

République Algérienne Démocratique et Populaire
Ministère de l'Enseignement Supérieure et de la Recherche Scientifique



Université Larbi Tebessi
Faculté des sciences exactes et sciences de la nature et de la vie
Département de biologie des être vivants
Mémoire présenté en vue de l'obtention du diplôme de Master
Spécialité : biotechnologie végétale

Thème

Les méthodes biotechnologiques de la régénération et la conservation des plantes: le cas d'une plante aromatique *Salvia officinalis* L.

Présenté par :

Amamra Sami

Hedhoud Aymen

Devant le jury

Souhail Maalem

Pr Université de Tébessa

Président

Souad Mehalaine

MCA Université de Tébessa

Encadreur

Ali Mihi

MCA Université de Tébessa

Examineur

Date de soutenance : 14 Juin 2022

بِسْمِ اللَّهِ الرَّحْمَنِ الرَّحِيمِ

Dédicace

Je dédie ce travail :

A mon père Mounir.

A ma mère Sabah.

A ma grand-mère Torkiya.

A mes frères Moatez, Mohammed-lamine.

A toute la famille.

A mon binôme Aymen.

A tous mes amis.

Sami

Dédicace

Je dédie ce travail :
A mon père Ismail
A ma mère Khadija
A mon frère et mes sœurs
A toute la famille
A mon binôme Sami.
A tous mes amis

Aymen

Remerciements

Avant tout, nous remercions Allah le Tout-Puissant de nous avoir donné le courage et la patience de mener à bien ce travail.

Nos remerciements s'adressent d'abord à notre encadreur Mme Mehalaine Souad, qui nous a fait l'honneur de diriger notre travail. Nous lui serons reconnaissants pour le temps qu'elle nous a consacré, ses nombreuses contributions, sa patience, ses remarques pertinentes et surtout sa disponibilité.

Nos remerciements vont aussi à Monsieur Souhail Maalem, qui nous a fait l'honneur de présider ce jury.

A Monsieur Ali Mihi, pour l'honneur d'accepter de juger ce travail.

Enfin, Nos remerciements vont à tous ceux qui ont contribué de près ou de loin à la préparation de ce document.

Résumé

La sauge officinale, *Salvia officinalis* L. est une plante médicinale, aromatique, appartenant à la famille des Lamiaceae. Elle a attiré l'attention de nombreux scientifiques dans le monde entier en raison de sa diversité et de ses propriétés thérapeutiques et ses activités biologiques. Néanmoins, l'utilisation de *Salvia officinalis* pour des fins cosmétiques, pharmaceutiques et dans l'art culinaire nécessite l'application de bonnes pratiques agricoles. La biotechnologie végétale offre de grandes opportunités pour produire et améliorer cette plante afin qu'elle puisse s'adapter aux changements climatiques et aussi préserver le patrimoine génétique de cette espèce végétale rare en Algérie grâce à des techniques modernes de culture *in vitro*.

C'est dans ce cadre que s'inscrit l'objectif de ce travail qui vise à aborder les approches biotechnologiques modernes pour produire, régénérer et préserver *Salvia officinalis*. Ce travail comprend trois chapitres : le premier chapitre traite les techniques biotechnologiques traditionnelles et modernes de production végétale. Le deuxième chapitre traite les différents milieux de cultures et les régulateurs de croissance utilisés dans les cultures *in vitro*. Le dernier chapitre concerne la description botanique, la composition chimique de *Salvia officinalis* et les principales techniques biotechnologiques utilisées pour produire et améliorer cette plante.

Aujourd'hui, les scientifiques travaillent pour développer de nouvelles méthodes biotechnologiques pour produire, améliorer et préserver la sauge officinale.

Mots clés : Plantes médicinales et aromatiques, *Salvia officinalis*, méthodes biotechnologiques, culture *in vitro*.

Abstract

Sage, *Salvia officinalis* L. is a medicinal and aromatic plant belonging to the Lamiaceae family. It has attracted the attention of many scientists around the world because of its diversity and its therapeutic properties and biological activities. Nevertheless, the use of *Salvia officinalis* for cosmetic, pharmaceutical and culinary purposes requires the application of good agricultural practices. Plant biotechnology offers great opportunities to produce and improve this plant so that, it can adapt to climate change and also to preserve the genetic factor of this rare plant species in Algeria.

In this regard, this work aims to address modern biotechnological approaches to produce, regenerate and preserve *Salvia officinalis*. This work comprises three chapters: the first chapter deals with traditional and modern biotechnological techniques of plant production. The second chapter deals with the different culture media and growth regulators used in *in vitro* cultures. The last chapter concerns the botanical description, the chemical composition of *Salvia officinalis* and the main biotechnological techniques used to produce and improve this plant.

Today, scientists are working to develop new biotechnological methods to produce, improve and preserve common sage.

Keywords: Medicinal and aromatic plants, *Salvia officinalis*, biotechnological methods, *in vitro* culture.

ملخص

المريمية هي نوع من النباتات الطبية ، العطرية ، تنتمي الى الفصيلة الشفوية. لقد جذبت انتباه العديد من العلماء حول العالم بسبب تنوعها وخصائصها البيولوجية الفريدة.

ومع ذلك ، فإن الاهتمام باستخدام نبات المريمية لأغراض التجميل والمستحضرات الصيدلانية والطهي ، يتطلب تطبيق ممارسات زراعية جيدة. في هذا الإطار ، تهدف هذه الدراسة الى تناول الطرق البيوتكنولوجية الحديثة من اجل إكثار و تجديد و المحافظة على نبات الميرمية.

تتيح التكنولوجيا الحيوية فرصا كبيرة لإنتاج و تحسين هذا النبات بحيث يمكنه التكيف بشكل جيد مع التغيرات المناخية و كذلك الحفاظ على العامل الوراثي لهذا النوع النباتي النادر في الجزائر من خلال الطرق الحديثة المتمثلة في الزراعة الزجاجية بكل أنواعها. في الوقت الحاضر ، تشجع العديد من الدراسات البحثية على تجديد نبات المريمية و تطويره من خلال زراعة في المختبر. يتناول هذا العمل ثلاثة فصول أساسية حيث يعالج الفصل الأول الطرق البيوتكنولوجية التقليدية و الحديثة لإنتاج النباتات. يعالج الفصل الثاني الأوساط الزراعية المختلفة و منظمات النمو المستعملة في الزراعات الزجاجية. يتناول الفصل الثالث التصنيف و الوصف النباتي لنبات الميرمية ، تركيبها الكيميائي ، و أهم الطرق التكنولوجية الحيوية المستعملة لإنتاج و تحسين هذا النبات.

اليوم ، يعمل العلماء على تطوير طرق جديدة للتكنولوجيا الحيوية لإنتاج و تحسين و الحفاظ على نبات المريمية.

الكلمات المفتاحية: نباتات طبية و عطرية ، نبات المريمية ، الطرق البيوتكنولوجية ، الزراعة الزجاجية.

Liste des figures

N°	Titre	Page
1	Schéma explicatif du bouturage	4
2	Deux exemples de marcottage	4
3	Trois procédés du greffage	5
4	Schéma sur la culture de cellules	7
5	L'embryogenèse somatique	8
6	Schéma de la culture de méristèmes	9
7	Schéma de la culture d'anthères	10
8	Hybridation de cellules somatiques	12
9	Formules chimiques de différents types d'auxines	16
10	La plante <i>Salvia officinalis</i> L.	19
11	Les feuilles de <i>Salvia officinalis</i> L.	19

Liste des tableaux

N°	Titre	Page
1	Constituants du milieu MS	13
2	Constituants du milieu B5	14
3	Les constituants du milieu de culture de White	15

Sommaire

Introduction	1
Chapitre 01	
1. Méthodes biotechnologiques de la régénération des plantes	3
1.1. Méthodes traditionnelles	3
1.1.1. Bouturage	3
1.1.2. Marcottage	4
1.1.3. Griffage	5
1.2. Culture <i>in vitro</i>	5
1.2.1. Culture de cellules	6
1.2.2. Embryogenèse somatique	7
1.2.3. Culture de méristèmes	8
1.2.4. Culture de protoplastes	9
1.2.5. Culture des anthères	10
1.2.6. Hybridation de cellules somatiques	10
1.2.7. Germination <i>in vitro</i> des graines	12
Chapitre 02	
1. Milieux de culture	13
2. Régulateurs de croissance	15
2.1. L'auxine	16
2.2. Les cytokinines	16
2.3. Les gibbérellines	17
2.4. Ethylène	17
Chapitre 03	
1. <i>Salvia officinalis</i> L.	18
1.1. Classification botanique	18
1.2. Description botanique	18
1.3. Origine et distribution géographique	19
1.4. Habitat naturel	20
1.5. Composition chimique	20
1.6. Intérêt thérapeutique et utilisations	20
1.7. Application des méthodes biotechnologiques pour la régénération de <i>S. officinalis</i>	21
1.7.1. Germination <i>in vitro</i> des graines de sauge	21
1.7.2. Micropropagation	21
1.7.2.1. Culture de cellules	21
1.7.2.2. Culture de tissus	21
Conclusion	23
Références bibliographiques	24

Introduction

Introduction

Depuis l'Antiquité, l'homme a utilisé les plantes comme principale source de nourriture et ensuite son intérêt s'est concentré sur les plantes médicinales pour traiter diverses maladies (Madi, 2010). Les plantes médicinales attirent un intérêt croissant dans le monde en tant que sources principales de molécules bioactives et par conséquent leurs propriétés pharmacologiques potentielles (Vissi et al., 2021).

L'Organisation mondiale de la santé (OMS) a rapporté qu'environ 80% de la population mondiale utilisent des plantes médicinales pour traiter différentes maladies en raison de leurs propriétés thérapeutiques importantes et l'absence de leurs effets indésirables (Zaccardelli et al., 2020).

La sauge officinale, *Salvia officinalis* L. est une espèce végétale de la famille des Lamiaceae. Elle est originaire du Moyen-Orient et zones méditerranéennes mais aujourd'hui, elle est naturalisée dans le monde entier (Ghorbani et Esmailizadeh, 2017). Le genre *Salvia* se compose de plus de 900 espèces végétales (Petrová et al., 2013).

Salvia officinalis est une plante médicinale largement cultivée pour son importance économique et sa grande teneur en principes actifs (Tosun et al., 2014). Dans le monde la sauge est utilisée pour traiter différentes maladies : réduire la transpiration, le gargarisme pour les maux de gorge, pour améliorer le statut lipidique et la fonction hépatique, et pour améliorer la capacité mentale (Jakovljevic et al., 2019). En Algérie, cette plante est utilisée contre le diabète, pour renforcer la mémoire, régulariser la menstruation et pour la convalescence (Adouane, 2015).

Aujourd'hui, les pays du monde accordent une attention particulière à la production de plantes à importance médicinale, comestible, aromatique et ornementale ainsi aux méthodes de culture et d'amélioration des plantes (Mamatkulovich et Mastona, 2021). Parmi les méthodes biotechnologiques appliquées pour régénérer la sauge officinale, la germination et la micropropagation in vitro. Ces deux techniques sont contrôlées par plusieurs facteurs, tels le stade physiologique du matériel végétal (graines, explants), les conditions de culture (milieu de culture, lumière, température, humidité, régulateurs de croissance). La culture in vitro est une approche biotechnologique efficace pour la régénération, l'amélioration et la conservation de nombreuses espèces et variétés végétales (Mehalaine, 2018).

L'objectif de ce document est d'aborder les méthodes biotechnologiques appliquées actuellement pour la propagation et la conservation d'une plante médicinale et aromatique cultivée pour ses propriétés médicamenteuses et comme plante ornementale en Algérie : *Salvia officinalis* L.

Ce mémoire est divisé en trois chapitres principaux :

- Le premier chapitre traite les approches biotechnologiques appliquées pour la régénération et l'amélioration des plantes.
- Le deuxième chapitre traite les types des milieux de culture et les régulateurs de croissance utilisés dans la culture in vitro des plantes.
- Le dernier chapitre concerne une synthèse bibliographique sur la plante *Salvia officinalis* et les différentes approches biotechnologiques utilisées pour sa régénération.

Chapitre 01

1. Méthodes biotechnologiques de la régénération des plantes

1.1. Méthodes traditionnelles

1.1.1. Bouturage

Le bouturage est une technique utilisée pour multiplier des végétaux à partir d'un fragment de racine, de branche, de tige ou de feuille. Les boutures prélevées sur l'individu à multiplier permettent de générer des copies dont le génotype, la croissance et l'architecture sont généralement identiques à ceux de la plante mère (Sbay et Lamhamedi, 2015). C'est une technique qui consiste à mettre en terre un fragment de plante (morceau de rameau, feuille, racine, tige ou écaille de bulbe) et à lui faire produire un système racinaire pour qu'il s'installe et se développe jusqu'à devenir une plante entière (Ky-Dembele et al., 2015).

Pour certaines espèces, il est difficile de multiplier les graines et seules les boutures sont utilisées exclusivement pour produire des plantes. Cette technique est couramment utilisée par les pépiniéristes pour multiplier en masse des individus dont les caractéristiques sont recherchées ou rares.

Le bouturage est une technique intéressante pour les raisons suivantes :

- Il permet de multiplier des porte-greffes compatibles, des individus rares, peu ou non fructifères, ainsi que des espèces à fructification aléatoire.
- Il permet de copier fidèlement les caractéristiques du pied mère et garantit souvent l'obtention de plants plus vigoureux.
- Cette technique est considérée parmi les voies rapides et efficaces en matière de sélection et de multiplication des individus sélectionnés pour leur résistance aux agents pathogènes (champignons, virus, etc.) (Sbay et Lamhamedi, 2015).
- Les boutures peuvent de plus servir comme matériel d'étude des proliférations axillaires et de la tubérisation et pour observer les cycles végétatifs successifs afin d'en mieux connaître leurs différentes phases et leur variabilité (Buffard-Morel et Toure, 1980).

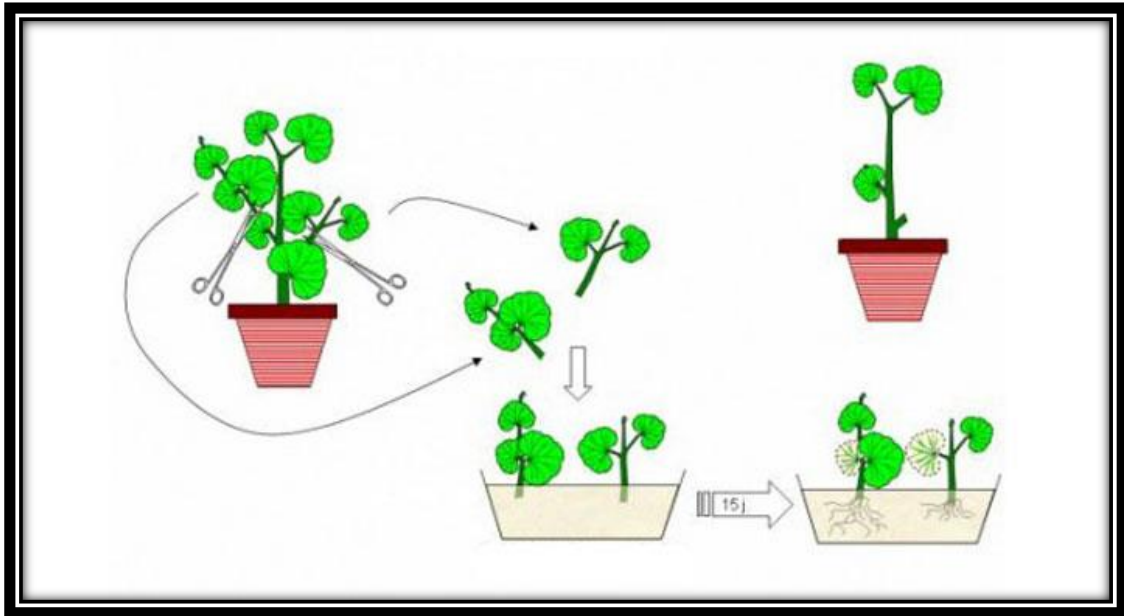


Figure 1 : Schéma explicatif du bouturage (Anonyme 1).

1.1.2. Marcottage

Le marcottage est une technique de propagation qui consiste principalement à placer des branches intactes au sol, capables de produire des racines à travers des plaies plus ou moins profondes ou à travers des obstructions qui entravent la circulation de la sève, tout en préservant chaque branche au passage, la nutrition normale de la plante mère, dont l'enracinement se développe le plus souvent près des nœuds portés par du bois mature (Priel et Retournard, 2005). Cette méthode de propagation végétative nécessite la présence de branches à proximité du sol, elle convient donc pour les arbustes, les jeunes arbres (Meunier, 2005).

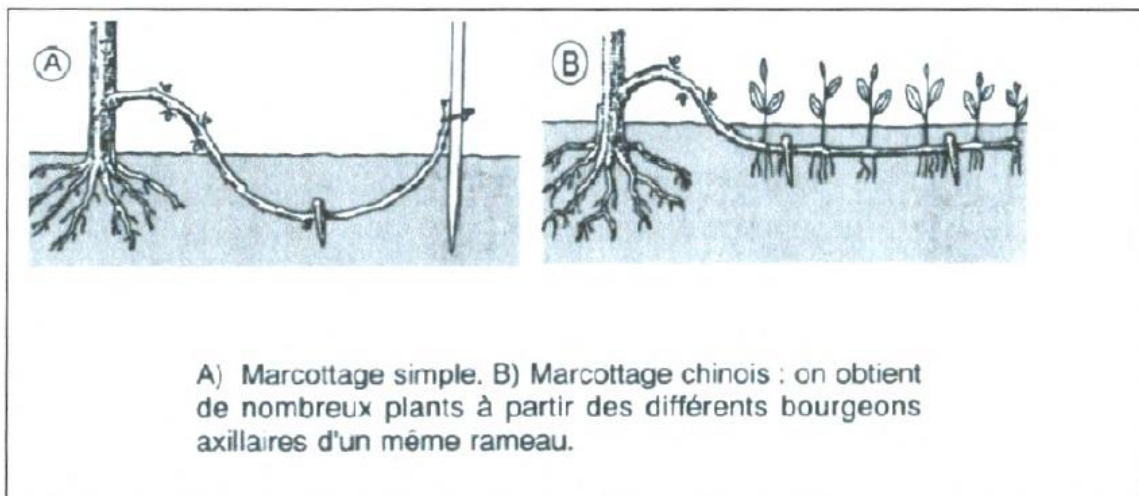


Figure 2 : Deux exemples de marcottage (Bouricha, 2014).

1.1.3. Greffage

Le greffage est une technique qui consiste à prélever une partie végétative de l'arbre-mère que l'on souhaite reproduire et conserver (greffon) pour certaines de ses qualités qui sont appréciées. Le greffon sera mis en contact direct avec une partie de la plante racinée (porte-greffe) ou avec une autre partie racinée, de la même plante, dans le but d'obtenir une bonne union végétative entre les deux (Metro, 1975). Cette technique doit se réaliser dans la période où la sève est en abondante activité.

Il existe plusieurs méthodes de greffage, parmi lesquelles : la greffe en écusson, la greffe en fente, la greffe à l'Anglaise... (Bouricha, 2014).

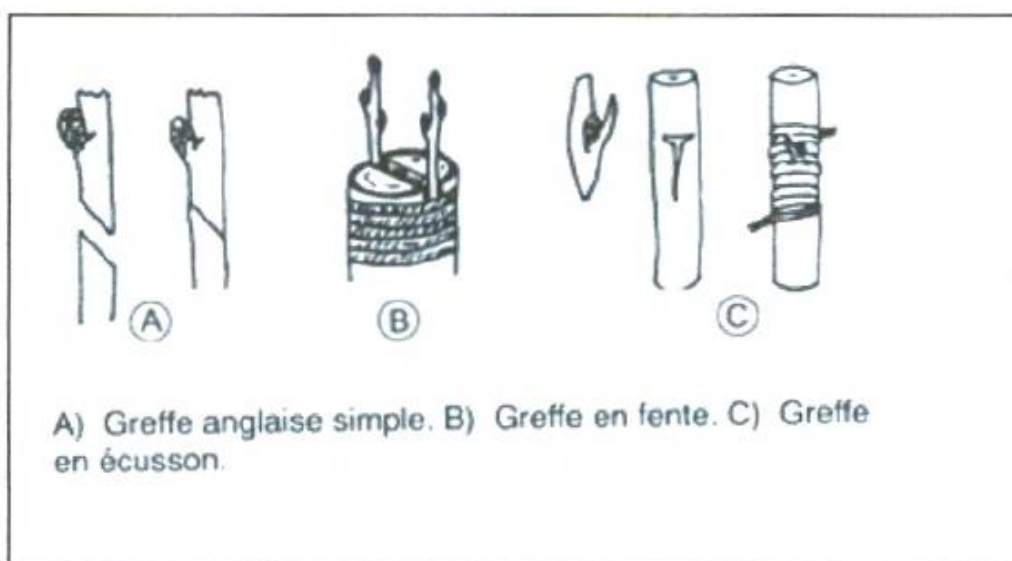


Figure 3 : Trois procédés du greffage (Bouricha, 2014).

Selon (Bouricha, 2014), les avantages du greffage sont nombreux :

- La reproduction parfaite de nombreuses variétés existantes.
- Transformer rapidement un arbre donnant des produits avec une variété fruitière de choix.
- Remplacer, pour une espèce donnée, un système racinaire déficient par un autre résistant.
- L'obtention d'arbres moins volumineux.
- Multiplier certaines variétés qui ne forment pas de graines viables.

1.2. Culture *in vitro*

La culture *in vitro* est un mode de reproduction asexuée artificielle. C'est une technique utilisée au laboratoire qui consiste à cultiver un fragment de tissu végétal appelé « explant » sur un milieu nutritif synthétique, cette technique se déroule en conditions stériles et est suivie

d'une acclimatation sur un milieu traditionnel (Dutuit et Gorenflot, 2008). Les conditions de la culture doivent être contrôlées parfaitement (milieux de culture définis pour chaque type de plante, température, lumière, humidité,...) (Rafamantanana, 2004).

Le but de la culture *in vitro* est la régénération de la plante entière autonome et fertile à partir de la propriété des cellules végétales : la totipotence cellulaire (Girard et Noiville, 2014).

La totipotence cellulaire est l'aptitude des cellules à se diviser puis à se différencier de nouveau, leur conférant la capacité de produire une plante entière, même à partir d'une seule cellule (Gazeau et Derreudre, 1988).

La culture *in vitro* est une technique très récente puisqu'elle fut développée seulement au début de 20^{ème} siècle (Jay-Allemand et al., 1992). La culture *in vitro* des végétaux connaît un essor particulier. Aujourd'hui avec l'évolution de la recherche agronomique, la culture *in vitro* occupe une place importante dans l'agriculture moderne (Augé et al., 1989).

1.2.1. Culture de cellules

La culture de cellules consiste en la culture de cellules individuelles sur un milieu nutritif dans des conditions bien contrôlées. Le principe de la culture unicellulaire est d'isoler un grand nombre de cellules vivantes intactes et de les cultiver sur un milieu nutritif approprié pour obtenir la croissance et le développement souhaités. Les cellules individuelles peuvent être isolées à partir de divers tissus et organes végétatifs, de cals et de suspensions cellulaires (Bhojwani et Razdan, 1986). Les cultures cellulaires *in vitro* sont fréquemment utilisées pour comprendre des mécanismes du comportement cellulaire *in vivo* (Huh et al., 2011).

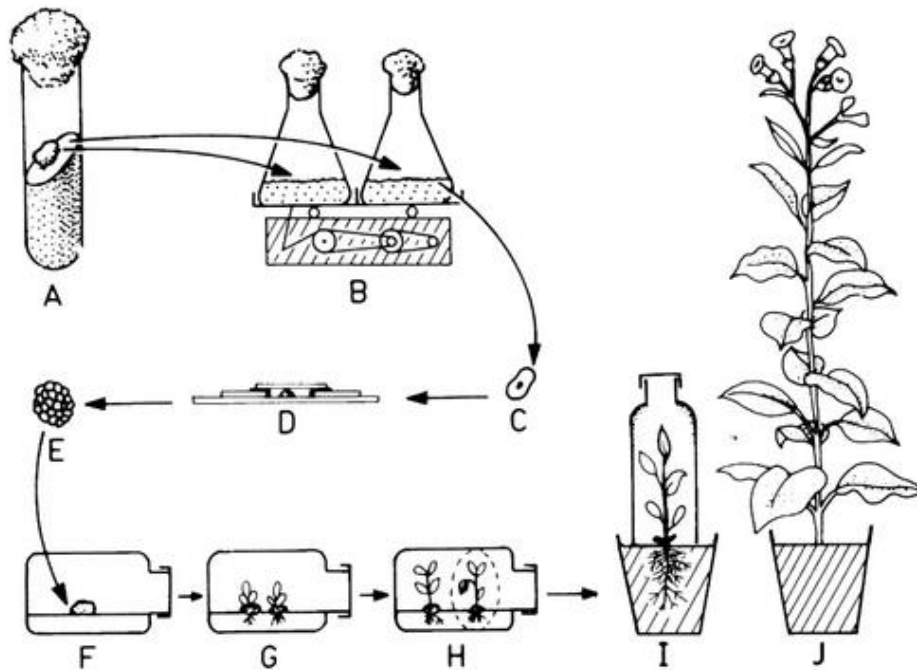


Figure 4 : Schéma sur la culture de cellules (Bhojwani et Razdan, 1986).

1.2.2. Embryogenèse somatique

Ce processus est défini par le développement d'une structure bipolaire à partir de n'importe quelle partie de la plante en passant par les mêmes étapes du développement d'un embryon zytotique (Sharma et Millam, 2004). L'embryogenèse somatique est une forme de multiplication végétative permettant d'obtenir des plantules génétiquement identiques à la plante mère. La technique consiste à faire émerger des embryons à partir de tissus végétaux cultivés *in vitro*, ce qui provoque de nombreuses divisions cellulaires. Dans certaines conditions, la culture cellulaire s'organise en de nombreux petits amas aux structures bipolaires appelés embryons somatiques (avec des méristèmes de tige et de racine). Comme les embryons zytotiques (dans les graines), les embryons somatiques sont obtenus à partir de cellules non sexuées (sans fécondation) et se développent en un nombre illimité de plantes génétiquement identiques. C'est actuellement la technique la plus efficace pour la multiplication végétative des conifères (Agnès et al., 2013). Certaines espèces, comme les palmiers dattiers ou certains conifères ont fait déjà l'objet d'une production industrielle par embryogenèse somatique (Lachachi, 2009). Cette technique est simple par rapport à la micropropagation traditionnelle qui nécessite plusieurs milieux de culture différents pour la caulogénèse et la rhizogénèse et puis l'obtention de plantules entières. Cependant, plusieurs difficultés subsistent en embryogenèse somatique :

- L'induction et la régénération du potentiel embryogène sont souvent encore difficiles.
- Les cultures de cals et des cellules isolées favorisent l'émergence de mutations génétiques qui peuvent être responsables de la variabilité des plantes produites (Lachachi, 2009).

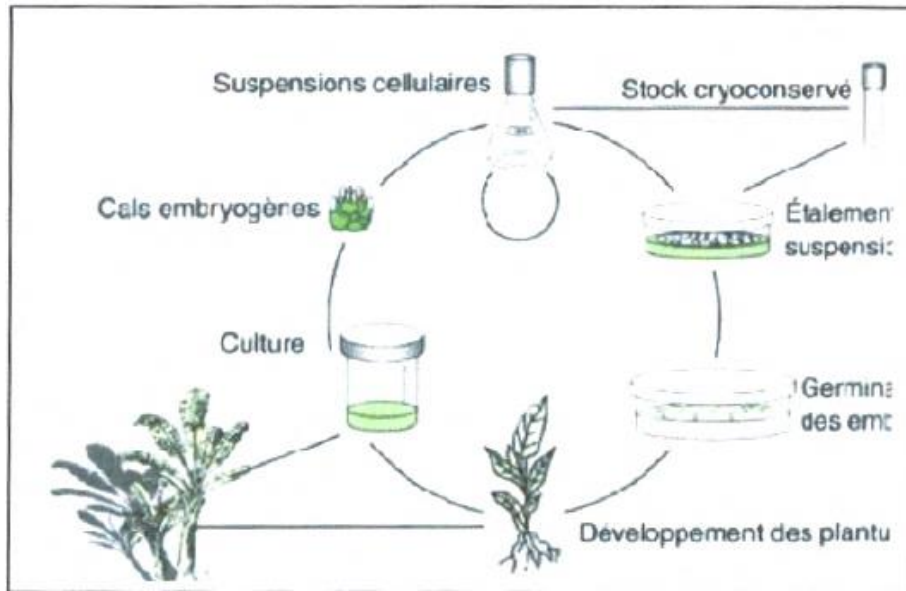


Figure 5 : L'embryogenèse somatique (Bouricha, 2014).

1.2.3. Culture de méristèmes

La culture de méristème est la méthode la plus courante et la plus sûre pour obtenir des plantes conformes à la plante mère (Saadi, 1991). Le méristème se compose de plusieurs cellules méristématiques à division rapide ; il constitue le matériel idéal de départ, car le méristème se développe d'une manière génétiquement stable et réduit le niveau d'infection virale (Espinoza et al., 1992).

En conditions aseptiques et sous une loupe binoculaire, le dôme du méristème (partie centrale du bourgeon) est prélevé et cultivé sur milieu de culture artificiel. Selon les objectifs, le milieu de culture est modifié périodiquement, afin d'obtenir une jeune plante identique à la plante initiale. Lorsque la plante de départ est affectée par un virus ou une bactérie phytopathogènes, les méristèmes restent indemnes, car ils ne sont pas encore infectés. La culture de méristème aboutit alors à une plante saine à partir d'une plante atteinte de virus (Schmid et Keller, 1984 ; Augé, 1992 ; Sama et al., 1998 ; Agnès et al., 2013).

En multipliant le méristème prélevé du bourgeon apical ou bourgeon axillaire, le plus souvent indemne de maladies, on pourra très rapidement obtenir de nombreuses plantes identiques génétiquement et débarrassées de maladies (Schmid et Keller, 1984 ; Sama et al., 1998).

La culture de méristèmes a conduit à des applications nouvelles, originales concernant le domaine du phytosanitaire, notamment pour l'éradication de nombreuses maladies (viroses, mycose, bactérioses) et a permis la régénération d'un grand nombre d'espèce saines (Toute, 1998).

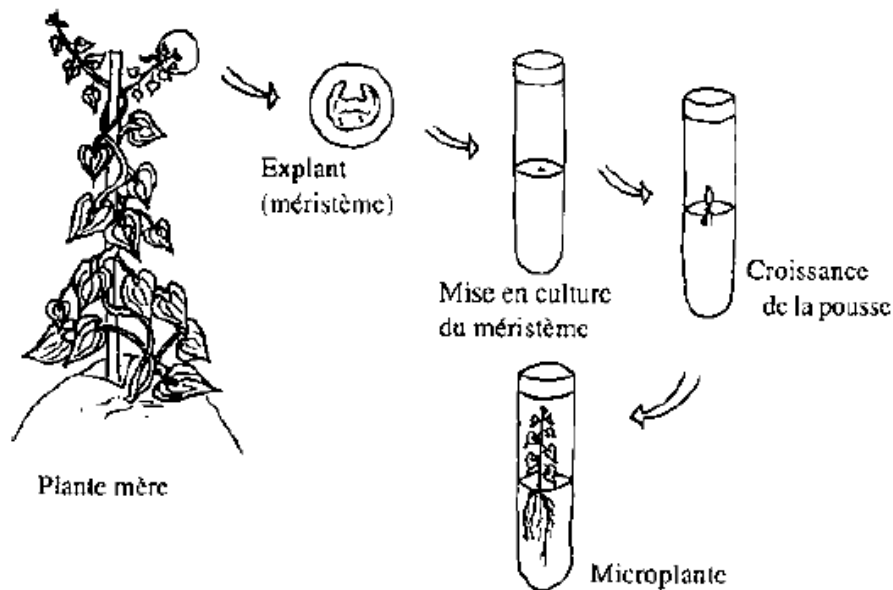


Figure 6 : Schéma de la culture de méristèmes (Anonyme 2).

1.2.4. Culture de protoplastes

Le terme protoplaste désigne une cellule végétale débarrassée de sa paroi cellulosique externe, elle apparaît alors comme une cellule sphérique, limitée par sa membrane plasmique (Lachachi, 2009). La culture de protoplaste comprend : L'isolement du protoplaste, le maintien en survie, l'entrée en division et la régénération de plantules. L'isolement du protoplaste se fait mécaniquement ou enzymatiquement. Les protoplastes sont souvent isolés des feuilles, mais on peut les obtenir aussi à partir de cals, suspension cellulaire ou d'organes végétaux (Robert et al., 1998 ; Rafamantanana, 2004). Les exigences nutritionnelles des protoplastes nécessitent une composition minérale adaptée, notamment pour le calcium qui joue un rôle important par son influence sur les divisions cellulaires (Karp et al., 1982). La technique de culture de protoplaste est très fortement inductrice de variabilité porte toujours sur le nombre chromosomique (Karp et al., 1982 ; Sheparid, 1982). L'avantage de cette technique est qu'elle permet un large champ d'étude sur des cellules nues ; et à ce stade,

différentes manipulations génétiques peuvent être réalisées (Rafamantanana, 2004). Les techniques de culture *in vitro* et de génie génétique utilisant les protoplastes offrent des perspectives prometteuses (Ellouz et al., 1994).

1.2.5. Culture des anthères

La culture d'anthères implique la culture aseptique d'anthères immatures pour générer des plantes haploïdes fertiles à partir de microspores. La production de plantes haploïdes par culture d'anthères est largement utilisée à des fins de sélection pour obtenir des lignées pures. Le dédoublement chromosomique des haploïdes pourrait entraîner l'établissement immédiat de l'homozygote. La culture d'anthères a conduit au développement de la culture de microspores pour régénérer des plantes homozygotes. De plus, les microspores isolées sont très intéressantes pour l'isolement des protoplastes et les applications visant à la transformation, car ce sont des plantes homozygotes (Dhlamini et al., 2005; Germana, 2006). L'androgenèse *in vitro*, qui consiste à obtenir des individus haploïdes doublés à partir de cellules reproductrices, permet alors l'obtention rapide d'une variété homozygote permettant d'accélérer les cycles de sélection variétale dont plusieurs années sont souvent nécessaires (Pelletier, 1988). Cette méthode présente d'autres avantages importants tels que la simplification de l'analyse du patrimoine génétique des traits, et la probabilité d'obtenir des génotypes multi-récessifs (Daunay, 2008).

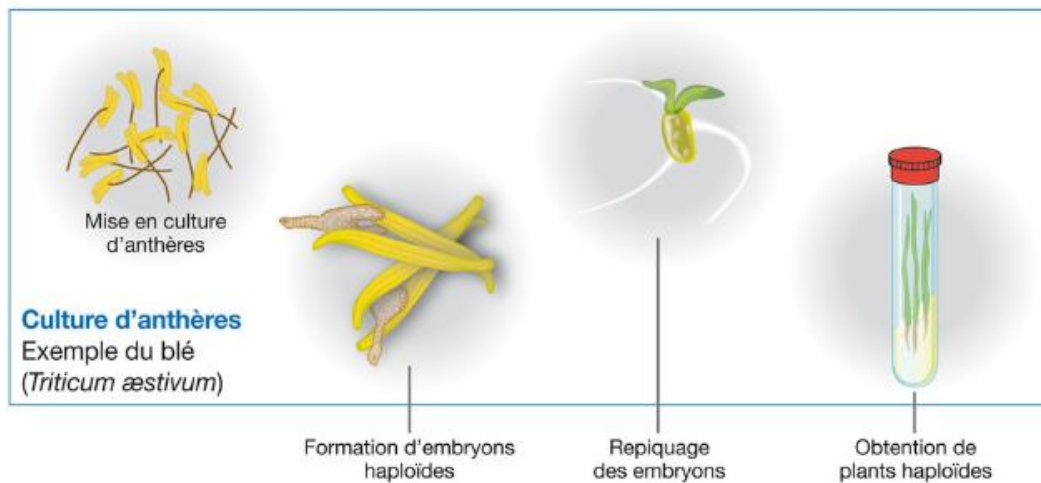


Figure 7 : Schéma de la culture d'anthères (Anonyme 3).

1.2.6. Hybridation de cellules somatiques

L'hybridation somatique est considérée comme une forme de génie génétique où on transmet toute une information cellulaire par fusion de cellules (protoplastes) ayant des caractères différents. La technique utilisée consiste à décaper les cellules que l'on veut fusionner avec

des enzymes appropriées. Les fusions sont ensuite obtenues par des traitements adéquats. Il s'agit donc d'un procédé artificiel pour obtenir des croisements entre cellules non sexuelles (Chevallier, 1990).

Les protoplastes obtenus ont un état épigénétique très perturbé et leur probabilité de régénérer l'intégrité cellulaire est faible et nécessite de nombreuses manipulations. En revanche, à ce stade, le protoplaste est susceptible de recevoir tout élément étranger sans l'identifier. On peut donc agglomérer deux protoplastes appartenant à des espèces, à des genres et même à des règnes biologiques différents. On appelle ce procédé fusion somatique. La cellule résultante peut, avec certaines restrictions, régénérer un individu dit hybride somatique (Cocking, 1981).

Cette méthode présente des avantages considérables :

- On peut travailler sur un nombre de chromosomes diminué de moitié.
- On peut rassembler, en un peu de temps, au sein d'un même individu tétraploïde un ensemble de plusieurs caractères importants (Boccon-Gibod et Jalouzot, 1989).
- La fusion de protoplastes permet de créer de nouvelles variétés, d'introduire des caractères cytoplasmiques ou d'obtenir des plantes transgéniques à partir de protoplastes transformés.
- Cette méthode permet l'introduction d'ADN nu (constructions génétiques) dans des protoplastes en utilisant un champ électrique à haute tension, rendant leurs membranes cytoplasmiques perméables (Pelletier, 1988).
- Par cette approche biotechnologique, on peut obtenir de nouvelles plantes comme la pomate, hybride de pomme de terre et de tomate (Chevallier, 1990).

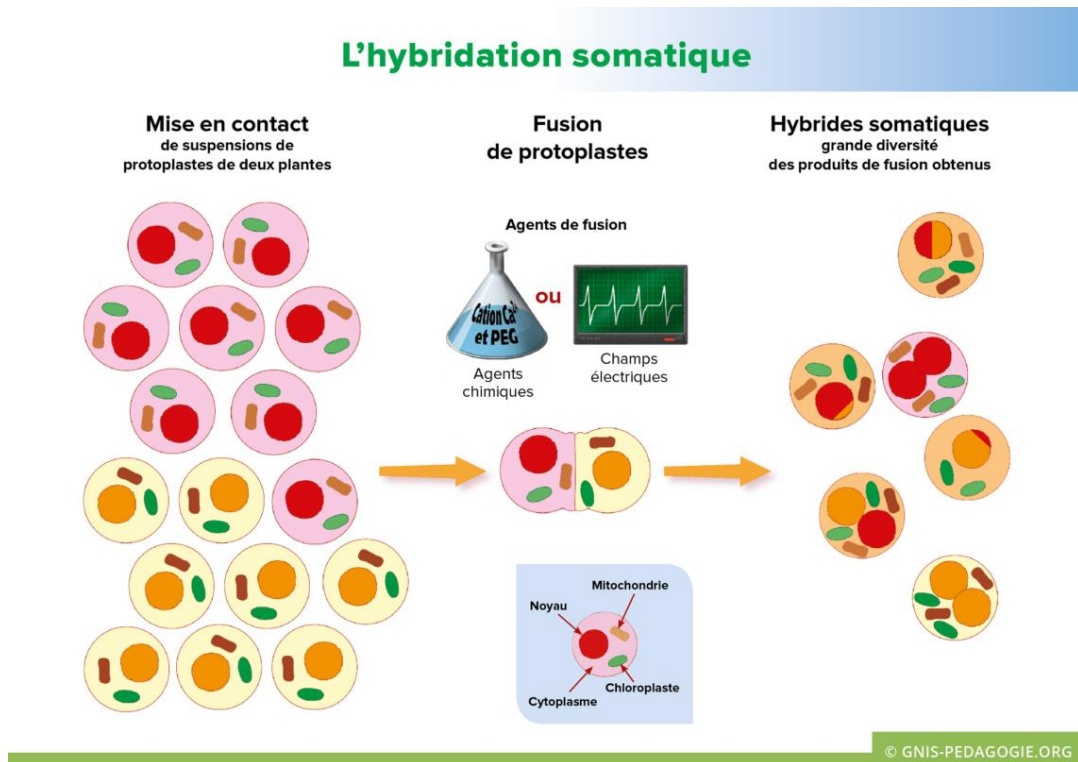


Figure 8 : Hybridation de cellules somatiques (Anonyme 4).

1.2.7. Germination *in vitro* des graines

La germination *in vitro* des graines est un mode de biotechnologie végétale où les graines sont stérilisées avec de produits chimiques différents comme l'hypochlorurie de sodium (NaOCl) et placées sur différents types de support comme le papier filtre ou sur un milieu de culture approprié (Chaipanich et al., 2020). Cette technique est une voie alternative pour la propagation en masse de plantes où les individus d'une espèce végétale peuvent être obtenus en un peu de temps dans des conditions similaires à la germination naturelle des graines. Dans cette technique, les graines ont besoin de nutriments et de sources de carbone pour induire une germination plus rapide (Sulong et al., 2016).

Chapitre 02

1. Milieux de culture

Le milieu de culture de plante a pour but d'assurer la nutrition des explants. La composition du milieu de culture est adaptée à la technique appliquée, à l'explant et à l'espèce et doit apporter aux explants les nutriments dont ils ont besoin. Le milieu de culture se compose généralement de :

- L'eau
- Des éléments minéraux : macroéléments et microéléments.
- Des phytohormones.
- Des substances organiques : les sucres, les vitamines, les acides aminés et d'un agent gélifiant pour les milieux solides (Rafamantanana, 2004).

Il y a plusieurs types de milieux de culture et les plus utilisés sont ceux de Murashige et Skoog (MS). En 1962, Murashige et Skoog ont étudié la reproduction végétative du tabac et ont composé le premier milieu de culture *in vitro*. Ce milieu contient des sels minéraux, des sucres, des vitamines (B), des hormones de croissance. Ce milieu permet la culture et la prolifération des méristèmes des pousses (Lachachi, 2009) (Tableau 1).

Tableau 1. Constituants du milieu MS (Murashige et Skoog, 1962).

Eléments	Composition chimique	Concentration en mg/l
Macroéléments	NH ₄ NO ₃	1650
	K NO ₃	1900
	Mg SO ₄ , 7H ₂ O	440
	Ca Cl ₂ , 2H ₂ O	370
	KH ₂ PO ₄	170
Microéléments	H ₃ BO ₃	6.20
	Mn SO ₄ , 4H ₂ O	22.30
	Zn SO ₄ , 4H ₂ O	8.60
	KI	0.83
	Na ₂ Mo O ₄ , 2H ₂ O	0.25
	Cu SO ₄ , 5H ₂ O	0.025
	Co Cl ₂ , 6H ₂ O	0.025
Fer	Fe SO ₄ , 7H ₂ O	27.85
	Na ₂ EDTA	37.25
Vitamines	Glycine	2.00
	Acide nicotinique	0.50
	Pyridoxine HCL	0.50
	Thiamine	0.10
Divers	Sucre	45.000
	Agar	7.000
	Myo-inositol	100

Le milieu de Gamborg qui a été développé pour la culture des tissus végétatifs, il convient à la croissance de différents organes végétaux (Tableau 2).

Tableau 2. Constituants du milieu B5 (Gamborg et al., 1968).

	Ingrédients	Solution mère mg/l	Volume de prélèvement
Macroéléments	KNO ₃ CaCl ₂ .2H ₂ O (NH ₄) ₂ .SO ₄ MgSO ₄ .7H ₂ O NaH ₂ PO ₄ .H ₂ O	2500 150 134 250 150	50 ml
Microéléments	MnSO ₄ .H ₂ O ZnSO ₄ .7H ₂ O H ₃ BO ₃ KI Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O CuSO ₄ .5H ₂ O CoCl ₂ .6H ₂ O	10 2 3 0.75 0.25 0.025 0.0125	5 ml
Fe -EDTA	Na ₂ EDTA FeSO ₄ .7H ₂ O	37.3 27.8	5 ml
	Ingrédients	Solution mère mg/100 ml	Volume de prélèvement
Vitamines et acides amines	Acide Nicotinique Pyridoxine.HCl Thiamine HCl Myo-inositol	1 10 100 1	5 ml
Sucre	Saccharose	20000 mg/L	/
Agar	Agar	8g/l	/

Il existe également le milieu de White qui est meilleur que le médium de Murashige et Skoog pour l'induction de l'embryogenèse somatique (Sata et al., 1999) (Tableau 3).

Tableau 3. Les constituants du milieu de culture de White (Gautheret, 1959).

	Ingrédients	Solution mère mg/l	Volume de prélèvement
Macroéléments	Ca (NO ₃) ₂ .4H ₂ O	288	100 ml
	KNO ₃	80	
	MgSO ₄ .7H ₂ O	737	
	NaH ₂ PO ₄	19	
	Na ₂ SO ₄	200	
	KCl	645	
Microéléments	Fe ₂ (SO ₄) ₃	2.5	10ml
	H ₃ BO ₃	1.5	
	KI	0.75	
	ZnSO ₄ .4H ₂ O	2.2	
	MnSO ₄ .4H ₂ O	6.7	
	Ingrédients	Solution mère mg/100ml	Volume de prélèvement
Vitamines et acides amines	Glycine	20	10 ml
	Acide nicotinique	5	
	Pyridoxine-HCl	5	
	Thiamine-HCl	1	
	Myo-inositol	1	
Sucre	Saccharose	30000 mg/L	30000 mg
Agar	Agar	8g	8g

2. Régulateurs de croissance

Les régulateurs de croissance des plantes sont des substances chimiques endogènes qui circulent dans les plantes dans des directions précises et à des points précis. Ces messagers servent de porteurs d'un ou plusieurs messages destinés à provoquer une réponse dans une zone donnée en réponse à des stimulations externes ou internes (Rafamantanana, 2004). Les phytohormones jouent un rôle essentiel dans la régulation de la croissance et du développement des plantes (Zulkarami et al., 2014). Les auxines, les cytokinines et les gibbérellines sont les plus importantes hormones impliquées dans la croissance des plantes (Guignard, 2000).

2.1. L'auxine

Les auxines sont un ensemble de substances possédant des propriétés physiologiques voisines et une conformation chimique apparentée (Rafamantanana, 2004). De nombreuses molécules ont une capacité d'auxine, mais l'acide 3-indole acétique (AIA) est le plus abondant dans les plantes. Les différentes formes naturelles et synthétiques utilisées sont présentées dans la figure 9 (Péret, 2007).

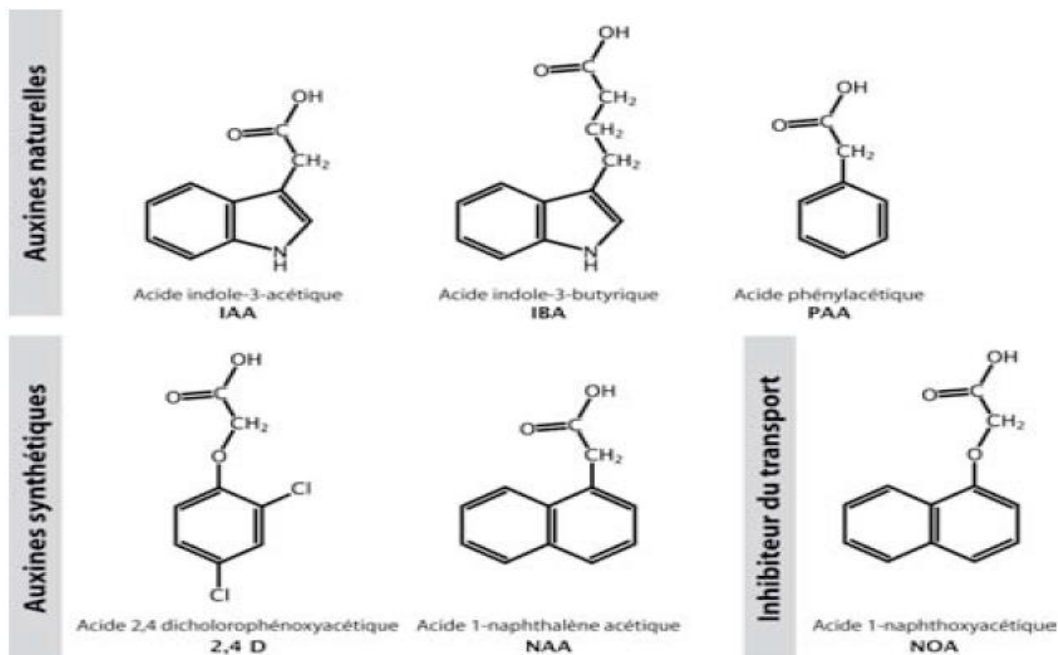


Figure 9 : Formules chimiques de différents types d'auxines (Péret, 2007).

L'auxine joue un rôle important dans de nombreux aspects de la croissance et du développement des plantes, y compris la dominance apicale, l'embryogenèse et la division cellulaire, l'expansion et la différenciation (Borrelli et al., 2021). L'auxine est importante dans le développement des plantes à différents stades de croissance dans des conditions favorables et de stress (Kazan, 2013). Il stimule également la libération d'éthylène (Fahad et al., 2015 a,b).

2.2. Les cytokinines

La cytokinine naturelle est la zéatine. Les cytokinines de synthèse sont les plus utilisées (Rafamantanana, 2004). Les cytokinines utilisées au laboratoire sont : benzyladénine (BA), la benzylaminopurine (BAP), la kinétine (Rafamantanana, 2004).

Les cytokinines sont responsables de la division cellulaire et du développement de la croissance des plantes, elles ont des fonctions diverses dans la défense contre les stress

biotiques et abiotiques (Borrelli et al., 2021). Les cytokinines permettent l'élongation cellulaire, la néoformation des bourgeons en présence de l'auxine (Rafamantanana, 2004).

2.3. Les gibbérellines

Cette famille de phytohormones regroupe de nombreuses substances dont la plus connue et la plus utilisée est le GA₃, acide gibbérellique (Rafamantanana, 2004).

Les gibbérellines sont un groupe d'hormones isoprénoïdes impliquées dans la régulation de nombreux processus de la croissance et du développement des plantes (Borrelli et al., 2021). Les gibbérellines sont impliquées dans la germination des graines, l'expansion des feuilles et la croissance des tiges et des fleurs des plantes. Elles jouent un rôle important dans l'amélioration de la qualité des fleurs et des fruits (Yamaguchi, 2008). Elles réduisent également les effets délétères du stress abiotique et augmentent les processus d'adaptation (Colebrook et al., 2014). Les gibbérellines ont également des interactions positives ou négatives avec l'éthylène et certaines phytohormones au cours de différents processus de croissance des plantes (Munteanu et al., 2014).

2.4. Ethylène

L'éthylène est une hormone végétale sous forme gazeuse, c'est un hydrocarbure simple de formule chimique C₂H₄ (Reid, 1995). L'éthylène joue un rôle important dans la maturation, la sénescence et la chute des fruits des plantes. Il joue également un rôle dans l'atténuation des effets néfastes du stress abiotique et la stimulation de la croissance des plantes (Gamalero et Glick, 2012 ; Groen et Whiteman, 2014). L'éthylène a une corrélation synergique et antagoniste avec l'acide abscissique, qui aide à contrôler la croissance et le développement des végétaux (Yin et al., 2015).

Chapitre 03

1. *Salvia officinalis* L.

La sauge officinale appartient à la famille des Lamiaceae, Il existe plus de 600 variétés de sauge à travers le monde (Alloun, 2013). La sauge est connue sous le nom de "plante du salut", provenant de l'ancien mot latin "salvarem", qui signifie sauver ou guérir (Jakovljevic et al., 2019).

1.1. Classification botanique

Règne : Plantae

Division : Magnoliophyta

Classe : Magnoliopsida

Ordre : Lamiales

Famille : Lamiaceae

Genre : *Salvia*

Espèces : *Salvia officinalis* L. (Cronquist, 1968)

1.2. Description botanique

La sauge est une plante vivace avec une tige ligneuse à la base, avec un fond blanchâtre et vert grisâtre au-dessus, atteint en général une hauteur de 30 à 70 cm (Pereira et al., 2018).

Les feuilles sont opposées, pétiolées à la base, longues de 3 à 10 cm et larges de 3 cm. Elles sont gris verdâtre avec un aspect velouté, les bords du limbe sont légèrement crénelés (Taleb-Toudert, 2015). Les fleurs sont regroupées dans des pseudo-verticilles de 5 à 10 fleurs chacune, avec une inflorescence lâche et terminale. Le calice peut atteindre 14 mm de longueur, avec des poils duveteux, ponctués de glandes. La corolle est bilabée, de couleur violette rarement rose à bleu. La lèvre supérieure est bilobée, presque droite, alors que la lèvre inférieure est trilobée. Les fruits sont des tétrakènes sphériques, de couleur brun foncé à noir (Sidi Moussa, 2012) (Figure 10, 11).



Figure 10 : La plante *Salvia officinalis* L. (Anonyme 5).

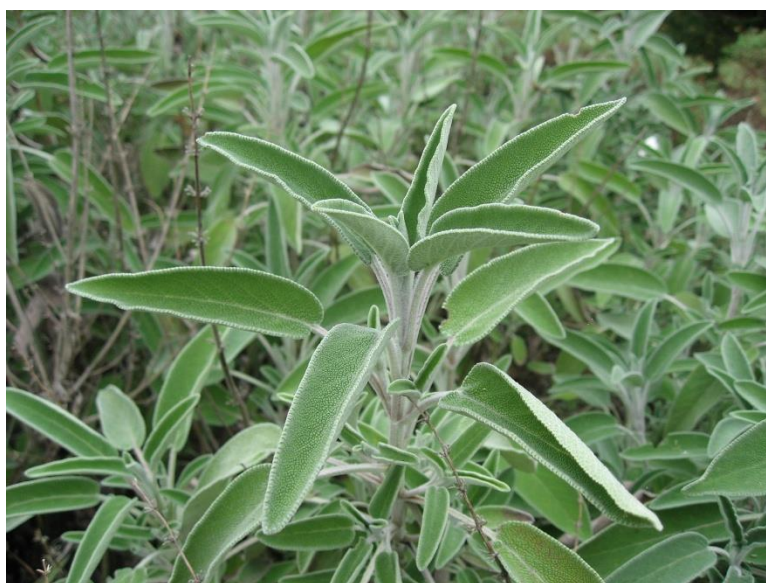


Figure 11 : Les feuilles de *Salvia officinalis* L. (Anonyme 6).

1.3. Origine et distribution géographique

Salvia officinalis est une plante originaire de région méditerranéenne particulièrement de l'Adriatique, la sauge est actuellement cultivée dans différents pays européens, depuis l'Espagne jusqu'à la Yougoslavie. En Algérie, la sauge est très répandue. Elle est cultivée ou

pousse spontanément (Sidi Moussa, 2012). Selon Alloun (2013), la sauge est introduite d'Asie occidentale.

1.4. Habitat naturel

La sauge pousse dans les zones tempérées, sur des sols bien drainés et endroits bien ensoleillés (Alloun, 2013).

1.5. Composition chimique

La sauge officinale est composée des huiles essentielles qui sont un mélange complexe riche en thujone avec une teneur comprise entre 35-50%, mélange de (-) $-\alpha$ thujone et de (+) $-\alpha$ thujone. La forme $-\alpha$ étant dominante le plus souvent. L'huile de sauge renferme également 1,8-cinéole, bornéol, camphre, caryophyllène, acétate de linalyl et d'autres terpènes (Teuscher et al., 2005). La sauge contient aussi des flavonoïdes (1-3%), des triterpènes (acide oléanique et ursolique), des diterpènes de type abiétane (carnosol, rosmanol) et des acides phénols (acide rosmarinique) (Carlier, 2005).

1.6. Intérêt thérapeutique et utilisations

La sauge est utilisée comme herbe médicinale depuis des milliers d'années. Elle est un ingrédient courant dans les mélanges de tisanes recommandés pour les personnes atteintes d'affections respiratoires (Duling et al., 2007). Cette plante a des effets anti-inflammatoires, antioxydants et antimicrobiens (Ghorbani et Esmailizadeh, 2017). La sauge a des effets positifs dans le traitement de l'hyperlipidémie (Kianbakht et Dabaghian, 2013). Cette herbe exerce un soulagement symptomatique des inflammations de la bouche et de la gorge (Hubbert et al., 2006). Elle favorise aussi l'équilibre hormonal chez la femme, calme les douleurs des règles et diminue les troubles de la ménopause (Finnel, 2002).

L'huile essentielle de la sauge est utilisée dans la fabrication des parfums. Les extraits de la sauge sont également incorporés dans les préparations cosmétiques pour le traitement de la peau grasse et dans les préparations pour bains (Teuscher et al., 2005).

Cette plante aromatique est utilisée dans la cuisine pour son goût puissant (Duling et al., 2007). Elle est utilisée pour les plats de viande, de poisson, soupes, salades, sauces, le fromage blanc, omelettes, et dans les pâtisseries (Ckébert, 1985 ; Teuscher et al., 2005).

1.7. Application des méthodes biotechnologiques pour la régénération de *S. officinalis*

Les plantes médicinales sont la source la plus importante de médicaments pour la majorité de la population mondiale. Les outils biotechnologiques sont importants pour la multiplication et l'amélioration des plantes médicinales par l'adoption de techniques telles que la micropropagation est la germination *in vitro* (Tripathi et Tripathi, 2003).

Parmi les approches biotechnologiques appliquées dans la production de la sauge officinale :

1.7.1. Germination *in vitro* des graines de sauge

Les graines de sauge officinale sont lavées à l'eau de robinet et stérilisées en surface à l'aide d'hypochlorite de sodium (1%) pendant 15 min puis rincées trois fois avec de l'eau distillée stérile. Les graines sont placées sur un milieu de culture Murachige et Skoog (MS) contenant de la kinétine (0.02 mg/l) et de l'acide gibbérellique (1mg/l) pour la germination. Après 3 semaines, les plantules obtenues sont utilisées comme source d'extrait de cals et de suspension cellulaire. L'objectif de ce type d'expérimentation est l'identification des composés antioxydants présents dans cette plante (Grzegorzczuk et al., 2005).

1.7.2. Micropropagation

La micropropagation ou propagation clonale en masse, est la multiplication *in vitro* des plantes par la culture de tissus ou de cellules pour produire des copies ou clones génétiquement identique à la plante mère (Ferry et al., 1998).

1.7.2.1. Culture de cellules

La culture de suspensions cellulaires de *S. officinalis* est induite en transférant 0.5 à 1.0 g de cal friable ou compact dans 30 ml de milieu MS liquide additionné de 30 g/L de saccharose, 10.47 μ M auxine (NAA) et 4.5 μ M cytokinine (BA). La culture est maintenue dans des flacons Erlenmeyer de 200 ml sur un agitateur giratoire à 65 tr/min. Le but de cette étude est l'évaluation de la croissance de la biomasse végétale. Les résultats montrent que la culture *in vitro* de suspensions cellulaires de sauge officinale donne une prolifération importante (Bolta et al., 2000).

1.7.2.2. Culture de tissus

La culture de tissus de *S. officinalis* est réalisée à partir des segments nodaux obtenus des graines germées *in vitro*. Puis, les explants sont cultivés sur de multiples milieux de culture

Murashige et Skoog contenant différents types de cytokinines: BAP, zéatine, thidiazuron ou 2iP à des concentrations de 0.5 ou 1 mg/L associés à l'auxine AIA à une concentration de 0.1 mg/L. Les résultats montrent que la prolifération maximale des pousses est obtenue lorsque les explants sont cultivés sur milieu de Murashige et Skoog supplémenté avec 0.5 mg/L de BAP et 0.1 mg/L AIA (Petrova et al., 2015).

Conclusion

Conclusion

La flore de l'Algérie est très riche en plantes médicinales et aromatiques. Parmi ces plantes, *Salvia officinalis* L. de la famille des Lamiaceae. Cette espèce vivace et cultivée occupe une place prépondérante dans l'art culinaire, la phytothérapie, les industries pharmaceutiques.

Les outils biotechnologiques sont importants pour la multiplication et l'amélioration génétique des plantes par l'adoption de plusieurs techniques d'une part, les méthodes traditionnelles : bouturage, marcottage et greffage, d'autre part, les méthodes modernes telles que la culture *in vitro*.

Le présent travail porte sur l'investigation de certaines vertus thérapeutiques et les méthodes biotechnologiques de régénération de *Salvia officinalis*. Dans notre étude, nous nous sommes intéressés à trois chapitres.

- Le premier chapitre aborde les méthodes traditionnelles comme : griffage, bouturage, marcottage et les techniques modernes comme : la culture *in vitro* de cellules, de protoplastes, anthères, et germination *in vitro*.
- Le deuxième chapitre traite les milieux de culture et les phytohormones.
- Le troisième chapitre concerne la classification et description botanique de *Salvia officinalis*, sa composition chimique et utilisations et les principales méthodes modernes de propagation.

Malgré la multiplicité des travaux scientifiques sur les méthodes biotechnologiques de la régénération des plantes, des recherches complémentaires sont nécessaires pour :

- Optimiser les conditions de culture des génotypes nouvellement sélectionnés.
- Raccourcir le temps nécessaire à la production de plantules des espèces rares et réduire l'incidence des troubles physiologiques.

Références bibliographiques

Listes des références bibliographiques

(A)

- Adouane, S (2015). Etude ethnobotanique des plantes médicinales dans la région méridionale des Aurès. Mémoire de magister. Université Mohamed Khider, Biskra.
- Agnès, B., Hélène, R., Louise, F (2013). La culture in vitro en TPE. <http://culture-in-vitro-tpe.e-monsite.com/>.
- Alloun, K (2013). Composition chimique et activités antioxydante et antimicrobienne des huiles essentielles de l'aneth (*Anethum graveolens* L.), de la sauge (*Salvia officinalis* L.) et de la rue des montagnes (*Ruta montana* L.). Mémoire de magister. Ecole Nationale Supérieure agronomique, El-Harrach, Alger.
- Augé, D., (1992). La culture in vitro et ses applications horticoles, Lavoisier .France.
- Augé, R., Beauchesne, G., Boccon-Gibod, J., Decourtye, L., Digat, B., Jalouzot, R., Minier, R., Morand, J-Cl., Reynoird, J.P., Strullu, D.G. (1989). La culture in vitro et ces applications horticoles. 3ème édition revue, corrigée et augmentée. Ed. Tec et Doc. Lavoisier 225p.
- Anonyme 1 : <https://auto-culture-maison.blogspot.com/2016/04/le-bouturage.html>
- Anonyme 2 : <https://fr.slideshare.net>
- Anonyme 3 : <http://monde.ccdmd.qc.ca/ressource/?id=121453&demande=desc>
- Anonyme 4 : <https://www.semae-pedagogie.org/sujet/biotechnologies-hybridation-somatique/>
- Anonyme 5 : <https://www.boutique-vegetale.com/p/sauge-officinale-salvia-officinalis-sage>
- Anonyme 6 : <https://www.herbea.org/fr/fiches/1351/Sauge-officinale>

(B)

- Bhojwani, S.S., Razdan, M.K (1986). Plant tissue culture: theory and practice. Elsevier.
- Boccon-Gibod, J., Jalouzot, R (1989). Les biotechnologies en horticulture: possibilités et perspectives. In La culture in vitro et ses applications horticoles, 3ème édition revue, corrigée et augmentée (pp. 91-131).
- Bolta, Z., Baricevic, D., Bohanec, B., Andresek, S (2000). A preliminary investigation of ursolic acid in cell suspension culture of *Salvia officinalis*. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 62, 57–63.

- Borrelli, V., Lanubile, A., Marocco, A (2021). Plant Hormones and Plant Defense Response against Pathogens. In D.K. Gupta & F.J. Corpas (Eds.), *Hormones and Plant Response* (pp. 1-28). Cham: Springer International Publishing.
- Bouricha, R (2014). Contribution à l'étude des techniques de multiplication arboricole dans la ferme de démonstration ITAFV. Ain Temouchent. Mémoire d'ingénieur d'état en agronomie. Université Abou Bekr Belkaid-Tlemcen.
- Buffard-Morel, J., Touré, B (1980). Multiplication végétative par bouturage de cultivars appartenant au complexe *Dioscorea cayenensis*-*D. rotundata*. *Annales de l'Université d'Abidjan. Série C : Sciences*. 16: p. 235-249.

(C)

- Carlier, V. (2005). *Herbier médicinal*. Aubanel, une marque des éditions minerva, Genève Suisse. Pp: 165.
- Chaipanich, V.V., Roberts, D.L., Yenchon, S., Sompong, T.C., Divakaran, M. (2020). In vitro seed germination and plantlet regeneration of *Vanilla siamensis*: An endemic species in Thailand. *ScienceAsia*, 46(3), 315-322.
- Chevallier, D (1990). Rapport sur les applications des biotechnologies à l'agriculture et à l'industrie agro-alimentaire. Office parlementaire d'évaluation des choix scientifiques et technologiques.
- Ckébert, J.P (1985). « *Herbier provençal* », Rivages éditions. Paris. 111p.
- Cocking, E.C., Davey, M.R., Pental, D., Power, J.B (1981). Aspects of plant genetic manipulation. *Nature*, 293(5830), 265-270.
- Colebrook, E.H., Thomas, S.G., Phillips, A.L., Hedden, P (2014). The role of gibberellin signalling in plant responses to abiotic stress. *J Exp Biol* 217(1):67–75.
- Cronquist, A. (1968). *The Evolution and Classification of Flowering Plants*, 396p.

(D)

- Daunay, M.C (2008). Eggplant, in *Vegetables II: Fabaceae, Liliaceae, Solanaceae, and Umbelliferae*, J. Prohens and F. Nuez, Editors. 2008, Springer New York: New York, NY. p. 163-220.
- Dhlamini, Z, Spillane, C, Moss, JP, Ruane, J, Urquia, N, Sonnino, A (2005). Status of research and application of crop biotechnologies in developing countries: preliminary

assessment. Food and Agriculture Organization of the United Nations, Viale delle Terme di Caracalla, 00100 Rome, Italy, 53 pp.

- Duling, E.N., Owen, J.C., John, B.G., Rosmary, F.W., Kevin, A.M., Yeap, L.F., Nigel, B.P (2007). Extraction of phenolic and essential oil from dried sage (*Salvia officinalis*) using ethanol-water mixture. Food chemistry. 101: 1417- 1424.
- Dutuit, P., Gorenflot, R (2008). Glossaire pour le développement durable : des mots pour les maux de la planète, Ed des archives contemporaines, p 182.

(E)

- Ellouz, O., Lakhoua, L., Gargouri, A (1994). Polymorphisme de l'ADN total chez des plantes régénérées à partir de protoplastes de pomme de terre. Quel avenir pour l'amélioration des plantes. Ed. AUPELF-UREF, Paris.
- Espinoza, N., lizarraga, R., Siguenas, C., Buitron, F., Brayn, J., Dodds, J.H (1992).Tissu culture: Micropropagation. Conservation and export of potato gerplasm. CIP Research Guide, 19p.

(F)

- Fahad, S., Hussain, S., Bano, A., Saud, S., Hassan, S., Shan, D., Khan, F.A., Khan, F., Chen, Y., Wu, C., Tabassum, M.A (2015a). Potential role of phytohormones and plant growth-promoting rhizobacteria in abiotic stresses: consequences for changing environment. Environ Sci Pollut Res 22(7):4907–4921.
- Fahad, S., Hussain, S., Matloob, A., Khan, F.A., Khaliq, A., Saud, S., Hassan, S., Shan, D., Khan, F., Ullah, N., Faiq, M (2015b). Phytohormones and plant responses to salinity stress: a review. Plant Growth Regul 75(2):391–404.
- Ferry, M., Bouguedoura, N., El Hadrami, I (1998). Patrimoine génétique et techniques de propagation in vitro pour le développement du palmier dattier. Spécial Oasis. Sécheresse 9(2):139–146.
- Finnel, G (2002). Arbres et plantes médicinales du jardin. Editions Fernand lamore. Paris.

(G)

- Gamalero, E., Glick, B.R (2012). Ethylene and abiotic stress tolerance in plants. In: Environmental adaptations and stress tolerance of plants in the era of climate change. Springer, New York, pp 395–412.
- Gamborg, O., Miller, R., Ojima, K (1968). Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells. *Exp Cell Res*; 50, 151-158.
- Gautheret, R.J (1959). La culture des tissus végétaux technique et réalisation .Maison et Cie .884p.
- Gazeau, C.M., Derreudre, J (1988). La culture des méristèmes. In J.-P. Zryd (Ed.), Culture de cellules, tissus et organes végétaux: Fondements théoriques et utilisations pratiques (pp. 13–30). Presses Polytechniques Romandes.
- Germana, M.A (2006). Doubled haploid production in fruit crops. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 86, 131-146.
- Ghorbani, A., Esmailizadeh, M (2017). Pharmacological properties of *Salvia Officinalis* and its components. *Journal of traditional and complementary medicine*. Pp: 433-440.
- Girard, F., Noiville, C (2014). Biotechnologies végétales et propriété industrielle edition : la documentation Française, Paris. P 62.
- Groen, S.C., Whiteman, N.K (2014). The evolution of ethylene signaling in plant chemical ecology. *J Chem Ecol* 40(7):700–716.
- Grzegorzcyk, I., Bilichowski, I., Mikiciuk-Olasik, E., Wysokinska, H (2005). In vitro cultures of *Salvia officinalis* L. as a source of antioxidant compounds. *Acta Societatis Botanicorum Poloniae*, 74: 17-21.
- Guignard, J.L (2000). Biochimie végétale. 2ème édition Dunod. Paris, pp 181–184.

(H)

- Hubbert, M., Sievers, H., Lehnfeld, R., Kehrl, W (2006). Efficacy and tolerability of a spray with *Salvia officinalis* in the treatment of acute pharyngitis - a randomised, double-blind, placebo controlled study with adaptive design and interim analysis. *European Journal of Medical Research* 11(1):20-26.
- Huh, D., Hamilton, G.A., Ingber, D.E (2011). From 3D cell culture to organs-on-chips. *Trends Cell Biol* 21: 745–754.

(J)

- Jakovljevic, M., Jokic, S., Molnar, M., Jašic, M., Babic, J., Jukic, H., Banjari, I (2019). Bioactive profile of various *Salvia officinalis* L. preparations, *Plant Sci.* 2019, 8, 55.

- Jay-allemend, C., Capelli, P., Cornu, D (1992). Root development of in vitro hybrid walnut microcutting in vermiculite containing gelrite medium. Station d'amélioration des arbres forestiers INRA, 45160. Ardon France. *Scienda horticultura*. 51(3-4): 335-342.

(K)

- Karp, A., Nelson R.S., Thomas, E., Bright, S.W.J (1982). Chromosome variation protoplast derived potato plants. *Theoretical and Applied Genetics* volume 63, pages 265–272 (1982)
- Kazan, K (2013). Auxin and the integration of environmental signals into plant root development. *Ann Bot* 112(9):1655–1665.
- Kianbakht, S., Dabaghian, FH (2013). Improved glycemic control and lipid profile in hyperlipidemic type 2 diabetic patients consuming *Salvia officinalis* L. leaf extract: a randomized placebo controlled clinical trial. *Complement Ther Med*. 21:441-446.
- Ky-Dembele, C., Traoré, F. T., Koné, B., Bayala, J., Kalinganiré, A., Bonneville, J., Olivier, A (2015). Le bouturage est-il une option envisageable au Sahel?. *Sahel Agroforesterie*. 20: p. 4-5.

(L)

- Lachachi, S (2009). Organogénèse et embryogénèse somatique directe chez la tomate. Mémoire de magister. Université d'Oran.

(M)

- Madi, A (2010). Caractérisation et comparaison du contenu polyphénolique de deux plantes médicinales (Thym et Sauge) et la mise en évidence de leurs activités biologiques. Mémoire de magister. Université Mentouri Constantine.
- Mamatkulovich, B.A., Mastona, B (2021). *Salvia Officinalis* Seed Germination. *Texas Journal of Multidisciplinary Studies*. 2, 171-172.
- Mehalaine, S (2018). Seed Germination and Propagation for Regeneration of Some Medicinal Plants Growing Wild in Semiarid Region of Algeria. In C. M. Hussain (Ed.), *Handbook of Environmental Materials Management* (pp. 1-24). Springer International Publishing.
- Metro, A. (1975). Dictionnaire forestier multilingue. Collection de terminologie forestière multilingue N°2.Édition. Conseil international de la langue française.431p.

- Meunier, Q. (2005). Soutien technique aux tradipraticiens pour la multiplication végétative d'espèces médicinales prioritaires dans le Sud-Ouest de l'Ouganda. Doctoral dissertation, Université de Paris-Val-de-Marne.
- Munteanu, V., Gordeev, V., Martea, R., Duca, M (2014). Effect of gibberellin cross talk with other phytohormones on cellular growth and mitosis to endoreduplication transition. *International Journal of Advanced Research in Biological Sciences* 1(6):136–153.
- Murashige, T., Skoog, F (1962). A Revised Medium for Rapid Growth and Bioassays with Tobacco Tissue Cultures. *Physiologia Plantarum*, 15, 473-497.

(P)

- Pelletier, G. (1988). Protoplastes : Méthodologie. In J.-P. Zryd (Ed.), *Culture de cellules, tissus et organes végétaux: Fondements théoriques et utilisations pratiques* (pp. 173–180). Presses Polytechniques Romandes.
- Pereira, O.R., Catarino, M.D., Afonso, A.F., Silva A.M.S., Cardoso, S.M (2018). *Salvia elegans*, *Salvia greggii* and *Salvia officinalis* Decoctions: Antioxidant Activities and Inhibition of Carbohydrate and Lipid Metabolic Enzymes. 23: 3169.
- Péret, B (2007). Transport de l'auxine et développement du nodule actinorhizien chez l'arbre tropical *Casuarina glauca*. Thèse de doctorat. Université Montpellier II. France.
- Petrová, J., Adriana, P., Lukáš, H., Jaroslav, P., Katarína, R., Miroslava, K (2013). Antimicrobial effect of *Salvia officinalis* L. against selected group of bacteria isolated from Chickens Meat *Scientific Papers: Animal Science and Biotechnologies* 46 (2). P: 123-127.
- Petrova, M., Nikolova, M., Dimitrova, L., & Zayova, E (2015). Micropropagation and evaluation of flavonoid content and antioxidant activity of *Salvia officinalis* L. L., *Genetics and Plant Physiology*, 5(1), 48-60.
- Priel, B., Retournard, D (2005). *Multipliez toutes les plantes de jardin, espèce par espèce, geste par geste*. Ed. Rustica éditions, Paris.

(R)

- Rafamantanana, H (2004). Multiplication d'*Eugenia jambolana* Lamarck (Myrtaceae) par la méthode de la culture in vitro. Mémoire de diplôme d'étude approfondie. Université d'Antananarivo. Madagascar.
- Reid, M.S (1995). Ethylene in plant growth, development, and senescence. In: *Plant hormones*. Springer, Dordrecht, pp 486–508.

- Robert, D, Dumas, C, Bayon, C., (1998). La reproduction. Edt. Doun initiatives santé pp 373.

(S)

- Saadi A. (1991). Régénération de plantes de pois *Pisum sativum* L. par embryogenèse somatique. Thèse de doctorat. Paris Grignon 162p.
- Sama, A.E., Simon, Z., Nyochembeng, L., Tambong, T.A., Nezana, X., Wutah, J.G (1998). Culture in-vitro et multiplication rapide de plante à tubercules et racines au Caméroune. Cahier Agriculture. 7 : 63-66.
- Sata, S.J., Bagatharia, S.B., Thaker, V.S (1999). Development of somatic embryos from garlic (*Allium sativum*) clove. UGC National seminar on ‘Cultivation and conservation of medicinal plants’: New millenium newer prospectus. Guj Uni Ahmedabad.
- Sbay, H., Lamhamedi, M.S (2015). Guide pratique de multiplication végétative des espèces forestières et agroforestières: Techniques de valorisation et de conservation des espèces à usages multiples face aux changements climatiques en Afrique du nord. HCEFLCD, Centre de Recherche Forestière éd, 96.
- Schmid, J., Keller, E (1984). Nouvelles possibilités pour l'amélioration et la multiplication des plantes : les cultures de tissus et de cellules. Revue Suisse Agriculture. 13(6): 265-272.
- Sharma, S.K., Millam, S (2004). Somatic embryogenesis in *Solanum tuberosum* L. A histological examination of key developmental stages. Plant Cell Rep 23 : 115–119.
- Sheparid, J (1982). La régénération in vitro de plantes de pomme de terre pour la science, Juillet .34.
- Sidi Moussa, F.N (2012). Etude de l'activité antimicrobienne de deux huiles essentielles, application in vivo sur les diarrhées bactériennes, Mémoire de magister. Université Saad Dahlab, Blida.
- Sulong, N.A., Khalil, N.I.M., Dahari, M.I., Zakaria, A.A. (2016). Effect of different sound genres on in vitro seed germination of *Grammatophyllum* hybrid and *Grammatophyllum stapeliiflorum* orchids. In The Open Conference Proceedings Journal (Vol. 7, No. 1).

(T)

- Taleb-Toudert, K (2015). Extraction et caractérisation des huiles essentielles de dix plantes aromatiques provenant de la région de Kabylie (Nord Algérien) : évaluation de leurs effets sur le bruche de niébé *Callosobruchus maculatus*, Université Mouloud MAMMERI.

- Teuscher, E., Anton, R., Lobstein, A (2005). Plantes aromatiques: épices, aromates, condiments et huiles essentielles. Tec & Doc. Paris. 522 pp.
- Tosun, A., Khan, S., Kim, Y.S., Calín-Sánchez, Á., Hysenaj X., Carbonell-Barrachina, Á.A (2014) Essential Oil Composition and Anti-Inflammatory Activity of *Salvia officinalis* L (Lamiaceae) in Murin Macrophages. *Tropical Journal of Pharmaceutical Research* June 2014; 13 (6): 937-942.
- Touth, Y. (1998). Génie génétique et biotechnologies : concepts et méthodes. Applications à l'agronomie et aux bio-industries. Ed. Dunod. Paris 209p.
- Tripathi, L., Tripathi, J.N (2003). Role of biotechnology in medicinal plants. *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*; 2 (2): 243-253.

(V)

- Vissi, T., Zelko, R., Foldesi, R., Turi, I (2021). Traditional application of Sage (*Salvia*) in conductive education and its potential evidence-based background. *Heliyon*, 7(10): p. e08114.

(Y)

- Yamaguchi, S (2008). Gibberellin metabolism and its regulation. *Annu Rev Plant Biol* 59:225–251.
- Yin, C.C., Ma, B., Collinge, D.P., Pogson, B.J., He, S.J., Xiong, Q., Duan, K.X., Chen, H., Yang, C., Lu, X., Wang, Y.Q (2015). Ethylene responses in rice roots and coleoptiles are differentially regulated by a carotenoid isomerase-mediated abscisic acid pathway. *Plant Cell* 27(4):1061–1081.

(Z)

- Zaccardelli, M., Catello-Pane, C., Caputo, M., Durazzo, A., Lucarini, M., Silva, A.M., Severino, P., Souto, E.B., Santini, A., De Feo, V (2020). Sage species case study on a spontaneous mediterranean plant to control phytopathogenic fungi and bacteria, *Forests* 11 704.
- Zulkarami, B., Razi, I.M., Halimi, M.S., Mondal, M.A., Panhwar, Q.A., Islam, MR (2014). Effectiveness of different phytohormones on grain filling and yield of rice (*Oryza sativa* L.) under drought stress. *Journal of Food, Agriculture and Environment* 12: 697–700.