

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE

Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique

Université Blida I



Faculté des sciences de la nature et de la vie

Département de Biologie des populations et des organismes

## *Mémoire de fin d'études*

En vue de l'obtention du diplôme de Master en Biologie

Option : Génomique et Biotechnologie Végétale

### Thème

Essais de régénération de deux cépages de vigne (*Vitis vinifera L.*) autochtones, par embryogénèse somatique indirecte.

Présenté par : MAHAMMEDI Selma

Soutenu le : 29-09-2016

ZIRAOUI Sabrina

Devant le jury :

Mme BENASSEL N.	Maitre assistante MAA	UBI	Présidente
Mme AYADI R.	Maitre de conférences MCB	UBI	Examinatrice
Mme AMEDJKOUH H.	Maitre assistante MAA	UBI	Promotrice
Mme HADDAD N.	Magister chef de service à ITAF		Co-promotrice

Promotion 2015/2016

# *Dédicace*

*Je dédie ce modeste travail :*

*A être la plus cher au monde, ma mère que dieu t'offre à ton âme le paradis.*

*A mon trésor éternel et raison de ma vie, symbole du sacrifice à mon père.*

*A mon chère frère et ma chère sœur.*

*A ma source de bonheur mes deux tantes Toha et Djamila*

*A toutes les personnes que j'aime*

*A mon binôme : Selma qui m'a jamais quitté, et qui a partagé tous les moments facile et difficile avec moi avec un grand sourire et une grande patience.*

*A toute ma famille maternelle et paternelle,*

*A toute personne je connais et j'aime.*

*Je dédie le fruit de cette modeste recherche.*

*Sabrina*

# *Dédicace*

*Je dédié mon travail spécialement à la plus généreuse de toute les mamans à toi maman mon cœur, ma raison de vie, pour ton amour , ta sagesse , tes sacrifices que dieu te garde parmi nous le plus longtemps possible.*

*A toi mon père qui a été là pour moi, pour tous ces sacrifices et sa large compréhension, je lui dois tous ce que je suis*

*A ma précieuse sœur Amel qui m'a encouragé et soutenu, orienter, aider dans tous pas que je faisais dans cette vie.*

*A mon chère frère Aziz*

*A mon neveu chouchou Iyado que j'aime le plus au monde.*

*A ma sœur Sabrina avant d'être mon binôme pour les moments que nous avons partagé durant toutes les années universitaire.*

*A toute personnes que j'aime : Besma , Hiba, Amira , Ouardia , Ayoub , Habib.*

*A toute la famille Mahhamedi et Gheouali*

*Selma*

# *Remerciements*

*Pour ce modeste travail on tient à adresser nos sincères remerciements à :*

*Mme HADDAD N, notre Co promotrice nous aimerons tout d'abord vous remercier de nous avoir accueilli dans votre laboratoire et nous offre l'opportunité de réaliser cette thèse et d'élargir nos connaissances. Merci d'avoir guidé ce travail et pour ta confiance. Vos connaissances et vos conseils nous ont permis de mener à bien ce sujet de recherche.*

*Melle AMEDJKOUH H, notre promotrice d'avoir accepté de codiriger, encadré ce travail, pour votre savoir-faire, vos connaissances dans la culture in vitro, merci pour ta patience, pour votre compréhension et votre bonne humeur.*

*Mme BENASSEL N, pour avoir fait l'honneur de présider ce jury, et d'avoir enrichi nos connaissances en coté botanique.*

*Mme AYADI R, pour avoir si aimablement accepté d'examiner ce travail, pour ta gentillesse durant tout le parcours de master.*

*Agréable remerciement et reconnaissance à Mme BRANCI Souhila technicienne de laboratoire d'amélioration de plantes pour son aide, ses précieux conseils et sa disponibilité à tous moment , sa gentillesse et son bon humeur avec nous durant toute la période de notre stage .*

*Je tiens également à remercier Melle BOUKHALFA Salima, Ingénieur au laboratoire d'amélioration des plantes pour son aide, aussi pour ses précieux conseils.*

*En fin on tenons a remercié tout le personnel de la station régionale de l'ITAF de Tessalat  
EL merdja : Mme AMINA, Mme NAWEL et tous les autres membres.*

Le présent travail porte sur l'application de l'embryogénèse somatique chez deux cépages du vigna (*Vitis vinifera*) autochtones ( Tadrith et Ferrana).

La meilleure méthode de désinfection est le passage rapide des explants dans la solution d'éthanol à 70° suivi par un trempage dans la solution d'hypochlorite à 7% pendant 10min.

Après 6 semaines de la mise en culture de différents explants (ovaires, étamines, boutons floraux immature) dans les deux milieux **MURASHIGE et SKOOG (1962)** et **CHEE et POOL (1987)** avec différentes balances hormonales, nous avons constaté que :

- La mise en culture des ovaires a induit la callogénèse dans les milieux Ms1 (1ml BAP + 2ml (NOA) et Ms2 (1ml BAP+1ml NOA) avec un taux de 27% et 3,12% respectivement pour la variété Tadrith.

- Pour la mise en culture des étamines une bonne aptitude à la callogénèse a été noté dans le milieu Ms1 (1ml BAP+2ml NOA) avec un taux de 37,5%, pour la variété Tadrith.

- La mise en culture des boutons floraux dans les trois milieux a permis le déclenchement de la callogénèse pour la variété Tadrith, avec des résultats proche pour Ms2, Ms3, 21,875% et 28,125% respectivement.

Ainsi nous avons constaté aussi que la variété Ferrana n'a développé aucun cal avec les 3 types d'explants et dans les deux milieux.

Mots clés : embryogénèse somatique, autochtones , **MURASHIGE et SKOOG** , callogénèse, **CHEE et POOL**

This work focuses on the application of somatic embryogenesis at two varieties of vine (*Vitis vinifera*) autochthons (Tadlith and Ferrana).

The best method of disinfection is the fast passage of explants in ethanol solution with 70° followed by a steeping of the latter in the hypochlorite sodium with 7% during 10 minutes.

After 6 weeks of the setting in culture of various explants (ovaries, stamens, flower buds) in both medium **MURASHIGE and SKOOG (1962)** and **CHEE and POOL (1987)** with various hormonal balances, we noted that.

- The setting in culture of the ovaries induced the callogénèse in the medium Ms1 (1ml BAP+ 2ml NOA) and Ms2 (1ml BAP+1ml NOA) with a rate of 27% and 3,125% respectively for the Tadlith variety.

- For the setting in culture of stamens a good aptitude for the callogenèse was noted in the medium Ms1 (1ml BAP + 2ml NOA) with a rate of 37,5% for the Tadlith variety.

- The cultivation of the flower buds in the three medium allowed the triggering of callogenesis for the Tadlith variety, with close results for Ms2, Ms3, 21.875% and 28.125%, respectively.

Thus we also noted that the Ferrana variety did not develop any cal with the 3 types of explants and in the two mediums.

Key words : somatic embryogenesis, autochtones, **MURASHIGE and SKOOG**, callogénèse, **CHEE and POOL**.

يركز هذا العمل على تطبيق مرحلة التطور الجنيني الجسدية في نوعين من الكرمة المحلية (تادليث و فرانة)

افضل طريقة لتطهير هو المرور السريع للإكسبلنتس في محلول الإيثانول عند 70 درجة تليها نقع في محلول هيبوكلوريت الصوديوم 7% لمدة 10 دقائق

بعد 6 أسابيع من زراعة إكسبلنتس المختلفة (المبيض، الأسيدي، و براعم الزهور ) في كل من **SKOOG (1962)** و **Murashige** و **POOL (1987)** و **CHEE** مع التوازنات الهرمونية المختلفة، وجدنا أن:

- زراعة المبيض سببت نمو البراعم في الوسط الحيوي Ms1 ( 1مل BAP + 2مل NOA ) و Ms2 ( 1مل BAP + 1مل NOA ) بمعدل 27% و 3.12% على التوالي للنوع تادليث
- بالنسبة للزراعة أسدية قدرة جيدة على التبرعم لوحظ في الوسط Ms1 ( 1مل BAP + 2مل NOA ) بنسبة 37.5% للنوع تادليث
- زراعة براعم الزهور في البيئات الثلاث سمح بإحداث التبرعم للنوع تادليث مع نتائج قريبة لـ MS2، MS3 ، 21.875% و 28.125%، على التوالي.

وهكذا لاحظنا أيضا أن النوع فرانة لم يتطور الى برعم مع 3 أنواع من إكسبلنتس في كل المحيطات

المفتاح : مرحلة التطور الجنيني الجسدية، المحلية، **MURASHINGE** و **SKOOG (1962)** ، البراعم، **CHEE** و **POOL (1987)** .

- **BAP**.....6-Benzylaminopurin
- **CP** .....CHEE et POOL (1987)
- **ITAF**.....Institut Technique d'Arboriculture Fruitière et de la Vigne
- **MS**.....MURASHIGE et SKOOG (1962)
- **NOA**.....Acide 2-naphthoxyacétique
- **TCa**.....Taux de callogénèse
- **TCo**.....Taux de contaminations
- **TD**.....Taux de dessèchement
- **TDZ**.....Thidia zuron



---

<b>Figure 01</b> : Aspect général de la vigne .....	05
<b>Figure 02</b> : Feuille de vigne.....	05
<b>Figure 03</b> : Vrilles de vigne.....	06
<b>Figure 04</b> : Inflorescence de vigne.....	06
<b>Figure 05</b> : Les méthodes d'applications de la culture <i>in vitro</i> .....	12
<b>Figure 06</b> : : type d'organogénèse contrôlée par les concentrations relatives d'auxines et cytokinines.....	16
<b>Figure 07</b> : Grappe de boutons floraux de Ferrana .....	20
<b>Figure 08</b> : : La mise en culture des ovaires.....	26
<b>Figure 09</b> : : Etamines sous la loupe Binoculaire .....	26
<b>Figure 10</b> : Les boîtes de pétri déposées dans la chambre de culture.....	26
<b>Figure 11</b> : Cals produits par les étamines de la variété Tadrith sur le milieu Ms .....	30
<b>Figure 12</b> : Cals produits par des boutons floraux de Tadrith, cultivés sur le milieu Ms.....	32
<b>Figure 13</b> : Cal de la variété Tadrith observé sous loupe binoculaire.....	32
<b>Figure 14</b> : Fruit de la variété Ferrana .....	(ANNEXE 01)
<b>Figure 15</b> : Fruit de variété Tadrith .....	(ANNEXE 01)
<b>Figure 16</b> : L'autoclave .....	(ANNEXE 02)
<b>Figure 17</b> : L'étuve.....	(ANNEXE 02)
<b>Figure 18</b> : pH mètre.....	(ANNEXE 02)
<b>Figure 19</b> : Balance de précision .....	(ANNEXE 02)
<b>Figure 20</b> : Bec benzen.....	(ANNEXE 02)

---

<b>Tableau I</b> : Avantage et inconvénients des techniques de culture in vitro.....	19
<b>Tableau II</b> : Balances hormonales utilisé.....	23
<b>Tableau III</b> : Les essais de désinfection du matériel végétal utilisé.....	25
<b>Tableau IV</b> : Essais de désinfection du matériel végétal.....	27
<b>Tableau V</b> : Résultats de la mise en culture des ovaires de la variété Tadmith dans les deux milieux utilisés.....	28
<b>Tableau VI</b> : Résultats de la mise en culture des étamines de la variété Tadmith sur les deux milieux utilisés.....	29
<b>Tableau VII</b> : Résultat de la mise en culture des demi-fleurs de la variété Tadmith sur les deux milieux utilisés .....	31
<b>Tableau VIII</b> : Résultat de la mise en culture des ovaires de la variété Ferana sur les deux milieux utilisés .....	33
<b>Tableau IX</b> : Résultats de la mise en culture des étamines de la variété Ferana sur les deux milieux utilisés.....	34
<b>Tableau X</b> : Résultats de la mise en culture des demi-fleurs de la variété Ferana sur les deux milieux utilisés .....	35

**Ampélographiques** : Est la discipline commune à la [botanique](#) et à l'[œnologie](#) traitant des [cultivars](#) de [vignes cultivés](#) en [viticulture](#) : les [cépages](#).

**Autochtones** : Variété locale.

**Bouturage** : Le bouturage est un mode de [multiplication végétative](#) de certaines [plantes](#) consistant à donner naissance à un nouvel individu (individu enfant de la plante mère) à partir d'un organe ou d'un fragment d'organe isolé (morceau de rameau, feuille, racine, tige, écaille de bulbe).

**Cal** : Structure de prolifération cellulaire obtenue notamment en culture in vitro par l'ajout d'hormones végétales.

**Callogénèse** : Néof ormation d'un cal.

**Cépages** : les cépages sont des [cultivars](#), c'est-à-dire des variétés de population composées d'individus [génétiquement](#) différents mais qui présentent des caractéristiques proches.

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

**Greffage**. Le greffage est une opération, consistant à insérer dans les tissus d'un végétal un autre végétal en vue de les unir.

**Marcottage** : Le marcottage est un mode de multiplication végétative par enracinement des rameaux d'un plant-mère sans que ceux-ci ne se séparent de ce dernier.

**l'œnologie** : Science qui a pour objet l'étude des vins. (Elle a pour but la connaissance des raisins et des vins à partir de l'analyse de leurs constituants et des phénomènes chimiques et biologiques dont ils sont le siège. Elle étudie la transformation du raisin en vin, ainsi que la conservation du vin).

**Organogénèse** : Formation des organes, l'organogénèse somatique se situe essentiellement au niveau des méristèmes.

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

**Variété** : En botanique, catégorie taxonomique de rang inférieur à sous-espèce.

**Multiplication végétative** : Synonyme de reproduction asexuée. Elle aboutit à la constitution de clones homogènes.

Introduction.....	1
-------------------	---

## **Partie bibliographique**

### **Chapitre I : Généralités sur la vigne**

I.1. Historique.....	03
I.2. Position systématique.....	03
I.3. Description Botanique.....	04
I.3.1. Les racines.....	05
I.3.2. Tronc, bras et rameau.....	06
I.3.3. Les feuilles.....	06
I.3.4. Les bourgeons.....	06
I.3.5. Les vrilles.....	07
I.3.6. L'inflorescence.....	07
I.3.7. Les fleurs.....	07
I.3.8. Les grappes et les baies.....	08
I.4 Multiplication de la vigne.....	08
I.4.1 Multiplication par voie sexuée ou semis.....	08
I.4.2 Multiplication par voie asexuée.....	08
I.5. Exigences pédoclimatiques de la vigne.....	09

### **CHAPITRE II : La culture *in vitro***

II.1. Définition.....	11
II.2. Historique.....	11
II.3 Les méthodes d'applications .....	12
II.3.1 La micropropagation.....	13
II.3.2 La culture de méristèmes.....	13
II.3.3 L'embryogenèse somatique.....	14
II.3.4 Culture des protoplastes .....	15
II.4. Les conditions .....	15
II.4.1. Composition des milieux de culture.....	15
II.4.2 Les facteurs de milieu.....	17
II.5 Avantages et inconvénients de la technique.....	18

**Partie expérimentale****Matérièl et méthodes**

I.1. Matériel.....	20
I.1.1. Matériel biologique.....	20
I.1.2. Matériel non biologique.....	21
I.2. Methodes.....	21
I.2.1. Préparation des milieux de culture.....	22
I.2.2. Stérilisation du matériel .....	22
I.2.3. La mise en culture des explants.....	23

**Résultats et discussion**

I. Résultat de la désinfection des explants.....	25
II. Résultats de la mise en culture.....	26
II.2. La variété Tadmith.....	26
II.2.1. Résultats de la mise en culture de l'ovaire.....	26
II.2.2. Résultats de la mise en culture des étamines .....	27
II.2.3. Résultats de la mise en culture de demi-fleurs .....	29
II.3. Résultats de la variété Ferrana.....	31
II.3.1 Résultat de la mise en culture des ovaires.....	31
II.3.2 Résultats de la mise en culture des étamines.....	32
II.3.3. Résultats de la mise en culture des demi-fleurs.....	33
III. Discussion.....	34
Conclusion.....	35
Références bibliographiques.....	36

## Annexe

La vigne traditionnellement cultivée appartient à l'espèce *Vitis vinefera* L. c'est une espèce à vocation agronomique remarquable, chargée d'histoire et des symboles, et offrant une diversité exceptionnelle (**THIS et al., 2006**).

En Algérie d'après **EL-HEIT (1981)**, le développement de la vigne a commencé à partir de 1860.

La viticulture est un peu partout à travers le territoire Algériens : à l'Ouest (Tlemcen, Sidi bel Abbes et Ain timouchent) sont les principales villes productrices de la vigne, à l'Est (Skikda et Bejaïa) et au centre (les collines de Sahel, Blida, Média, Mitidja et la Kabylie) (**LERY, 1982**).

Entre 2000 et 2006 la production annuelle moyenne de l'Algérie est de 275 mille tonnes (**MONTGOMERY, 2009**).

En 2010, la superficie totale des vignobles a engendré une baisse de la production. Cette diminution de rendements peut être attribué à plusieurs facteurs, entre autres, les facteurs climatiques ; la méconnaissance de l'agriculteur Algérien des techniques de viticoles appliquées (fertilisation, entretien du sol, traitements phytosanitaires utilisation anarchique des portes greffes et variété ect....) et d'après **BLOUIN (2005)**, il existe des maladies fongique, bactérienne, virales, et des maladies due, à des prédateurs.

Depuis les débuts de l'agriculture, l'Homme a cherché à améliorer les plantes qu'il cultivait par rapport à des critères de qualité ou de rendement correspondant à ses besoins ; de nombreux chercheurs font appel aux techniques de la culture *in vitro* (**Auge et al., 1989**).

Cette technique est basé sur la totipotence cellulaire (Toute cellule végétale vivante, quelle que 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.

Il n'y a 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. (**AUGE et al.,1989**)

Ainsi et dans le cadre des activités de l'institut technique de l'arboriculture fruitière et de la vigne (l'ITAF) , qui a pris en charge la conservation des variétés intéressantes de la vigne, nous nous sommes fixée comme objectifs à travers cette étude : la mise en culture *in vitro* de deux variétés de vigne (Tadlith et Ferana) par l'embryogénèse somatique , dans deux milieux de culture (**MURASHIGE et SKOOG (1962) et CHEE et POOL (1987)**), et avec différentes balances hormonales, en utilisant trois types d'explants : l'ovaire, l'étamine et la demi-fleur.

## I.1 Historique

Les origines de la vigne ont pu être étudiées grâce à la découverte des vignes fossiles datant de l'Eocène au Pliocène (**HUGLIN et SCHNEIDER, 1998**).

Avant l'apparition de l'Homme sur terre à la fin du tertiaire, soit 3 millions d'années avant l'ère chrétienne, plusieurs indices ( présence de pépins et de pollen ) prouvent que la vigne était présente en Europe occidentale et en Asie mineure (**GALET, 2000**). Au cours de quaternaire, certains espèces ont survécu aux glaciations dans des refuges épargnés par le froid ; regroupant les formes sauvage ou Lambrusque de *Vitis vinifera* dans la flore spontanée de Transcaucasie, en Grèce, en Italie, en France, en Allemagne et en Espagne au cours de Quaternaire (**REYNIER, 2007**).

Selon **REYNIER (2007)**, la culture de la vigne a débuté il y'a 5 à 6 millénaire avant J.C , à partir des refuges de Transcaucasie et d'Iran ou les Hommes se sont sédentarisée et ont découvert l'intérêt alimentaire de cette plante, qui a été multipliées par bouturage puis domestiquées par la taille, de là proviennent les cépages , c'est-à-dire des sélections faites dans les populations de Lambrusques ensuite les migrations des Hommes vers le sud (Palestine, Egypte) puis vers l'Ouest (Grèce et Empire romain) ont permis le développement de la culture de la vigne et ont assuré le transport de ses premiers cépages vers d'autres régions.

Toujours dans ce sens selon **SPAHINI et LABYS (1992)**, la culture de la vigne s'est étendue graduellement, au fil des siècles, du Moyen-Orient aux zones tempérées d'Afrique du nord et d'Europe, puis de là aux Amérique, en Afrique du sud, en Australie et en extrême orient.

Selon **LEVADOUX (1956)** il y'a des liens étroits entre les vignes sauvages et cultivées, il estime qu'il n'y a en réalité qu'une seule espèce *V.vinifera*, existant en Europe, en Asie et en Afrique du nord.

## I.2 Position systématique

La vigne est une ligneuse, appartient à la famille des vitacées, elle comprend 12 genres et 700 espèces; dont les principaux sont : *Ampélopsis* et *Parthenocissus* (vigne ornementales), *Cissus* (vigne tropicale) et le genre *Vitis* originaire des zones tempérées de l'Asie, de l'Europe et de l'Amérique (**CHAUVET et REYNIER, 1979**).



Le genre *Vitis* est le plus intéressant, il est divisé en deux sous-groupes (**CRESPY, 1992**) :

- ❖ le sous genre *Muscadinia* à  $2n=40$  chromosomes.
- ❖ le sous genre *Euvitis* à  $2n=38$  chromosomes.

La quasi-totalité des vignes cultivées fait partie de sous genre *Euvitis*, à l'intérieur duquel se distingue trois groupes (**HUGLIN 1986**) :

- ❖ groupe eurasiatique : comportant une seule espèce, *Vitis vinifera*. qui comprend des milliers de variétés cultivées.
- ❖ groupe asiatique : comprend dix espèces, la plus connue est *Vitis amurensis*.
- ❖ groupe américain : comportant plusieurs espèces, les plus importantes sont *Vitis riparia*, *Vitis rupestris*, *Vitis labrusca*, *Vitis berlandieri*.

D'après la classification phylogéniques des Angiospermes (APG III) et selon **REVEAL ET CHASE 2009**, la vigne appartient :

**Règne** : Plantae  
**Sous-règne** : Tracheobionta  
**Division** : Magnoliophyta  
**Classe** : Magnoliosida  
**Sous classe** : Rosidae  
**Ordre** : Rhamnales  
**Famille** : Vitaceae  
**Genre** : *Vitis*  
**Espec**e : *Vitis vinefera* L.

### I.3 Description Botanique

**HUGLIN** et **SCHNEIDER (1998)**, soulignent que les organes de la vigne, indépendamment de leur rôle ontogénique proprement dit, c'est-à-dire de leur influence spécifique sur le développement de la plante, la variabilité morphologique de certains de ces organes est utilisée pour la description des variétés basées sur diverses méthodes ampélographiques plus ou moins objectives.

La vigne est en effet une liane dont il faut discipliner l'allongement par une taille sévère.



**Figure 01** : Aspect général de la vigne.

### **I .3.1. Les feuilles**

Les feuilles de vigne sont découpées insérées sur le rameau au niveau des nœuds en disposition alterne par l'intermédiaire d'un

Pétiole assez long (**CRESPY, 1992**).

Elles présentent une morphologie très variable avec un sinus plus profondément échancrés chez les pieds males, le rougissement automnale est en général prononcé (**ARNOLD, 2002**).

Elles jouent un rôle physiologique important et possèdent de point de vue ampélographique des caractères propres à chaque espèce et variété (**REYNIER.2007**).



**Figure 02** : Feuille de  
Vigne

### I.3.2. Les vrilles

Les vrilles sont opposées aux feuilles, elles sont proches parents des inflorescences (SIMON, 1992), elles s'enroulent autour des supports auxquels elles sont accrochées à l'aide du renflement adhésif de leurs extrémités et se lignifient en même temps que les sarments (REYNIER, 1991) ; Elles sont d'abord herbacées, deviennent ligneuse à l'automne (GALET, 2000).



**Figure 03 :** Vrilles de vigne

### I.3.3. L'inflorescence

L'inflorescence est une grappe composée dont la dimension et la ramification dépendent de l'espèce, de la variété, de sa position sur le rameau et de la vigueur. Elle comprend un axe principal sur lequel partent des ramifications secondaires qui peuvent se ramifier à leur tour pour se terminer par un bouquet de une à deux fleur (REYNIER, 2007).



**Figure 04 :** Inflorescence de Vigne

### I.3.4. Les fleurs

Chez *Vitis vinifera*, les fleurs sont hermaphrodites, verdâtre, petites et le plus souvent elles sont pentamères (Ribereau-Gayon et Peynaud, 1971).

Elle se compose de 5 sépales avortés (calice), de 5 pétales soudés (corolle ou capuchon), de 5 étamines et d'un ovaire comprenant 2 carpelles renfermant chacun 2 ovules. La floraison de la vigne dure plusieurs jours (maximum 15). Cela dépend des cépages et des conditions climatiques essentiellement.

### **I.3.5. Les grappes et les baies**

Selon **HUGLIN** et **SCHNEIDER (1998)**, après la nouaison des fleurs, les inflorescences sont communément appelées grappes . Ces dernières sont composées d'un ensemble de ramification parmi lesquelles s'identifie, le pédoncule ou queue de raisin, l'axe principal ou rachis est les pédicelles qui portent les baies ou grains. Le rachis porte également le nom de la rafle (**GALET, 2000**).

### **I.3.6. Les bourgeons**

Tous les bourgeons de la vigne sont constitués d'écailles externes brunes plus ou moins foncées et d'une bourre blanchâtre abondante (duvet) à l'intérieur (**GALLET, 1993**).

Les bourgeons sont des rameaux en miniatures, naissant à l'aisselle des feuilles recouverts par des organes protecteurs (écailles et bourre) destinés à assurer leur protection et la pérennité de la vigne.

### **I.3.7. Tronc, bras et rameau**

Le tronc est le support de tout système végétatif aérien de la vigne, il se ramifie en plusieurs branches ou bras qui portent les tiges de l'année appelées : rameaux tant qu'elles demeurent herbacées et sarments après l'aoûtement, (**GALET, 1998 ; REYNIER, 1989**).

L'aoûtement est le passage graduel du rameau au sarment au cours du mois d'août d'où cette appellation, reconnaissable extérieurement par le passage de la teinte verte à une coloration brune, (**REYNIER, 2007**).

### **I.3.8. Les racines**

Les racines d'une souche de vigne sont des racines adventives (**HUGLIN ET SCHNEIDER, 1998**). Constituant avec la partie enterrée de la tige, la partie souterraine.

Ces racines ont avant tout un rôle d'ancrage pour la plante. Elles ont pour fonction principale de puiser dans le sol l'eau et les matières minérales nécessaires, mais également de produire des hormones de croissance : gibbérellines et cytokinines (**GALET, 2000**).

Elles constituent également un organe de réserve en accumulant les grains d'amidon synthétisés au niveau des feuilles (**HUGLIN ET SCHNEIDER, 1998 ; GALET, 2000**).

## **I .4 Multiplication de la vigne**

### **I .4.1 Multiplication par voie sexuée ou semis**

La vigne cultivée est majoritairement hermaphrodite, à cycle reproductif long, il s'écoule en général entre 3 et 5 années pour qu'un nouvel individu produise de nouveaux pépins. Le mode de reproduction de la vigne n'est pas toujours bien déterminé, la pollinisation est principalement anémophile (**GALET, 1993**). La vigne cultivée est vraisemblablement à la fois allogame et autogame, bien que les individus issus d'autofécondation soient en général peu viables (**LEVADOUX et al., 1956**). En effet, la vigne présente une très forte dépression de consanguinité et supporte généralement très mal l'autofécondation (**VALLEAU, 1916**). La reproduction sexuée a été à l'origine de la diversification variétale (**BOURSIQUOT & THIS, 1996**), et a permis de générer de nouveaux cépages (**BOWERS et al., 1999**).

### **I .4.2 Multiplication par voix asexuée**

A l'état sauvage, la vigne peut se multiplier par voie végétative sous la forme de marcottes. Une partie du sarment enterré va être capable de se bouturer et de régénérer un nouveau système racinaire (**LEVADOUX, 1956**). En viticulture, la reproduction végétative est très utilisée car elle permet la multiplication et la conservation des différents cépages sélectionnés.

Elle permet également une homogénéité de culture et le maintien de la typicité du cépage. Certains cépages très anciens possédant des qualités particulières ont ainsi pu être conservés.

Après la crise phylloxérique, les procédés de multiplication comme le bouturage et le marcottage ont été abandonnés pour être remplacés presque exclusivement par le greffage. Celui-ci peut être réalisé de plusieurs manières : en fente, à l'anglaise ou en oméga. De nouveaux procédés de multiplication par culture *in vitro* ont été mis au point chez la vigne il y a une trentaine d'années (**BOUQUET et al., 1989**).

Ces techniques sont peu utilisées par les pépiniéristes pour la multiplication dans la pratique. Cependant, c'est un moyen efficace pour restaurer du matériel sain à partir de plantes malades.

## I .5. Exigences pédoclimatiques de la vigne

La vigne est sujette à une multitude de stress de nature abiotique et biotique. Parmi les facteurs abiotique : les températures extrêmes, les gelées, les carences ou les excès en éléments minéraux essentielle ou toxiques.

Les végétaux sont également au contact de nombreux microorganismes tel que les champignons, les bactéries et les virus dont certains sont pathogène

La vigne est une espèce qui préfère les climats semi-aride et subtropicaux avec des étés secs et chauds sans précipitation et des hivers frais (**COOMBE, 2000**).

Les principales exigences de la vigne sont :

✦ Température : la température moyenne annuelle ne doit pas être inférieure à 9°C. l'optimum se situe entre 11\_16°C ; le maximum est sensiblement plus élevé. La vigne gèle vers -2.5°C en période de végétation un plant bien aouté peut supporter, lorsque le froid s'installe progressivement, des températures au-dessous de -10°C, mais à partir de -18°C, le plant est détruit (**GALET, 1991**). Les températures très élevées qui dépassent 42°C grillent la vigne.

✦ Ensoleillement : **GALET(1993)** affirme que la vigne exige des climats lumineux car ses fleurs nouent mal à l'ombre ou par temps brumeux, elle demande au moins 1200h pendant la période végétative. Les années de grandes insolation donnent des raisins sucrés. Peu acides et inversement.

✦ Précipitation : la vigne se contente de 300mm/an de pluie bien répartie. C'est ainsi que dans les sables de Sfax, **MANGONNAT(1964)** in **GALET (2000)**, a observé des vignes supportant pendant 3 années consécutives 100mm d'eau/an pour une pluviométrie moyenne de 200mm/an.

✦ Le sol : la vigne est une espèce qui s'adapte à tous types de sols, seulement il est essentiel que ceux-ci repose sur des sous-sols perméables à l'eau (**GALET, 2000**). Pour maximiser la production, le sol doit être labouré, irrigué, fertilisé et le plant taillé.



## II.1. Définition

La culture *in vitro* consiste à cultiver des tissus ou des cellules dans des conditions totalement artificielles, qui s'appliquent à des plantes entières qu'à des fragments de plantes (tissus ou organes), ainsi qu'à des cellules isolées (**AUGE, 1989**).

C'est une technique qui s'améliore progressivement, et qui promet beaucoup ; ses objectifs sont de résoudre les problèmes de reproduction et de coût de production des plants fruitiers, ainsi que de satisfaire rapidement les exigences des professionnels (**BENETTAYEB 2011**), de permettre la régénération de la plante entière autonome et fertile à partir de la propriété des cellules végétales « la totipotence » : la multiplication *in vitro* trouve son fondement dans le concept de totipotence cellulaire, énoncé au début du siècle par **HABERLANDT en 1902** : Toute cellule végétale vivante, quelle que soit sa « spécialisation » du moment qu'elle est vivante et possède un noyau, est capable de reproduire la plante entière ; d'où elle provient (**BEAUCHESNE, 1989**).

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 (micropropagations) 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 phytogénétiques (**ROSELL et VILLALOBOS, 1992**).

## II.2 Historique

Les premiers travaux de la culture *in vitro* de tissus végétaux sont dus à **HABERLANDT (1902)**, qui énonce le concept de la totipotence cellulaire.

Ainsi, il réussit à faire suivre *in vitro* pendant quelques mois mais sans multiplication, de petits amas cellulaires issus de cellule isolée de tissus palissadique de feuilles de lamier pourpre (*Lamium purpureum*).

Il a fallu attendre 1922, pour que de nouveaux espoirs apparaissent pour la culture de tissus végétaux, grâce à **ROBBINS**, qui réussit à maintenir des pointes de racines en suivie près de six mois et à obtenir des fragments qui passèrent de quelques millimètres à six centimètres de long.

En **1934**, **WHITE** réussit une culture indéfinie de racines de tomate. Ce succès fut sans doute à l'origine des résultats obtenus par **GAUTHERET (1939)**, qui réussit les premières cultures indéfinies de tissus de carotte.

En **1944**, **BUVAT**, par les techniques de culture de tissus de tabac, met en évidence de phénomène de différenciation qui aboutit à une structure cytologique comparable à celle des cellules des méristèmes.

En **1946**, **BALL** obtient la régénération de plants de lupin à partir d'apex de grande taille.

En **1956**, **SKOOG** et **MULLER** régénèrent des racines et des tiges de tabac à partir de cals, sous l'influence d'auxine et de cytokinines.

Une autre étape historique a été la guérison de plantes atteintes de maladies à virus à l'aide de la culture in vitro de méristèmes. en effet, les observations qui ont conduit à la mise au point de cette technique ont débuté avec les travaux de **WHITE en 1932**, qui a remarqué que dans les racines de tomates cultivées *in vitro* et provenant de plantes infectées par le virus de la mosaïque de tabac, le nombre de particules virales diminue régulièrement des extrémités des racines (**BOXUS, 1978**).

En **1949**, **LIMASSET** et **CORNUET** ont montré le même phénomène dans les méristèmes de tabac virosé.

En **1952**, mettant à profit ces travaux, **MOREL** et **MATIN** régénèrent des plantes entières saines de dahlia à partir de culture de méristème de plante infectés par deux virus : la mosaïque et spotted wilt virus.

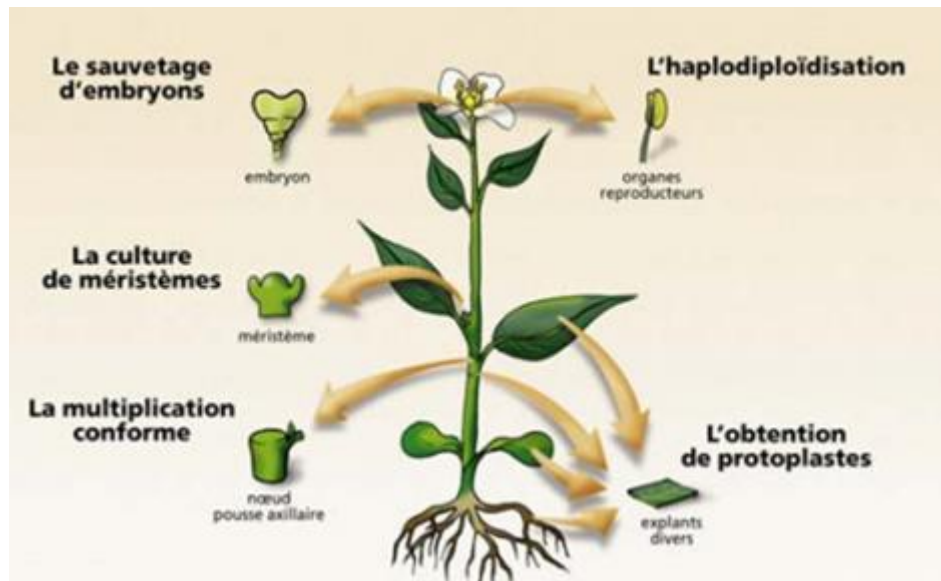
Deux ans plus tard, la même méthode permit de sauver la variété de pomme de terre « la belle de Fontenay » atteintes des virus A, Y et X (**BOXUS, 1978 ; RAJNCHAPEL-MESSAL et GUERCHE, 1985**).

Depuis lors, la culture de méristème a permis la régénération d'un grand nombre d'espèces (le framboisier, la vigne,...etc.) et l'élimination de beaucoup de viroses, (**BOXUS, 1978 ; REGNER et al., 1995**).

### II.3 Les méthodes d'applications de la culture *in vitro*

La culture in vitro d'explants ou de fragments (explant) prélevés sur la plante permet différentes applications (**Figure 05**) :





**Figure 05** : Les méthodes d'applications de la culture *in vitro*

### II.3.1 La micropropagation

D'après **AUGE et BOCCON\_GIBBOD, (1989)** ; **FERRY et al., (1998)** ; **SEMAL (1998)**, la micropropagation est utilisée dans un but de multiplication en masse, puisqu'elle permet, en partant d'un seul individu (plant), l'obtention d'un nombre considérable de plantes génétiquement identiques à la plante mère. C'est une technique qui consiste à reproduire des plantes semblables à la plante mère par la stimulation des capacités naturelles de multiplication végétatives de l'espèce, ou par l'induction d'une nouvelle organogénèse de bourgeons et de racine.

### II.3.2 La culture de méristèmes

La culture de méristèmes consiste une autre application importante de la *culture in vitro*, notamment pour l'éradication des maladies à virus (**MARTIN, 1985** ; **REGNER et al., 1995**).

Elle a été mise au point et utilisée pour la première fois, par **MOREL et MARTIN (1952 à 1955)**, avec le dahlia et la pomme de terre (**MARGARA, 1989**).

Les méristèmes sont formés de cellules non différenciées à l'origine de tous les tissus de la plante. La mise en culture in vitro des méristèmes permet d'obtenir une plante identique à la plante initiale ; l'intérêt des méristèmes réside dans le fait que ce sont des structures indemnes de virus capable de donner des plantes saines (**HELLER et al., 1995**).

### II.3.3 L'embryogenèse somatique

L'aptitude de cellule végétale somatique à se développer en embryon somatique est connue depuis longtemps, mais depuis les années 80 l'embryogenèse somatique connaît un intérêt croissant, car elle apparait dans beaucoup de cas comme la meilleure méthode de multiplication végétative (**TEOULE, 1993**).

L'intérêt essentiel des recherches sur l'embryon somatique a été démontré que la capacité de reproduire un nouvel individu est une aptitude fondamentale de la cellule végétale (**ZRYD et al., 1988 ; MARGARA, 1989**).

L'embryon est défini comme étant une plante à son stade initial de développement, il s'agit en fait d'une structure bipolaire (axe tige – racine) ou s'individualisent rapidement et simultanément deux méristèmes, l'un rhizogène, l'autre caulinaire, qui suite au processus de germination donne naissance à une nouvelle plante (**MARGARA, 1989**).

. L'embryon zygotique est un embryon issu de la fécondation de l'oosphère (peuvent également se développer à partir de cellules du sporophyte ou du gamétophyte).

. L'embryon somatique est un embryon issu de développement in vitro d'une cellule somatique à n chromosomes (embryons qui ne sont pas le produit d'une fusion gamétique).

Selon **SHARP et al (1980)** décrivent deux voies pour l'embryogenèse somatique:

La première dite est l'embryogenèse directe où les embryons sont initiés à partir de tissus en absence de prolifération de cal. Ceci se produit à partir des cellules pré-embryogéniques déterminées (P.E.D.C) ou les cellules sont déjà engagées dans un développement embryogène et ils ont besoins seulement d'être libérées (**PIATTI, 1988; ROUGET, 1989**). Elle semblent préexister dans les tissus de certains explants comme les embryons immatures ou les fragments de très jeunes plantes (**SAADI, 1991**).

La seconde dite est l'embryogenèse somatique indirecte, pour la quelle une prolifération cellulaire est requise. Les travaux de **SHARP (1980)** et **d'EVANS (1981)** ont également pu servir à mettre en évidence, l'existence de cellules initiatrices qui sont déjà différenciées mais dépourvues de capacité embryogènes. Ils les nomment des cellules pré-embryogènes indéterminées (PEIC). Les cellules embryogènes apparaissent tardivement au sein du cal produit par la réactivation mitotique des cellules différenciées et/ ou la prolifération des cambiums obtenus à partir d'explants de type racines, tige ou de feuille (**JULLIEN,1991 ; RUGKHLA et JONES , 1998**). Leurs multiplications aboutit à la formation de groupes de cellules embryogènes "nodules méristématiques" dispersés, parmi les autres cellules du cal et qui sont généralement de type parenchymateux. A la suite de leur repiquage sur des milieux dépourvus d'auxines, ces nodules évoluent en des embryons somatiques (**SAADI,1991**).

### **II .3.3.1 Intérêt de l'embryogenèse somatique**

Historiquement , les premiers embryons somatiques ont été signalés, en 1958, par l'équipe de **REINERT & STUART** sur des cultures du parenchyme libérien de racine de carotte (**BELANGER, 1998**). Depuis et grâce au progrès spectaculaire que connaît les techniques de cultures *in-vitro*, la production d'embryons somatiques est devenue possible chez un grand nombre d'espèces végétales.

Comparativement aux autres voies de multiplication végétative *in-vitro* , l'embryogenèse somatique se montre plus séduisante en terme de performance et d'efficacité (**HARKMAN et ARNOLD , 1985 ; PIATTI, 1988**). En effet, la maîtrise de la production d'embryons, chez certaines espèces, via les suspensions cellulaires permet d'obtenir des milliers d'embryons par litre de milieu de culture et par conséquent la régénération de milliers de plants. L'embryogenèse somatique permet aussi en un temps très court de produire des plantes entières sans passer par les contraintes que connaît habituellement l'organogenèse (phase de caulogenèse et de rhizogenèse). Ainsi la voie de l'embryogenèse somatique est actuellement intégrée dans de nombreux schémas de sélection puisqu'elle permet de diminuer sensiblement la longueur des cycles d'amélioration, comme par exemple, le temps nécessaire à la valorisation du matériel sélectionné âgé ou juvénile ou la production de parents hybrides nécessaires à la diffusion de nouvelles variétés (**DAIKH et DEMARLY, 1987 ; ROGUET, 1989**).

### II.3.4 Culture des protoplastes

Un protoplaste est une cellule chlorophyllienne isolée et débarrassée de sa paroi squelettique. Ces protoplastes sont des matériaux de base très intéressants pour la recherche sur le fonctionnement cellulaire. Ils permettent également la réalisation d'hybride somatique après leur fusion (**BOUTHERIN et BRON, 2002**).

L'intérêt de la technique réside dans le fait qu'il est possible d'introduire dans un délai assez court des molécules assez diverses telles que l'AND des organites (**CAMARA et KESSAR, 2004**).

### II.4 Les conditions de la 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 :

#### II.4.1 composition des milieux de culture

##### ✓ sel minéraux

-macroéléments : il s'agit de six éléments minéraux présents à des concentrations élevées tel que l'azote (N), le calcium (Ca), soufre (S), phosphore (P), magnésium (Mg), et le potassium (K).

-microéléments : ou oligoéléments, principalement : le fer (Fe), le cuivre (Cu), le zinc (Zn), le manganèse (Mn), le molybdène (Mo), le bore (B), le chlore (Cl), le cobalt (Co), et le nickel (Ni). Sont nécessaires à la plante qu'en faible concentration

##### ✓ les sucres

Dans le cas des tissus végétaux placés en culture *in vitro*, l'assimilation chlorophyllienne est nulle ou insuffisante pour assurer la survie et le développement de l'explant ; l'adjonction des sucres

(le plus souvent du saccharose) dans le milieu de culture est nécessaire pour fournir à l'explant une source de carbone (**GAUTHERET, 1959**).

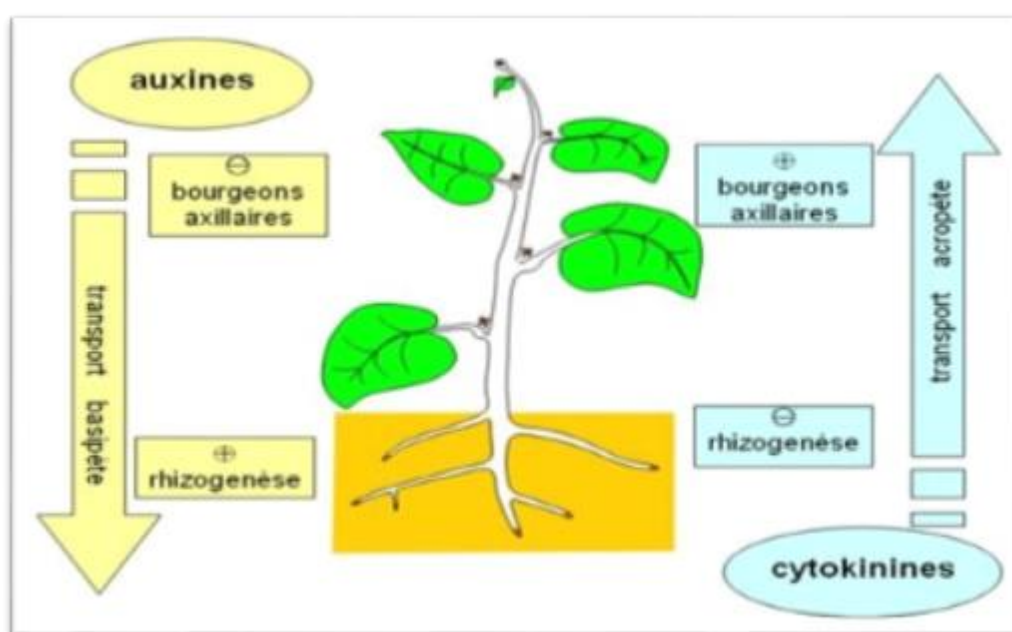
##### ✓ Les vitamines

L'emploi de diverses vitamines favorise fréquemment le développement des cultures in vitro, elle appartient surtout au groupe B, les plus courantes sont : la vitamine B1 (la thiamine-HCl),

la vitamine B6 (la pyridoxine), la biotine, la pantothénate de calcium et le myo-inositol (GAUTHERET, 1959).

### ✓ Les régulateurs de croissance

Appelés généralement hormones de croissance, les tissus présentent des besoins spécifiques vis-à-vis des régulateurs de croissance (**Figure 06**). En effet, ces substances ont une influence très sensible sur la croissance ou le développement des tissus pour de très faibles variations de concentration (de l'ordre du 1/100 mg/l).



**Figure 06** : type d'organogénèse contrôlée par les concentrations relatives d'auxines et cytokinines

#### ▪ Les auxines

L'auxine est un composé à noyau indole dont la formule brute est  $C_{10}H_8O_9N$ , dont le nom est Acide Indole Acétique (AIA) ; la synthèse de l'auxine se situe au niveau des très jeunes feuilles, dans les bourgeons en activité, au niveau des ébauches florales et des jeunes fruits.

De nombreux composés de synthèse présentent des propriétés similaires à celle de l'auxine naturelle l'AIA : Acide 2,4-dichlorophénoxyactique (2,4-d), Acide Indole 3 butyrique (AIB), Acide 1 Naphtalène Acétique (ANA).

Les auxines stimulent l'élongation des tiges, la différenciation et la croissance des racines, la maturation des fruits et l'abscission des feuilles et des fruits (**ZRYD et al., 1988 ; AUGÉ, 1989 ; HELLER et al., 1995**).

- **Les cytokinines**

Les cytokinines sont des adénines substituées dont la zéatine (Zéa) est naturelle ; élaboré essentiellement par les racines et au niveau des embryons.

Les cytokinines les plus généralement utilisées sont :

La kinétine (Kin), la benzyladénine (BAP), la 2 isopentényl adénine (2IP), le thidiazuron (TDZ) , elles sont synthétisées dans les tissus de croissance active plus particulièrement dans les racines, les embryons et les fruits (**ZRYD et al., 1988 ; HELLER et al., 1995**).

Les cytokinines sont souvent utilisées pour stimuler la prolifération des tissus en culture, déclencher la néoformation des bourgeons sur des cals.

- **les gibbérellines**

En culture des tissus, seul l'acide gibbérellique (GA3) est utilisé, il favorise la croissance cellulaire, l'allongement des entre nœuds et la levée de la dormance des grains (**HELOIR, 1999**).

## **II.4.2 Les facteurs de milieu**

### **a. Stérilisation**

Les conditions stériles sont obtenues par une désinfection des explants, une stérilisation du milieu de culture et des flacons ou tubes de culture. Les différentes opérations de mise en culture sont réalisées dans un environnement stérile obtenu par une hotte à flux laminaire horizontal : de l'air stérile est propulsé vers le vitroculteur. Les conditions stériles sont primordiales à obtenir afin qu'aucun champignon ou bactérie ne viennent coloniser les milieux de culture, très favorables à leur prolifération, sous peine de nécrose de l'explant.

### **b. La lumière et la photopériode**

La lumière est un facteur déterminant pour la culture *in vitro* des plantes, elle a une grande influence de par 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 (500à 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 apparait souvent préférable d'augmenter l'intensité de l'éclairage (par exemple 10000 lux) (**MARGARA, 1989**).

### **c. La température**

La température de beaucoup de chambres à culture est constante de l'ordre de 22° à 25° C (**MARGARA, 1989**).

## **II.5 Avantages et inconvénients de la technique**

Par rapport aux méthodes conventionnelles de multiplication, la technique de la culture *in vitro* présente des avantages et des inconvénients lesquels sont donnés dans le Tableau I.

**Tableau I : Avantage et inconvénients des techniques de culture *in vitro***

Techniques	Avantages	Inconvénients
Culture de méristème	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Obtention de plants sains.</li> <li>- Rajeunissement de plants.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Taux de réussite faible</li> </ul>
Micropropagation	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Production et multiplication rapide des plants.</li> <li>- Sauvetage des espèces en voie de disparition.</li> <li>- Production continue indépendante des saisons.</li> <li>- Homogénéité génétique des plants régénérés.</li> <li>- Simplification de certains schémas de certification.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Cout élevé du vitroplant par rapport à celui multiplié par les méthodes traditionnelles.</li> </ul>
Embryogenèse somatique	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Les embryons somatiques peuvent être encapsulés et traités comme des graines artificielles.</li> <li>- Obtention de plants possédant de nouveaux caractères.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Régénération difficile chez certaines espèces</li> <li>- Apparition de mutants.</li> </ul>
Culture de protoplastes	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Introduction et création de nouvelles variétés.</li> <li>- Limite l'incompatibilité inter ou intra spécifique entre les espèces.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Technique difficile à réaliser</li> <li>- Augmentation de mutants.</li> </ul>

(BIGOT, 1984 ; GENEVES, 1992 ; HAICOUR , 2003).



Notre travail a été réalisé au niveau du laboratoire d'amélioration des plantes de l'Institut Technique de l'Arboriculture Fruitière et de la Vigne (ITAF) à Tessala El Merdja (Alger) durant la période février-juillet (2016).

L'objectif de notre étude est la mise en culture *in vitro* de deux cépages de vigne (Tadlith et Ferrana), par l'embryogénèse somatique, dans deux milieux de culture (**MURASHIGE et SKOOG (1962)** et **CHEE et POOL (1987)**), et avec différentes balances hormonales, en utilisant trois types d'explants : l'ovaire, l'étamine et les boutons floraux

## **I.1. Matériel**

### **I.1.1. Matériel biologique**

#### **I.1.1.1 Matériel végétal**

Le matériel végétal utilisé au cours de notre expérimentation est représenté par des boutons floraux immatures (**Figure 07**) de la vigne (*Vitis vinefera*), de deux cépages autochtones Ferrana et Tadlith (**Annexe 01**). Ces échantillons ont été récoltés de la station expérimentale de Benchicao (Médéa), en Avril 2016 (la matinée).

Pour chaque cépage, l'échantillonnage a été réalisé sur le même pied.



**Figure 07** : Grappe de boutons floraux de Ferrana

## I.1.2. Matériel non biologique

### I.1.2.1 Milieux de culture

Nous avons testé deux milieux de culture :

- ♣ Milieu de **MURASHIGE et SKOOG (1962) (Annexe 02)**
- ♣ Milieu de **CHEE et POOL (1987) (Annexe 03)**

Dans tous les essais, la source énergétique de carbone est le saccharose à raison de 30 g/l  
Différents régulateurs de croissance ont été utilisés : deux cytokinine (BAP : 6-Bnzylaminopurin et TDZ : Thidia zuron) et une auxine (NOA : Acide 2-naphthoxyacétique) (**Tableau II**) à des Concentrations variables.

#### a. Composition de milieu MURASHIGE et SKOOG (MS) (1962)

<b>MACROÉLÉMENTS</b>	<b>MICROÉLÉMENTS</b>
KNO <sub>3</sub> .....1900mg/l	MnSo <sub>4</sub> .4H <sub>2</sub> O.....22,3mg/l
CaCl <sub>2</sub> .2HO.....440mg/l	ZnSo <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O.....8,6mg/l
MgSo <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O.....370mg/l	H <sub>3</sub> Bo <sub>3</sub> .....6,2mg/l
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> .....170mg/l	CuSo <sub>4</sub> .5H <sub>2</sub> O.....0,025mg/l
NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub> .....1650mg/l	Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> .2H <sub>2</sub> O.....0,25mg/l
	COCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O.....0,025mg/l
	KI.....0,83mg/l
<b>CHELATES DE FER</b>	<b>VITAMINES</b>
Pour 10ml de Chélate	Myoisitol.....100mg/l
FeSo <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O .....27,85mg	Acidenicotinique.....0,5mg/l
Na EDTA .....37,25mg	Pyridoxine HCL.....0,5mg/l
	Thiamine HCL.....1mg/l
	Glycine.....2mg/l

**AUTRES**

Saccharose .....	30g
Agar .....	7g
Ph .....	5,7-5,8

**b. Composition de milieu CHEE and POOL (1987)****MACROÉLÉMENTS**

KNO <sub>3</sub> .....	1900mg/l
NH <sub>4</sub> NO <sub>4</sub> .....;	1650mg/l
NH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> .....;;;	470mg/l
MgSo <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O.....;;;	100mg/l
Ca(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> .....	492.30mg/l

**MICROÉLÉMENTS**

COCl <sub>2</sub> .H <sub>2</sub> O.....	0,25mg/l
CuSo <sub>4</sub> .5H <sub>2</sub> O.....	0,25mg/l
H <sub>3</sub> Bo <sub>3</sub> .....;	6,2mg/l
MnSo <sub>4</sub> .H <sub>2</sub> O.....	10,85mg/l
Na <sub>2</sub> Mo <sub>4</sub> .H <sub>2</sub> O.....	0,25mg/l
ZnSo <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O.....	8,6mg/l

**CHELATES**

Pour 10ml de Chélate	
FeSo <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O .....	27,85mg
NaEDTA .....	37,25mg

**VITAMINES**

Myoisitol.....	100mg/l
Acide nicotinique.....	0,5mg/l
Pyridoxine HCL.....	0,5mg/l
Thiamine HCL.....	1mg/l
Glycine.....	2mg/l

**AUTRE**

Saccharose .....	30g
Agar .....	7g
Ph .....	5,7-5,8

**Tableau II** : Balances hormonales utilisé.

<b>MURASHIGE et SKOOG (1962)</b>			
Hormone Milieu	BAP (mg/l)	NOA (mg/l)	TDZ (mg/l)
Ms0	0	0	0
Ms 1	1	2	0
Ms 2	1	1	0
Ms 3	0	4	0,09
<b>CHEE et POOL (1987)</b>			
	BAP (mg/l)	NOA (mg/l)	TDZ (mg/l)
CP0	0	0	0
CP1	1	2	0
CP2	1	1	0
CP3	0	4	0,09

## I.2.Methodes

### I.2.1 Préparation des milieux de culture

Les milieux de culture utilisés comprennent les sels minéraux (macro et microéléments), de l'eau, des vitamines, une source de carbone ainsi que des régulateurs de croissance.

Certains composés comme les macroéléments, les oligo-éléments, les vitamines et les hormones de croissance, sont utilisés en petite quantité, qu'il n'est pas possible de les peser à chaque préparation de milieu. Il faut donc utiliser des solutions concentrées des produits entrant dans la composition du milieu et que nous diluons de façon adéquate. Ces solutions concentrées sont appelées « solutions-mères ».

Les différentes solutions mères utilisées sont (**Annexe 04**)

- la solution mère du macroélément concentré 10 fois.
- la solution mère des microéléments concentrée 100 fois.
- la solution mère des chélates de fer concentrés 100 fois.
- la solution mère des vitamines concentrée 10 fois.
- la solution mère des hormones de croissance.

Le pH de des milieux de culture est ajusté à 5,7 - 5,8 avec une solution d'acide

chlorhydrique HCL de 0,1N ou une solution de soude (NAOH) à 0,1N selon le cas.

Les milieux de culture sont ensuite solidifiés par 7 g/l d'agar (milieu solide) et distribué dans des boucaux en verre de conserve autoclavables à raison de 100 ml par bocal.

Le milieu autoclavé au préalable est versé dans des boites sous une hotte à flux laminaire horizontal à raison de 25ml par boite de 9cm de diamètre. Par la suite, les boites de pétri sont scellées par du paraflm et conservées dans la chambre de culture à température ambiante ( $24^{\circ} \pm 2$ ).

## **I.2.2. Stérilisation du matériel**

La technique de culture *in vitro* exige beaucoup de soin afin d'éviter tout type de contaminations et pour des cultures en conditions d'asepsie.

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

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

- toutes les manipulations se font sous hotte à flux laminaire horizontal.
- l'eau distillée servant au rinçage du matériel végétal est stérilisée à l'autoclave à 120° C pendant 60 minutes.
- les pinces, scalpels, bistouris et toute la verrerie sont stérilisés à l'étuve à 180°C pendant une heure.

### **I.2.2.2 Stérilisation des milieux de culture**

Les milieux utilisés sont stérilisés à l'autoclave à 120°C, sous une pression de 1 bar pendant 20 minutes avant d'être distribué sous hotte.

### **I.2.2.3 Stérilisation du matériel végétal**

La stérilisation du matériel végétal est réalisée sous hotte à flux laminaire.

La désinfection des explants est réalisée selon 3 essais par l'hypochlorite de sodium à 7% additionné de deux gouttes de Tween20 en tant qu'agent mouillant, en modifiant la durée de trempages des fleurs dans l'alcool 70 (**Tableau III**), afin de retenir la plus appropriée à notre matériel.

**Tableau III** : Les essais de désinfection du matériel végétal utilisé

1 <sup>er</sup> essai	2 <sup>ème</sup> essai	3 <sup>ème</sup> essai
<ul style="list-style-type: none"> <li>- Lavage des explants à l'eau du robinet</li> <li>- Trempage dans l'alcool à 70° / 1min</li> <li>- Trempage dans l'hypochlorite de sodium à 7% / 15min</li> <li>- Rinçage à l'eau distillé stérile 3 fois / 10 min.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Lavage des explants à l'eau du robinet</li> <li>- Trempage dans l'alcool à 70° / 1min</li> <li>- Trempage dans l'hypochlorite de sodium à 7% / 10min</li> <li>- Rinçage à l'eau distillé stérile 3 fois / 10 min.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Lavage des explants à l'eau du robinet</li> <li>- Trempage dans l'alcool à 70° / quelques secondes</li> <li>- Trempage dans l'hypochlorite de sodium à 7% / 10min</li> <li>- Rinçage à l'eau distillé stérile 3 fois / 10 min.</li> </ul>

Une fois la stérilisation est terminée nous passons à la mise en culture des fleurs.

### **I.2.3. Prélèvement et mise en culture de l'explant**

#### **1.2.3.1 Ovaires**

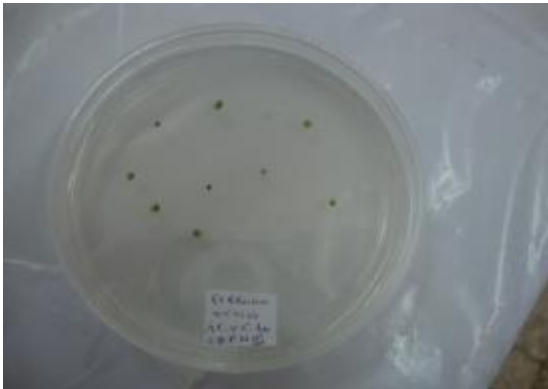
Les explants sont isolés aseptiquement sous loupe binoculaire équipé de lumière, à l'aide de fragments de lames de rasoirs nous avons prélevé soigneusement les ovaires, les autres parties sont éliminées à l'aide d'une pince et un scalpel stérile, 8 explants par boîte de pétri Avec 2 répétitions pour (Ms0 et CP0) et 4 répétitions pour chaque milieu (Ms1, Ms2, Ms3 et CP1, CP2, CP3) (224 au total) (**Figure 08**).

#### **1.2.3.2 Etamines**

Les explants sont isolés aseptiquement sous loupe binoculaire équipé de lumière, à l'aide de fragments de lames de rasoirs nous avons prélevé soigneusement les étamines, 8 explants par boîte de pétri Avec 2 répétitions pour (Ms0 et CP0) et 4 répétitions pour chaque milieu (Ms1, Ms2, Ms3 et CP1, CP2, CP3) (224 au total) (**Figure 09**).

#### **1.2.3.3 boutons floraux**

Les fleurs sont coupées longitudinalement et mise en culture dans les boîtes de pétri à raison de 8 explants Avec 2 répétitions pour (Ms0 et CP0) et 4 répétitions pour chaque milieu (Ms1, Ms2, Ms3 et CP1, CP2, CP3) (224 au total) (224 au total). La surface de la coupe doit être en contact avec le milieu de culture .



**Figure 08** : La mise en culture des ovaires



**Figure 09** : Etamines sous la loupe

Binoculaire

Après la mise en culture, les boîtes de pétri sont scellées avec du parafilm et placées dans la chambre de culture à une température ( $24^{\circ}\pm 2$ ) avec une photopériode de 16h de lumière et 8h d'obscurité (**Figure 10**).



**Figure 10** : Les boîtes de pétri déposées dans la chambre de culture

Les observations ont été faites chaque 3 jour depuis la mise en culture, les paramètres étudiés sont :

- La callogénèse
- Le dessèchement
- Les contaminations

## I. Résultat de la désinfection des explants

Les résultats de la désinfection des explants sont illustrés dans le Tableau IV

**Tableau IV** : Essais de désinfection du matériel végétal

paramètres Essais	Méthode de désinfection	Effectif	Nombre d'explant desséché	% Taux de dessèchement	% Taux de contamination
1 <sup>er</sup> essai	- Trempage à l'alcool /1min - Trempage à l'hypochlorite de sodium/ 15min	48	48	100	0
2 <sup>ème</sup> essai	- Trempage à l'alcool/ 1min -Trempage à l'hypochlorite de sodium / 10min	48	43	89,58	8,33
3 <sup>ème</sup> essai	- Trempage à l'alcool /quelques secondes - Trempage à l'hypochlorite de sodium/ 10min	48	6	12,5	4,16

Nous avons testé l'effet de la désinfection des explants par l'hypochlorite de sodium et l'alcool à des temps de trempages variable.

Pour la désinfection à base d'hypochlorite de sodium à 7% pendant 15min et une durée de trempage à l'alcool 70° pendant 1min , montre un taux de dessèchement total (100%) par contre, nous constatons un faible pourcentage de dessèchement (12,5%) lorsque nous avons diminuées le temps de trempage à l'hypochlorite de sodium 7% à 10min et le trempage à l'alcool pour quelques secondes.

Selon **BENIN et al. (1988)**, la vigne est parmi les espèces ayant dans leurs tissus des quantités importantes des produits phénoliques de type orthophénols et les tannins.



Ces composés sont considérés comme des antagonistes aux substances de croissance et inhibiteurs des réactions métaboliques.

D'après **MARGARA (1989)**, le brunissement de l'explant est dû à la sécrétion des composés phénoliques qui provoquent une inhibition de la croissance.

Selon **BOCCON-GIBOD (1989)**, l'utilisation de l'hypochlorite de calcium est plus favorisé, car il ne pénètre pas dans les tissus, contrairement à l'hypochlorite de sodium où les ions de sodium peuvent dans certains cas gêner la croissance, d'où le brunissement et le dessèchement des tissus mise en culture *in vitro*.

## II. Résultats de la mise en culture

### II.2 La variété Tadmith

#### II.2.1. Résultats de la mise en culture de l'ovaire

Après la mise en culture de l'ovaire dans les deux milieux de cultures (**MURASHIGE et SKOOG (1962)** et **CHEE et POOL (1987)**), nous avons obtenu les résultats cités dans le Tableau V.

**Tableau V** : Résultats de la mise en culture des ovaires de la variété Tadmith dans les deux milieux utilisés

<b>Milieu MURASHIGE et SKOOG (1962)</b>				
paramètres milieux	Effectif	% de callogénèse	% de dessèchement	% de contamination
<b>Ms 0</b> Sans hormones	16	0	100	0
<b>Ms 1</b> (1ml BAP+2ml NOA)	32	25	75	25
<b>Ms 2</b> (1ml BAP+1ml NOA)	32	3,125	71,875	25
<b>Ms 3</b> (4ml NOA+0,09 TDZ)	32	0	62,5	37,5
<b>Milieu CHEE et POOL (1987)</b>				
	Effectif	% de callogénèse	% de dessèchement	% de contamination
<b>CP 0</b> Sans hormones	16	0	100	0
<b>CP 1</b> (1ml BAP+2ml NOA)	32	0	25	75
<b>CP 2</b> (1ml BAP+1ml NOA)	32	0	62,625	34,375
<b>CP 3</b> (4ml NOA+0,09 TDZ)	32	0	50	50

Il ressort du Tableau IV, que l'initiation à la callogénèse de la variété Tadmith diffèrent selon la combinaison hormonale :

- l'utilisation du milieu Ms sans hormones n'entraîne aucune formation de cal, malgré la composition complexe du milieu de base Ms en sels minéraux, ceci pourrait être attribué à l'absence des rapports BAP/NOA dans le milieu de culture.

- Nous avons observé une meilleure réponse au niveau de Ms 1 (1ml BAP + 2ml NOA) avec un pourcentage de 25%, par contre le milieu Ms2 (1ml BAP + 1ml NOA), a permis un faible développement des cals (3,125%).

Dans le milieu **CHEE et POOL** avec ou sans hormones aucun déclenchement à la callogénèse n'a été observé.

### II.2.2. Résultats de la mise en culture des étamines

Après la mise en culture des étamines dans les deux milieux de cultures (**MURASHIGE et SKOOG (1962)** et **CHEE et POOL (1987)**), nous avons obtenu les résultats cités dans le Tableau VI.

**Tableau VI** : Résultats de la mise en culture des étamines de la variété Tadmith sur les deux milieux utilisés

<b>Milieu MURASHIGE et SKOOG (1962)</b>				
paramètres milieux	Effectif	% de callogénèse	% de dessèchement	% de contamination
<b>Ms 0</b> Sans hormones	16	0	100	0
<b>Ms 1</b> (1ml BAP + 2ml NOA)	32	37,5	37,5	25
<b>Ms 2</b> (1ml BAP + 1ml NOA)	32	6,25	68,75	25
<b>Ms 3</b> (4ml NOA + 0,09 TDZ)	32	0	93,75	6,25
<b>Milieu CHEE et POOL (1987)</b>				
	Effectif	% de callogénèse	% de dessèchement	% de contamination
<b>CP 0</b> Sans hormones	16	0	100	0
<b>CP 1</b> (1ml BAP + 2ml NOA)	32	0	100	0
<b>CP 2</b> (1ml BAP + 1ml NOA)	32	0	100	0
<b>CP 3</b> (4ml NOA + 0,09 TDZ)	32	0	75	25

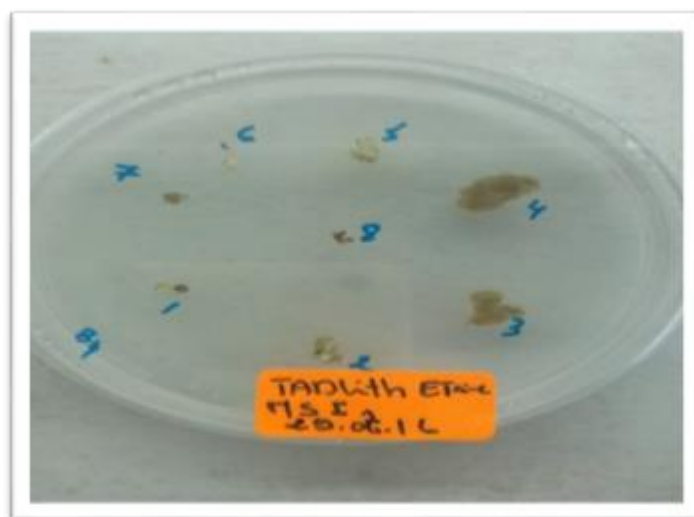
D'après ces résultats, le déclenchement de la callogénèse a été constaté chez la variété Tadhith, 6 semaines après la mise en culture des explants dans le milieu Ms1 (1ml BAP + 2ml NOA) et Ms2 (1ml BAP + 1ml NOA).

Le milieu Ms2 a donné meilleur résultat avec un taux de callogénèse de 37,5% (**Figure12**).

La diminution de la concentration en NOA entraîne un faible taux de callogénèse.

L'utilisation de la TDZ de combinaison avec la BAP dans le milieu Ms3, n'a donné aucun résultat de callogénèse, ainsi 93,75% des explants ont subi un dessèchement.

Aucune manifestation de callogénèse n'a été observée dans le milieu **CHEE et POOL**, par contre, après 4 semaines de culture, un brunissement a été constaté sur la majorité des explants ensemencés dans ce milieu.



**Figure 11** : Cals produits par les étamines de la variété Tadhith sur le milieu Ms

### II.2.3. Résultats de la mise en culture des boutons floraux

Après la mise en culture des boutons floraux dans les deux milieux de cultures (**MURASHIGE et SKOOG (1962)** et **CHEE et POOL (1987)**), nous avons obtenu les résultats cités dans le Tableau VII.

**Tableau VII** : Résultat de la mise en culture des boutons floraux de la variété Tadmith sur les deux milieux utilisés

<b>Milieu MURASHIGE et SKOOG (1962)</b>				
paramètres milieux	Effectif	% de callogénèse	% de dessèchement	% de contamination
<b>Ms 0</b> Sans hormones	16	0	100	0
<b>Ms 1</b> (1ml BAP+ 2ml NOA)	32	3,125	46,875	50
<b>Ms 2</b> (1ml BAP + 1ml NOA)	32	21,875	28,125	50
<b>Ms 3</b> (4ml NOA + 0,09 TDZ)	32	28,125	46,875	25
<b>Milieu CHEE et POOL (1987)</b>				
	Effectif	% de callogénèse	% de dessèchement	% de contamination
<b>CP 0</b> Sans hormones	16	0	100	0
<b>CP 1</b> (1ml BAP + 2ml NOA)	32	0	25	75
<b>CP 2</b> (1ml BAP + 1ml NOA)	32	0	96,875	3,125
<b>CP 3</b> (4ml NOA + 0,09 TDZ)	32	0	28,125	71,875

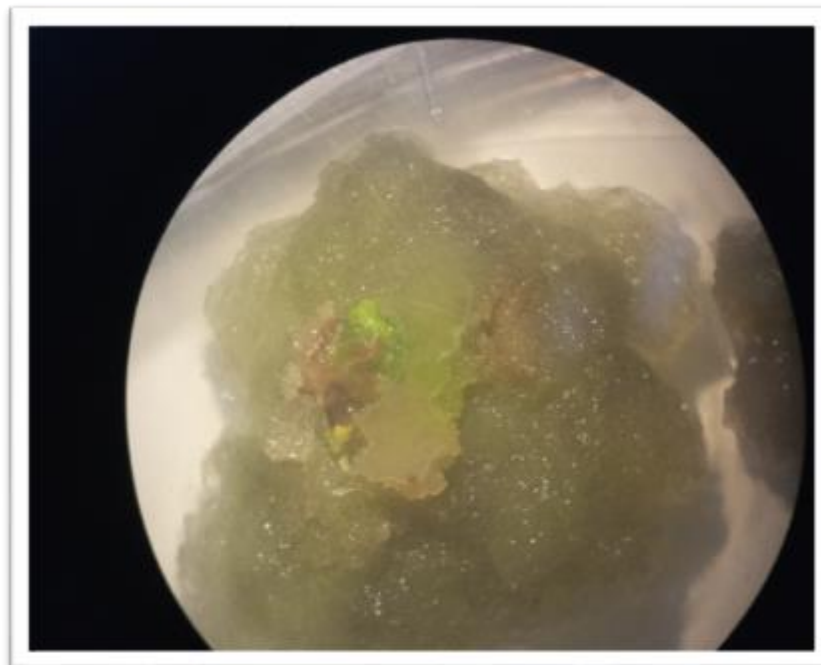
Selon le Tableau VII le taux de dessèchement est maximal (100%) dans les milieux sans hormones et les milieux **CHEE et POOL (1987)**.

seul les milieux Ms avec les différents balances hormonales que les explants ont permis le développement des boutons floraux, avec un meilleur résultats (28,125%) dans le milieu Ms3 (4ml NOA + 0,09 TDZ)

La nature de cal obtenue après 6 semaines de la culture est friable et de couleur verdâtre (**Figure 13 et 14**).



**Figure 12** : Cals produits par des boutons floraux de Tadlith, cultivés sur le milieu Ms



**Figure 13** : Cal de la variété Tadlith observé sous loupe binoculaire

### II.3. Résultats de la variété Ferrana

#### II.3.1 Résultat de la mise en culture des ovaires

Après la mise en culture des ovaires dans les deux milieux de cultures (**MURASHIGE et SKOOG (1962)** et **CHEE et POOL (1987)**), nous avons obtenu les résultats cités ci-dessous.

**Tableau VIII** : Résultat de la mise en culture des ovaires de la variété Ferrana sur les deux milieux utilisés

<b>Milieu MURASHIGE et SKOOG (1962)</b>				
paramètres milieux	Effectif	% de callogénèse	% de dessèchement	% de contamination
<b>Ms 0</b> Sans hormones	16	0	100	0
<b>Ms 1</b> (1ml BAP + 2ml NOA)	32	0	81,25	18,75
<b>Ms 2</b> (1ml BAP+ 1ml NOA)	32	0	50	50
<b>Ms 3</b> (4ml NOA + 0,09 TDZ)	32	0	100	0
<b>Milieu CHEE et POOL (1987)</b>				
	Effectif	% de callogénèse	% de dessèchement	% de contamination
<b>CP 0</b> Sans hormones	16	0	100	0
<b>CP 1</b> (1ml BAP + 2ml NOA)	32	0	100	0
<b>CP 2</b> (1ml BAP + 1ml NOA)	32	0	100	0
<b>CP 3</b> (4ml NOA + 0,09 TDZ)	32	0	75	25

Le résultat montré dans le tableau VIII montre que la variété Ferrana n'a pas donné de réponse de callogénèse à aucun milieu utilisé. En revanche le taux de dessèchement a pu atteindre les 100% dans la majorité des milieux, cette incapacité d'exprimer un cal est liée au génotype de l'espèce. Accompagné d'un taux élevé de contamination dans le milieu Ms1 et Ms2 (18,75% et 50%) respectivement.

### II.3.2 Résultats de la mise en culture des étamines

Après la mise en culture des étamines dans les deux milieux de cultures (**MURASHIGE et SKOOG (1962)** et **CHEE et POOL (1987)**), nous avons obtenu les résultats cités dans le tableau IX.

**Tableau IX** : Résultats de la mise en culture des étamines de la variété Ferrana sur les deux milieux utilisés

<b>Milieu MURASHIGE et SKOOG (1962)</b>				
paramètres milieu	Effectif	% de callogénèse	% de dessèchement	% de contamination
<b>Ms 0</b> Sans hormones	16	0	100	0
<b>Ms 1</b> (1ml BAP + 2ml NOA)	32	0	78,125	21,875
<b>Ms 2</b> (1ml BAP + 1ml NOA)	32	0	62,5	37,5
<b>Ms 3</b> (4ml NOA + 0,09 TDZ)	32	0	75	0
<b>Milieu CHEE et POOL (1987)</b>				
	Effectif	% de callogénèse	% de dessèchement	% de contamination
<b>CP 0</b> (sans hormones)	16	0	100	0
<b>CP 1</b> (1ml BAP + 2ml NOA)	32	0	93,75	6,25
<b>CP 2</b> (1ml BAP + 1ml NOA)	32	0	75	25
<b>CP 3</b> (4ml NOA + 0,09 TDZ)	32	0	81,25	18,75

Nous avons constaté que le taux de dessèchement est liée avec la concentration de NOA, en effet nous avons noté un dessèchement de 62% dans les milieux Ms2 (1ml BAP + 1ml NOA) et 75% dans Ms3 (4ml NOA + 0,09 TDZ). De même pour les milieux **CHEE et POOL** avec 93,75% dans CP1 et 81,25% dans le milieu CP3.

Le taux de contamination est lié à la durée des culture qu'elle est long (30 jours au maximum), et les milieux sont relativement riches et très favorables au développement des bactéries et des champignons dont la croissance bien plus rapide que celle du tissu végétale, aboutit à l'envahissement de la culture,

### II.3.3. Résultats de la mise en culture des boutons floraux

Après la mise en culture des boutons floraux dans les deux milieux de cultures (**MURASHIGE et SKOOG (1962)** et **CHEE et POOL (1987)**), nous avons obtenu les résultats cités ci-dessous.

**Tableau X** : Résultats de la mise en culture des boutons floraux de la variété Ferrana sur les deux milieux utilisés

<b>Milieu MURASHIGE et SKOOG (1962)</b>				
paramètres milieux	Effectif	% de callogénèse	% de dessèchement	% de contamination
<b>Ms 0</b> Sans hormones	16	0	100	0
<b>Ms 1</b> (1ml BAP + 2ml NOA)	32	0	43,75	56,25
<b>Ms 2</b> (1ml BAP + 1ml NOA)	32	0	50	50
<b>Ms 3</b> (4ml NOA + 0,09 TDZ)	32	0	100	0
<b>Milieu CHEE et POOL (1987)</b>				
	Effectif	% de callogénèse	% de dessèchement	% de contamination
<b>CP 0</b> sans hormones	16	0	100	0
<b>CP 1</b> (1ml BAP + 2ml NOA)	32	0	100	0
<b>CP 2</b> (1ml BAP+ 1ml NOA)	32	0	100	0
<b>CP 3</b> (4ml NOA + 0,09 TDZ)	32	0	100	0

D'après le tableau X nous avons constaté un taux de dessèchement très élevé dans les différents milieux. Accompagné d'un taux élevé de contaminations dans le milieu Ms1 et Ms2 (56,25% et 50% respectivement), cette contamination est due probablement aux erreurs de manipulation.



### III. Discussion

Le déclenchement de la callogénèse a été constaté chez la variété Tadmith après 6 semaines de la culture, contrairement à la variété Ferrana qui n'a manifesté aucune aptitude à la callogénèse, ce qui nous permet de comprendre que les espèces ne réagissent pas de la même manière dans les mêmes milieux.

Effectivement, **MARTIN (1977)** a signalé qu'un milieu favorable à une espèce ne convient pas forcément à une autre même très voisines, à l'intérieur d'une même espèce il peut y'avoir également des différences considérables de réponses entre les variétés. Cependant plusieurs auteurs mentionnent que seulement certains génotypes paraissent posséder la capacité d'induire une embryogénèse somatique. Cette capacité, chez beaucoup d'espèces être génotypiquement contrôlé (**GEORGE ET SHERRINGTON, 1984 ; BROWN, 1988 ; DODEMAN et al., 1997**)

Et Selon (**CARIMI, 2005**) la callogénèse dépend de la qualité et la nature de l'explant

Le milieu de **MURASHIGE et SKOOG (1962)** est caractérisé principalement par une très forte teneur en sels minéraux, en particulier en potassium et par une concentration également élevé en azote sous forme de nitrate et d'ammonium, ce milieu est très favorable à l'induction de l'embryogénèse somatique (**DEL VESCO et GUERRA, 2001**) ; ceci concorde avec nos résultats, en effet, nous avons obtenu les meilleurs taux de callogénèse dans le milieu Ms avec différents balance hormonale. Tandis que pour le milieu **CHEE et POOL** aucune manifestation de callogénèse n'a été observée, par contre un dessèchement a été constaté sur les explants de ce milieu.

Généralement dans les cultures *in vitro*, les auteurs privilègent les explants les plus jeunes (embryons immature, ovaire, étamine, boutons floral, méristème), car c'est la juvénile qui semble offrir le plus de possibilité de régénération (**DAVIS, 1986, SAADI, 1991**). Souvent, ce sont les tissus provenant d'embryons qui expriment le plus, d'une manière nette et reproductible, l'aptitude à la régénération, c'est le cas par exemple du pois (**SAADI, 1991**) ; du soja (**SANTAREM et al., 1997**) et bien d'autres espèces.

Selon **GREEN et PHILIPS (1975)**, l'âge de l'explant a un rôle très important dans la formation de cals et les explants récoltés à différents âges donnent des réponses variables.

Le but de notre expérimentation est de rechercher le milieu favorable pour l'embryogenèse somatique de la vigne, cette technique qui permet d'obtenir des plantules génétiquement identiques à la plante mère.

Au terme de notre étude, nous pouvons formuler un certain nombre de conclusions :

En culture *in vitro*, la maîtrise de la technique, demande surtout la maîtrise des conditions d'asepsie, c'est pour cela la désinfection du matériel végétal et du matériel du laboratoire occupent une place importante pour réussir les techniques *in vitro*.

La meilleure méthode de désinfection est le passage rapide des explants dans la solution d'éthanol à 70° suivit par un trempage dans la solution d'hypochlorite à 7% pendant 10min.

Après 6 semaines de la mise en culture de différents explants (ovaires, étamines, demi-fleurs) dans les deux milieux **MURASHIGE et SKOOG (1962)** et **CHEE et POOL (1987)** avec différentes balances hormonales, nous avons constaté que :

- La mise en culture des ovaires a induit la callogénèse dans les milieux Ms1 (1ml BAP+2ml NOA) et Ms2 (1ml BAP+1ml NOA) avec un taux de 27% et 3,12% respectivement pour la variété Tadmorit.

- Pour la mise en culture des étamines une bonne aptitude à la callogénèse a été noté dans le milieu Ms1 (1ml BAP+2ml NOA) avec un taux de 37,5%, pour la variété Tadmorit.

- La mise en culture des demi-fleurs dans les trois milieux a permis le déclenchement de la callogénèse pour la variété Tadmorit, avec des résultats proche pour Ms2, Ms3, 21,875% et 28,125% respectivement.

Ainsi nous avons constaté aussi que la variété Ferrana n'a développé aucun cal avec les 3 types d'explants et dans les deux milieux.

Au terme de notre étude, nous pouvons conclure que la culture *in vitro* par embryogénèse somatique, semble très délicate et nécessite le bon choix du milieu de culture qui induit à la callogénèse, spécifique pour chaque variété, afin de réussir les autres étapes de la technique.

**ARNOLD C., 2002.** Ecologie de la vigne sauvage, *Vitis vinifera L. ssp sylvestris* (Gmelin) Hegi, dans les forêts alluviales et colluviales d'Europe. PhD thesis, University of Neuchâtel, Switzerland.

**ATTIA F., 2007.** Effet du stress hydrique sur le comportement ecophysiologique et la maturité phénolique de la vigne *Vitis vinifera L.*: étude de cinq cépages autochtones de Midi-Pyrénées. Thèse de Doctorat. Institut national polytechnique de Toulouse. 185p.

**AUGE A., 1989.** La culture *in vitro* et ses applications horticoles. Ed Lavoisier Tec et Doc. J.B Bailliere. 225 pages.

**BALLE., 1946.** Development in sterile culture of stem tips and subjacent regions of *tropalum majus L* and *Lupinus albus L.*, Ann.J. BOT (33) p 301\_318.

**BEAUCHESNE G., 1989.** La culture *in vitro* et ses applications horticoles.

**BIGOT C., 1984** La multiplication *in vitro*. Cultivar, n°174 :24-30pp

**BLOUIN J., 2005.** Les parasites de la vigne. Stratégie de protection raisonnée. L'espagnol sous la direction de Daniel Gouadec par Gaulou-Brain. J et Amos-Sanchez. A.2007. pp 138-147.

**BOCCON-GIBBOD J., 1989.** La culture *in vitro* et ses applications horticoles. Ed Lavoisier Tec et Doc. J.B Bailliere. 25 pages.

**BOMMINENI U R, JAUHAR PP., 2003.** Regeneration of plant through isolated scirtelum culture of durum . Wheat .plant sci .116; 197

**BOUQUET A, DAVIS HP, DANGLLOT Y, RENNIS C., 1989.** Culture *in vitro* d'ovules et d'embryons De vigne (*vitis vinifera* L.) appliquée à la sélection de variétés de raisins de table Sans pépins. *Agronomie* 9(6): 565-574

**BOURISQUOT J.M. ET THIS p., 1996.** Vigne et vin publication internationale \_ Martillac.33, pp : 13\_19

**BOUTHERIN D., BRON G., 2002.** Multiplication des plantes horticoles Ed :2 Tec et Doc. 248 Pages.

**BOWERS, J. E.and al., 1999.** Development and characterization of additional microsatellite DNA markers for grape. *Am. J. Enol. Vitic.* 50, 243-246.

**BOXUS PH., 1978.** Cultures de tissus et assainissement.Extrait du compte rendu de la journée d'étude belgian. *I.S.H.S.*, P 75\_80.

**BRIGGS,D.E., 1964.** origin and distrubution of a amylase in malt.*J. Inst Brew* .70 :14.

**BROWN C.D.W., 1988.** Germplasm of in vitro somatic embryogenesis in alfalfa. *Hortscience.* 23(3):526-531.

**BUVAT R., 1944.** Recherche sur la dédifférenciation des cellules végétales : plantes entières Et boutures. *Ann.Sci.Nat* N°11(5). P 1\_130. Ed lavoisier Tec et Doc. J.B BAILLIERE. 225 pages.

**CAMARA M., KESSAR Z., 2004.** Micropropagation et préservation de deux cépages autochtones de vinge *Vitis vinefera*.L (Torki et Aneb El kabyle).Thèse Ing, Biologie, Blida.57pages.

**CARIMI. F, et DE PASQUALE.F., 2003.** Micropropagation of citrus. Micropropagation of woody tree and fruits.Kluwer Academic publishers, p840.

**CARIMI F., 2005.** Somatic embryogenesis protocol : citrus in : protocol for somatic embryogenesis in woody plants. Springer (eds), p115\_128.

**CHAUVET M., REYNIER A., 1979.** Manuel de viticulture.Coll. D'enseignement agricole. Ed. Paris Bailliére. 351p.

**COOMBE B.G. and MC CARTHY, M.G., 2000** dynamics of grappe berry growth and physiology og ripening. Australin journal of grappe and wine research 6 : pp : 131\_135

**CRESPY A., 1992.** Viticulture d'aujourd'hui. Paris : edition Tec et Doc\_ lavoisier,coll. « Agriculture d'aujoud'hui »,240p.

**DALVESCOL.L et GUERRAP.M., 2001.** The effectiveness of nitrogen sources in feijoa somatic embryogenesis. Plant cell tissue and organ culture 64 :19\_25.

**DODEMAN, V.L., DUCREUX, G et KREIS, M., 1997.** Zygotic embryogenesis versus somatic embryogenesis. 48 :1493\_1509.

**EL HEIT K., 1981.** Le vignoble algérien : problèmes de la reconversion. Thèse de Doctorat De 3eme cycle. Université de la Sorbonne. 272p.

**FERRY M., BOUGUEDOURAN., HADARAMI I., 1998.** Patrimoine génétique et techniques de propagation *in vitro* pour le développement du palmier dattier sécheresse, 9(2) :139\_146.

**GALET P., 1991.** Précis de pathogènes viticoles.

**GALET P ., 1993.** Précis de viticulture 6ème Ed. Déhan, Montpellier. 575pp.

**GALET p., 1998.** Précis de viticulture 7 ème ed. Déhan Montpellier. 561 p.

**GALET P., 2000.** Précis de viticulture. Ed. JF. 7ème edition.597P

**GAUTHERET R.,J ., 1939** sur la possibilité de réaliser les culture indéfinies des tissus de tubercules de carottes C.R.Acad.Sci, 208 p118\_129ome2 : Blackwell Scientiflentie Publications. 167 pages.

**GAUTHERET R. ,J., 1959.** Sur la possibilité de réaliser les cultures indéfinies des tissus de tubercules de carottes. C.R. Acad. Sci. 208. P118\_129.

**GENEVES L., 1992.** Reproduction et développement des végétaux. Edition DUNOD : 233p.

**GEORGE, E.F. & SHERRINGTON, P.D., 1984.** Plant propagation by Tissue Culture. Eastern Press. England.

**GREEN CE, PHILIPS RI., 1975** Plant regeneration from tissue cultures of maize. Crop Sci 15:417-421.

**HABERLANDT C ., 1902.** Culturversuche mit isolierten.

Plan Zenzellen silzungsber. Akad. Wiss. Math. Nat. Class, 111. Pages 69-92.

**HAICOUR R., 2003** Multiplication de plantes herbacées *in vitro*, Lavoisier , INRA, France : 16p.

**HELLER R., ESNAULT R., LANCE C., 1995** Physiologie végétale.

**HELLER, F. and M. E. EVANS, 1995.** Loess magnetism, Rev. Geophys., 33, 211– 240.

**HELOIR MC., 1999.** Micropropagation de la vigne et maîtrise de la fertilité. Progrés Agricoles et Viticoles 116 : 115-160.

**HUGLIN P., 1986.** Biologie et écologie de la vigne. Ed.Payot Lausanne, Paris.

**HUGLIN P., SCHNEIDER C., 1998.** Biologie et écologie de la vigne. Ed Lovoisier Tec ET Doc . 2éme Ed. . 365p.

**HUSSEY,G et STACEY ,N J .,1981.***In vitro* propagation of potato (Solanum tuberosum) of potato of photoperiod on in vitro tuberisation of potato- S tuberosum- .JEA Seabrook shirlyn m CD. levey .1993 .plant cell m tissue and organe culture .1993.34; 43-51.

**KAMMOUN N et DAALOUL A., 1990.** Culture in vitro des embryons immatures d'orge (Hordeum vulgare L.) : Effet des caractéristiques de l'embryon sur la formation des cals. 7(1): 330-8065.

**LERY., 1982.** L'agriculture au maghreb G.P. Ed. maisonneuve et Larose. pp284-286.

**LEVADOUX L., 1956.** Les populations sauvages et cultivées de *Vitis vinifera* L. Station de Recherches Viticoles et d'Arboriculture Fruitière du Sud-Ouest, Pont-de-la-Maye (Gironde) pp59-115.

**MARGARA J., 1989.** Base de la multiplication végétatives .Les méristèmes et l'organogénèse. Institut National de la recherche Agronomique.

**MARTIN N., 1980.** La culture de méristème : la recherche au service de l'agriculture et de l'horticulture. Station de physiologie INRA, Dijon, 222-231pp.

**MONTGOMERY R., 2009.** Statistique en bref Eurostat. KS-SF-09-012-FR-N. pp 1-7.

**MOREL G., MARTIN C., 1952.** Guérison de pomme de terres atteintes de maladies à virus CR, Acad,Agro. Fr, 41. P432\_475.

**RAJNCHAPEL A., GUERCHE PH., 1985.** Méthodes *in vitro* et productions végétales Biofutur octobre. 1985. P 31\_43.

**REGNER F, BRANT S., ROMANN A., stadhuber a., 1995.** Elimination des virus de la vigne *in vitro*. Mitttteiluriger. Reb and Wein. Autriche. N°3.P67\_74.

**REYNIER A., 1989.** Manuel de viticulture. Edition. Bailliére 406p.

**REYNIER A., 1991.** Manuel de viticulture. Edition J.B Bailliére. Paris. 6<sup>ème</sup> Ed.. 411p.

**REYNIER A., 2007.** Manuel de viticulture. Edition TEC & DOC. Paris. 10<sup>ème</sup> Ed. 527P.



**RIBEREAU-GAYON J et PEYNAUD E., 1971 a** - Sciences et techniques de la vigne  
Tome 1 et 2. Edit. Dunod, Paris, 1443 p.

**ROBBINS W.J.,1922.** Cultivation of excised root tips and stem tip under sterile conditions.  
Bot Gaz, 73. P 376\_390.

**SAADI A., 1991.** Régénération de plantes de pois *Pisum sativum* L par embryogénèse  
somatique. Thèse de doctorat. Paris Grignon 192p.

**SAMAL, A.E., SIMON, Z., NYOCHEMBENG L., TAMBONG T.A., NEZANA, X et  
WUTAH, J.G., 1998.** Culture *in vitro* et multiplication rapide de plante a tubercules et  
racines a Cameroun. Cahier Agriculture. (7) ; 63\_66.

**SCHWARZENBACH J., 1992.** Viticulture. Ed. Payot, Lausanne.

**SPAHNI P., LABYS W. 1992.** Le vin. Ed. Economica.130p.

**THIS P., LACOMBET. Et THOMAS MR., 2006.** Historical origins and genetic diversity  
of wine grapes. Trends in genetics , vol 22 (n°9),511\_519.

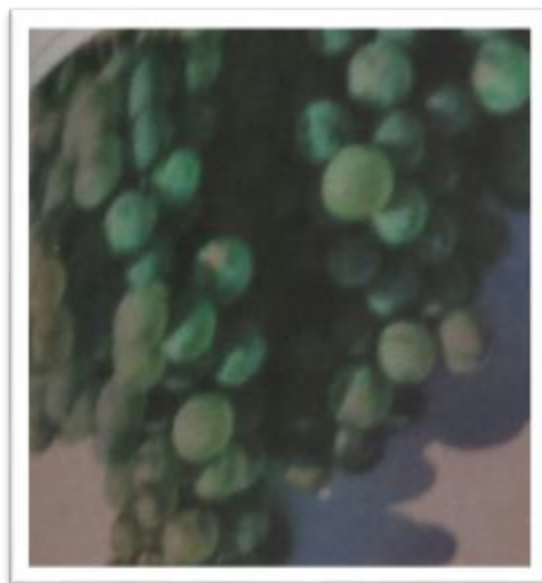
**VALLEAU,W,D., 1916** : inheritonce of sex grape. Amer . Naturalist 50, 554\_564.

**WHITE PH. R., 1934.** Potentially unlimited growth of excised tomato root tip in a liquide  
medum. Plant physiology, 9. Potentially unlimited growth of excised tomato root tip in a  
liquid medium. Plant physiology, 9. Pages 585-600.

**ZRYD J.P. GAZEAU M., DERREUDRE J., MONNIE, R., 1988 .** Culture de cellules,  
tissus et organes végétaux : fondements théoriques et utilisation pratiques. Presses  
Polytechniques. Romande, P307 pages.

**ANNEXE 01 : Caractéristiques des variétés (ITAF, 2009)****a- La variété Ferrana**

Variété autochtone à double fin, donne un raisin de table très agréable, mais ses grappes un peu trop compacte et un peu trop volumineux sont peu attrayantes. Il produit des vins souples et bouquetés qui vieillissent bien. C'est une variété très productive qui redoute les plaines humides en raison de sa sensibilité à la pourriture, mais convient très bien en montagnes et coteaux



**Figure 14 :** Fruit de la variété Ferrana (ITAF, 2009)

**a- Variété Tadrith**

C'est un cépage de table blanc il mûrit dès la première décennie de septembre, il possède des belles grappes ailées à gros grains blancs arrondis. C'est une variété vigoureuse qu'il faut la conduire en taille longue. Cépage très fertile. La baie est très juteuse et présente un goût fade.



**Figure 15 :** Fruit de variété Tadrith  
(ITAF, 2009)

## ANNEXE 02 : MATERIEL UTILISÉ EN LABORATOIRE

La verrerie : Entonnoir , éprouvette , bouteilles , fiole geaugé , pipette, bécher.

Materiel de dissection : pinces , scalpels.

### L'appareillage



Figure 16 : l'autoclave



Figure 17 : l'étuve



Figure 18: pH mètre



Figure 19: Balance de precision



**Figure 20** : Bec benzène