

**République Algérienne Démocratique et Populaire**  
**Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche**  
**Scientifique**  
**Université Saad Dahleb de Blida**  
**Faculté des sciences de la nature et de la vie**  
**Département de Biologie des Populations et des Organismes**

***Mémoire de fin d'étude***

**En vue de l'obtention du diplôme de Master II en Biologie**  
**Option : Génomique et Biotechnologie Végétale**

**Thème :**

**Contribution à la régénération de deux  
variétés autochtones (Chemlal et Sigoise) de  
l'Olivier *Olea europea.L* par embryogenèse  
somatique**

**Présenté par :**

AISSA Fatiha  
BOURAIB Louiza

**Soutenu le 29/10/2015**

**Devant le jury :**

Dr AISSANI	Maître de conférence A	USDB	Président
M <sup>me</sup> AMEDJKOUH.H	Maître assistant A	USDB	Examinatrice
M <sup>me</sup> ZERKAOUI.A	Maître assistant A	USDB	Promotrice
M <sup>me</sup> HADDAD.N	Magister en Agronomie	ITAF	Co-promotrice

**Promotion : 2014/2015**

# Remerciements

*Ce modeste travail qui s'achève aujourd'hui après avoir naissance grâce à la direction et sous l'observation de M<sup>me</sup> ZERKAOUIA, notre promotrice qui nous a orientés durant l'élaboration de ce travail, on tient à leur adresser nos sincères remerciements.*

*Nos remerciements vont particulièrement à :*

*Notre Co promotrice M<sup>me</sup> HADDAD.N d'avoir bien voulu diriger et encadrer ce travail avec une grande rigueur scientifique, en suite pour ses conseils précieux, ses orientations judicieuses et ses directives efficaces, ainsi que pour sa contribution et son aide concernant la réalisation du travail.*

*Nos remerciements s'adressent également :*

*A Mr AISSANI pour nous avoir fait l'honneur de présider ce jury.*

*A M<sup>me</sup> AMEDJKOUH, d'avoir si aimablement accepté d'examiner ce travail.*

*Nos sincères remerciement à Mr RABHI, directeur de département de recherche de l'ITAF et à M<sup>me</sup> RADJI.H, chef de département de laboratoire central de l'ITAF, de nous avoir accueilli et avoir mis à notre disposition les moyens nécessaires à la réalisation de ce projet de fin d'étude.*

*Nous tenons à exprimer nos sincères remerciements et reconnaissances à tous le staff de l'ITAF en particulier celui de laboratoire central en l'occurrence M<sup>me</sup> BRANCI et M<sup>elle</sup> BOUKHALFA pour leur soutien scientifique et leur contribution dans la réussite de ce travail.*

*Nous tenons également à remercier tous les enseignants du département de BPO qui ont contribué à notre formation.*

*Enfin, on tient à remercier tous ceux qui de près ou de loin ont contribué à l'élaboration de ce travail.*

## *Dédicaces*

*Aujourd'hui, et plus que jamais, je tiens à dédier ce modeste travail à ceux qui sont chères à mon cœur :*

*Ma mère que je l'aime beaucoup, la chandelle qui éclaire ma vie, la source de tendresse, d'amour et de sacrifice, que dieu me la garde en vie.*

*Mon ange gardien, mon père qui a toujours été là pour moi, à tous ces sacrifices et sa large compréhension, je lui dois tous ce que je suis.*

*A mon amie Fatiha avant d'être mon binôme, pour les moments que nous avons partagé durant la réalisation de ce travail*

*A mes chères frères : Mohamed, Ali, Ismail et Abdellah, pour le soutien moral et l'encouragement qu'ils n'ont cessé de me prodiguer.*

*A mes chères sœurs : Zahia, Fatiha et Karima.*

*A mes belles-sœurs.*

*A mes neveux et mes nièces.*

*A ma chère nièce Nour El Houda.*

*A toute la famille BOURAIIB sans exception.*

*A mes amis (es) qui m'ont apporté aide et encouragement : Farida et Amel*

*A mon gérant, et mes collègues de travail : Saïda, Sihem, Amina et Ahlem.*

*Louïza*

## ABREVIATIONS

---

### Liste des abréviations

**°C** : degree celsius.

**2,4D** : acide 2,4 dichloro-phénoxy-acétique.

**2-4D** : Acide 2-4Dichlorophenoxyacétique.

**AIA** : acide indolacétique.

**AIB** : acide indolbutyrique.

**ANA** : Acide Naphtalène Acétique.

**ANA** : acide naphtalène-acétique.

**Bo** : Borate.

**Ca**: calcium.

**CaCl<sub>2</sub>**: chlorure de calcium.

**Cm** : centimètre.

**Cu** : cuivre.

**Fe** : Fer.

**ha** : hectare.

**HCL** : Acide Chlorhydrique.

**HCl** : chlorure d'hydrogène.

**ITAFV** : Institut Technique de l'Arboriculture Fruitière et de la Vigne.

**JC** : jesus christ.

**K** : Potassium.

**KCl**: chlorure de potassium.

**MADR** : Ministère de l'Agriculture, du Développement Rural et de la Pêche.

**Mg**: Magnisium.

**Mn** : Manganèse.

**Mo** : molybdène.

## ABREVIATIONS

---

**MS** : Murashige et Skoog.

**N** : Azote.

**NaOH** : Hydroxyde de Sodium.

**NFM** : nouvelle forets du maghreb.

**NOA** : Nitric oxyde.

**P** : Phosphore.

**PCA** : acide parachlorophénoxy-acétique.

**S**: Soufre.

**TC** : Taux ce Contaminations.

**TD** : Taux de Desséchement.

**TR** : Taux de Reprises.

**UV** : Ultra-Violet.

**Zn** : Zinc.

# Glossaire

**Explant :** Fragment d'organisme (apex, organe, fragment d'organe ou fragment tissulaire) excisé et éventuellement mis en culture *in vitro* (encyclopédie, 2015).

**Multiplication végétative :** Synonyme de reproduction asexuée. Elle aboutit à la constitution de clones homogènes (encyclopédie, 2015).

**Cal :** Amas de cellules végétales indifférenciées. Structure de prolifération cellulaire obtenue notamment en culture *in vitro* par l'ajout d'hormones végétales. Il peut être localisé au niveau des blessures ou s'étendre à des régions indemnes, sa croissance peut être indéfinie au cours des repiquages. Il peut être homogène ou hétérogène (encyclopédie, 2015).

**Callogenèse :** Néoformation d'un cal (encyclopédie, 2015).

**Pédoclimatiques :** Qui caractérise les conditions extérieures au niveau du sol affectant une plante, et les conditions climatiques (encyclopédie, 2015).

**Verger :** Un verger est un espace de terrain dévolu à la culture d'arbres fruitiers, appelée arboriculture fruitière. Il en existe différents types : les vergers commerciaux, les vergers conservatoires et les prés-vergers (encyclopédie, 2015).

## Glossaire

---

**Érosion génétique :** L'érosion génétique est la perte de diversité génétique entre et dans des populations au fil du temps due à l'intervention humaine ou des modifications de l'environnement (encyclopédie, 2015).

**Autochtone :** variété locale (encyclopédie, 2015).

**Caulogénèse :** La caulogénèse est un processus qui conditionne la formation et le développement des bourgeons et de tige du végétal. La caulogénèse est stimulée par des hormones végétales. : Les cytokinines (encyclopédie, 2015).

**Rizhogénèse :** La rhizogénèse est un processus qui conditionne la formation et le développement de racines chez les végétaux. La rhizogénèse peut être favorisée par application d'auxine. Les cytokinines sont antagonistes de la rhizogénèse, c'est-à-dire qu'ils inhibent le développement des racines (encyclopédie, 2015).

**Organogénèse :** formation et développement des différents organes (encyclopédie, 2015).

**Phylogénèse :** La phylogénie est l'étude des relations de parentés entre différents êtres vivants en vue de comprendre l'évolution des organismes vivants. On peut étudier la phylogénie d'un groupe d'espèces mais également, à un niveau intraspécifique, la généalogie entre populations ou entre individus (encyclopédie, 2015).

**Somaclonale :** La variation somaclonale est la modification observée chez certaines cellules, après un long cycle de cultures in vitro sans régénération. Elles ne sont plus alors identiques à la plante mère (encyclopédie, 2015).

# Liste des Figures

<b>Figure 1</b> : Aire de culture de l'olivier.....	4
<b>Figure 2</b> : Le cycle de vie de l'olivier.....	7
<b>Figure 3</b> : Les différentes variétés d'olivier produites en Algérie.....	9
<b>Figure 4</b> : Aspect de l'arbre d'olivier de la variété sigoise.....	10
<b>Figure 5</b> : Aspect de l'arbre d'olivier de la variété Chemlal.....	11
<b>Figure 6</b> : Principe de la régénération des plantes .....	12
<b>Figure 7</b> : schéma explicatif de la totipotence végétale.....	13
<b>Figure 8</b> : schéma explicatif de la culture de méristème.....	16
<b>Figure 9</b> : Schéma explicatif de la micropropagation in vitro.....	17
<b>Figure 10</b> : schéma explicatif de l'embryogénèse somatique.....	17
<b>Figure 11</b> : schéma explicatif de la culture de protoplastes <i>in vitro</i> .....	18
<b>Figure 12</b> : schéma des structures chimiques des auxines.....	23
<b>Figure 13</b> : Structure chimique de quelques cytokinines.....	23
<b>Figure 14</b> : Structure chimique de l'acide gibberellique.....	24
<b>Figure 15</b> : Structure chimique de l'acide abscissique.....	24
<b>Figure 16</b> : Structure chimique de l'éthylène.....	25
<b>Figure 17</b> : laboratoire central de l'Institut Technique de l'Arboriculture Fruitière à Tessala El Merdja –Alger-.....	27
<b>Figure 18</b> : Les boutons floraux de l'olivier <i>Olea europea</i> (variété sigoise).....	28
<b>Figure 19</b> : les fleurs fermées de la variété Chemlal.....	30
<b>Figure 20</b> : La désinfection des fleurs à l'hypochlorite de sodium à 20%.....	32
<b>Figure 21</b> : des fleurs découpées des deux variétés d'olivier.....	33
<b>Figure 22</b> : La mise en culture des explants dans les boites de pétri.....	34
<b>Figure 23</b> : Les boites de pétrie placés dans la chambre de culture.....	34
<b>Figure 24</b> : Résultats du premier essai de désinfection à l'hypochlorite de sodium 20%.....	37
<b>Figure 25</b> : Résultats du deuxième essai de désinfection à l'hypochlorite de sodium 20%.....	38
<b>Figure 26</b> : Résultats du troisième essai de désinfection à l'hypochlorite de sodium 20%.....	40



<b>Figure 27</b> : Résultats des trois essais de désinfection.....	41
<b>Figure 28</b> : Cals produits par les explants de la variété Chemlal.....	44
<b>Figure 29</b> : pourcentage de callogenèse chez la variété Chemlal dans différents milieux de culture.....	46
<b>Figure 30</b> : Aspect des cals produits par la variété Chemlal, après 2 mois de culture. ....	47
<b>Figure 31</b> : pourcentage de callogenèse chez la variété Sigoise dans différents milieux de culture. ....	50
<b>Figure 32</b> : Cals produits par les explants de la variété Sigoise.....	50
<b>Figure 33</b> : Aspect des cals produits par la variété Sigoise, après 1 mois de culture.....	51
<b>Figure 34</b> : les taux de callogenèse obtenus chez les deux variétés étudiés (Chemlal et Sigoise).....	53

# Liste des Tableaux

<b>Tableau I</b> : Résultats du premier essai de la désinfection des explants à l'hypochlorite de sodium 20%.....	36
<b>Tableau II</b> : Résultats du deuxième essai de la désinfection des explants à l'hypochlorite de sodium 20%.....	38
<b>Tableau III</b> : Résultats du troisième essai de désinfection à l'hypochlorite de sodium 20%.....	39
<b>Tableau IV</b> : Résultats de la callogenèse chez la variété chemlal.....	43
<b>Tableau V</b> : Résultats de la callogenèse chez la variété sigoisie .....	48
<b>Tableau VI</b> : composition de la solution du milieu MS (1962) en macroéléments, microéléments et en Fer EDTA.....	Annexe I
<b>Tableau VII</b> : la composition des milieux de culture en hormones de croissance:.....	Annexe II

# Résumé

La culture de l'olivier occupe une place très importante dans l'économie agricole nationale. Cependant, son développement reste confronté aux contraintes de production de plants sains et de qualité, alors qu'il existe plusieurs techniques modernes de multiplication et d'assainissement, parmi elles : l'embryogenèse somatique.

L'embryogenèse somatique à partir de la culture des fleurs d'olivier *in vitro* permis de régénérer des plants d'olivier sains et génétiquement identique à la plante mère.

L'objectif de ce travail est l'application de cette technique sur deux génotypes d'olivier *Olea europea.L* appartenant au patrimoine oléicole algérien.

Le passage rapide des explants dans une solution d'alcool 70° et le trempage de ces derniers dans l'hypochlorite de sodium à 20% pendant 8 à 10 mn, est s'avéré comme une meilleure méthode de désinfection, avec un taux de contamination de 0%, et un taux de reprise allant jusqu'aux 72,5%.

2 à 4 semaines après la culture initiale, certains explants des deux variétés d'olivier ont exprimés une bonne aptitude à la callogenèse dans les milieux de culture traités avec l'ANA et la Zéatine, à savoir la variété Chemal (2,5% - 25%) dans les milieux M12, M13 et M10, et la variété Sigoise (10% - 65%) dans les milieux M10, M11 et M12 .

Aucune régénération embryonnaire n'a été observée chez les deux variétés étudiées pour les 32 concentrations.

**Mots clés :** callogenèse, embryogenèse somatique, *Olea europea.L*, régénération.

## ملخص

زراعة الزيتون تحتل مكانة هامة جدا في الاقتصاد الزراعي الوطني . ومع ذلك ، لا يزال تطوره يواجه عدة عوائق في إنتاج شتلات صحية وذات جودة، في حين أن هناك العديد من التقنيات الحديثة للتكاثر النباتي منها : تقنية تكوين أجنة جسمانية.

تكوين أجنة جسمانية من خلال زراعة زهور الزيتون في المختبر يسمح بتجديد و إنتاج شتلات زيتون صحية و متطابقة وراثيا مع النبتة الأم.

الهدف من هذا العمل هو تطبيق هذه التقنية على نوعين من مورثات الزيتون *Olea europea* تعود إلى إرث الجزائر من الزيتون.

لقد ثبت أن التمرير السريع للعينات في محلول الكحول 70° و نقعها في محلول إيبوكلوريت الصوديوم 20% لمدة 8 إلى 10 دقائق، أنها أفضل طريقة للتطهير بنسبة عدوى تقدر ب 0%، و نسبة استرداد تصل إلى 72.5%

بعد 2-4 أسابيع من الزراعة الأولية، أظهرت بعض العينات من أصناف اثنين من الزيتون قدرة جيدة على تكوين أنسجة لينة في الوسط الزراعي المعالج بالهرمونات ANA و Zéatine، بنسب تتراوح ما بين (2.5% - 25%) في صنف Chemlal ، و في صنف Sigoise بنسب تتراوح ما بين (10%-65%).

لم يلاحظ أي تشكل للأجنة الجسمانية في كل من الأصناف المدروسة و ذلك بالنسبة لكل من التراكيز المدروسة ال32.

**كلمات المفتاح :** تكوين أنسجة لينة، تكوين أجنة جسمانية ، *Olea europea.L* ، تجديد.

# Abstract

The culture of the olive-tree occupies a very important place in the national agricultural economics. However, its development remains confronted with the constraints of production of healthy seedlings and quality, whereas there exist several modern technologies of multiplication and cleansing, among them: somatic embryogenesis.

Somatic embryogenesis starting from the culture of the flowers of olive-tree in vitro allowed to regenerate healthy seedlings of olive-tree and genetically identical to the plant mother.

The objective of this work is the application of this technique on two genotypes of olive-tree *Olea europea*.L pertaining to the Algerian olive-growing inheritance.

The fast passage of explants in an alcohol 70° solution and the steeping of the latter in the sodium hypochlorite with 20% during 8 to 10 mn, is proven like a better method of disinfection, with a rate of contamination of 0%, and a rate of recovery going until the 72,5%.

2 to 4 weeks after the initial culture, certain explants of the two varieties of olive-tree expressed a good aptitude for the callogenèse in the culture media treated with ANNA and Zéatine, namely the variety Chemal (2,5% - 25%) in the mediums M12, M13 and M10, and the variety Sigoise (10% - 65%) in the mediums M10, M11 and M12.

No embryonic regeneration was observed at the two varieties studied for the 32 concentrations.

**Key words:** callogenesis, somatic embryogenesis, *Olea europea*.L, regeneration

# Sommaire

<b>Introduction :</b> .....	1
-----------------------------	---

## **Partie bibliographique :**

### **Chapitre I : Généralités sur l'Olivier :**

<b>I.1.</b> Historique :.....	3
<b>I.2.</b> Origine géographique :.....	3
<b>I.3.</b> Taxonomie et origine génétique :.....	5
<b>I.3.1.</b> Classification botanique :.....	5
<b>I.3.2.</b> Origine génétique :.....	5
<b>I.3.3.</b> Description botanique :.....	5
<b>I.4.</b> Cycle de développement de l'Olivier :.....	6
<b>I.5.</b> Morphologie des fleurs d'Olivier :.....	8
<b>I.6.</b> Production Algérienne et mondiale de l'Olivier :.....	8
<b>I.7.</b> Description de la variété Sigoise d'Olivier :.....	9
<b>I.8.</b> Description de la variété Chemlal d'Olivier :.....	10

### **Chapitre II : La culture *in vitro* et la régénération végétale**

<b>II.1.</b> Définition de la culture <i>in vitro</i> : .....	12
<b>II.2.</b> Définition de la totipotence :.....	13
<b>II.3.</b> Principes fondamentaux de la culture <i>in vitro</i> :.....	13
<b>II.4.</b> Historique de la culture <i>in vitro</i> :.....	14
<b>II.5.</b> Les catégories de la culture <i>in vitro</i> :.....	14
<b>II.6.</b> Les méthodes d'application de la culture <i>in vitro</i> :.....	15
<b>II.7.</b> Les avantages de la culture <i>in vitro</i> :.....	19
<b>II.8.</b> Les inconvénients :.....	19
<b>II.9.</b> Les conditions de la culture <i>in vitro</i> :.....	19

## **Partie expérimentale :**

### **Chapitre I : Matériel et Méthodes :**

<b>I.1. Matériel :</b> .....	28
<b>I.1.1.</b> Origine du matériel végétal :.....	28
<b>I.2. Méthodes :</b> .....	28
<b>I.2.1.</b> Préparation des milieux de culture :.....	28
<b>I.2.2.</b> Techniques de stérilisation :.....	29
<b>I.2.2.1.</b> Stérilisation du matériel du laboratoire :.....	29
<b>I.2.2.2.</b> Stérilisation des milieux de culture :.....	30
<b>I.2.3.</b> Préparation de l'explant :.....	30
<b>I.2.3.1.</b> Désinfection du matériel végétal :.....	30
<b>I.2.3.1.1.</b> La désinfection à l'hypochlorite de sodium 20% :.....	31
<b>I.2.3.2.</b> Mise en culture des fleurs :.....	32

### **Chapitre II : Résultats et Discussion :**

<b>II.1.</b> Méthodes de désinfection :.....	36
<b>II.1.1.</b> Premier essai : première désinfection :.....	36
<b>II.1.2.</b> Deuxième essai : deuxième désinfection :.....	37
<b>II.1.3.</b> Troisième essai : troisième désinfection :.....	39
<b>II.2.</b> L'aptitude à la callogenèse :.....	42
<b>II.2.1.</b> L'aptitude à la callogenèse chez la variété Chemlal :.....	43
<b>II.2.2.</b> L'aptitude à la callogenèse chez la variété Sigoise :.....	48
<b>II.2.3.</b> Comparaison entre l'aptitude à la callogenèse chez les deux variétés étudiées : .....	52
<b>Conclusion :</b> .....	54
<b>Références bibliographiques :</b> .....	56
<b>Annexes :</b>	

# INTRODUCTION

---

L'olivier (*Olea europaea*.L) est l'une des plantes les plus anciennes et les plus cultivées dans le bassin méditerranéen (Roussos et Pontikis, 2002). En Algérie, l'oléiculture revêt une grande importance socio-économique. Elle est constituée de 42 557 070 arbres à travers le territoire national sur une superficie de 328 884 ha soit, 130 arbre/ha occupant ainsi 38,7% de la superficie totale consacrée aux cultures pérennes (MADR, 2012).

Le secteur de l'olivier malgré ses potentialités importantes, n'arrive toujours pas à répondre aux besoins croissants de la population algérienne notamment en huile alimentaire. Cette situation résulte du fait que l'oliveraie nationale souffre de différentes contraintes liées, d'une part, aux conditions pédoclimatiques pas toujours favorables et d'autres part, au manque de soins sanitaires, à la non maîtrise d'itinéraires techniques adéquats et à la non disponibilité de matériel végétal performant.

Cependant, nous enregistrons, ces dernières années un regain d'intérêt pour la culture de l'olivier en Algérie pour son aspect socio-économique et environnemental et aux qualités nutritionnelles de l'huile d'olive. Une prise de conscience s'est opérée récemment à ce sujet en matière d'amélioration de la conduite du verger et de son extension sur des terres où l'intensification de la production est possible (Benderradji et *al.*, 2007).

En effet, l'oléiculture est considérée aujourd'hui comme étant une des filières stratégiques dans l'économie du pays. Pour ce faire, une nouvelle approche a été initiée par le Ministère de l'Agriculture, du Développement Rural et de la Pêche dans le cadre de son programme de renouveau de l'économie agricole et rurale qui vise, principalement, l'extension du verger oléicole et la valorisation des ressources génétiques locales de l'olivier.

Concernant la réhabilitation et le développement de l'oléiculture algérienne, un projet de développement et d'extension de la filière a été entamé, à cet effet, par l'Institut Technique de l'Arboriculture Fruitière et de la Vigne en l'an 2009 avec, pour objectif principal, la réalisation de 1 million d'hectares à l'horizon 2019.

Néanmoins, la réussite de tout programme de réhabilitation ou de plantation reste tributaire à la mise en place de techniques de production en masse de plants sains et de meilleure qualité.



## INTRODUCTION

---

La maîtrise et l'introduction des techniques modernes de multiplication sont exigées pour performer le secteur. Parmi ces dernières, via l'embryogénèse somatique notamment en matière de régénération conforme et intense du matériel et d'assainissement des arbres virosés dans un temps très réduit.

Près de 25 cultivars d'olivier étrangers ont été multipliés *in vitro* avec succès (Niaz et *al.*, 2014). Toute fois, la régénération via l'embryogénèse somatique de l'olivier n'a pas été effectuée et les informations expérimentales liées à sa réalisation ne sont pas encore trouvées.

Il serait donc intéressant de mener une étude sur l'aptitude de la régénération *in vitro* des variétés autochtones algériennes d'olivier via l'embryogénèse somatique dans le but de leur valorisation, leur préservation contre l'érosion génétique et la mise en place de protocoles de sa régénération *in vitro*.

La présente étude vise à contribuer à l'élaboration d'un protocole permettant la régénération de deux variétés autochtones de *Olea europaea*.L à savoir, la variété Chemlal et la Sigoise par l'embryogénèse somatique.

L'olivier, *Olea europaea***L.**, est une espèce très cultivée en méditerranée, il est utilisé en gastronomie ; mais également pour l'éclairage, en cosmétique et en thérapie etc.

L'oléiculture s'est répandue avec l'envahissement de la civilisation phénicienne et romaine, dans presque tout le bassin méditerranéen pour devenir enfin un symbole de la méditerranée.

On le trouve également en Amérique du Nord et du Sud, en Chine, en Australie, avec un pourcentage ne dépassant pas les 3% de l'oléiculture mondiale (FAO, 2005).

## **I.1. Historique :**

L'olivier, arbre d'une longévité exceptionnelle, l'olive est l'un des plus anciens fruits cultivés; on ne connaît pas exactement la période où l'olivier sauvage fut cultivé pour la première fois, toutefois des fouilles archéologiques amènent certains historiens à penser que la culture a commencé de 5 000 à 3 000 ans avant notre ère en Crète puis se serait déplacée vers l'Égypte, la Grèce, la Palestine et l'Asie Mineure. L'histoire de l'olivier se confond avec celle de l'agriculture et du bassin méditerranéen; on fait déjà mention du rameau de l'olivier dans l'histoire du Déluge. Dès le III<sup>e</sup> millénaire avant notre ère, les moulins à huile ont fait partie du paysage. Symbole mondial de paix et de sagesse, l'olivier occupe une place importante dans la mythologie; Égyptiens, Grecs et Romains le vénèrent (Matallah, 2006).

À la Renaissance, les Espagnols et les Portugais implantèrent l'olivier en Amérique. L'olivier permit à des populations entières de se nourrir de ses fruits et de son huile, de s'éclairer et de se traiter avec son huile. Encore aujourd'hui, l'économie de plusieurs pays méditerranéens repose en bonne partie sur la culture d'olive (Matallah, 2006).

## **I.2. Origine géographique :**

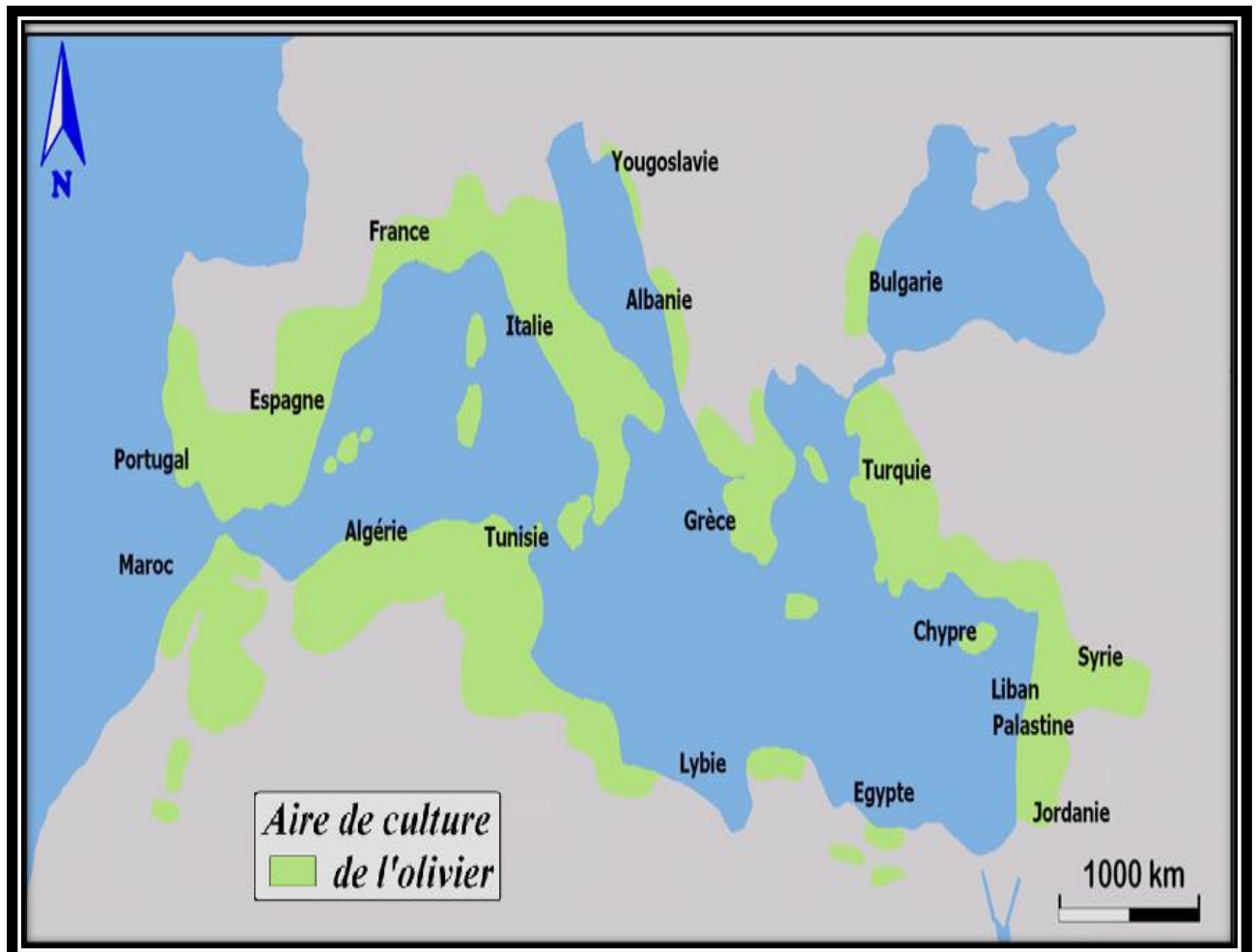
L'olivier semble, selon De Candolle (1985), avoir vu le jour aux confins de la frontière Irano-Syrienne ; dans la partie externe de la zone dite du croissant fertile (Rugini et al., 1998 ; Loumon et Giourage, 2003).

Mais, il est probable que la culture de l'olivier en Afrique du Nord soit antérieure à l'arrivée des phéniciens. En effet, Camps (1984) confirme cela en disant qu'à l'arrivée des Romains en Afrique du Nord, les berbères savaient greffer les oléastres, alors que dans le territoire occupé par les carthaginois, une véritable culture avait commencé à se répandre. Plus tard, les Romains ont pu étendre la culture sur toute la province.

Sur le pourtour méditerranéen, ce sont d'abord les Phéniciens et les Phocéens qui ont diffusés l'arbre avant que les Grecs et les Romains ne vulgarisent et enseignent sa culture. L'olivier ne se trouve en forte concentration que dans la région méditerranéenne.

Sa culture est située entre les latitudes 30° et 45° Nord (Loussert et Brousse, 1987).

D'après Longman in Fiorino et Grifi (1992), l'oléiculture en bordure de la méditerranée remonte au IVème millénaire avant JC. L'olivier a été introduit dès le seizième siècle dans plusieurs régions (Baldy, 1990) et plus récemment l'oléiculture s'est développée modestement en Afrique du Sud, en Australie, au Japon et en Amérique du Sud (Loussert et Brousse, 1978) (fig 1).



**Figure 1** : Aire de culture de l'olivier (Argeson, 1999).

### I.3. Taxonomie et origine génétique :

#### I.3.1. Classification botanique :

L'olivier est classé par (Maillard, 1975) comme suit :

- **Embranchement** : Phanérogames
- **Sous Embranchement** : Angiospermes
- **Classe** : Dicotylédones
- **Famille** : Oléacées
- **Tribu** : Oléinées
- **Genre** : *Olea*
- **Espèce**: *Olea europea*.L.

#### I.3.2. Origine génétique :

Selon Taylor (1945) in Fantanazza et Baldini (1990), le nombre chromosomique de base  $N = 23$  est caractéristique de toutes les espèces du genre *Olea*. Le nombre de  $2n=46$  a été confirmé par Calado et Fausto (1987) après une étude faite sur 20 cultivars d'oliviers. La famille des Oléacées comporte 25 genres, le genre *Olea* serait lui-même composé de 30 espèces différentes parmi lesquelles on trouve, *Olea europea*.L, avec deux sous espèces :

- *Olea oleaster* (oléastre) : qui se présente sous une forme spontanée comme un buisson épineux et à fruit ordinairement petit.
- *Olea sativa* (olivier cultivé) ; il est constitué par un grand nombre de variétés améliorées, multipliées par bouturage ou par greffage.

L'origine génétique de l'olivier est jusqu'à présent mal connue, l'oléastre a toujours été considéré comme l'ancêtre de l'olivier cultivé.

L'étude de la diversité moléculaire de cultivars et d'oléastres, a révélée que les cultivars s'apparentent aux oléastres (besnardet et *al.*, 2001 ; Brozined de Garaffa et *al.* ,2002 ; Breton et *al.* ,2006a ; breton et *al.* ,2006b).

#### I.3.3. Description botanique :

L'Olivier est un arbre vivace au feuilles persistantes, dur, gris-vert et ayant une forme allongée, elles sont utilisées pour l'alimentation de bétail (Metzidatis ,1997). Les fleurs sont déposées en grappes sur une longue tige, l'olivier produit deux sortes de fleurs, une parfaite

qui contient les deux sexes male et femelle et une staminée (Bernie et *al.*, 2006). Le tronc est gris-vert et lisse jusqu'à sa dixième année, il devient moneux et prend un teint gris foncé (Rugini et *al.*, 1998). Pour le système racinaire, il s'adapte à la structure des sols, le système radicaire reste à une profondeur de 500 à 700 cm et se localise principalement sous le tronc, mais ces racines forment une souche ligneuse très importante, dans laquelle s'accumulent des réserves, dans les mêmes conditions d'alimentation (Maillard, 1975 ; Loussert et Brousse, 1978).

#### **I.4. Cycle de développement de l'olivier :**

Après le repos hivernal de Novembre à février, la végétation démarre à partir de Mars - Avril, les pousses terminales s'allongent, les bourgeons axillaires se développent après s'être différenciés en boutons floraux ou en yeux à bois, les bourgeons végétatifs débourent vers la fin du mois de Mars un peu après les bourgeons floraux, la floraison se déroule entre Mai et Juin, l'endocarpe (noyau) se scarifie en Juillet - Août. La pousse de printemps la plus importante dans la croissance annuelle, dure jusqu'à mi-Juillet environ, une deuxième pousse peut avoir lieu entre Septembre et mi-octobre, si les conditions le permettent.

Chez les arbres qui ne portent pas de fruits (années moins) une croissance continue mais irrégulière peut être observée pendant toute la période de Mars à Octobre. L'ampleur à la croissance des rameaux est très affectée par la quantité de fruits portés par l'arbre.

Les feuilles de troisième année jaunissent puis chutent à un âge compris entre 28 et 30 mois en moyenne. L'arbre rentre enfin en repos hivernal.

La floraison s'effectue sur la pousse de l'année précédente et sur la pousse de deuxième année qui n'a pas fleuri l'année première.

La production interviendra donc sur du bois en deuxième année de croissance.

L'induction florale est déjà intervenue 90 à 100 jours avant le début de la floraison et vraisemblablement antérieurement à une période où aucune évolution n'est visible, ce caractère traduit une exigence pour l'oléiculture, celle de ne tailler l'olivier qu'après le bon déroulement de cette induction florale. Une taille d'automne va automatiquement conduire l'olivier à privilégier une pousse à bois au déterminant d'une croissance florale.

La régularité d'une pousse annuelle est par conséquent une condition « sine qua non » pour obtenir une fructification annuelle (Argenson *et al.*, 1999).

Le cycle de vie de l'olivier est résumé dans la figure 2 :

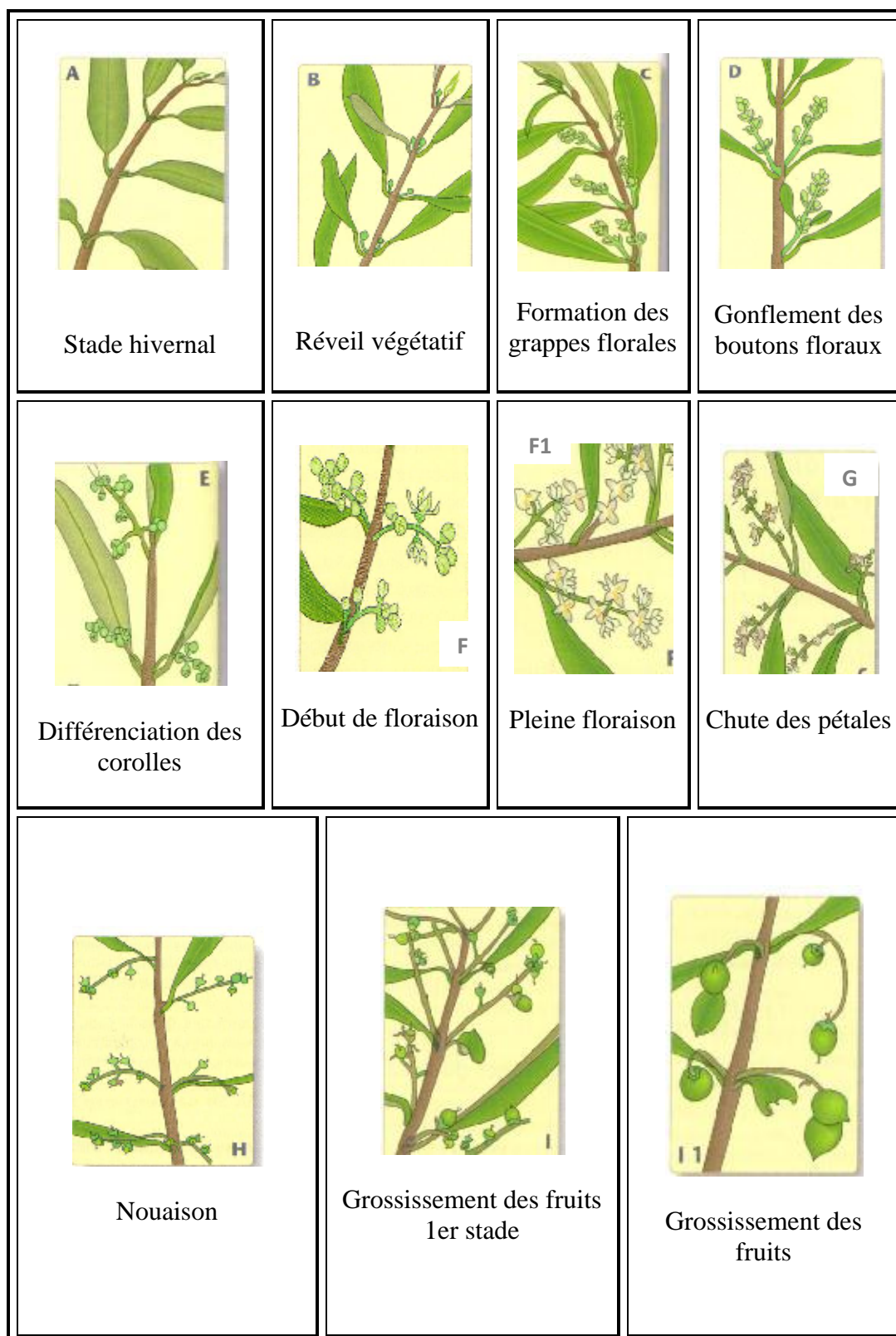


Figure 2 : Le cycle de vie de l'olivier (Argenson et al ; 1999)

### **I.5. Morphologie des fleurs d'olivier :**

Les fleurs de l'olivier sont groupées en inflorescence, ces dernières sont constituées par des grappes longues et flexueuses pouvant comporter de 4 à 6 ramifications secondaires. Selon DAOUDI (1994), la grappe peut contenir un nombre de fleurs qui varie de 10 à 40. De son côté (OUKSSILI, 1983) précise que ce nombre est un caractère variétal.

Dans le même contexte NAIT TAHEEN et *al.* (1995) ont affirmé que le nombre de fleurs parfaites par inflorescence est un caractère discriminatoire entre variétés d'olivier. Les fleurs de l'olivier sont hermaphrodites, toutefois les travaux d'AMIROUCHE (1977) montrent que cette caractéristique change, selon les variétés. Parfois sur un même arbre, on trouve trois types de fleur :

- \* Des fleurs complètes (monoclines) pourvues d'organes (pistils et étamines) normaux, qui produisent fruits et graines;
- \* Les fleurs stériles (déclines) possédant des étamines avec pollen mais pas de pistils ;
- \* Les fleurs pourvues d'étamines normales et de pistils anormaux (stigmates non fonctionnels ou ovaire sans ovules ou avec ovules anormaux).

### **I.6. Production algérienne et mondiale de l'olivier :**

L'Algérie fait partie des pays du pourtour méditerranéen dont le climat est plus propice à la culture de l'olivier. Elle se positionne après l'Espagne, l'Italie, la Grèce et la Tunisie qui sont, par ordre d'importance, les plus gros producteurs au monde d'huile d'olive.

L'olivier constitue en Algérie, une des principales essences fruitières. Le verger oléicole occupe 200 000 ha soit 45% de la surface arboricole nationale à peine 2,3% de la superficie agricole utile totale et produit près de 20.103 tonnes d'huile par an (Sahli, 2009).

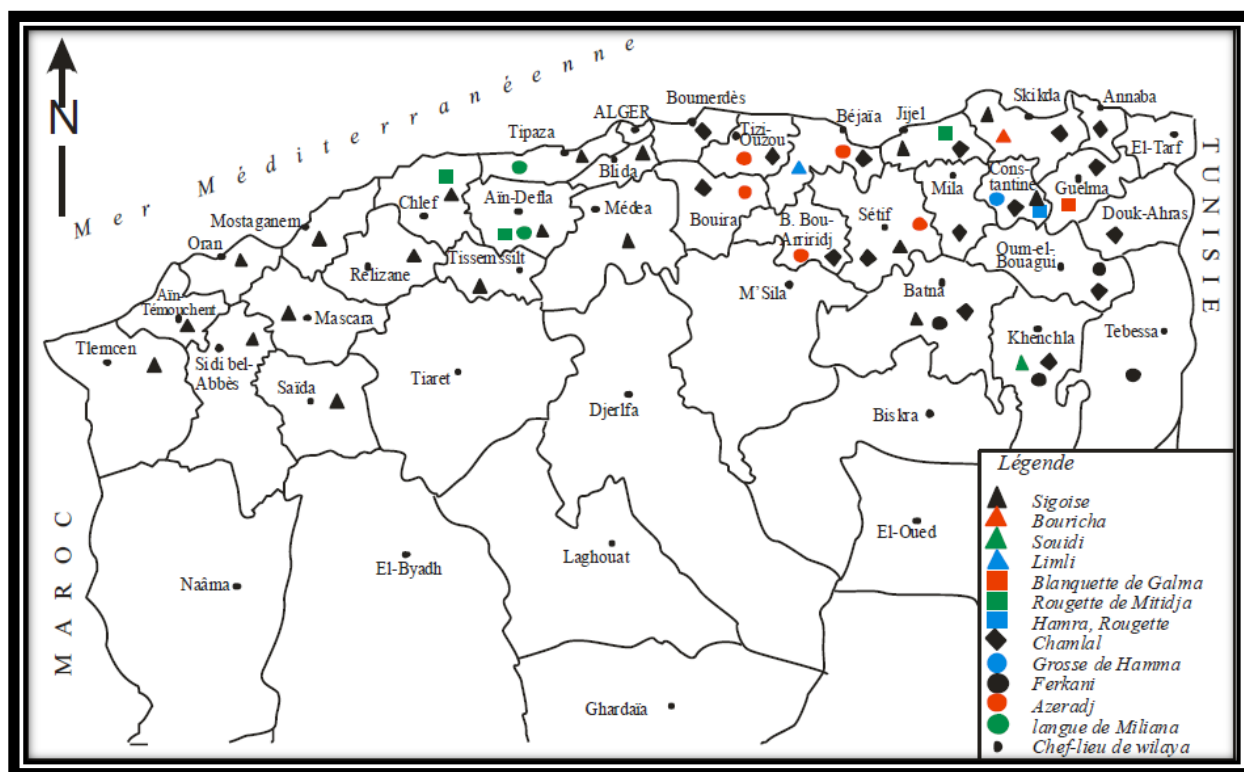
Le potentiel oléicole est concentré dans les régions montagneuses (Sahli, 2009). La Kabylie occupe à elle-même 54,3% de la superficie oléicole nationale dans le centre Nord (Istambouli, 1976 ; Mazliak, 1982 ; Hamlat, 1995), le reste est distribué dans l'est (28,3 %) et l'Ouest (17 %) (Yakoub-Bougdal et *al.*, 2007).

Le profil variétal est constitué essentiellement de deux variétés très répandues (les plus dominantes) Chemlal et Sigoise. Cette faible diversité variétale contraste avec celle des milieux de production. Il existe des variétés populaires « Aberkane », « Aidel », « Bouchouk », « Agraraz », « Aime », « Azeradj », « Bouchouk », « Rugette », «



« Blanquette », « Hamma », et « Limli » (Sahli, 2009) très rustiques et très adaptées aux conditions pédoclimatiques de leur milieu d'implantation mais qui ne sont pas multipliées (Fig 3).

L'Algérie dispose d'un patrimoine constitué de 164 cultivars autochtones et introduits de toute la méditerranée et même d'autre atlantique. Les travaux de caractérisation entamés par Amirouche et Ouksili (in Mendil et sebai, 2006), ensuite par Mendil et sebai (2006) ont permis de répertorier 72 variétés autochtones dont 36 sont homologuées, le reste est en court de réalisation. Les variétés nationales les mieux connus sont recommandés dans les régions d'origine.



**Figure 3** : Les différentes variétés d'olivier produites en Algérie (d'après Saad, 2009).

### I.7. Description de la variété Sigoise d'olivier :

La Sigoise (olive du Tell ou olive de Tlemcen) est originaire de la plaine de Sig, elle occupe 25% du verger oléicole algérien, elle est utilisée pour la production de l'olive de table et de l'huile avec un rendement moyen de 18 à 22% (Mendil et Sebri, 2006).

C'est un arbre vigueur moyenne (fig 4), les feuilles sont longues, largeur moyenne, elliptiques lancéolées, peu d'inflorescences de longueur moyenne. Le fruit est ovoïde,



légèrement asymétrique, à sommet pointu, et à base tronquée de couleur noire en pleine maturation, l'endocarpe est elliptique sommet pointu avec mucron son extrémité et à base arrondie (Mendil et Sebri, 2006).



**Figure 4 :** Aspect de l'olivier de la variété sigoise (ITAF Alger, 2015).

### **I.8. Description de la variété Chemlal :**

Le Chemlal est un olivier local à arbre retombant avec des feuilles Lancéolée une vigueur élevée. Sont entrée en production est bonne avec une floraison précoce sa maturation est tardive et sa production abondante. C'est une variété adaptée au milieu aride et productive (NFM, 2015). Cette variété a un noyau qui pèse 54% du poids de l'olive (Chevalier, 1948).



**Figure 5** : Aspect de l'olivier de la variété Chemlal (ITAF Alger, 2015).

Durant les 25 dernières années la culture des tissus végétaux s'est développée, offrant un ensemble d'outils technologiques au service de la production végétale. Ces techniques (micropropagation) s'utilisent aujourd'hui par exemple pour la propagation par clonage des meilleurs individus, l'obtention de plantes indemnes de virus et de maladies, l'amélioration génétique par culture d'anthers et fusion de protoplastes, ou encore la conservation de ressources phylogénétiques (Rosell et Villalobos, 1992).

Ces technologies offriront pour les générations futures une importante alternative aux besoins soutenus de production agricole. Lorsque des variétés améliorées de bon indice sanitaire parviendront effectivement aux producteurs de tous niveaux, on aura contribué positivement à résoudre les problèmes alimentaires d'une population en augmentation constante (Rosell et Villalobos, 1992).

### II.1. Définition de la culture *in vitro* :

La culture *in vitro* est basée sur la mise en culture d'explant en milieu artificiel contrôlé, à l'abri de toutes contaminations. Le but de la culture *in vitro* est de permettre la régénération de la plante entière autonome et fertile à partir de la propriété des cellules végétales : la totipotence. Les techniques de culture *in vitro* sont des outils qui permettent d'améliorer les plantes mais aussi d'assainir les variétés ou bien de réduire les coûts de productions. Cependant bien d'autres applications sont possibles (Girard et Noiville, 2014).

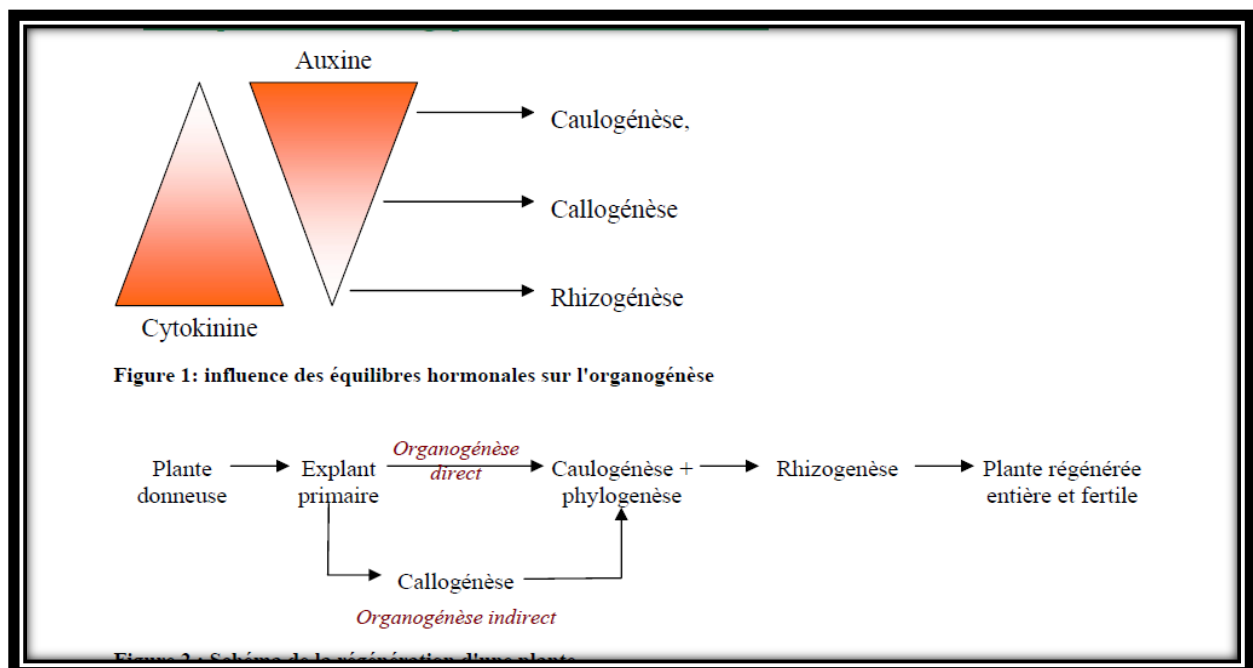


Figure 6: principe de la régénération de plantes

## II.2. Définition de La totipotence :

C'est l'habilité d'une cellule à se différencier puis après de se développer en un nouvel organisme à part.

Toute cellule végétale vivante, quelque soit sa « spécialisation », du moment qu'elle est vivante et possède un noyau, est capable de reproduire la plante entière d'où elle provient.

C'est à cette remarquable capacité de la cellule végétale que la culture *in vitro* doit toute son extension, et, peut –on dire, son pouvoir. A cause de cela, tout individu du règne végétal peut ou pourra être cultivé *in vitro* ; il n'ya pas d'exception. Cependant cela ne veut pas dire que le développement actuel des milieux de cultures, et les connaissances que l'on peut avoir du comportement de différentes espèces sur ces milieux de culture, permettent de réaliser immédiatement et sans problème la culture *in vitro* de toutes les plantes existant sur la terre (Augé et *al.*, 1989).

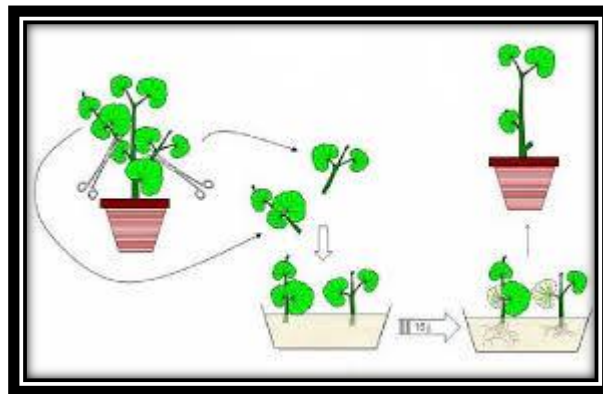


Figure 7: schéma explicatif de la totipotence végétale.

## II.3. Principes fondamentaux de la culture *in vitro* :

La culture *in vitro*, qui permet en particulier le sauvetage d'embryons, l'accélération des générations et la reproduction à l'identique d'un génotype (micro-propagation) (Gallais, 2013). Et selon Bergman, 1960, Les principes fondamentaux de la culture des tissus végétaux sont :

- 1- isolement de fragments de tissus ou organes d'une plante complète (explants) et
- 2- fourniture d'un milieu ambiant approprié permettant aux explants d'exprimer leur capacité de morphogenèse.

### II.4. Historique de la culture *in vitro* :

En 1878, il y a donc plus de 120 ans. Cl Bernnard formulait les principes théoriques de la création d'un système artificiel dans lequel les organes pourraient survivre hors de l'influence de l'organisme entier. Depuis cette orientation de recherche lentement d'abord, d'une manière plus rapide ensuite, a permis de grands développements à la biologie (Nozron et Bancihon. 1972);

La culture indéfinie des tissus des végétaux à été réalisée il y a 70 ans, c'est en effet au printemps 1937 qui fut isolée la première souche tissulaire dans l'activité c'est maintenue jusqu'à présent grâce à des repiquages réguliers;

Dés, 1941, on savait obtenir des plantes entières à partir de petits fragments d'organes ou colonies tissulaires ; leur enracinement ne posait aucun problème grâce aux auxines rhizogènes dont le maniement était connu depuis assez longtemps (Margara ,1989).

En 1944, Buvat par les techniques de culture de tissus met en évidence le phénomène de dédifférenciation : la juvénalisation ;

En 1949, Limasset et Cornuet notent l'absence de Virus dans les méristèmes de tabacs viroses ;

En 1955, la découverte de la kénétine, substance douée d'une puissante activité caulogène, puis d'autres cytokinines ont permis de provoquer presque à volonté la néoformation de bourgeons adventifs ;

Cette multiplication végétative *in vitro* fut enfin facilitée par la mise au point à partir de 1962 de solutions minérales particulièrement appropriées (Margara, 1989).

En 1966, Guha et Maheswari en Inde obtenaient des plantes haploïdes de *Datura innoxia* M.LL à partir de culture d'anthères ;

En 1971, au Japon, Takebe et Col régénéraient des plantes entières de *Nicotina tabacum* à partir de protoplaste (bergman, 1960).

### II.5. Les catégories de la culture *in vitro* :

#### ► La catégorie de la culture *in vitro* Conforme :

Il s'agit d'un mode de multiplication conduisant à des individus pourvus de même stock d'information héréditaire que la plante d'ont ils sont issus (Nozoron et Benalhon, 1972). Selon Rousselle *et al* .,(1996) la culture de méristèmes depuis les travaux de Morel et Mortin en 1950, a permis de guérir les plantes atteintes de virus .La micropropagation *in vitro* est plus ou moins utilisée dans la production de plantes conformes pour les premières générations de



multiplication. Et selon LÊ,(2001) pour produire des plantes génétiquement modifiées, la régénération doit donner des plantes conformes.

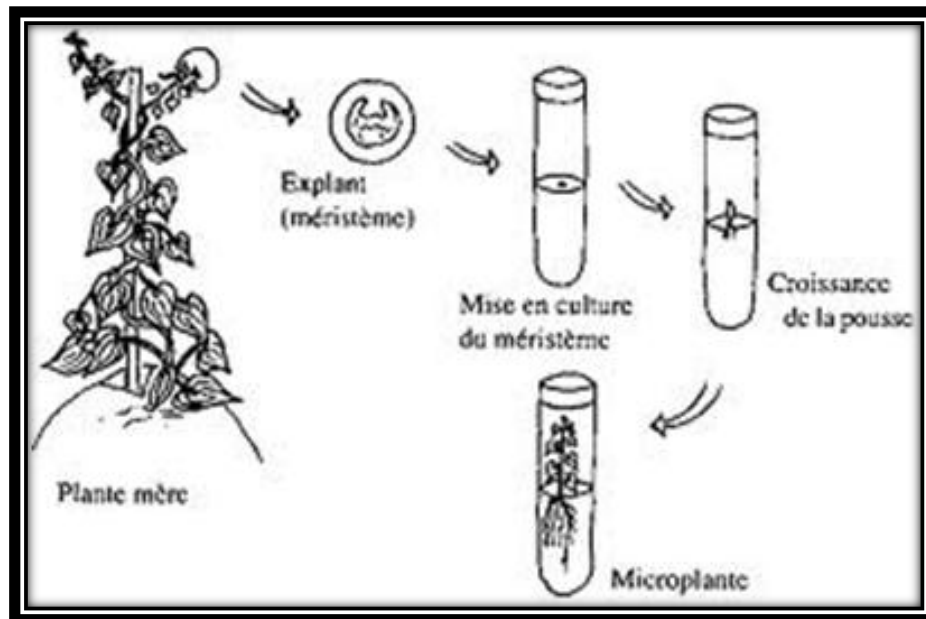
### ► La catégorie de la culture *in vitro* Non conforme :

D'après Nowbuth *et al .*, (2005) on appelle variation somaclonale des modifications du phénotype des plantes qui apparaissent le plus souvent lors de la régénération de nouvelles plantules à partir de tissus déjà différenciés. De très nombreux travaux ont porté sur la variation somaclonale et sont d'un éventuel intérêt pour la création variétal, le problème rencontré est souvent celui du crible puisque l'apparition d'un caractère utile est un événement rare et que l'on constate souvent l'apparition de caractères défavorables. Cette méthode peut être intéressante pour des caractères tel que la résistance aux parasites s'il est possible de faire un tri *in vitro*, mais seule des résultats préliminaires ont été obtenus (Bajaj, 1987).

## II.6. Les méthodes d'application de la culture *in vitro* :

### II.6.1. La culture de méristème :

Dès 1952, George Morel de INRA de Versailles réussit à obtenir une plante entière à partir d'un méristème (Ochett *et al .*, 2005), et selon Téoulé, (1993) chez une plante virosée la répartition du virus semble très variée selon l'organe, le méristème en particulier est une structure très protégée et est généralement indemne de virus. Le méristème est un petit organe composé de cellules méristématiques à division rapide ; il constitue le matériel idéal de départ étant donné que le méristème se développe d'une manière génétiquement stable et réduit le niveau d'infection virale (Espinosa *et al.*, 1992). Cette technique est donc utilisée pour obtenir des plantes saines à partir des plantes virosées (Auge, 1992).



**Figure 8** : schéma explicatif de la culture de méristème.

### II.6.2. La micro propagation :

Les plantes se multiplient par semis ou par multiplication végétative, ce dernier est indispensable quand on veut conserver les caractères d'une variété donnée. La micropropagation *in vitro* apporte un progrès considérable par rapport aux méthodes traditionnelles avec un taux de multiplication de 100 à 1000 fois plus élevé (Ochatte et *al.*, 2005). La micropropagation consiste en une prolifération des bourgeons axillaires préexistants sur l'explant mère. Ceci offre une bonne garantie de conformité génétique et une bonne stabilité des caractères au cours de repiquages successifs (Zhyd , 1988). L'application de la technique de la micropropagation des plantes ligneuses, fruitières forestières, permet l'amélioration de leurs capacités d'enracinement notamment sur le porte greffe reconnue difficile (LÊ et *al.*, 2005). Cette technique permet la multiplication végétative de plusieurs plantes alimentaires, médicinales, horticoles, agroforestières,..... (Bretaudeau, 2006).

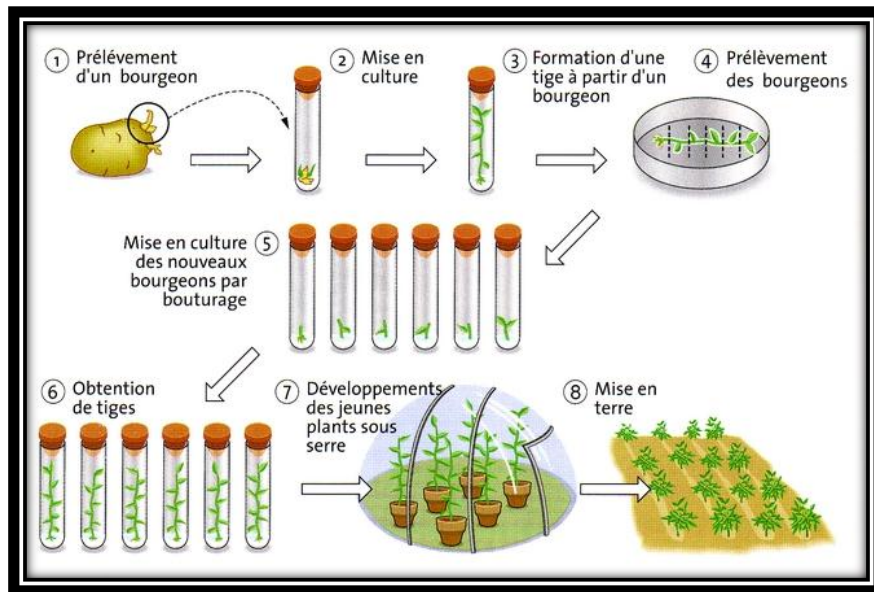


Figure 9 : Schéma explicatif de la micropropagation in vitro.

### II.6.3. L'embryogenèse Somatique :

Un apport important de la technique de culture in vitro à la biologie a montré que des cellules somatiques pouvaient produire des structures comparables à des embryons méritant l'appellation d'embryons somatiques (Margara ,1989 ; Boccon R Gibod et Jalouzot ,1989 ; Gray *et al* .,1995). Une revue fait mention d'une vingtaine d'espèces ligneuses capables de révéler une potentialité embryogène souvent décelée à partir d'embryons zygotique (Williams et Maheshwarm, 1986).

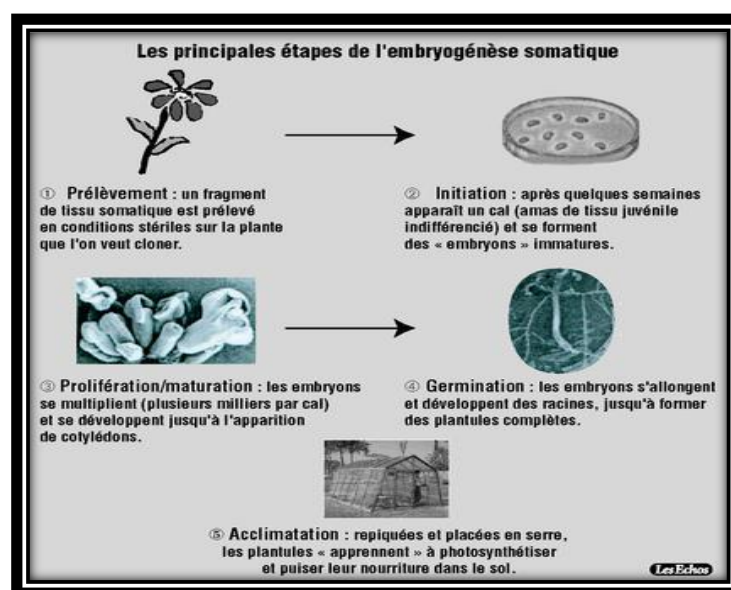


Figure 10 : schéma explicatif de l'embryogénèse somatique.



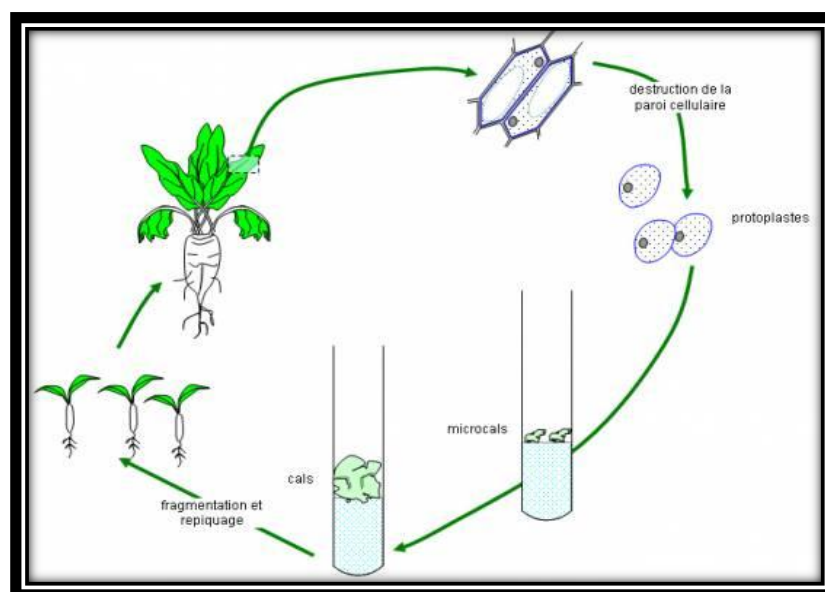
### Les potentialités de l'embryogénèse somatique :

L'aptitude de la cellule végétale somatique à se développer, sous certaines conditions, en embryon est connue depuis longtemps (Steward *et al.*, 1958), mais c'est surtout dans les années 1980 que son exploitation a vraiment débuté pour la multiplication des génotypes.

En effet, une technologie s'est développée autour du concept de « semence artificielle ». Le principe de cette technique est de produire, généralement en milieu liquide, des embryons somatiques synchrones en grandes quantités, de les stabiliser à un stade déterminé afin qu'ils puissent supporter des durées de stockage compatibles avec une utilisation en agriculture à grande échelle. Bien que cette méthode de production ait suscité de grands espoirs, elle n'est employée pour la multiplication de masse que chez certaines espèces où ce processus est efficace et bien contrôlé (Ricroch *et al.*, 2011).

### II.6.4. La culture de protoplaste:

Ces cellules végétales dépourvues de paroi peuvent être obtenues soit à partir d'organes de plantes, soit à partir de suspensions cellulaires (Robert *et al.*, 1998). 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 (Karp *et al.*, 1982). La technique de culture de protoplaste est très fortement inductrice de variabilité porte souvent sur le nombre chromosomique; cela a été montré chez la pomme de terre (Sheparid, 1982 ; Karp *et al.*, 1982).



**Figure 11** : schéma explicatif de la culture de protoplastes *in vitro*.

### II.7. Les avantages de la culture *in vitro* :

Par rapport aux méthodes conventionnelles de multiplication, la technique de la culture *in vitro* présente les avantages suivants:

- ▶ La possibilité de conservation de ressources végétales et faire une banque de géotypes et réaliser ainsi des plantation hors la période de croissance (LÊ et *al.*, 2002);
- ▶ L'amélioration des conditions sanitaires par les techniques de cultures *in vitro* souvent associées à l'éradication des viroses (Sibi, 1981);
- ▶ La propagation végétative des espèces qui ne présentent pas ces capacités en conditions classiques (Sibi, 1981);
- ▶ La multiplication rapide, cette dernière et due à l'augmentation de diffusion cellulaire par ces techniques (Smith *et al.*, 1985 ; Collet et LÊ, 1988);
- ▶ La facilité de leur transport d'une région à l'autre ou d'un pays à l'autre;
- ▶ Sauvetage d'espèces en voie de disparition ou d'extinction ;
- ▶ Multiplication des géotypes d'élite difficiles à multiplier par bouturage ou par greffage.

### II.8. Les inconvénients :

Parmi les inconvénients de la culture *in vitro*, nous pouvons citer les points suivants :

- ▶ Le problème de contamination et selon Casselle, (1987) il est dû à deux causes : Le premier c'est l'explant et le deuxième c'est la technique;
- ▶ L'exigence de main d'œuvre qualifiée.
- ▶ La disponibilité de fleurs fermées que pendant une durée restreinte durant l'année.
- ▶ La conservation de fleurs est de quelques jours seulement.
- ▶ Cout de revient plus élevé que celui d'un plant multiplié par des méthodes traditionnelles, bien que les prix soient plus tard amortis.

### II.9. Les conditions de culture *in vitro* :

La réussite de la culture de tissus végétaux dépend de la composition chimique des milieux de culture utilisés ainsi que d'autres facteurs ambiants.

### ► La lumière et la photopériode :

La lumière est un facteur déterminant pour la culture in vitro des plantes, elle a une grande influence de part la durée d'exposition (photopériode), selon Hussey et al .,(1981) d'autre part la longueur de jour qui affecte la vigueur et le développement des proliférations et la croissance des cals, cette dernière pourrait aussi contribuer à la formation des cals (Briggs ,1964), de façon général le début de croissance nécessite une faible intensité lumineuse (500 à 1000 lux) avec 12 à 16 heures de photopériodes (Bommeneni et jauhar , 2003 ). Lorsqu'il s'agit de préparer la plantule au repotage en serre, il apparaît souvent préférable d'augmenter l'intensité de l'éclairage (par exemple 10000 lux) (Margara ,1989).

### ► La température :

La température de beaucoup de chambres à culture est constante de l'ordre de 22° à 25° C (Margara ,1989) mais selon Walali, (1993) pour l'olivier (27° à 28° C) est la température optimale.

### ► Le support de milieux de culture :

On sait que pour une bonne croissance, les plantes ont besoin d'importantes quantités de macroéléments comme l'azote, le potassium, le calcium, le phosphore, le magnésium, zinc, bore, cuivre, molybdène et cobalt. Le milieu de culture doit contenir tous ces éléments ainsi que des hydrates de carbone (généralement du saccharose) qui viennent remplacer le carbone que la plante absorbe de l'atmosphère lorsqu'elle réalise la photosynthèse. On sait également que pour obtenir de meilleurs résultats, il faut ajouter au milieu de petites quantités de composés organiques dont des vitamines, des acides aminés et des régulateurs de croissance.

En règle générale les milieux de culture sont composés des constituants suivants ;

### **II.9.1. Sels inorganiques :**

#### **II.9.1.1. Macroéléments :**

Selon (Hill, 1985) ;

Les tissus en culture ont besoin d'une source constante de composés inorganiques. Les éléments essentiels en plus du carbone, de l'hydrogène et de l'oxygène sont ; N, P, K, Ca, Mg, et S.

L'azote doit être présent en grande quantité et il se trouve dans le milieu sous forme de nitrate ou d'ion d'ammonium, ou comme combinaison des deux ions.

## Chapitre II : La culture in vitro et la régénération végétale

---

Le sulfate de magnésium ( $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ ) répond à la demande en magnésium et en soufre.

Le phosphore peut s'ajouter sous forme de  $NaH_2PO_4 \cdot H_2O$ . Ou  $KH_2PO_4$ .

Le potassium qui se trouve en grande quantité dans la nature ; c'est un cation que l'on additionne sous la forme  $KCl$ ,  $KNO_3$  ou  $KH_2PO_4$ .

Le calcium s'ajoute avec  $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ ,  $Ca(NO_3)_2 \cdot 4H_2O$  ou sous forme anhydre de n'importe quel sel.

Le sodium est un cation non nécessaire aux plantes supérieures mais cependant il peut être un élément essentiel pour la culture des plantes halophytes ou plantes C4.

Le chlore est présent sous forme de  $KCl$  ou  $CaCl_2$ .

### **II.9.1.2 Oligoéléments :**

Selon (Girard et Noiville, 2014) ;

Pour une activité métabolique appropriée, les cellules végétales ont besoin d'oligoéléments. Les plus essentiels sont Fe, Mn, Zn, Bo, Cu et Mo. Les cinq derniers sont fondamentaux pour la synthèse de la chlorophylle et le fonctionnement des chloroplastes.

Fe est nécessaire pour la formation des précurseurs de la chlorophylle.

Mn permet d'entretenir l'ultrastructure et le processus de photosynthèse (l'activité du photosystème II est proportionnelle à la teneur en Mn).

Cu et Zn sont utiles pour l'oxydation et l'hydrogénation en composés phénoliques.

Mo et Fe sont des constituants des enzymes nitratoréductase et nitrogénase.

Co est le métal composant des vitamines B12.

Bo est nécessaire pour entretenir l'activité des méristèmes, il participe à la synthèse des bases azotées et en particulier de l'uracile.

Divers oligoéléments sont liés à l'activité des régulateurs de croissance, par exemple :

Zn-auxines : Zn est lié à la synthèse de tryptophane, précurseur de l'AIA.

Bo : une déficience du bore inhibe la synthèse des cytokinines, mais augmentent les niveaux d'auxines.

Les agents chélates : les molécules de ces composés peuvent détenir un ion métallique sous plusieurs combinaisons chimiques formant un anneau complexe (un chélate). Exemple : EDTA (acide éthylène- dinitrotetra-acétique). De petite concentrations d'EDTA incitent la croissance et permettent que le fer soit disponible en petites quantités.

### II.9.2. Vitamines :

Selon St-Pierre (1988), elles sont nécessaires en petites quantités pour produire une série de réactions catalytiques dans le métabolisme. Les vitamines les plus employées sont :

La thiamine (vitamine B1) ; on l'ajoute sous forme de thiamine HCl en quantité comprise entre 0,1mg/l et 30mg/l. c'est en fait la seule vitamine essentielle à la croissance des cellules végétales.

L'acide nicotinique (niacine).

La pyridoxine (vitamine B6) ; on l'ajoute sous forme de pyridoxine-HCl.

Le méso-inositol ; ce n'est pas vraiment une vitamine mais un sucre-alcool. Il produit un effet stimulant sur la morphogénèse car il participe probablement à la biosynthèse de l'acide galacturonique.

L'acide panthoténique ; il aide à la croissance de certains tissus.

L'acide folique ; il diminue la prolifération des tissus dans l'obscurité, tandis qu'il l'augmente à la lumière car il est hydrolysé en acide P-amino-benzoïque en présence de lumière.

La riboflavine ; c'est un inhibiteur de la croissance de racine.

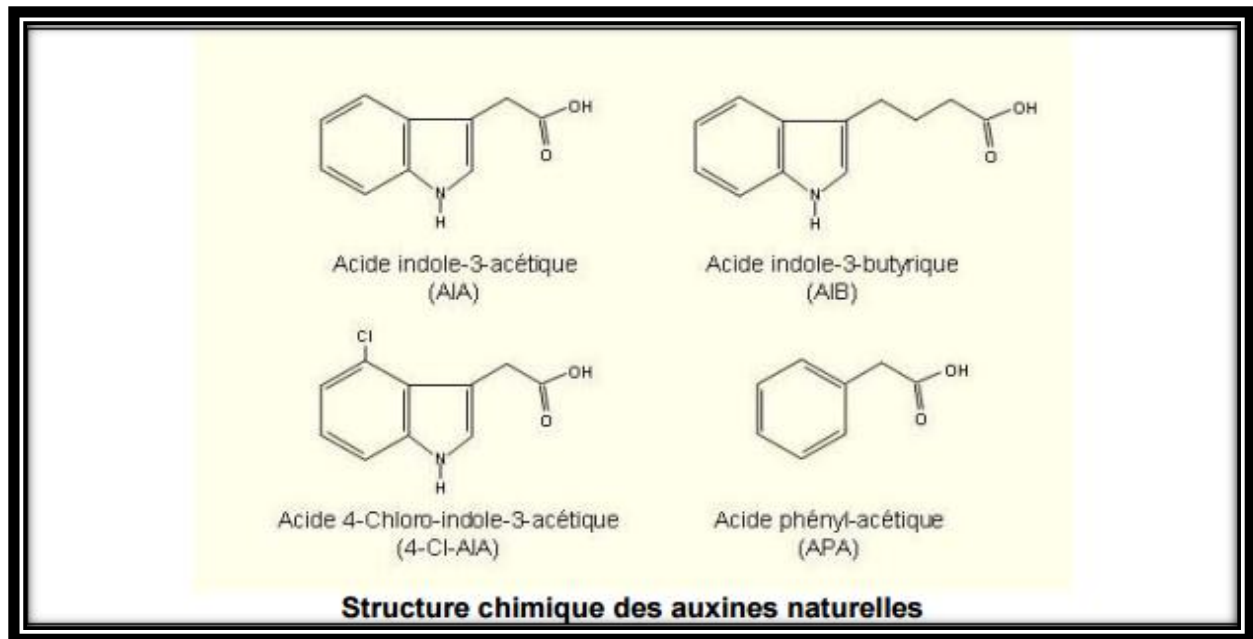
La vitamine E : elle aide à la formation des cals provenant d'embryons et elle contribue à la viabilité des cellules dans les cultures en suspension.

### II.9.3. Régulateurs de croissance :

Cinq types de régulateurs de croissance autrement appelés ; phytohormones :

#### II.9.3.1. Les auxines :

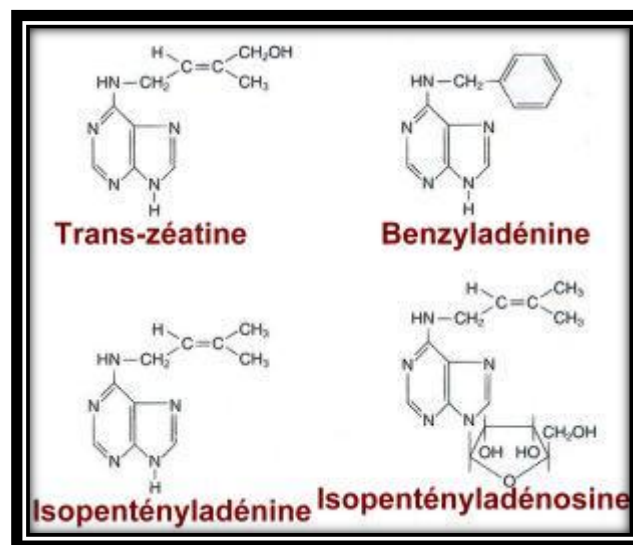
Les effets de l'auxine sont multiples et cette hormone agit sur les trois réponses cellulaires coordonnées qui sous-tendent l'ensemble des processus de croissance chez les plantes, à savoir la division, l'élongation et la différenciation. L'auxine est généralement considérée comme la phytohormone majeure dans le contrôle de la croissance et du développement. Il est toutefois important de noter que dans un grand nombre de cas l'auxine n'agit pas seule mais en combinaison ou en opposition avec d'autres hormones (Augé et *al.*, 1989).



**Figure 12** : schéma des structures chimiques des auxines (Encyclopédie Universelle, 2007).

### II.9.3.2. Les cytokinines :

Elles favorisent la division cellulaire et l'organisation des cals et le bourgeonnement adventif. Les plus utilisées sont la BA-benzyladénine, la kinétine et la zéatine, en concentration de 0,03 à 30 mg/l. La BA- est cependant la plus employée. La kinétine favorise la formation de pousses et de bourgeons adventifs (Hopkins, 2013).



**Figure 13** : Structure chimique de quelques cytokinines.

### ☑ La combinaison auxine-cytokinines :

Selon Hopkins (2013) ;

➤ De **fortes concentrations** en **cytokinines** alliées à de **faibles** concentrations en **auxines**, nous permettent d'obtenir le **développement** des bourgeons axillaires ou adventifs et ainsi de **multiplier** les plantes.

➤ De **fortes concentrations** en **auxines** alliées ou non à de **faibles** concentrations en **cytokinines**, nous permettent d'obtenir **l'enracinement** des tiges feuillées.

➤ Si on **équilibre** les **concentrations** de ces deux hormones, on obtient un **cal**. Le cal est le résultat de la **prolifération anarchique** de cellules plus ou moins différenciées mais qui n'arrivent plus à s'organiser en tissus et organes distincts.

### II.9.3.3. L'acide gibberellique :

Il favorise l'élongation et empêche la formation de pousses sur tous les tissus organisés (Hopkins, 2013).

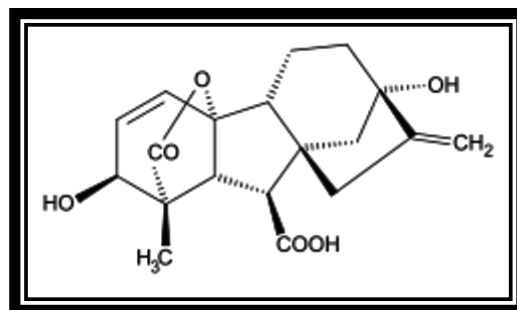


Figure 14 : Structure chimique de l'acide gibberellique.

### II.9.3.4. L'acide abscissique :

On l'utilise dans des cas très particuliers ; il favorise la synchronisation durant l'embryogenèse de certaines cultures ; il inhibe aussi la croissance (Hopkins, 2013) .

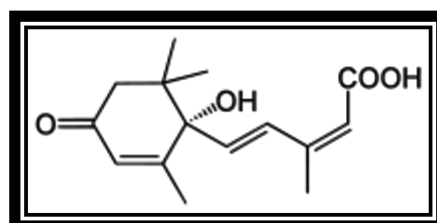


Figure 15 : Structure chimique de l'acide abscissique.

### II.9.3.5. L'éthylène :

L'éthylène peut être considéré comme une hormone mixte avec des effets positifs : initiation de la floraison, et des effets négatifs sur le développement : inhibition de la croissance, abscission, sénescence.

Elle exerce une influence sur toutes les phases du développement de la germination à la sénescence souvent en interaction avec d'autres hormones (Hopkins, 2013).

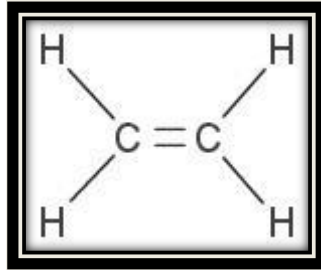


Figure 16 : Structure chimique de l'éthylène.

### II.9.4. Acides aminés :

Aucun acide aminé n'est essentiel à la croissance des tissus *in vitro*, même si plusieurs sont utilisés dans les expérimentations. Ces acides aminés procurent aux tissus une source immédiate d'azote à assimilation plus rapide qu'avec l'azote inorganique fourni par le milieu. Par ailleurs les acides aminés peuvent intervenir en tant qu'agents chélates.

Les principaux acides aminés dans les systèmes *in vitro* ont les fonctions suivantes : la glutamine et l'asparagine transportent l'azote ; la L-arginine stimule les racines ; la L-sérine est employée dans la culture de microspores et la L-cistéine est un agent réducteur (Gallais, 2013).

### II.9.5. Hydrates de carbone :

Ils sont utilisés comme source d'énergie et comme régulateurs osmotiques. La saccharose est le sucre employé universellement viennent ensuite par ordre d'importance le glucose, le maltose, le raffinose, le fructose et le galactose, le manose et le lactose. La concentration employée pour le saccharose est de 20 à 45g/l (Augé et *al.*, 1989).



### II.9.6. Eau :

Nous nous contentons ici de remarquer qu'il convient d'employer pour la préparation des solutions de l'eau bidistillée, tridistillée ou déminéralisée, et que dans tous les cas la distillation finale doit être faite avec un distillateur en verre (Augé et *al.*, 1989).

### II.9.7. Agent solidifiant :

Selon Girard et Noiville (2014), c'est l'agar que l'on emploie communément comme support gélosé pour la préparation des milieux solides et semi-solides. Les avantages de l'agar sont :

- L'agar forme avec l'eau un gel qui fond à 100 °C et se solidifie à 45 °C. Ceci veut dire que ce gel est stable quelques soient les températures d'incubation.
- L'agar n'est pas altéré par les enzymes végétales.
- L'agar ne réagit pas avec les constituants du milieu.
- L'agar n'interfère pas avec la mobilisation des constituants du milieu.

D'autres composants ont été testés pour remplacer l'agar, mais sans réel succès. Le plus connu est peut-être le « Geltrice ». Etant donné le cout élevé de l'agar, les recherches pour trouver d'autres composants « supports » restent à l'ordre du jour.

### II.9.8. Autres additifs :

Selon Girard et Noiville (2014), On utilise aussi d'autres additifs tels que ;

- L'extrait de levure
- Le jus et les extraits de divers fruits (banane, tomate et lait de coco)
- La caséine hydrolysée (protéines)
- Les anti-oxydants comme l'acide ascorbique
- Les absorbants comme le charbon activé.

**Lieu de l'expérimentation :**

Notre travail a été réalisé au sein du laboratoire central d'amélioration des plantes de l'Institut Technique d'Arboriculture Fruitière et de la Vigne (ITAFV), à Tessala El-Merdja Alger (fig 17), durant la période Mars– septembre 2015.



**Figure 17 :** laboratoire central de l'Institut Technique de l'Arboriculture Fruitière à Tessala El Merdja –Alger-

**Et cela afin de :**

- Régénérer deux variétés d'olivier *Olea europea*.L : Chemlal et Sigoise, par la culture in vitro, en utilisant la technique de l'embryogenèse somatique.
- Rechercher une meilleure méthode de désinfection des explants des deux variétés étudiées.
- Rechercher des milieux de culture favorables pour la callogenèse chez les deux variétés étudiées.

## I.1. Matériel :

### I.1.1. Origine du matériel végétal :

Durant la période allant de fin mars jusqu'au début d'avril 2015, les boutons floraux de deux variétés d'olivier (Chemlal, et sigoise) appartenant à l'espèce *Olea europea*, ont été collectés à partir des verges de la collection nationale d'olivier, relevant de l'Institut Technique de l'Arboriculture Fruitière et de la Vigne (ITAFV) à Tessala El Merdja Alger. ( fig 18).



Figure 18 : Les boutons floraux de l'olivier *Olea europea*.L (variété sigoise)

-photo originale-

## I.2. Méthodes:

### I.2.1. Préparation des milieux de cultures :

#### I.2.1.1. Les solutions mères :

Pour chaque produit entrant dans la composition du milieu nous avons utilisés des solutions concentrées (solutions mères) de ces produits que nous diluons de manière adéquate.

La composition des solutions mères est expliquée dans le Tableau VI (annexe I).

### **I.2.1.2. Les milieux de cultures :**

33 types de milieux de cultures ont été préparés pour la mise en culture des fleurs, le milieu (témoin) sans hormone, et 32 milieux avec différents doses d'hormones (voir annexe), pour l'induction de l'embryogenèse somatique.

Le milieu MS décrit par MURASHIGE et SKOOG en 1962, est enrichi par des vitamines (2ml/l), saccharose (30g/l) source de carbone, (7g/l) d'Agar pour solidifier le milieu, sans ou avec une ou deux hormones de croissance, (ANA, Zéatine, NOA, ou le 2-4 D, selon le traitement étudié).

Le pH des milieux est ajusté à 5,7 – 5,8 avant leurs stérilisations par l'autoclave à une température de 120°C pendant 20 min et sous une pression de 2 bars. Par la suite, les milieux sont écoulés dans des boîtes de Pétri (90 mm) à raison de 20ml par boîte, ensuite scellé par du Parafilm et conservé au laboratoire à la température ambiante en attendant leur utilisation.

### **I.2.2. Techniques de stérilisation :**

La technique de la culture in vitro exige beaucoup de soin afin d'éviter tout type de contamination et pour le maintien des cultures en condition d'asepsie, mais il faut toujours se rappeler que les micro-organismes sont partout (spores de champignon, et bactéries), la stérilisation du milieu de culture a pour but d'éliminer ces micro-organismes.

Le maintien des cultures en conditions aseptiques sous-entend la stérilisation des milieux de cultures, d'instruments de manipulation et de dissection :

#### **I.2.2.1. Stérilisation du matériel de laboratoire :**

Toutes les manipulations se font sous hotte à flux d'air laminaire stérilisé en tenant compte de certaines précautions :

- Nettoyage de la hotte à l'alcool 70°C avant et après chaque manipulation.
- Allumage de la lampe à UV 20 à 30 min avant chaque manipulation.

- Les instruments (les pinces, scalpels, bistouris) et toute verrerie sont préalablement stérilisés dans l'étuve à 240 °C pendant quatre heures.
- Les instruments sont trempés dans de l'alcool 70°C puis flambés et placés sur leur portoir stérilisé après chaque usage.

Nous avons pris en compte toutes ces considérations car la première condition pour la réussite d'une culture *in vitro* est l'asepsie.

### **I.2.2.2. Stérilisation des milieux de cultures :**

Les milieux utilisés dans cette étude sont stérilisés à l'autoclave à 120 °C, sous une pression de 1 bar pendant 20 minutes, après ajustement du pH dont la valeur est de 5,7 à 5,8, soit avec NaOH ou avec HCL, selon le milieu, acide ou basique.

### **I.2.3. Préparation de l'explant :**

#### **I.2.3.1. Désinfection du matériel végétal :**

Les fleurs utilisées pour l'embryogenèse somatique ont été collectées avant la fécondation des fleurs pour éviter l'introduction des gènes étrangères, et avant l'anthèse afin d'éviter l'introduction des solutions stérilisantes à l'intérieur durant l'étape de stérilisation. Une partie des fleurs a été utilisée directement par la culture *in vitro*, l'autre partie a été conservée à 4°C dans des sachets fermés pour une période de 5 à 7 jours en attendant leurs utilisations.



**Figure 19 : les fleurs fermées de la variété Chemlal.**

Il y a lieu de souligner que pour désinfecter le matériel végétal, on utilise généralement de l'hypochlorite de sodium ou de calcium.

Pour notre matériel nous avons utilisés de l'hypochlorite de sodium.

### **I.2.3.1.1. La désinfection à l'hypochlorite de sodium à 20% :**

#### **a. Préparation de la solution d'hypochlorite de sodium à 20 % :**

Nous avons mis en solution 10 ml d'hypochlorite de sodium ajusté à 50 ml d'eau distillée, et deux gouttes de Tween 20 qui est un détergent.

#### **➤ Désinfection des fleurs :**

Nous avons effectués trois essais, en changeant à chaque fois, la durée de trempage des fleurs dans l'alcool 70°, et la solution d'hypochlorite de sodium à 20% :

#### **❖ premier essai :**

-les boutons floraux (40 explants) sont stérilisés par immersion dans une solution d'alcool 70° pendant 2 min.

-Les fleurs sont ensuite traitées pendant 30 min avec une solution d'hypochlorite de sodium

-rinçages des fleurs à l'eau distillée stérilisée (5 rinçages, 3 min par rinçage)

-la stérilisation et les rinçages à l'eau distillée se font sous hotte à flux laminaire, et devant un bec benzène.

-à la fin de la stérilisation, les fleurs sont étalées pour séchages sur un papier buvard stérile.



**Figure 20 : La désinfection des fleurs à l'hypochlorite de sodium à 20%**

❖ **Deuxième essai :**

Nous avons procédé la même technique précédente, sauf que nous avons diminué cette fois ci, la durée de trempage des fleurs dans l'alcool 70° à 1 min, et dans l'hypochlorite de sodium à 20 min.

❖ **Troisième essai :**

Dans le troisième essai, nous avons diminué la durée de trempage des boutons floraux dans l'alcool 70°, à quelques secondes, et dans l'hypochlorite de sodium à 8 ou 10 min.

Le choix de la meilleure méthode de désinfection est déterminé à partir des paramètres suivants :

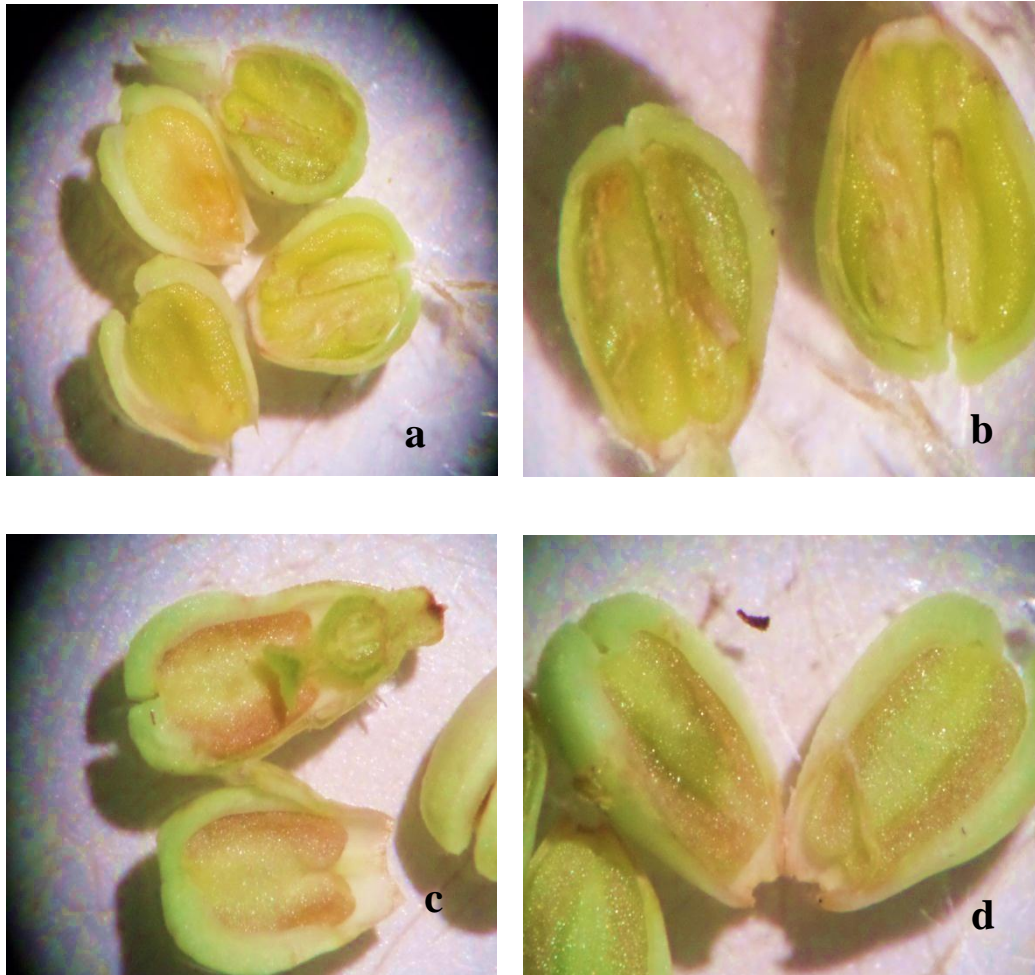
- Taux de contamination (TC).
- Taux de dessèchement (TD).
- Taux de reprise (TR).

### **I.2.3.2. Mise en culture des fleurs :**

Dans des conditions aseptiques et après stérilisation et séchage des boutons floraux, les fleurs sont mises en culture *in vitro* selon le procédé suivant :



- Les boutons floraux sont déposés sous loupe, les calices sont éliminés à l'aide d'une pince et un scalpel stériles.



**Figure 21 : des fleurs découpées des deux variétés d'olivier observées sous loupe :**

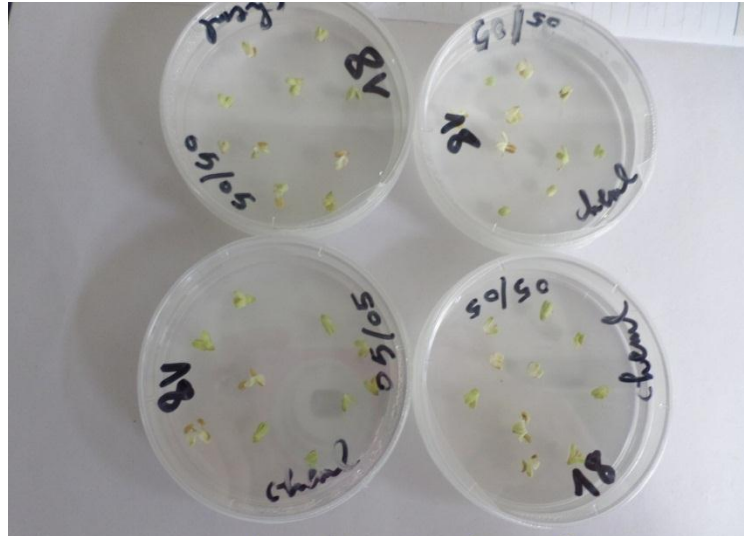
**a-c) G : 8x ; b-d) G : 10x**

**a-b) Variété Sigoise ; c-d) Variété Chemlal.**

- Les fleurs sont ensuite coupées longitudinalement, et mise en culture dans les boîtes de pétri, à raison de dix explants par boîte (avec quatre



répétition) ; la surface de la coupe doit être en contact avec le milieu de culture (fig 21).



**Figure 22 : La mise en culture des explants dans les boîtes de pétri.**

- Après la mise en culture, les boîtes de pétri sont scellées et placées dans la chambre de culture à une température maintenue entre 22 et 25 °C avec une photopériode de 16 h de lumière et 8 h d'obscurité.



**Figure 23 : Les boîtes de pétrie placés dans la chambre de culture****• Subculture :**

Périodiquement après 4 à 6 semaines de la culture initiale, des subcultures des cals sont effectuées dans des milieux de la même composition.

En cas d'obtention d'embryons, les cals embryogènes, ainsi que les embryons seront transférés sur des milieux sans hormone.

Le présent travail a pour but la régénération des plants d'olivier *Olea europea*.L via l'embryogenèse somatique à partir de la culture des fleurs fermés *in vitro*.

Les fleurs utilisées appartenant à deux variétés d'olivier à savoir chemlal et sigoise.

### II.1. Méthodes de désinfection :

Nous avons utilisés trois méthodes de désinfection, par l'hypochlorite de sodium à 20%, en modifiant la durée du trempage des fleurs dans l'alcool 70°et la solution d'hypochlorite de sodium.

Les fleurs des deux variétés étudiées ont été cultivées sur milieu MS (1962), où les cultures ont été déposées pour une période de 10 jours au niveau de la chambre de culture pour être isolées de tous facteurs externes.

#### II.1.1. Premier essai : première désinfection :

Nous avons testé la désinfection de 40 explants, à l'hypochlorite de sodium 20%, avec une durée de trempage de 30 min, et 2 min dans l'alcool 70°.

Nous avons obtenus les résultats suivants (Tableau I et Fig 24) :

**Tableau I : Résultats du premier essai de la désinfection des explants à l'hypochlorite de sodium 20% :**

Type de désinfection	Nbre d'explants total	Nbre d'explants contaminés	TC %	Nbre d'explants desséchés	TD%	Nbre d'explants repris	TR %
Hypochlorite de sodium (20%)	40	20	50	17	42.5	3	7.5

#### Taux de contamination :

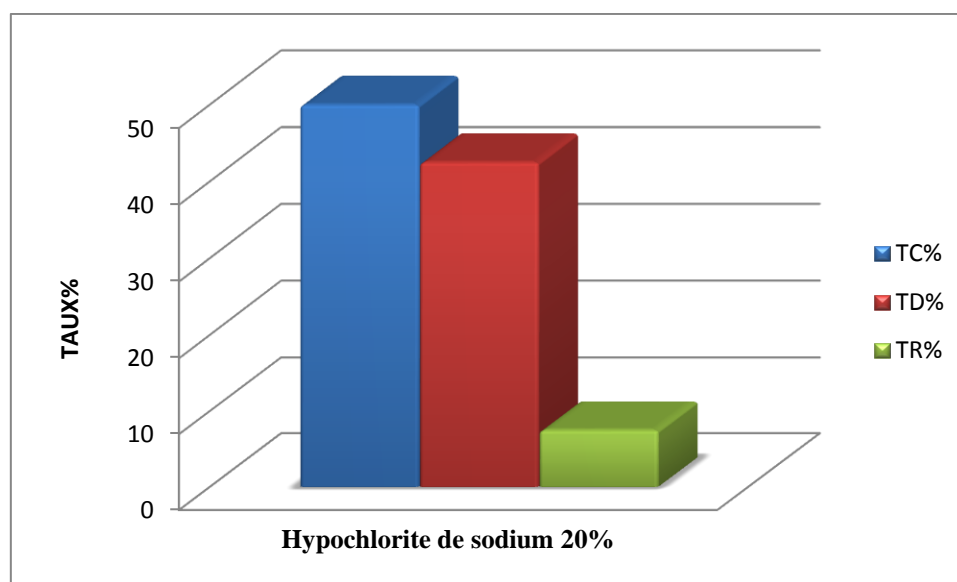
Selon le tableau I, nous remarquons que parmi les 40 explants testés, 20 se sont contaminés, donc un taux de contamination élevé atteignant les 50%.

Nous pouvons expliquer ce taux de contamination par le fait que les boutons floraux utilisés renferment beaucoup de germes (bactéries et champignons) malgré la désinfection.

### Taux de dessèchement :

Dans la première désinfection, le taux de dessèchement des explants est très élevé, atteignant les 42.5%.

Le dessèchement peut s'expliquer par le fait que l'hypochlorite de sodium et l'alcool pénètrent facilement dans les tissus végétaux, surtout celles des boutons floraux ; sachant que la durée de trempage de ces derniers dans la solution d'hypochlorite de sodium et de l'alcool est longue.



**Figure 24 : Résultats du premier essai de désinfection à l'hypochlorite de sodium 20%.**

### II.1.2. Deuxième essai : deuxième désinfection :

Le taux de contamination et le taux de dessèchement étant élevés lors de la précédente méthode de désinfection, donc cette fois ci, nous avons diminués la durée de trempage des fleurs dans la solution d'hypochlorite de sodium 20% à 20 min, et dans l'alcool 70° à 1 min.

**Tableau II : Résultats du deuxième essai de la désinfection des explants à l'hypochlorite de sodium 20% :**

Type de désinfection	Nbre d'explants total	Nbre d'explants contaminés	TC %	Nbre d'explants desséchés	TD%	Nbre d'explants repris	TR%
Hypochlorite de sodium (20%)	40	20	50	12	30	8	20

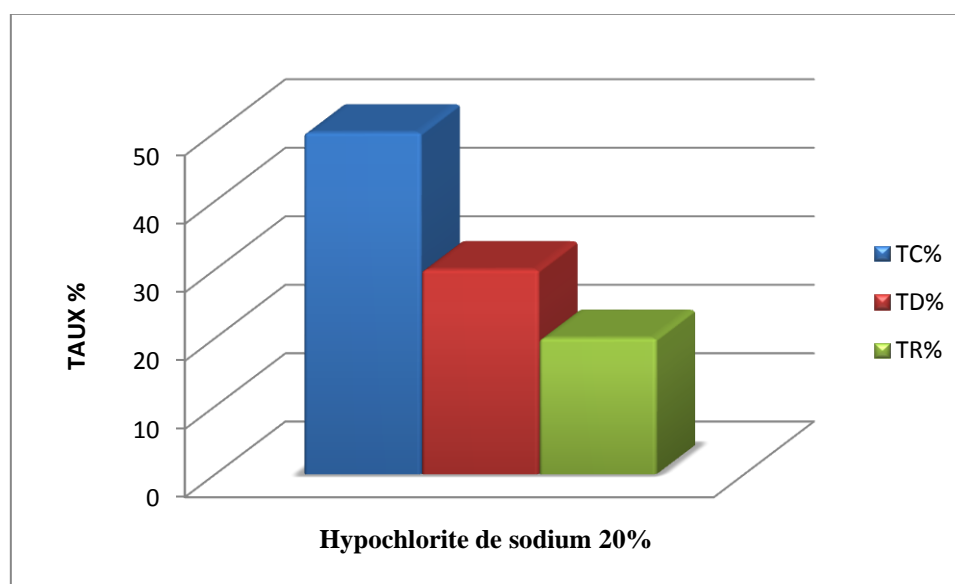
**Taux de contamination :**

Le taux de contamination est le même pour le 2ème essai

**Taux de dessèchement :**

Lorsqu'on a diminué la durée de trempage des fleurs dans l'hypochlorite de Sodium et de l'alcool 70°, le taux de dessèchement a bien diminué pour les explants du présent essai (30%) par rapport à l'essai précédent (42.5%) (Tableau II et Fig 25).

Cette diminution peut être expliquée par la durée de trempage dans l'alcool 70° et la solution d'hypochlorite de sodium ; lorsque ces derniers sont considérés comme étant des produits qui pénètrent les tissus.



**Figure 25 : Résultats du deuxième essai de désinfection à l'hypochlorite de sodium 20%**

**II.1.3. Troisième essai : troisième désinfection :**

Les deux premiers essais de désinfection à l'hypochlorite de sodium à 20% n'ayant pas été efficaces, nous avons effectué un troisième essai, avec un passage rapide des explants dans l'alcool 70°, et un trempage dans la solution de l'hypochlorite de sodium pendant 8 à 10 min.

Les résultats sont mentionnés dans le Tableau III et la Figure 26 :

**Tableau III : Résultats du troisième essai de désinfection à l'hypochlorite de sodium 20%:**

Type de désinfection	Nbre d'explants total	Nbre d'explants contaminés	TC%	Nbre d'explants desséchés	TD%	Nbre d'explants repris	TR %
Hypochlorite de sodium (20%)	40	0	0	11	27.5	29	72.5

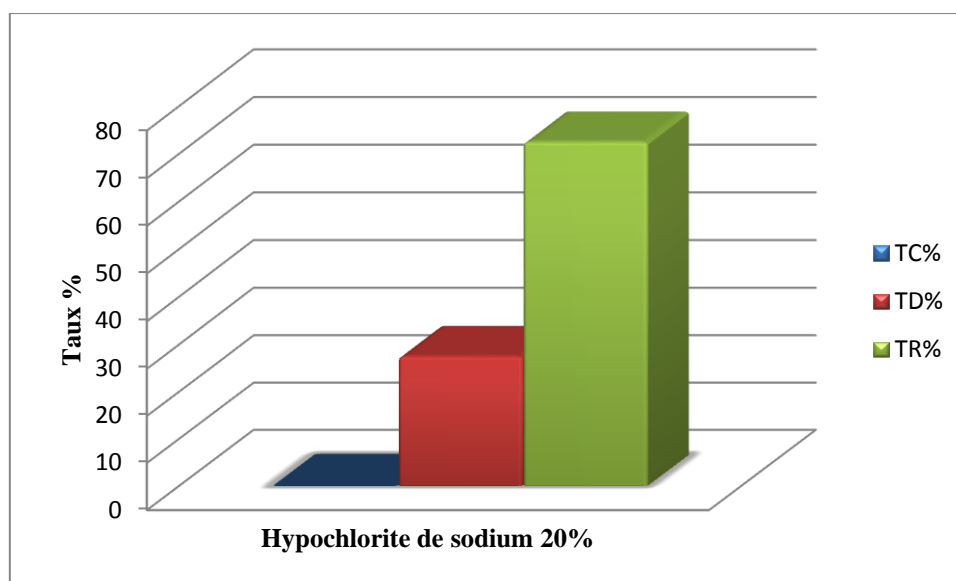
**Taux de contamination :**

Avec la désinfection des explants par l'hypochlorite de sodium en une durée de 8 à 10 min, et le passage rapide dans l'alcool 70°, nous avons constaté une diminution du taux de contamination à (0%) en comparaison au taux très élevé lors des deux essais précédents.

On suppose qu'une longue durée de trempage des explants dans la solution d'alcool 70° empêche la solution d'hypochlorite de sodium de bien désinfecter les tissus végétaux.

**Taux de dessèchement :**

Le taux de dessèchement a bien diminué dans le troisième essai avec 27,5 %, en comparant avec les taux très élevés du 2<sup>ème</sup> essai (30%), et du 1<sup>er</sup> essai (42,5%).



**Figure 26 : Résultats du troisième essai de désinfection à l'hypochlorite de sodium 20%**

Selon (Zryd., 1988), une bonne méthode de désinfection doit permettre un compromis entre les exigences d'une bonne stérilisation et une préservation de l'intégrité du tissu végétal.

Il s'est avéré que parmi les trois essais de désinfection testés, le troisième est la méthode la plus efficace pour la désinfection. Cette dernière nous a permis de diminuer le taux d'infection des explants, de même que le taux de dessèchement (Fig 27).

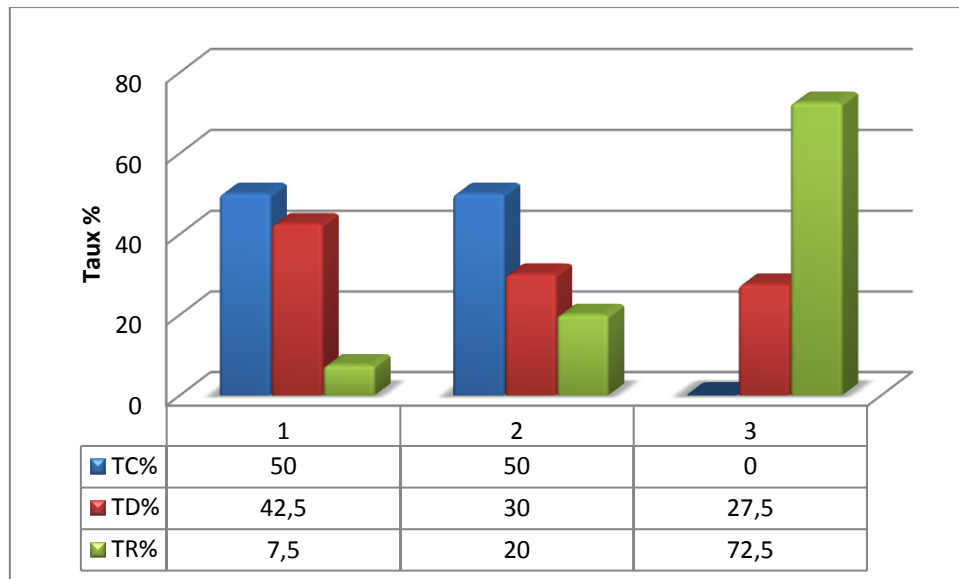


Figure 27 : Résultats des trois essais de désinfection



**II.2. L'aptitude à la callogenèse :**

Chez les deux variétés d'oliviers étudiés, la callogenèse s'est déclanchée 2 à 4 semaines après la mise en culture des explants.

Chez les deux variétés étudiées, tous les cals formés atteignent leur taille maximale 4 à 5 semaines après la culture initiale et présentent une structure friable de couleur blanchâtre ou verdâtre à la base de l'ovaire et à la surface de la section en contact avec le milieu de culture.

Le pourcentage d'explants callogènes ainsi que leur taille diffèrent selon les génotypes de la même espèce et selon le milieu de culture utilisé avec les différentes combinaisons d'hormones (Zéatine, 2-4 D, ANA et NOA).

Les différentes concentrations d'hormones sont utilisées afin de stimuler l'induction de l'embryogenèse somatique.

**II.2.1. L'aptitude à la callogenèse chez la variété Chemlal :****Tableau IV : Résultats de la callogenèse chez la variété chemlal :**

L'importance des cals : +++ :(1 à 1.5 cm) ; ++ :(0.5 à 1 cm) ; + (moins de 0.5 cm) ;

- : (aucun résultat) :

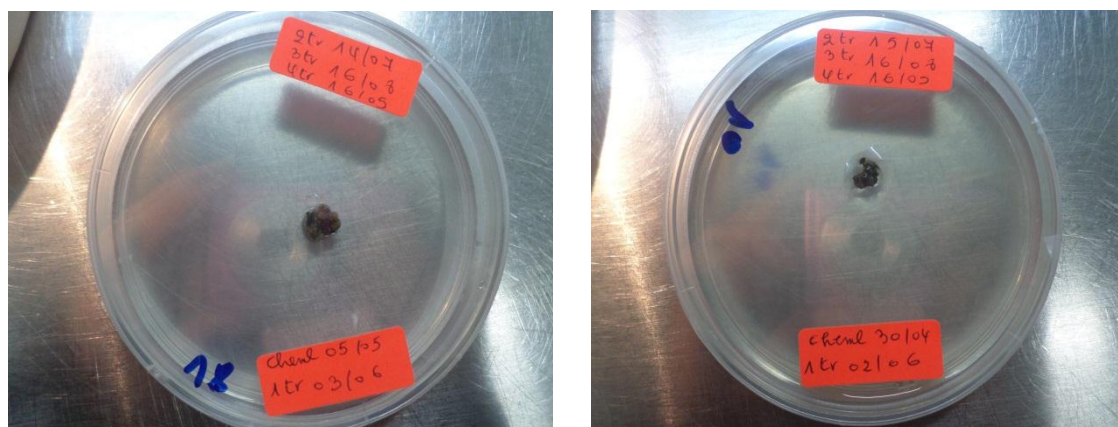
Milieu (M)	Apparition des cals/Milieu		Caractéristiques des cals	
	Importance	%	texture	Couleur
M T0 (sans hormone)	-	-	-	-
M 1 (0,5 mg ANA)	-	-	-	-
M 2 (1 mg ANA)	-	-	-	-
M 3 (0,5 mg Zéatine)	-	-	-	-
M 4 (1 mg Zéatine)	+	6.66	Friable	Blanchâtre, brunâtre
M 5 (0,5 mg 2-4D)	-	-	-	-
M 6 (1 mg 2-4D)	-	-	-	-
M 7 (0,5 mg NOA)	+	2.5	Friable	Blanchâtre, brunâtre
M 8 (1 mg NOA)	+	2.5	//	Blanchâtre
M 9 (0,5 mg ANA+0,5 Zéatine)	+	2.5	//	Blanchâtre
M 10 (0,5 mg ANA+ Zéatine)	++	17.5	//	Blanchâtre
Mi 11(1 ANA + 0,5 Zéatine)	++	2.5	//	Blanchâtre
M 12 (1mg ANA + 1 mg Zéatine)	++	25	//	Blanchâtre, Brunâtre
M 13(0,5 mg ANA+0,5 mg 2-4D)	+	20	//	Blanchâtre
M 14 (0,5 mg ANA+1mg 2-4D)	-	-	-	-
M 15 (1mg ANA + 0,5 mg 2-4D)	-	-	-	-
M 16 (1mg ANA + 1 mg 2-4D)	-	-	-	-
M 17 (0,5 Zéatine + 0,5mg 2-4D)	-	-	-	-
M 18(0,5 mg Zéatine+1mg 2-4D)	+++	2.5	Friable	Blanchâtre
M 19 (1mg Zéatine+0,5mg 2-4D)	-	-	-	-
M 20 (1 mg Zéatine + 1mg 2-4D)	-	-	-	-
M 21(0,5 Zéatine+0,5mg NOA)	-	-	-	-
M 22 (0,5 Zéatine + 1mg NOA)	-	-	-	-
M 23 (1mg Zéatine + 0,5 NOA)	-	-	-	-
M 24 (1mg Zéatine + 1mg NOA)	-	-	-	-
M 25 (0,5mg 2-4D +0,5mg NOA)	-	-	-	-
M 26 (0,5mg 2-4D + 1mg NOA)	-	-	-	-
M 27 (1mg 2-4D + 0,5mg NOA)	-	-	-	-
M 28 (1mg 2-4D + 1mg NOA)	-	-	-	-
M 29 (0,5mg ANA+0,5mg NOA)	-	-	-	-
M 30 (0,5mg ANA + 1mg NOA)	-	-	-	-
M 31 (1mg ANA + 0,5mg NOA)	-	-	-	-
M 32 (1mg ANA + 1mg NOA)	-	-	-	-

D'après le Tableau IV, seuls les milieux (M4, M7, M8, M9, M10, M11, M12, M13 et M18) ont donné des cals.

Le déclenchement de la callogenèse a été constaté chez la variété Chemlal, 4 à 5 semaines après la mise en culture des explants. Selon (Carimi, 2005) la callogenèse dépend de la qualité et la nature de l'explant.

(Carimi et De Pasquale., 2003) ont rapporté l'effet génotypique des espèces sur les réponses à la callogenèse. En effet, les espèces d'agrumes répondent plus rapidement à la callogenèse (après 4 à 9 jours de la culture initiale).

Aucune manifestation de callogenèse (0%) n'a été observé dans les autres milieux. Après 4 semaines de culture, un brunissement a été constaté sur la majorité des explants ensemencés dans ces milieux.



**Figure 28 : Cals produits par les explants de la variété Chemlal**

Le milieu M12 (1 mg/l ANA + 1 mg/l Zéatine) est plus favorable à la callogenèse avec un taux atteignant les 25%, suite à la présence de la cytokinine (ANA), molécule connue par son effet déterminant dans l'accélération des divisions cellulaires, et sa

combinaison avec la Zéatine, une Auxine qui favorise le développement des embryons somatiques (Brhadda et *al.*, 2006).

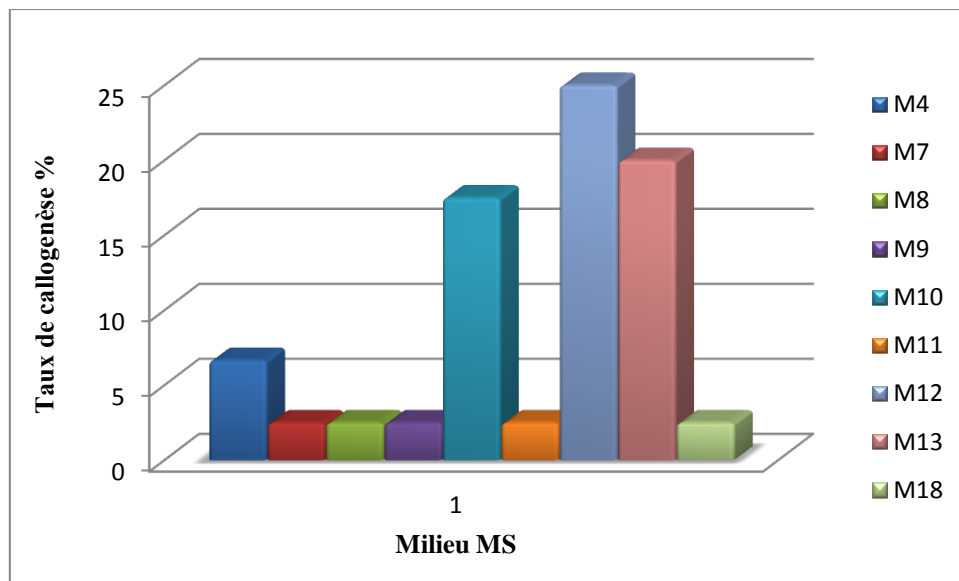
Selon les travaux de (Brhadda et *al.*, 2006) sur la régénération de l'olivier à partir de la culture *in vitro* des cotylédons, L'induction des cals a significativement été influencée par la concentration en ANA. Les meilleurs résultats ont été obtenus avec 2 mg/l d'ANA pour l'induction des cals (82,3 %) et 5 mg/l d'ANA pour le développement de ces cals.

La variété Chemlal présente aussi une aptitude à la callogenèse dans le milieu M10 (0,5 mg/l ANA + 1 mg/l Zéatine), avec un taux de 17,5%, et dans le milieu M13 (0,5 mg/l ANA + 0,5 mg/l 2-4D), avec un pourcentage de 20%.

D'après nos résultats nous constatons que le traitement hormonal par l'ANA, la Zéatine et le 2-4D, donne une bonne callogenèse dans les milieux M10, M12 et M13.

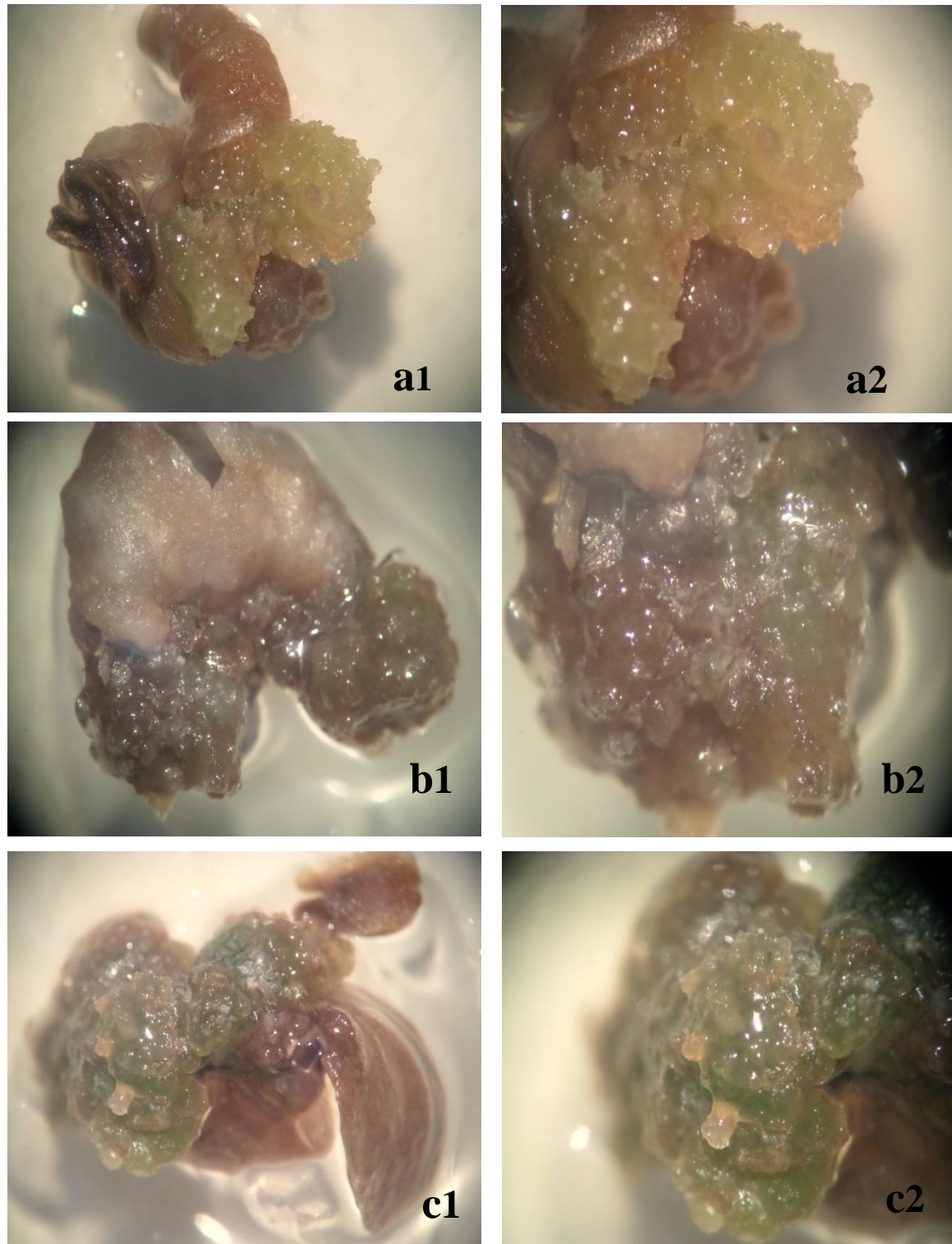
La croissance et la morphogenèse des tissus *in vitro* sont largement influencées par la composition des milieux de culture. Les phytohormones (notamment le rapport auxines / cytokinines) contrôlent le déclenchement de toute morphogenèse, ceci confirme les résultats obtenus dans les milieux M12 et M10, après la combinaison entre l'ANA et la Zéatine (Yakoub.S, et *al.*, 2003).

Le taux de callogenèse obtenu dans le milieu M13 (20%), confirme que l'utilisation des auxines seuls (ANA +2-4D), peut induire une callogenèse. A la lumière de ce résultat, on propose d'utiliser le 2-4D en combinaison avec l'ANA, en raison de la cherté et la non disponibilité de la Zéatine en Algérie.



**Figure 29 : pourcentage de callogenèse chez la variété Chemlal dans différents milieux de culture**

L'ensemble des cals produits par les explants de la variété Chemlal, sont marqués par une taille moins importante et un faible pourcentage de callogenèse.



**Figure 30 : Aspect des cals produits par la variété Chemlal, après 2 mois de culture observé sous loupe : a1-a2) dans le milieu 18, b1-b2) dans le milieu 10, c1-c2) dans le milieu 12**

**a1, b1, c1) G : 10x ; a2, b2, c2) G : 12x**

**II.2.2. L'aptitude à la callogenèse chez la variété Sigoise :****Tableau V : Résultats de la callogenèse chez la variété sigoïse :**

L'importance des cals : +++ :(1 à 1.5 cm) ; ++ :(0.5 à 1 cm) ; + (moins de 0.5 cm) ;

- : (aucun résultat) :

Milieu (M)	Apparition des cals/Milieu		Caractéristiques des cals	
	Importance	%	texture	Couleur
M T0 (sans hormone)	-	-	-	-
M 1 (0,5 mg ANA)	-	-	-	-
M 2 (1 mg ANA)	-	-	-	-
M 3 (0,5 mg Zéatine)	-	-	-	-
M 4 (1 mg Zéatine)	-	-	-	-
M 5 (0,5 mg 2-4D)	-	-	-	-
M 6 (1 mg 2-4D)	+	20	Friable	Blanchâtre
M 7 (0,5 mg NOA)	+	15	//	Blanchâtre, Brunâtre
M 8 (1 mg NOA)	+	10	//	Blanchâtre
M 9 (0,5mg ANA+0,5mg Zéatine)	++	47,5	//	Blanchâtre
M 10 (0,5mg ANA + 1mg Zéatine)	+++	65	//	Blanchâtre, Verdâtre.
M 11 (1mg ANA + 0,5mg Zéatine)	+++	60	//	Blanchâtre, Verdâtre ou Brunâtre.
M 12 (1mg ANA + 1mg Zéatine)	+++	60	//	Blanchâtre, Verdâtre
M 13 (0,5mg ANA + 0,5mg 2-4D)	+	10	//	Blanchâtre
M 14 (0,5mg ANA + 1mg 2-4D)	-	-	-	-
M 15 (1mg ANA + 0,5mg 2-4D)	-	-	-	-
M 16 (1mg ANA + 1mg 2-4D)	-	-	-	-
M 17 (0,5mg Zéatine+0,5mg 2-4D)	-	-	-	-
M 18 (0,5mg Zéatine + 1mg 2-4D)	-	-	-	-
M 19 (1mg Zéatine + 0,5mg 2-4D)	-	-	-	-
M 20 (1mg Zéatine + 1mg 2-4D)	-	-	-	-
M 21(0,5mg Zéatine+0,5mg NOA)	-	-	-	-
M 22 (0,5mg Zéatine + 1mg NOA)	-	-	-	-
M 23 (1mg Zéatine + 0,5mg NOA)	-	-	-	-
M 24 (1mg Zéatine + 1mg NOA)	-	-	-	-
M 25 (0,5mg 2-4D + 0,5mg NOA)	-	-	-	-
M 26 (0,5mg 2-4D + 1mg NOA)	-	-	-	-
M 27 (1mg 2-4D + 0,5mg NOA)	-	-	-	-
M 28 (1mg 2-4D + 1mg NOA)	-	-	-	-
M 29 (0,5mg ANA + 0,5mg NOA)	-	-	-	-
M 30 (0,5mg ANA + 1mg NOA)	-	-	-	-
M 31 (1mg ANA + 0,5mg NOA)	-	-	-	-
M 32 (1mg ANA+ 1mg NOA)	-	-	-	-



L'induction de la callogenèse chez la variété Sigoise a eu lieu après deux semaines de la culture initiale, dans les milieux (M6, M7, M8, M9, M10, M11, M12 et M13) (Tableau V et Fig 31).

Pour l'ensemble des explants calés, le meilleur pourcentage d'induction de la callogenèse (65%) ainsi que la taille importante des cals a été obtenu avec les explants ensemencés dans le milieu M10 (0,5 mg/l ANA + 1 mg/l Zéatine).

Un taux de callogenèse atteignant les 60% a été observé dans les milieux M11 (1 mg/l ANA + 0,5 mg/l Zéatine) et M12 (1 mg/l ANA + 1 mg/l Zéatine). Nous avons obtenu aussi un pourcentage moyen de callogenèse dans le milieu M9 (0,5 mg/l ANA + 0,5 mg/l Zéatine) gagnant les 47.5%.

Les autres milieux (M6, M7, M8 et M13) ont montré une faible aptitude à la callogenèse varie entre 10 et 20%.

Selon ces résultats, nous avons constaté que la combinaison de la Zéatine avec l'ANA a renforcé l'effet callogène de l'auxine et a permis d'obtenir une prolifération rapide des cellules d'où des cals volumineux. Des chercheurs ont noté que la capacité de formation des cals est exprimée sur un milieu spécifique pour chaque taxon et qu'elle est aussi déterminée génétiquement (Smirnov et Smirnova, 1985).

D'après nos résultats on peut dire que les milieux traités avec de l'ANA et de la Zéatine sont les meilleurs pour l'induction de la callogenèse chez la variété Sigoise.



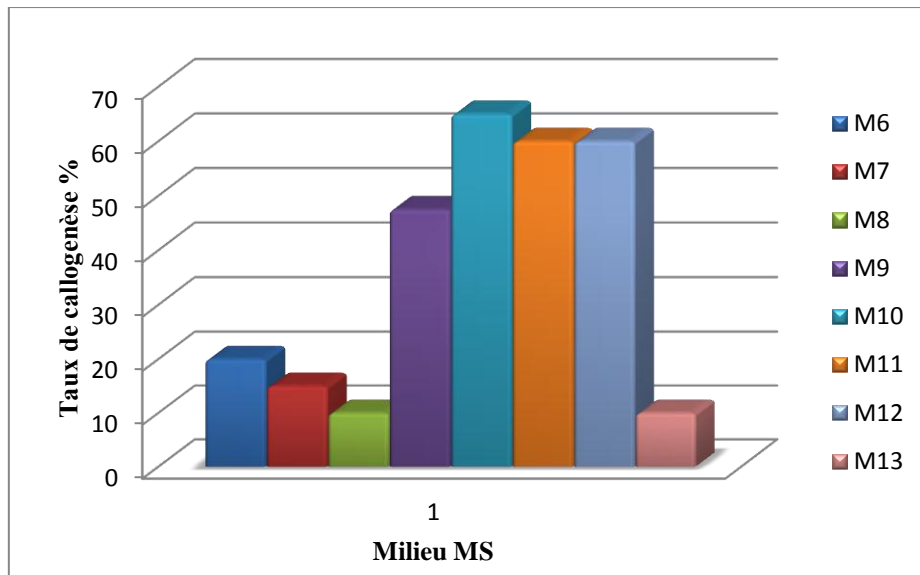


Figure 31 : pourcentage de callogénèse chez la variété Sigoise dans différents milieux de culture

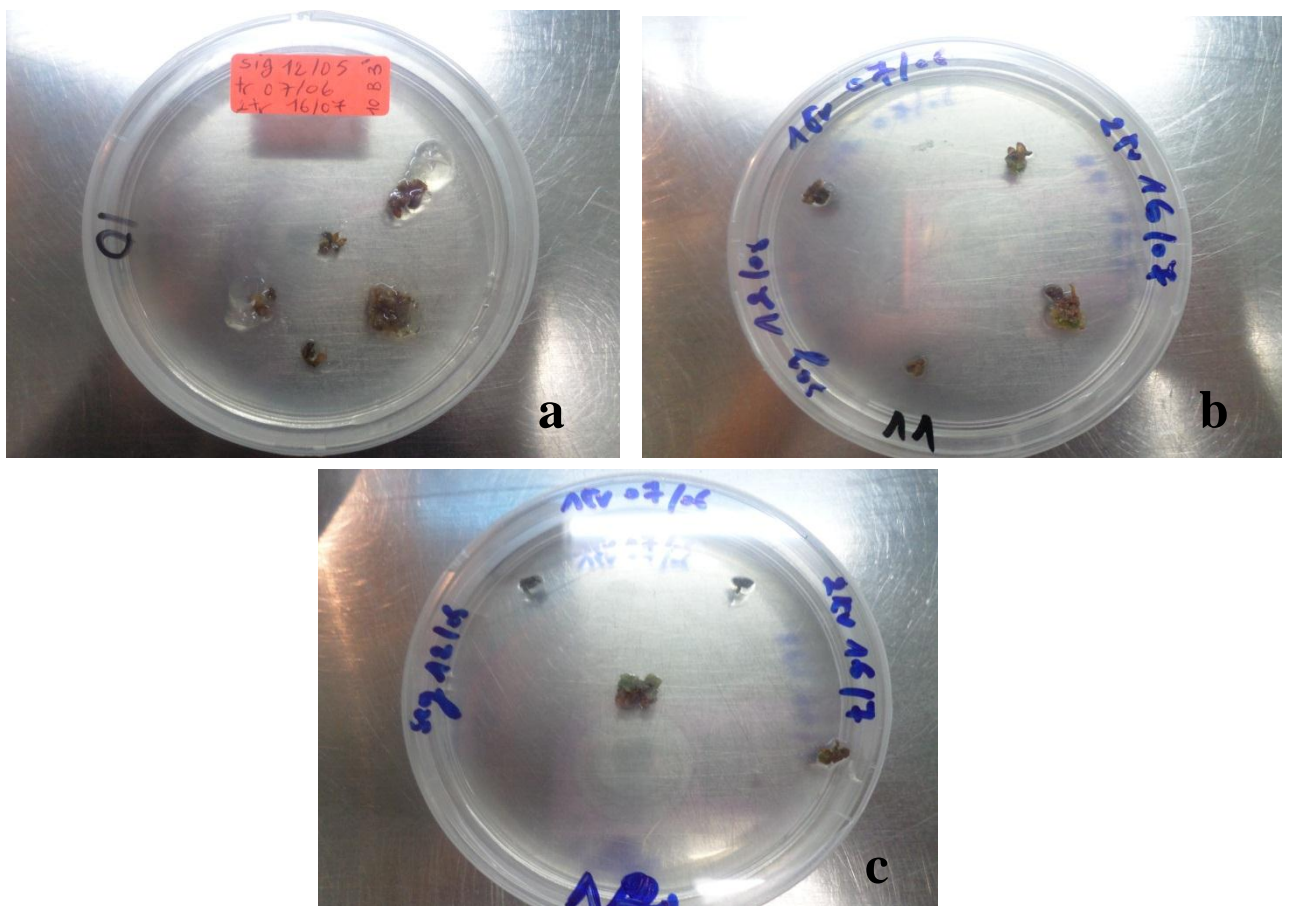
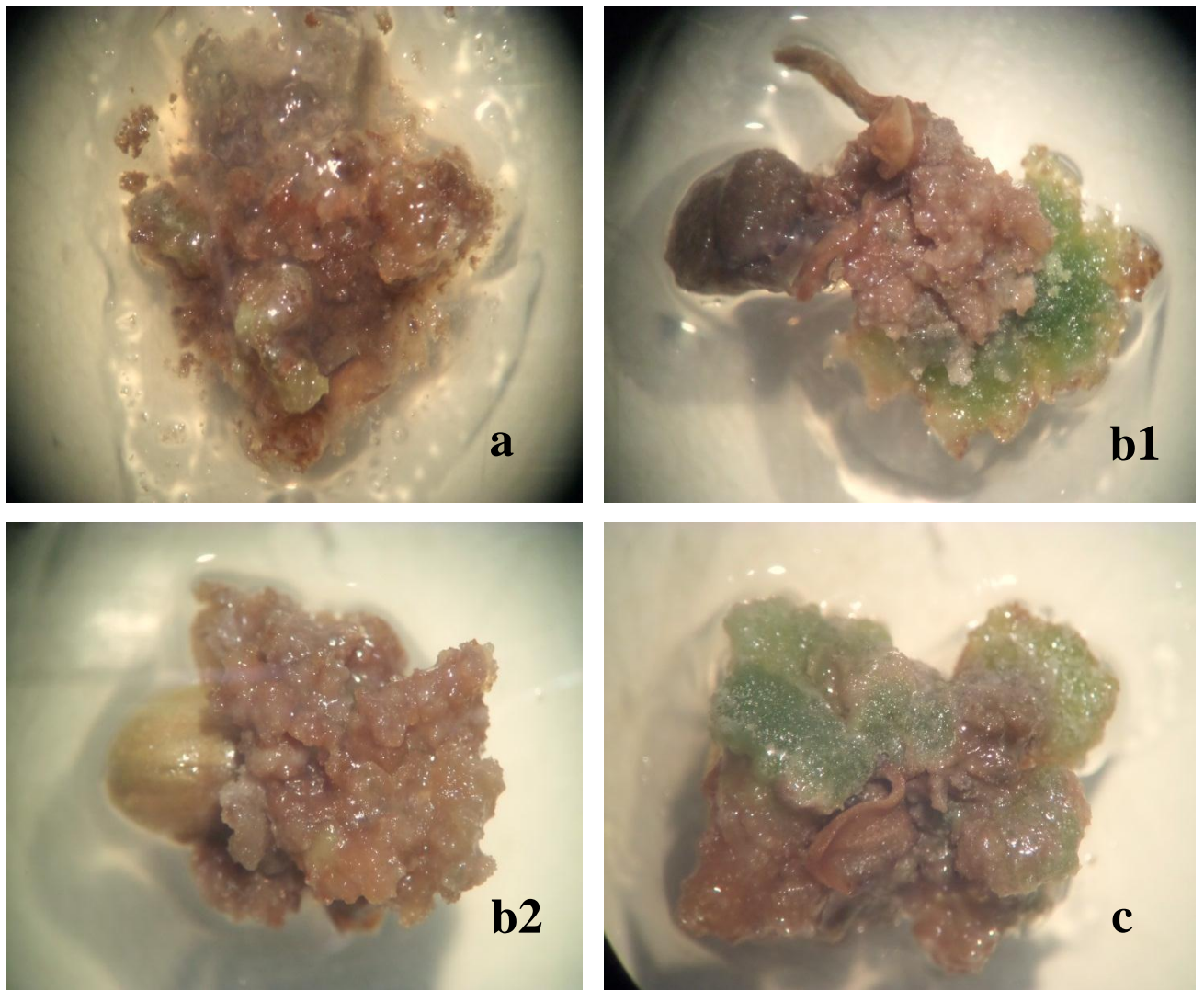


Figure 32 : Cals produits par les explants de la variété Sigoise :

a)- Milieu 10, b)- Milieu 11, c)-Milieu 12



**Figure 33 : Aspect des cals produits par la variété Sigoise observés sous loupe**

**G : 10x après 1 mois de culture :**

**a) dans le milieu 10, b1-b2) dans le milieu 11, c) dans le milieu 12**

### **II.2.3. Comparaison entre l'aptitude à la callogénèse chez les deux variétés étudiées :**

Les deux variétés étudiées (Chemlal et Sigoise) ont répondu à la callogénèse presque dans les mêmes milieux de culture, on notant que les meilleures aptitudes à la callogénèse ont été observées chez la variété Sigoise (Fig 34).

L'induction de la callogénèse chez la variété Sigoise est marquée par le meilleur pourcentage obtenu dans le milieu (10) avec 65%, qui est très élevé par rapport à celui obtenu chez la variété Chemlal (17,5%) dans le même milieu.

Le meilleur potentiel de callogénèse pour la variété Chemlal a été enregistré dans le milieu (12) avec 25%, qui est très faible en comparant avec celui obtenu par la variété Sigoise (60%) dans le même milieu.

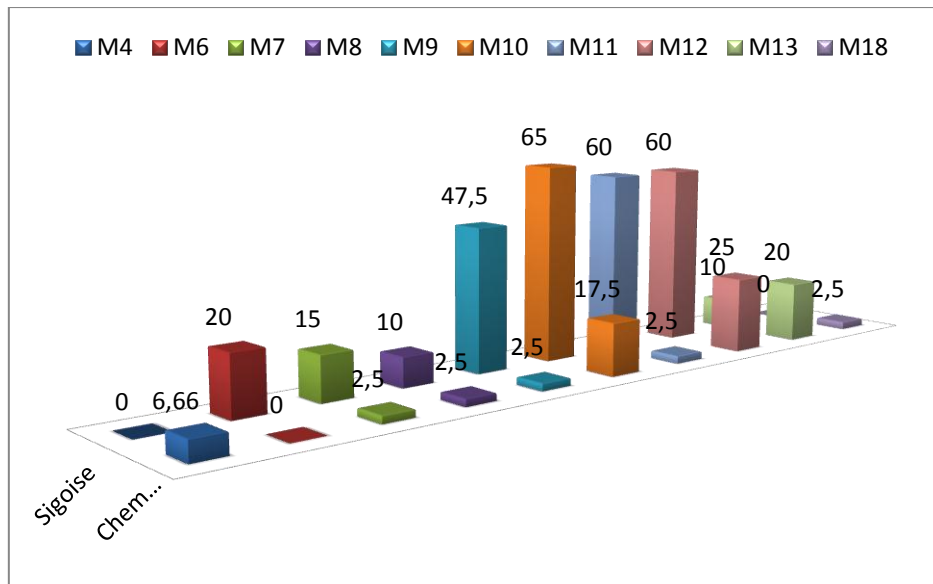
Les explants de la variété Sigoise ont très bien répondu à la callogénèse dans le milieu (11) avec un taux gagnant les 60%, contrairement aux explants de la variété Chemlal qui ont marqués une très faible induction à la callogénèse dans ce milieu ne dépasse pas 2,5%.

Le même résultat a été obtenu dans le milieu M9. La variété Sigoise a répondu à la callogénèse dans ce milieu avec un taux (47,7%) plus supérieur à celui obtenu par la variété Chemlal (2,5%).

Pour les milieux M6, M7 et M8, les explants de la variété Sigoise ont marqué une aptitude à la callogénèse mieux à celui observé chez les explants de la variété Chemlal dans les mêmes milieux.

Aucune callogénèse n'a été observé dans les milieux M4 et M18 concernant les explants de la variété Sigoise. Contrairement aux explants de la variété Chemlal, qui ont marqué par un taux de 6,66% dans M4, et 2,5% dans M18.

La variété Sigoise a mieux répondu à la callogénèse dans le milieu M6 avec un taux de 20%, tandis que la variété Chemlal n'a donné aucun cal dans ce milieu contenant que le 2-4D.



**Figure 34 : les taux de callogenèse obtenus chez les deux variétés étudiés (Chemlal et Sigoise).**

# Conclusion

---

## Conclusion

L'embryogenèse somatique apparaît comme technique très prometteuse pour la production de plusieurs plants génétiquement identiques au plant mère et indemne de certaines maladies virales très graves, transmissibles par les méthodes de multiplications conventionnelles particulièrement le greffage traditionnel qui est très utilisé.

Notre travail a pour objectif l'application de cette technique sur deux variétés autochtones (Chemlal et Sigoise) de l'olivier *Olea europea*.

Au terme de notre étude et à la lumière des résultats obtenus nous pouvons formuler un certain nombre de conclusions.

La réussite de la culture in vitro nécessite la maîtrise de toutes ses étapes, essentiellement l'asepsie. C'est pour cela nous avons essayé de rechercher une meilleure méthode de désinfection en utilisant une solution d'alcool 70°, et une solution d'hypochlorite de sodium à 20%.

Il s'est avéré que la meilleure méthode de désinfection est le passage rapide des explants dans la solution d'alcool 70°, puis le trempage de ces derniers dans la solution d'hypochlorite de sodium 20% pendant 8 à 10 min. cette dernière nous a permis de diminuer le taux d'infections des explants, de même que le taux de dessèchement.

2 à 4 semaines après la culture initiale, certains explants des deux variétés étudiées ont produits des cals friables de couleur blanchâtre ou verdâtre. Le pourcentage d'explants callogènes diffère selon les génotypes et les milieux de culture utilisés à savoir M0 utilisé comme témoin, et 32 milieux avec différentes concentrations d'hormones (ANA, NOA, 2-4D et Zéatine).

Les deux variétés étudiées ont exprimés une meilleure aptitude à la callogenèse dans les milieux de culture traités avec une combinaison des deux hormones (ANA et Zéatine).

# Conclusion

---

En effet les meilleures aptitudes à la callogenèse et la taille importante des cals ont été observées chez la variété Sigoise dans le milieu M10 avec un taux de 65%, et 60% dans les milieux M11 et M12.

Par ailleurs, il est noté que les plus faibles pourcentages de callogenèse sont obtenus avec les explants de la variété Chemlal, avec un taux de 25% dans le milieu M12, 20% dans M13 et 17,5% dans le milieu M10.

L'objectif que nous nous sommes tracés au début de notre étude était la régénération de l'olivier via l'embryogenèse somatique, mais malheureusement suite aux contraintes rencontrés nous nous sommes focalisé sur l'induction de la callogenèse dont les résultats sont satisfaisants et prometteurs.

Ce travail mérite d'être poursuivi afin de maîtriser tout le processus de multiplication des plants d'olivier via l'embryogenèse somatique. La maîtrise de cet outil permettra à la préservation et à la valorisation de notre patrimoine oléicole et le relance de l'oléiculture algérienne.

## Références bibliographique

---

- **André Gallais, 2013.** De la domestication à la transgénèse: évolution des outils pour l'amélioration des plantes, ed.Quae, France.
- **Agnès Ricoch, Yvette Dattée, Marc Fellous, 2011.** Biotechnologies végétales ; environnement, alimentation, santé, édition ; Vuibert-AFBV, 2011, paris 266 p.
- **AMIROUCHE M., 1977.** contribution à la caractérisation des principales variétés d'olivier cultivées en Kabylie, par l'analyse des données biométriques et morphologiques. Thèse de Magistère. Int. Nat. Agr., El-Harrach. 47p.
- **Bernie G ,Forrester S, Grey D ., 2006.** Botanica. Encyclopedie de botanique et d'horticulture plus de 1000 plants de monde entière .édition place victores.
- **Casselle A.C., 1987.**In vitro induction of free-virus potatoes by chemotherapy .In biotechnology and forestry Pp: 40-50.
- **Food and Agriculture Organisation (F.A.O.), 2005,** séries statistiques.
- **LÊ C .L, 2001,** Identification of potato by AFLP. **In** Conservation des pomme de terre in vitro et caractérisation des variétés cultivées en suisse.
- **Abousalim A., Walali LDM., Slaoui K., 1993.** Effet du stade phénologique sur l'enracinement des boutures semi-ligneuses de l'olivier en tablettes chauffantes. *Olivae* 46, p.30.
- **ARGESON L., 1999** – L'olivier dans le monde, Edition Luis Gérard, 55p.
- **Article de vulgarisation, 2007.** Nouvelle édition de l'Encyclopédie Universelle.
- **Bajaj Y.S.P. ,1987.**Biotechnologie in agriculture and. forestry in amélioration des espèces cultivées .p 225.
- **BALDY CH., 1990** – Le climat de l'olivier (*Olea europea*) volume jubilaire du professeur P.QUAZEL. Ecole méditerranéenne XVI, 1990, p121.
- **Bergman, L. 1960.** Growth and division of single cells of higher plants in vitro. *J. Gen. physiol.* 43
- **Besnard G, Breton C, Baradat P, Khadari B, Bervillé A., 2001.** Cultivar identification in the olive (*Olea europaea* L.) based on RAPDS. *J Amer Hort Science* 2001b; p126.-
- **Boccon –Gibod J,Jalouzot R., 1989.** Les biotechnologies en horticulture, possibilités et perspectives .In La culture in vitro et ses applications horticoles. Edt .JB Bailliéte p



## Références bibliographique

---

91.

● **Brhadda.N, ElMacane Walali.L-D et Abousalim.A, 2006.** Etude Histologique de l'Embryogenèse Somatique de l'Olivier *Olea europea* cv. Picholine marocaine, article originale, Vol 62, 2007 Cirad/EDP Sciences, p.115.

● **Bretaudeau A., 2006.** Les techniques de culture in vitro et la micropropagation des espèces végétales .,IPR/Kolibougou Koulikoro B P 06.

● **Breton C, Besnard G, Bervillé A., 2006a.** Using multiple types of molecular markers to understand olive phylogeography. In : De l'olivier à L'oleastre :Origine et domestication de l'Olea europaea L. dans le Bassin méditerranéen ., **2006.** Cahiers agricultures vol.15,n°4, juillet Août 2006.

● **Breton C,Tersac M , et Berville A.,2006 b .**Genitic diversity and gene flow between the wild olive (*Oleastre , Olea Europea .L*) and the olive . In : De l'olivier à L'oleastre :Origine et domestication de l'Olea europaea L. dans le Bassin méditerranéen ., **2006.** Cahiers agricultures vol.15,n°4, juillet Août 2006.

● **Briggs W B ., 1964.**phototropis; in higher plants in physiology academic press p 223.

● **Cadmo H. Rosell et Victor M. Villalobos A., 1992.** Fondements théoriques et pratiques de la culture des tissus vegetaux, Organisation des nations unies pour l'alimentation et l'agriculture, Rome.

● **CALADO. F et FAUSTO. J, 1987** – l'olivier, Vol I, 1er Edit. Milan, 120 p.

● **CAMPS., 1984.** L'olivier et l'homme, Vol I, 1ér, Edit Louis F, 105p.

● **Carimi.F, 2005.** Somatic Embryogenesis Protocol: Citrus. In: Protocol for somatic Embryogenesis in woody plants. Springer (eds), p115-128.

● **Carimi.F, et De Pasquale.F, 2003.** Micropropagation of Citrus. Micropropagation of woody tree and fruits. Kluwer Academic Publishers, p840.

● **Chevalier Aug,1948.** L'origine de l'olivier cultivé et ses variations (article).Revue internationale de botanique appliquée et d'agriculture tropicale. Volume 28/N° 303/pp.1-25.

● **Collet G.F et LE C.L .,1988.**Micro propagation de porte-greffes de pommier et de poirier .Enracinement in vitro de *Pyrus malus* L.(M25,26,27,MM106 ,M9 type jork ) et



## Références bibliographique

---

*Cydonia oblonga* Mill.(A) .Revue suisse Vitic .Arboric ,Hortic .Vol 20(2) :131.

● **DAOUDI L., 1994.** Etude des caractères végétatifs et fructifères de quelques variétés d'olives locales et étrangères cultivées à la station expérimentale de Sidi-Aiche (Bejaia), Thèse de Magistère, Inst, Nat, Agr, El-Harrach, 130p.

● **DE CANDOLE V., 1985.** L'olivier dans le monde, Edi, J-B.Baillières.Vol.2, 120 p

● **Espanoza N, Lizzarraga R Siguna S.C, Brayn J, Dodds H., 1992.**Tissu culture:Micropropagation .Conservation and export of potato gerplasm .CIP Reshjerche Ghide ,edtCIP ,19p.

● **Fabien Girard et Christine Noiville, 2014.** Biotechnologies végétales et propriété industrielle edition : la documentation Française, Paris. P 62.

● **FANTANAZZA G., et BALDONI L., 1990** – Proposition pour un programme d'amélioration génétique de l'olivier, Revue Olivae n°34, Décembre 1990, P39.

● **FIORINO et GRIFI., 1992** – L'olivier technique et pratique, Edi, R. Leonardo, 75p.

● **Geoffrey M.Cooper, 1999.**La cellule : une approche moléculaire, Geoffrey M.Cooper, édition Debook University, Paris. P32.

● **Gray DG, Compton N.F, Harell R .C, Cantliffe D.J., 1995.**Stomatic embryogenesis and the technology of synthetic seed in somatic Embryogenesis on various potato Tissues from a range of genotypes and ploidy levels Seabrook JEA.Douglass L K ., 2001.Plant cell report (2001).175.

● **Hamlat M., 1995.** Influence des phyto hormones sur les embryons les microboutures d'olivier (*Olea europea*). Thèse. université de Tizi ouzou, Algérie. P136.

● **Hussey,G et Stacey ,N J .,1981.**In vitro propagation of potato (*Solanum teberosum* of potato of photoperiod on in vitro tuberisation of potato- *S tubreosum*- .JEA Seabrook shirlyn m CD. levey .1993 .plant cell m tissue and organe culture .p120.

● **Istanbouli.A., 1976.** Etude expérimentale sur la nature des périodes de repos des semences et des bourgeons d'olivier (*Olea europea*). Thèse, université Aix, Marseille, France.p200.

● **Jain, S.M. et Gupta. P.K., 2005.** Protocol for somatic embryogenesis in woody plants. Netherlands. Ed : Springe.

## Références bibliographique

---

- **Karp A, Nelson R.S, Thomas E, Bright S.W.J., 1982.** Chromosome variation protoplast derived potato plants .Theor .Appl.Génét .,p63.
- **LÊ C, L, Thomas, D, Nowbuth, L ., 2002.**Conservation des pomme de terre in vitro et caractérisation des variétés cultivées en suisse .suisse Agric p34.
- **Loumon A, Giourga C., 2003.**Olive groves: “The life and the identity of the Mediterranean”. Agriculture and Human Values; p87-95.
- **Loussert R . et Brousse G., 1978 .**L’olivier .Ed . Maisonneuve et Larose , Paris .447p .
- **M. MENDIL ET A. SEBAI ; 2006).** Catalogue des variétés algériennes de l’olivier Eds. Aperçus sur le patrimoine génétique Autochtone. P7-11.
- **MAILLARD R., 1975 –** L’olivier, Edit, INVUFLEC, Paris, 147p.
- **Margara J., 1978.** Mise au point d’une gamme de milieux minéraux pour les conditions de la culture in vitro. C. R. Acad. Sci. 8, p. 65.
- **Margara J., 1989.**Base de la multiplication végétatives .Les méristèmes et l’organogenèse. Institut National de la recherche Agronomique.
- **Mazliak.p., 1982.** Physiologie végétale, Tome 2, croissance et développement. Ed.Coll. méthode Herman, Paris. P465.
- **Med Assad Allah Matallah,2006.** institut national d’agronomie (INA) Alger, Magister 2006.
- **Murashige.T, et Skoog.F, 1962.** A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue, Ed. Physiologia plantarum. p 473.
- **NAIT TAHEEN R., BOULOUHA B., et BENCHABANE ; 1995.** étude des caractéristiques de la biologie florale chez les clones sélectionnés de la variété population « picholine marocaine» Olivae N° 58 pp : 48-53.
- **Nowbuth et CL LE .Agroscope RAC changines ., 2005.**Teneur non-conforme en ADN comme indicateur de variation soma clonale chez la pomme de terre .suisse agric .37 (6):255.
- **Nozeran R,Bancilhon L ., 1972 .**Les cultures in vitro en tant que technique pour l’approche de problèmes posés par l’amélioration des plantes .In Ann. Amélioration .Plantes 22(2),p 167.

## Références bibliographique

---

- **Ochette C., 2005.** growth, quality and biotechnology, WFP publisher .Finland.
- **OUKSSILI S., 1983.** Contribution à l'étude de la biologie florale de l'olivier (*Olea europea* L.) de la formation des fleurs à la période de pollinisation effective, Thèse de Doct, Ing, E.N.S.A.M., Montpellier, 143p.
- **R. Augé, G.Beauchesne, J.Boccon-Gibod, L.Decourtye, B.Digat, R.Jalouzot, R.Minier, J.Cl.Morand, J.P.Reynoird, D.G.Strullu, H.Vidalie, 1989.** la culture in vitro et ses applications horticoles. Edition lavoisier, TEC & DOC, Paris.
- **R.Augé, G.Beauchesne, J.Boccon-Gibod, L.Decourtye, B.Digat, J.-Cl.Galandrin, R.Minier, J-Cl.Morand, H.Vidalie, 1984.** la culture in vitro et ses applications horticoles, Edition ; lavoisier.
- **Robert D, Dumas C, Bayon C., 1998.** La reproduction .Edt .Doun initiatives santé p 373.
- **Rousselle P, Robert Y, Grossuer J.C, ed ., 1996** .La pomme de terre production, Amélioration, Ennemis et Maladies. Utilisation édition RDoun P278.
- **Rugini E .,R. Biasi M. Rosario .,1998.** Olive (*Olea europaea* var *sativa*) transformation .In Proceeding seminar on Molecular biology of woody plants .Editors jain ; S.M.,S.C . Minocha.,,245.
- **Saad D., 2009.** Etude des endomycorhizes de la variété sigoise d'olivier *Olea europea* Et essai de leur application à des boutures semi-ligneuses multipliées sous nébulisation. Mémoire de magister en Biotechnologie, univ. Oran.
- **Sahli Z., 2009.** Produits de terroir et développement en Algérie cas des zones rurales de montagnes et de piémonts. Options méditerranéennes.
- **Shepard J. ,1982.** La régénération in vitro de plantes de pomme de terre pour la science, Juillet .34.
- **Sibi M .,1981.** Hérité de variants épi géniques obtenus par culture des tissus in vitro chez les végétaux supérieurs .Thèse Doct ès Sci ; Univ Paris Sud, Orsay, 280 p.
- **Smirnov (V.A.), Smirnova (V.V.) ,1985.** Genetic determination of callus formation in tomatoes. -Plant Genet. Breed, p40.

## Références bibliographique

---

- **Smith R.H, Bhaskaran S, Miller F.R., 1985.** Screening for drought tolerance in Sorghum activity: localization using cell culture. In Vitro Cell .Dev. Biol .541.
- **Téoulé E .,1999.** Biotechnologie et Amélioration des plantes in Biotechnologie Seriban R. EdT TEC &DOC p 565.
- Traduction de Claude **André St-Pierre**, 1988. N.W.SIMMONDS , édition ; les presses de l'université Laval, 1988, Canada. 406p.
- **Tremblay.L, Lamhamedi.M, Colas.F et Beaulieu.J, 2007.** Des plants aux plantations, Techniques, Technologies, Performances. Colloque de transfert des connaissances. Recueil des résumés. Centre des congrès de Québec.
- **William G. Hopkins, 2013.** Physiologie végétale edition De Boeck, France.
- **Williams E.G, Maheshuan G .,1986.** Somatic embryogenesis :factors influencing coordinator behaviour of cell as an embryonic group .Ann .Botany p57.
- **Yakoub-Bougdal S., Cherifi D., Bonaly J., 2007.** Production de vitro plants d'Olea europea Var Chemlal, Cahier agriculture.
- **Zryd. J-P., 1988.** Cultures des cellules, tissus et organes végétaux, édition presse polytechnique romande, 308p.

### ► Sites:

<http://www.gnis-pedagogie.org/>

<http://www.plantes-botanique.org/>

<http://www.universalis.fr/encyclopedie>

<http://www.inra.fr/Chercheurs-etudiants/Biotechnologies>

<http://www.minagri.dz/>

<http://www.NFM-Dz.com> (nouvelles forêts du maghreb).

# ANNEXES

## Annexe I :

**Tableau VI :** composition de la solution du milieu MURASHIGE et SKOOG (1962) en macroéléments, microéléments et en Fer EDTA:

Composition	Concentration (mg/l)
<u>Macroéléments</u>	
NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	1400
CaCl <sub>2</sub> 2H <sub>2</sub> O	440
MgSO <sub>4</sub> 7H <sub>2</sub> O	370
KNO <sub>3</sub>	1900
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	170
<u>Microéléments</u>	
KI	0,83
H <sub>3</sub> BO <sub>4</sub>	6,2
MnSO <sub>4</sub> 4H <sub>2</sub> O	22,3
ZnSO <sub>4</sub> 7H <sub>2</sub> O	8,6
NaM <sub>10</sub> O <sub>4</sub> 2H <sub>2</sub> O	0,25
CuSO <sub>4</sub> 5H <sub>2</sub> O	0,025
CaCl <sub>2</sub> 6H <sub>2</sub> O	0,025
<u>Fer EDTA</u>	
Fe SO <sub>4</sub> 7H <sub>2</sub> O	27,85
Na <sub>2</sub> EDTA	37,25

# ANNEXES

---

## Annexe II :

**Tableau VII:** la composition des milieux de culture en hormones de croissance:

Milieu MS	Composition en hormones (mg par litre)
Milieu 0	Sans hormone (témoin)
Milieu 1	0,5 mg ANA
Milieu 2	1 mg ANA
Milieu 3	0,5 mg Zéatine
Milieu 4	1 mg Zéatine
Milieu 5	0,5 mg 2-4D
Milieu 6	1 mg 2-4D
Milieu 7	0,5 mg NOA
Milieu 8	1 mg NOA
Milieu 9	0,5 mg ANA + 0,5 mg Zéatine
Milieu 10	0,5 mg ANA + 1 mg Zéatine
Milieu 11	1 mg ANA + 0,5 mg Zéatine
Milieu 12	1 mg ANA + 1 mg Zéatine
Milieu 13	0,5 mg ANA + 0,5 mg 2-4D
Milieu 14	0,5 mg ANA + 1mg 2-4D
Milieu 15	1 mg ANA + 0,5 mg 2-4D
Milieu 16	1 mg ANA + 1 mg 2-4D
Milieu 17	0,5 mg Zéatine + 0,5 mg 2-4D
Milieu 18	0,5 mg Zéatine + 1 mg 2-4D
Milieu 19	1 mg Zéatine + 0,5 mg 2-4D
Milieu 20	1 mg Zéatine + 1 mg 2-4D
Milieu 21	0,5 mg Zéatine + 0,5 mg NOA
Milieu 22	0,5 mg Zéatine + 1 mg NOA
Milieu 23	1 mg Zéatine + 0,5 mg NOA
Milieu 24	1 mg Zéatine + 1 mg NOA
Milieu 25	0,5 mg 2-4D + 0,5 mg NOA
Milieu 26	0,5 mg 2-4D + 1 mg NOA
Milieu 27	1 mg 2-4D + 0,5 mg NOA
Milieu 28	1 mg 2-4D + 1 mg NOA
Milieu 29	0,5 mg ANA + 0,5 NOA
Milieu 30	0,5 mg ANA + 1 mg NOA
Milieu 31	1 mg ANA + 0,5 mg NOA
Milieu 32	1 mg ANA + 1 mg NOA

# ANNEXES

---

## **Annexe III :**

- **Préparation de l'Alcool 70% :**

L'Alcool éthylique est vendu à une concentration de 96%. Ses propriétés antiseptiques sont optimales à une concentration de 65 à 70%, soit une dilution de 7 parties d'alcool dans 3 parties d'eau.

Donc pour fabriquer un litre d'une solution d'alcool 70% on mélange 700 ml d'alcool 96% à 300 ml d'eau distillée.

- **Préparation de la solution de fer EDTA :**

La solution de fer EDTA contient deux composés  $\text{Fe SO}_4, 7\text{H}_2\text{O}$  et  $\text{Na}_2 \text{EDTA}$ , qui sont dissout séparément dans  $1/10^{\text{e}}$  et  $9/10^{\text{e}}$  du volume final désiré d'eau distillée à  $60^{\circ}\text{C}$  respectivement.

Sur une plaque d'agitation chauffante, verser la solution de  $\text{Fe SO}_4, 7\text{H}_2\text{O}$  dans celle de  $\text{Na}_2\text{EDTA}$  avec ajout de quelques gouttes de  $\text{NaOH}$  (pour éviter la précipitation), puis laisser le mélange sous agitation pendant 1h, le mélange passe progressivement d'une couleur jaune claire à jaune foncé. La solution du fer EDTA doit être conservée à l'abri de la lumière à  $4^{\circ}\text{C}$  dans un flacon préalablement stérilisé.

# ANNEXES

---

## Annexe IV :

### Matériel de laboratoire et appareillages :

Verrerie et accessoires :	L'appareillage :
-Béchers.	-Balance à précision.
-Boîtes de pétrie.	-Balance analytique.
-creusets.	-Etuve.
-Entonnoirs.	-Hotte à flux laminaire.
-Erlen Meyers.	-Microscope à loupe.
-Flacons.	-Plaque chauffante.
-Papier aluminium.	-Agitateur magnétique.
-Papier filtres.	-Autoclave.
-Papier Josef.	-Bec benzène.
- Papier buvard.	-Stérilisateur à bille.
-Pipettes graduées.	-pH mètre.
-Parafilm.	
- Pincés	
- Scalpels.	
-poire.	
-Spatule.	
-Barreaux magnétiques.	



# Partie Bibliographique

# Chapitre I :

## Matériel et Méthodes

# Partie expérimentale

## Chapitre II :

# La culture *in vitro* et la régénération végétale

# Chapitre I :

## Généralités sur l'olivier

# Chapitre II :

## Résultats et Discussions

# Conclusion

# Références bibliographiques



# ANNEXES

# Introduction