**).

A l'issu des 4 semaines d'incubation, les résultats ont montrés une augmentation dans le taux de la prolifération des pousses, le taux de multiplication, la hauteur moyenne, et le nombre de pousses obtenus comprenait 40 explants en double pour chaque parcelle expérimentale.



**Figure 9** : Culture *in vitro* de *Clinopodium vulgare L.* : (a) multiplication des pousses sur milieu MS complété avec B1I0.1, (b) enracinement *in vitro* sur milieu MS demi-fort et (c) plantes cultivées dans le champ expérimental (**Petrova et al., 2023**).

B1I0.1 : BAP et IBA (acide indole-3-butyrique).

#### 1. Analyse phytochimique :

**Petrova et al (2023)** ont récolté les parties aériennes des plantes cultivées *in vitro* dans la parcelle expérimentale et les parties aériennes de plantes sauvages (tiges, feuilles et fleurs) pour effectuer des analyses d'activités phytochimiques et anti-tumorales en formulant ces parties en suspension végétale.

Les polyphénols totaux ont été déterminés par dosage colorimétrique en utilisant la méthode du Folin-Ciocalteu. De même pour les flavonoïdes totaux qui ont été dosés avec un réactif au chlorure d'aluminium.

Les polyphénols et des flavonoïdes obtenus sont :

- L'acide rosmarinique était abondant dans les échantillons des plantes cultivées *in vitro* et sauvages, avec une abondance au niveau des feuilles.
- La catéchine a été détectée uniquement dans les fleurs et les feuilles des plantes cultivées *in vitro*.
- L'acide néochlorogénique et l'acide caféique étaient plus élevés dans les fleurs des plantes cultivées *in vitro* que celles sauvages.

Pour démontrer l'activité antioxydante des extraits, **Petrova et ses collaborateurs** ont mesuré l'activité de la capacité d'absorption des radicaux oxygène (ORAC).

Les résultats obtenus montrent qu'aucune différence de l'activité ORAC n'est observée entre les extraits des plantes cultivées *in vitro* et sauvages, mais il a été observé que la plus faible activité était dans les tiges en comparaison aux feuilles et fleurs.

Pour l'activité anti-tumorale, des cellules tumorales humaines (carcinome cervical, carcinome colorectal, et carcinome mammaire) ont été cultivées dans un milieu Eagle modifié du Dulbecco (DMEM) additionné de 10% de sérum bovin fœtal, de 2Mm de glutamine, des antibiotiques (pénicilline et streptomycine) et incubé à 37°C avec 5% de CO<sub>2</sub>.

Un test de viabilité cellulaire qui est le MTT a été utilisé dans le but de mettre en évidence les effets des extraits de *C. vulgare* sur la viabilité des cellules tumorales employées, à l'aide d'un spectrophotomètre dans une plaque de 96 puits.

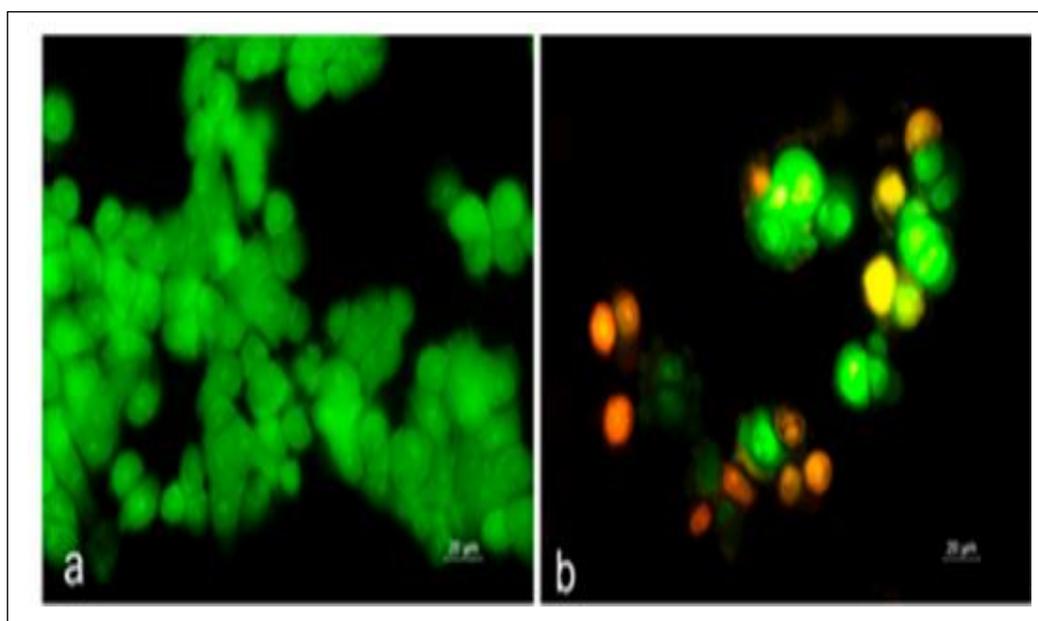
Les cellules ont été traitées avec quatre concentrations différentes d'extraits de *C. vulgare* de 125 µg/mL à 1000 µg/mL en présence d'un contrôle (0 µg/mL).

Les résultats du test MTT ont montré que les deux extraits, sauvage et de culture *in vitro* ont une grande activité cytotoxique plus particulièrement les extraits des fleurs par rapport aux autres extraits avec les concentrations de 250µg/mL et 500 µg/mL.

**Petrova et al. (2023)** ont également réalisé une analyse par microscopie à fluorescence afin d'examiner l'influence de l'extrait sur les cellules cancéreuses de carcinome colorectal.

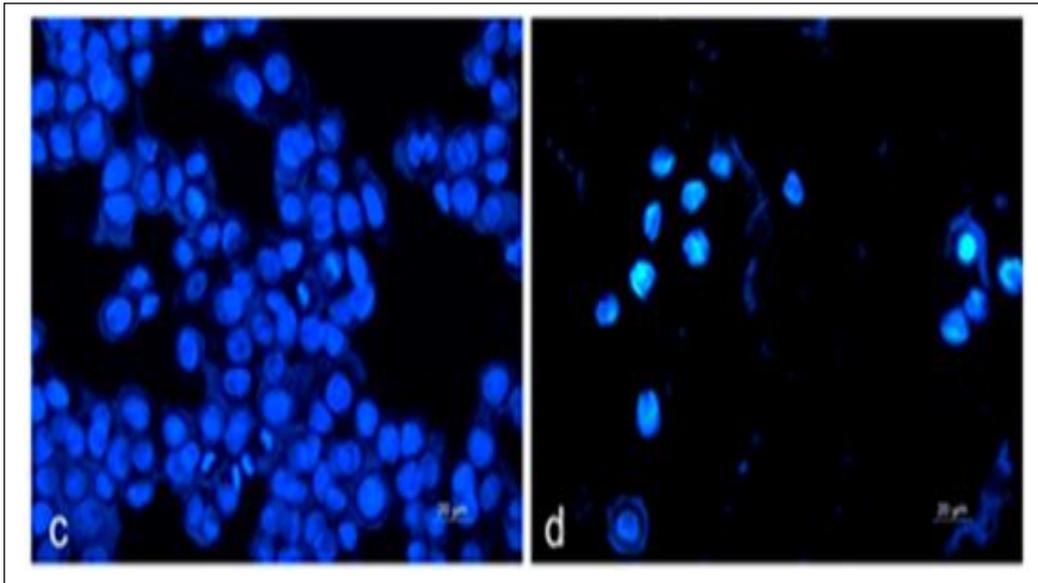
Des cellules cancéreuses traitées avec de l'extrait et des cellules cancéreuses (témoin) non traitées, ont été cultivées sur des lamelles, et colorées avec l'acridine orange / bromure d'éthidium (AO/EB) et au 4',6-diamidino-2-phénylindole (DAPI) des colorants fluorescents (**Figure 10**).

Les résultats de leurs expériences ont montré une coloration verte homogène des cellules de carcinome colorectal témoin (**Figure 10 a**), tandis que les cellules traitées avec de l'extrait ont montré une diminution dans leur densité, et un grand nombre de cellules apoptotiques précoces ont été colorées en vert ou jaune, ainsi que les cellules apoptotiques tardives ont été colorées en rouge (**Figure 10 b**).



**Figure 10** : Altérations cytomorphologiques induites par l'extrait de cultures *in vitro* de *C. vulgare* dans les cellules de carcinome colorectal HT-29. (a) Cellules témoins non traitées ; (b) cellules traitées avec l'extrait de *C vulgare*. (a,b) Coloration AO/EB; microscopie à fluorescence ; objectif 40× (**Petrova et al., 2023**).

Ils ont aussi étudié les altérations de la morphologie nucléaire causée par l'extrait, les résultats ont montré une forme ovale des noyaux des cellules non traitées avec une coloration bleue homogène (**Figure 11 c**), par contre la morphologie des noyaux des cellules traitées a été altérée, la chromatine a été condensée et avait une coloration fluorescente intense (**Figure 11 d**).



**Figure 11** : Altérations cytomorphologiques induites par l'extrait de cultures *in vitro* de *C. vulgare* dans les cellules de carcinome colorectal HT-29. (c) Cellules témoins non traitées ; (d) cellules traitées avec l'extrait de *C vulgare*. Coloration DAPI ; microscopie à fluorescence ; objectif 40× (Petrova *et al.*, 2023).

### 2. Discussion générale de l'étude

**Petrova et ses collaborateurs** ont réalisé cette étude en développant un protocole de micro propagation simple par des extrémités de pousses et des segments nodaux des plantules de *Clinopodium vulgare L* cultivées *in vitro*.

Leurs résultats ont montré le rôle efficace de la composition chimique du milieu nutritif afin de maintenir une bonne culture des tissus végétaux.

L'ajout de cytokinine au milieu basal MS influence le processus de croissance et de développement cellulaire.

Ils ont aussi étudié l'activité antioxydante de cette plante en comparant le contenu phénolique total et flavonoïdique total des feuilles, fleurs et tiges des plantes cultivées et les plantes sauvages.

Les fleurs et les feuilles des plantes cultivées *in vitro* étaient plus riches en ces constituants végétaux par rapport aux plantes sauvages, c'est pour cela qu'ils ont trouvé une activité antioxydante plus élevée dans les plantes cultivées.

Les plantes cultivées *in vitro* ont aussi montré une forte activité anti-tumorale due aux teneurs élevées en acide néochlorogénique et en catéchine connus pour leurs effets anti-tumoraux.

Dans l'ensemble, l'étude de **Petrova et ses collaborateurs** a montré que la plante de *Clinopodium vulgare L* cultivée *in vitro* et à l'état sauvage présentaient des activités anti-tumorales et antioxydante, avec des variations dans les niveaux d'activité en fonction de la partie de la plante et de la méthode de cultures.

***Conclusion***

# CONCLUSION

---

La culture végétale *in vitro* est une technique qui aide à comprendre la croissance et le développement des plantes au niveau cellulaire, elle fait référence à la capacité d'une cellule unique à exprimer l'intégralité de son génome par division cellulaire.

La culture végétale *in vitro* est une source précieuse pour la production des métabolites secondaires de grande valeur, elle est utilisée dans plusieurs domaines comme l'industrie pharmaceutique, la cosmétologie, et l'agro-alimentaire.

Une des méthodes de production biotechnologique, dont l'efficacité a déjà été démontrée pour plusieurs molécules, est l'utilisation de cultures de cellules végétales en suspension.

Ces cellules sont alors cultivées dans un milieu contenant tous les nutriments et toutes les phytohormones nécessaires au développement de la culture. La croissance des cellules est plus rapide dans un milieu liquide comparant au milieu solide, car chaque cellule a un accès plus direct aux nutriments.

Les résultats de l'étude comparative, citée dans notre document, de l'état sauvage et de la culture en suspension de *C.vulgare* ont montré que la teneur totale en flavonoïdes et en polyphénols était plus élevée dans la plante cultivée, Ce qui explique l'activité antioxydante élevée des feuilles cultivées due, notamment, à la présence d'acide chlorogénique, d'acide rosmarinique, et d'acide caféique.

L'étude a aussi évalué l'activité anti-tumorale des extraits de plantes cultivées où ils ont constaté que la présence de la catéchine et de l'acide néochlorogénique dans les feuilles et les fleurs cultivées a montré une activité cytotoxique meilleure sur les lignées cellulaires cancéreuses comparant aux mêmes extraits de la plante sauvage.

Plusieurs études comparatives des plantes sauvages et cultivées ont montré majoritairement que les extraits issus des plantes cultivées contiennent un taux plus élevé de composés actifs qui sont utilisés comme source principale pour la production de plusieurs médicaments.

Cette recherche bibliographique était menée dans l'optique de maîtriser théoriquement le monde de la culture cellulaire végétale en suspension, notamment, afin de pouvoir lancer la pratique dans les années à venir, ceci dans de meilleures conditions de compréhensions et de connaissances possible.

## ***Références bibliographiques***

- Akin, B. "tissue culture techniques of medicinal and aromatic plants: history, cultivation and micropropagation". *Journal of scientific reports-A* ; 2020, 45 :253-266.
- Barbulova A, Apone F, Colucci G. Plant Cell Cultures as Source of Cosmetic Active Ingredients. *Cosmetics* ; 2014, 1 :94-104.
- Barna A S, Maxim C, Trifan A, Blaga C B, Cimpoesu R, Turcov D, Suteu D. Preliminary Approaches to Cosmeceuticals Emulsions Based on N-ProlylPalmitoyl Tripeptide-56 Acetat-Bakuchiol Complex Intended to Combat Skin Oxidative Stress. *International Journal of Molecular Sciences* ; 2023, 24 :1-17.
- Beuel A.K, Jablonka N, Heesel J, Severin K, Spiegel H, Rasche S. LEDitSHAKE : A lighting system to optimize the secondary metabolite content of plant cell suspension cultures. *Scientific Reports* ; 2021, 11 :1-15.
- Bhatia S, Sharma K, Dahiya R, Bera T. *Modern Applications of Plant Biotechnology in Pharmaceutical Sciences*. Londre : Academic Press, 2015 :452.
- Bhojwani S.S, Dantu P.K. *Plant Tissue Culture : An Introductory Text*. Londre : Springer, 2013 :309.
- Cassells AC. Pathogen and biological contamination management in plant tissue culture : phytopathogens, vitro pathogens and vitro pests. *Methods in Molecular Biology* ; 2012, 877 :57-80.
- Castro-Concha L. A, Escobedo R. M, De Miranda-Ham M. L. Measurement of cell viability in in vitro cultures. *Plant Cell Culture Protocols* ; 2006, 318 :71-76.
- Dobránszki J. Application of naturally occurring mechanical forces in *in vitro* plant tissue culture and biotechnology. *Plant Signaling & Behavior* ; 2021, 16 :1-16.
- Eibl R, Eibl D. Design of bioreactors suitable for plant cell and tissue cultures. *Pytochemistry Reviews* ; 2007, 7 :593–598.
- Evans D. E, Coleman J. O, Kearns A. *Plant Cell Culture*. Oxford : Garland Science, 2003 :194.
- George E. F, Hall M. A, De Klerk G. J. *Plant propagation by tissue culture 3rd Edition* : Springer, 2008 :502.
- Hashim M, Ahmad B, Drouet S, Hano C, Abbasi B.H, Anjum S. Comparative Effects of Different Light Sources on the Production of Key Secondary Metabolites in Plants In Vitro Cultures" *Plants* ; 2021, 10 :1-18.

- Hussain A, Qarshi I. A, Nazir H, Ullah I. Plant tissue culture : current status and opportunities. *Recent advances in plant in vitro culture* ; 2012, 6 : 1-28.
- Jha T.B, Ghosha B. *Plant Tissue Culture : Basic and Applied*. Hyderabad : Universities Press, 2005 :206.
- Krasteva, Gergana & Georgiev, Vasil & Pavlov, Atanas. Recent applications of plant cell culture technology in cosmetics and foods. *Engineering in Life Sciences* ; 2020, 21 :68-766.
- Kumar S. *Plant Tissue Culture*. New Delhi : APH Publishing Corporation, 2009 :286.
- Kumar V, Mishra S. *Plant Tissue Culture : Theory and Techniques*. New Delhi : Scientific Publishers, 2016 :211.
- Motolinía-Alcántara E A, Castillo-Araiza C O, Rodríguez-Monroy M, Román-Guerrero A, Cruz-Sosa F. Engineering Considerations to Produce Bioactive Compounds from Plant Cell Suspension Culture in Bioreactors. *Plants*; 2021; 10 : 2762.
- Nizam NN, Mahmud S, Kamruzzaman M, Hasan M K. Bakuchiol and its pharmacological benefits. *Awaiting peer review* ; 2023, 29 :1-17.
- Petrova M, Dimitrova L, Dimitrova M, Denev P, Teneva D ,Georgieva A, Petkova-Kirova P, Lazarova M, Tasheva K. Antitumor and Antioxidant Activities of InVitro Cultivatedand Wild-Growing Clinopodium vulgare L. *Plants*. *Plants* ; 2023, 12 : 1-16.
- Pullaiah T, Rao M. V. S, Sreedevi E. *Plant Tissue Culture : Theory & Practicals*. Jodhpur : Scientific Publishers, 2017 :233.
- Qiang B,Gao Y, Miao J, Phillips N, Wei K. Recent Advances in the Tissue Culture of American Ginseng (Panax Quinquefolius). *Chemistry & Biodiversity* ; 2020, 17 :1-3.
- Raei M, Angaji S A, Omidi M, Khodayari M. Effect of abiotic elicitors on tissue culture of Aloe vera. *International Journal of Biosciences* ; 2014, 5 :74-81.
- Razdan MK. *Introduction to Plant Tissue Culture*. Oxford : Enfield NH,2003 :375.
- Trigiano R.N, Gray D.J. *Plant Development and Biotechnology*. Royaume-Uni : CRC Press, 2004 :376.
- Vaňková R, Kuncová G, Opatrná J, Süssenbeková H, Gaudinová A, Vaněk T. Two-dimensional fluorescence spectroscopy - a new tool for the determination of plant cell viability. *Plant Cell Reports* ; 2001,1 :41-47.
- Xu J, Ge X, Dolan MC. Towards high-yield production of pharmaceutical proteins with plant cell suspension cultures. *Biotechnology Advances* ; 2011, 3 :278-99.

- Yadav P. R, Tyagi R. *Biotechnology of Plant Tissues*. New Delhi : Discovery Publishing House, 2006 :256.

## Résumé

Les plantes sont considérées comme source importante de divers domaines tels que l'agroalimentaire, la cosmétologie, et le pharmaceutique. La culture *in vitro* et une technique permettant de faire croître des cellules, elle est très variée et regroupe plusieurs types de cultures dont la culture en suspension, où les cellules se divisent rapidement en milieu liquide en favorisant la production de métabolites secondaires. L'utilisation de ces composés actifs comme remèdes sûrs et non toxiques ne cesse de croître. *Clinopodium vulgare L.* est l'une des plantes médicinales utilisée comme remède naturel grâce à sa composition chimique, tels que les polyphénols, les flavonoïdes, les acides phénols carboxyliques. L'activité antioxydante et antitumorale de cette plante cultivée a été étudiée et comparée à celle de la plante sauvage. Les extraits de la plante cultivée ont montré une activité plus élevée par rapport à ceux de la plante sauvage. Plusieurs autres études ont montré que les extraits issus des plantes cultivées *in-vitro* présentaient toujours les meilleures activités biologiques en les comparant aux mêmes extraits issus de la même plante sauvage.

**Mots clés :** culture en suspension, métabolites secondaires, *C. vulgare*, activité anti-tumorale.

## Abstract

Plants are considered as an important source for a wide range of sectors, including agri-food, cosmetology and pharmaceuticals. *in-vitro* culture is a technique for growing cells in a wide variety of ways, including suspension culture, in which cells divide rapidly in a liquid medium, promoting the production of secondary metabolites. The use of these active compounds as safe, non-toxic remedies continues to grow. *Clinopodium vulgare L.* is one of the medicinal plants used as a natural remedy due to its chemical composition, such as polyphenols, flavonoids and phenolic carboxylic acids. The antioxidant and anti-tumor activity of this cultivated plant has been studied and compared with that of the wild plant. Extracts from the cultivated plant showed higher activity than those from the wild plant. Several other studies have shown that extracts from *in-vitro* cultivated plants always showed the best biological activity when compared to the same extracts from the same wild plant.

**Key words:** suspension culture, secondary metabolites, *C. vulgare*, antitumor activity.