

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

Influence du génotype et de la balance hormonale sur l'induction de la callogénèse *in vitro* de deux cépages autochtones de vigne *Vitis vinifera* L.

Présenté par :

- ALANE Fatiha
- CHABAHI Faiza

Soutenu le : 21/09/2017

Devant le jury :

Mme AMARA N.	Présidente	
Mme ZARKAOUI A.	Examinatrice	
Mme CHAOUIA C.	Promotrice	
Mme HADDAD N.	Co-promotrice	ITFv

2016/2017

Dédicace

Je dédie ce modeste travail :

À mon raison de ma vie, symbole du sacrifice

À mon père

À ma mère ma fierté et mon courage.

À ma source de confiance et d'énergie

*Mes frères et mes sœur : **Najet** et **Fatima Zohra***

*À tous mes amis : **Hadjar, Khaoula, Naima, Ibtissem, Nesrin** et tous mes
camarade de la promo Génomique et Biotechnologie végétale sans
exception.*

FATIHA

Dédicace

Je dédie ce travail à :

Mes parents à qui m'ont soutenu tout au long de cette épreuve et sans eux je ne serai ce que je suis en ce moment.

Mes chères sœurs :

khalida, Souade ,Nacira,Fathia,Nawel, Houda, et Nesrine.

Mes frères :

Massoud, Kamel, Merzak, Billel, et Yacine.

Atous mes amis :

Assia, Asma, Fouzia, khaoula, Mounia,hanane ,khadidjaet tous mes collègues sans exception.

Faiza

Remerciements

Tout d'abord nous remercions le **Bon Dieu** pour nous avoir donné la santé, le courage, la volonté et l'énergie de réaliser ce travail

Puis nous remercions notre promotrice **Dr.Mm CHAOUIACHIRIFA** pour sa patience et ses orientations qui nous ont guidées tout au long de notre travail.

Nous présentons aussi nos sincères remerciements à :

Notre Co-promotrice **Mme HADDAD NASSIMA** chef de service au laboratoire d'amélioration des végétaux à l'ITAFV de Tessalat EL Merdja, pour l'accueil dans votre laboratoire et nous offre l'opportunité de réaliser cette mémoire 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.

Aux membres du jury qui ont accepté de juger notre travail :

Mme AMARA N, pour avoir fait l'honneur de présider ce jury.

Mme ZARKAOUI A, pour avoir si aimablement accepté d'examiner ce travail.

L'ensemble de personnel de l'ITAFV de Tessalat EL Merdja :

Mme TAIBI A et **Mme RAHEL N** pour leurs précieux conseils et leurs disponibilités à tous moments, leurs gentillesse et leurs bonnes humeurs avec nous durant toute la période de notre stage.

Je tiens également à remercier **Melle BOUKHALFA S**, et **Mme BRANECIS** pour leurs aides, aussi pour leurs précieux conseils. **Mme RADJI** chef de département du laboratoire et **Mme GHAZLI C** chef de département de production des plantes et le personnel du laboratoire central de l'ITFV sans exception.

Enfin nous remercions toute personne ayant contribué d'une manière ou d'une autre à la réalisation de ce modeste travail.

Résumé

Le présent travail porte sur l'induction de callogenèse chez deux cépages de la vigne (*Vitis vinifera*L.) Autochtones (AMELLAL et BOUANI).

Nous avons désinfecté notre explantes (prélevé de la serre et du champ) par deux méthodes différentes :

La première méthode consiste :le Trempageles explantes dans l'alcool à 70° pendant quelques secondes,après le trempage dans l'hypochlorite de sodium (NaClO) à 3% pendant 20 min cette méthode donne un taux de contamination total de 82% et ce pour le cépage AMELLAL et 60,5% pour le cépage BOUANI pour les explantes prélevé du chanp.

La deuxième méthode consiste : Trempage les explantes dans chlorure de mercure (HgCl₂) à 0.3% pendant 15min, nous a permis de réduire le taux de contamination à 16% et le taux de brunissement de 8% pour les deux cépages pour les explantes prélevé de la serre .

La meilleur méthode de désinfection est le passage rapide des explants dans la solution chlorure de mercure 0,5% pendant 15minpour les rameaux herbacés.

La mise en culture des feuilles a induit la callogénèse dans les milieux enrichis par les auxines et les cytokines, avec un taux total de callogenèse 45% pour les feuilles du cépageAMELLAL.

La mise en culture despétioles a induit un faible taux 1% seulement la callogénèse, pour tous les milieux deMURASHIGE et SKOOG (1962) le cépageAMELLAL.

Pour le cépage BOUANI la mise en culture des feuilles a induit la callogénèse avec un taux total de 53% et un faible taux pour les pétioles 3%.

Aussi a été remarqué une faible induction de la callogenèse pour les milieux contenant (BAP 1mg+ NOA 1 mg) et (BAP 1mg+NOA 2mg) pour les deux cépages testé.

Mots clés : Méthode de l'infection, BOUANI, AMELLAL, Callogenèse.

Abstract

His work deals with the induction of callogenesis in two grape varieties of the vine (*Vitis vinifera* L.) Native (AMELLAL and BOUANI).

We have disinfected our explants (taken from the greenhouse and field) by two different methods:

The first method consists in dipping into 70% alcohol in seconds, after soaking in 3% sodium hypochlorite (NaClO) for 20 min. This method gives a total contamination rate of 82% and for the AMELLAL grape variety and 60.5% for the BOUANI grape variety for explants taken from the champ.

The second method consists in: Soaking the explants in 0.3% mercury chloride (HgCl₂) at 15min, we have reduced the contamination rate to 16% and the browning rate of 8% for the two varieties for explants taken from the greenhouse .

The best method of disinfection is the rapid passage of the explants in the 0.5% mercury chloride solution for 15min for the herbaceous branches.

Leaf culture induced callogenesis in auxin and cytokine-enriched media, with a total callogenesis rate of 45% for leaves of the AMELLAL grape variety.

The culture of the petioles induced a low rate 1% only callogenesis, for all the environments of MURASHIGE and SKOOG (1962) the AMELLAL grape variety.

For the BOUANI grape variety, the growth of the leaves induced callogenesis with a total rate of 53% and a low rate for the petioles 3%.

There was also a low induction of callogenesis for the media containing (BAP 1mg + NOA 1 mg) and (BAP 1mg + NOA 2mg) for the two varieties tested.

Key words: Method of infection, BOUANI, AMELLAL, Callogenesis.

الملخص

يتناول عملنا طريقة تحريض التكاثر في اثنين من أصناف العنب من الكرمة المحلية *Vitis Vinifera* l.

الأصلية (املال وبوعني).

قمنا بتطهير القطع مأخوذة من الدفيئة والحقل بطريقتين مختلفتين:

طريقة الأولى: نقوم بغمس القطع في 70° درجة في الكحول لوضع ثوان بعدها نقوم بتبليل القطع في هيبوكلوريت الصديوم (3)% لمدة 20 دقيقة وقد سمحت لنا هذه الطريقة بإعطاء نسبة تعفن اجمالية قدرها 82% لصنف املال و60% لسنف بوعني مأخوذ من الحقل

ام طريقة الثانية فتتمثل بنقع القطع في كلوريد الزئبقي بنسبة 0.3% لمدة 15 دقيقة مما سمح لنا تقليل من معدل تعفن قدرت ب 16% ومعدل اسمرار للقطع 8% وهذا بالنسبة للقطع المأخوذة من الدفيئة.

اما أفضل طريقة للتطهير هي المرور السريع للقطع (أوراق والسويقات) في محلول الكلوريد الزئبقي لمدة 15 دقيقة.

لاحظنا ان زراعة الأوراق سببت نمو البراعم في الأوساط الغنية بالاكسين والسيتوكينين بمعدل كلي % 45 بالنسبة للأوراق عند النوع املال. كما لاحظنا ان زراعة السويقات سببت ظهور ضعيف للبراعم في كل الأوساط الحيوية.

اما بالنسبة للنوع بوعني سببت زراعة الأوراق إلى ظهور ونمو البراعم في الأوساط بمعدل % 53 ومعدل ضعيف 3% بالنسبة للسويقات.

وفي أخير لاحظنا ان هناك تحريض منخفد بالنسبة للأوساط المحتوية على (BAP 1mg +NOA 1mg) و

(BAP 1mg+ NOA2m) بالنسبة للصنفين التي تم اختبارهما

كلمات البحث: بوعني, املال, ظهور البراعم طرق التطهير

Liste des abréviations

BAP : 6-Benzylaminopurin

ANA : Acide 1-naphtalacétique

NOA : Acide 2-naphthoxyacétique

ITAF : Institut Technique d'Arboriculture Fruitière et de la Vigne

MS : MURASHIGE et SKOOG (1962)

v/v : Volume par Volume

AL : AMALLEL

BN : BOUANI

Liste des figures

Figure 1 : Classification botanique de la vigne cultivée.....	4
Figure 2 : Aspect général d'un cep la vigne.....	5
Figure 3 : Feuilles trilobée de vigne	6
Figure 4 : Vrilles de la vigne.....	7
Figure 5 : Stades phénologiques de la vigne	8
Figure 6 : Explants du cépage AMELAL	18
Figure 7 : Mise en culture (A : feuilles, B : pétioles).....	26
Figure 8 :Taux de contamination du cépage AMELLAL.....	31
Figure 9 : Taux de contamination du cépage BOUANI.....	32
Figure 10: Taux de contamination du cépage BOUANI prélevé de la serre.....	33
Figure 11 : Cals produits par les pétioles du cépage AMELLAL (Milieu MS).....	34
Figure 12 :Cals repiqués sur le milieu MS observés après 20jours sous loupe binoculaire (Cépage AMALLALA et B : Pétioles, C : Feuilles).....	35
Figure 13:Cals repiqués sur le milieu MS observés après 20jours sous loupe binoculaire (Cépage BOUANIAet B : Pétioles, C : Feuilles).....	35

Liste des tableaux

Tableau 1 : Types de régulateurs de croissance et leur solubilité.....	20
Tableau 2 : Composition de milieu MURASHINGE ET SKOOG (MS, 1962).....	22
Tableau 3 :Balance hormonale testée	23
Tableau 4: Essais de désinfection du matériel végétal.....	26
Tableau 5 : Désinfection des explants prélevés du champ.....	28
Tableau 6 : Désinfection des explants prélevés du la serre.....	30
Tableau 7 : Contaminations et brunissement des feuilles et des pétioles prélevés de la serre du cépage.....	33
Tableau 8 : Taux d'explants callogènes de deux cépages.....	34

SOMMAIRE

Introduction.....	1
Partie bibliographique	
<u>Chapitre I : Généralités sur la vigne</u>	
1.	
Historique.....	3
2.Taxonomie.....	3
2.1. classification de la vigne.....	5
3. Description Botanique.....	5
3.1. Système racinaire	6
3.2. Rameau principal	6
3.3. feuilles.....	6
3.4. vrilles.....	7
3.5. Fleurs	7
3.6. Fruits.....	7
3.7. Bourgeons.....	7
4 .Cycle végétatif et reproducteur de la vigne.....	7
5. Caractéristiques des deux cépages :(BOUANI , AMELLAL).....	9
6. Exigences de la vigne.....	9
6.1. Climat.....	9
6.2. Précipitations.....	10
6.3. Sol.....	10
7. Génome de la vigne	10
<u>CHAPITRE II : Multiplication de la vigne</u>	
1. Multiplication sexuée.....	11

2. Multiplication asexuée.....	11
2.1. Marcottage.....	11
2.2. Bouturage.....	11
2.3. Provignage.....	12
2.4. Greffage.....	12
2. Culture in vitro.....	12
2.1. Catégories de la culture.....	13
2.2. Techniques de culture in vitro.....	13
2.2.1. Culture de méristème.....	13
2.2.2. Micro propagation	13
2.2.3. Culture de protoplaste.....	14
2.2.4. Embryogenèse Somatique.....	14
2.3. Conditions de la culture in vitro.....	15
2.3.1. Sel minéraux	15
2.3.2. Sucre.....	15
2.3.3. Vitamines.....	15
2.4. Facteurs de milieu.....	15
2.4.1. Stérilisation.....	15
2.4.2. lumière et photopériode.....	16
2.4.3. Température.....	16
2.4.4. Régulateurs de croissance.....	16
2.4.4.1.1. Auxine.....	17
2.4.4.2. Cytokinine.....	17
2.4.4.3. Gibbérelline.....	17

Partie expérimentale

Matériel et méthodes

1. Matériel végétal utilisé.....	18
2. Préparation du milieu de culture.....	19
2.1. Préparation des solutions mères.....	19
2.2. Préparation des milieux de culture.....	21
3. Préparation des stérilisants.....	24
4. Moyens d'asepsie.....	24
5. Mise en culture des explants.....	26
6. Paramètres étudiés.....	27

Résultats et discussion

1. Résultat de la désinfection des explants.....	28
1.1. Explants prélevés du champ.....	28
1.2. Explants prélevés de la serre.....	30
2. Résultats de la mise en culture des explants prélevés du champ.....	30
2.1. Cépage AMELLAL.....	30
2.1.1. Taux de contamination.....	31
2.1.2. Taux de brunissement.....	31
2.2. Cépage BOUANI.....	31
2.2.1. Taux de contamination.....	32
2.2.2. Taux de brunissement.....	32
3. Mise en culture des explants prélevés de la serre.....	32
3.1. Cépage AMELLAL.....	32

3.2. Cépage BOUANI.....	33
3. Taux (%) d'explants calogènes pour les deux cépages.....	34
4. Aspect qualitatif des cals.....	35
Discussion.....	36
Conclusion.....	38
Références bibliographique.....	39
Annexes	



Annexe 3: l'Autoclave



Annexe 4: l'Etuve



Annexe 5: Plaques chauffantes



Annexe 6 : Balance de precision



Annexe 7 : pH mètre



Annexe 8 : Bec benzène

Annexe 1 :Appareillage et petit matériel utilisé

grand matériel	petit matériel	Infrastructures
Plaques chauffantes Agitateurs magnétiques PH mètre Bec benzène Balance à précision Autoclave Stérilisateur à bille Distillateur. Etuve,	Béchers gradué Epruvettes gradué Baro magnétiques Papiers buvard Flacons épindorf lames à bistouri Pincés et scalpels métalliques en inox. Boîtes de stérilisation métalliques en inox Lames à bistouri et à rasoir. Micropipettes de 250, 500 et 1000 µl.	Hotte à flux laminaire horizontal Chambre de culture Chambre de lavage La serre Hote chimique

Annexe 2 : Consommables et solvants

Consommable	Solvant
-Boites de pétri en plastiques stériles de 60 mm et 90 mm de Ø, boites de pétri en verre, -Béchers d'100, 500 et 2000 ml, -Flacons de 500 et 1000ml transparents et flacons d'1l fumés pour solutions mères, -Epruvettes de 10, 25, 100 et 1000ml - Papier filtre et papier aluminium, papier cellophane -Parafilm -Ependorffs, filtres stérilisants de 0,2 µm, icones de micropipettes,	-Ethanol 96°, 70° ; -Hypochlorite de sodium (NaOCL), chlorure de mercure (HgCL2), NaOH 0,1N, HCL 0,1N ; -Solution d'antibiotique (penicilline) ; -Eau de javel de commerce ; -Isis et tween 20

La vigne est un arbre très anciennement cultivé qui caractérise particulièrement bien certains paysages (**COUTIN, 2002**). Selon (**MARCHIVE, 2006**), la vigne est l'espèce végétale la plus cultivée dans le monde. Son importance économique considérable se situe au niveau de la production des fruits, le raisin, commercialisé comme raisin frais de table et transformé en raisins secs ou liquides (jus et vins).

La viticulture occupe environ 8 millions d'hectares dans le monde. La majorité des vignes cultivées est regroupée en Europe (63% du vignoble mondial) et notamment en France, Italie et en Espagne. En Méditerranéen, mer intercontinentale la vigne a toujours occupé une place dans le paysage traditionnel de cette région, par sa présence sous ces deux formes spontanée et cultivée. Cependant la culture de cette espèce est bien enracinée dans les traditions des populations paysannes Maghrébines en général et Algérienne en particulier (**BOUBY *et al.*, 2010**).

Avant la colonisation, la superficie de la vigne en Algérie était estimée à environ 5000 ha représentée par les cépages autochtones et ceux introduits du moyen orient par les Turcs (**BOUBY *et al.*, 2010**).

En Algérie d'après AOUF(1972), 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 ti mouchent) 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 (**LERY, 1982**).

Selon AOUF, (1972) l'Algérie, jusqu'à son indépendance en 1962, était considérée comme faisant partie du territoire français et sa production viti-vinicole était régie par la même réglementation que celle de la métropole. La France importait alors jusqu'à 14 millions d'hectolitres de vin produit sur le sol algérien.

Au lendemain de l'indépendance de l'Algérie de graves difficultés sont apparus, le vignoble algérien avait à faire face à de graves difficultés. Notamment les sur production de près de 15 millions d'hectolitres de vin, n'avait pas trouvés des preneur pour son écoulement (**AOUF, 1972**).

Depuis l'indépendance, le secteur viticole a connu des bouleversements profonds engendré par des mutations d'ordre politique et socioéconomique dans notre pays. Les surfaces cultivées ont considérablement diminué suite à des arrachages et à la faiblesse de production (**AGGAD, 1988**).

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* basé notamment sur la totipotence cellulaire (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 intérêt de cette étude : la mise en culture *in vitro* de deux variétés de vigne (AMELLAL et BOUANI).

L'objectif de ce travail est de suivre :

- L'effet des milieux MS sur la régénération de deux cépages autochtones de vigne : AMELLAL et BOUANI.
- L'effet du génotype et de l'influence de la balance hormonal sur le taux de l'induction de la callogénèse.

Pour cela, notre document se subdivise en trois parties :

Après une introduction, un premier volet traite d'une synthèse bibliographique

Dans la deuxième partie nous avons entamé notre travail expérimental en détaillant l'importance de la des infections du matériel végétale et les méthodes de régénération *in-vitro* utilisées suivi par une discussion globale et nous terminons par conclusion et les dissections à entreprendre pour continuer ce travail de recherche.

1. Historique

L'histoire de la vigne accompagne l'histoire de l'humanité depuis des millénaires. Elle semble originaire des régions chaudes du bassin méditerranéen (**DUBOIS et DESHAIES, 1997**). Les plus anciens fossiles de Vitacées remontent à la fin du Crétacé (il y a environ 100 millions d'années). C'est la région caucasienne qui est le lieu d'origine de *Vitis vinifera*, où l'influence climatique de la mer caspienne favorisa la conservation d'un cépage remarquable qui donna naissance aux vignes que l'on connaît actuellement (**VILLA, 2005**). L'Algérie doit ses premiers plants de vignes aux Phéniciens.

Selon (**AOUF, 1972**), durant la période coloniale, la culture de la vigne s'est développée intensément devenant une des grandes richesses du pays. Jusqu'à son indépendance en 1962, l'Algérie était considérée comme faisant partie du territoire français et sa production viti-vinicole était régie par la même réglementation que celle de la métropole. La France importait alors jusqu'à 14 millions d'hectolitres de vin produit sur le sol algérien. En 1962, l'Algérie se retrouvait donc avec une superficie plantée en vignes à vin voisine de 350 000ha, dont le potentiel de production pouvait atteindre 14 millions d'hectolitres de vin. Au contraire, les vignes à raisin de table étaient peu développées 4000 ou 5000 ha avec une production approximative de 200 000 quintaux de raisin.

Selon (**REYNIER, 2007**), la culture de la vigne a débuté il y'a 5 à 6 millénaires avant J.C à partir des refuges de Transcaucasie et d'Iran où les hommes se sont sédentarisés et ont découvert l'intérêt alimentaire de cette plante, qui a été multipliée par bouturage puis elle a été domestiquée d'où proviennent les cépages, issus 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 ces premiers cépages vers d'autres régions.

2. Taxonomie

La vigne est une plante sarmenteuse, ligneuse vivace qui peut demeurer plusieurs dizaines d'années dans des conditions normales de culture (**GALET, 1993**). Elle appartient à la classe des dicotylédones (Ampélidacées) (**MARIO, 1996**), à la famille des Vitacées à l'ordre des *Rhamnales* lui-même divisé en neuf genres dont le genre *Vitis*. Ce dernier est séparé en deux sous-genres qui sont *Muscadinia* et *Euvitis* (Vraies vignes) (figure 1).

La quasi-totalité des vignes cultivées fait partie du sous genre *Euvitis* qui se divisent en trois groupes : *euroasiatique* (ne comprend qu'une seule espèce (*Vitis vinifera*), *asiatique* et *américain* (REYNIER, 2007).

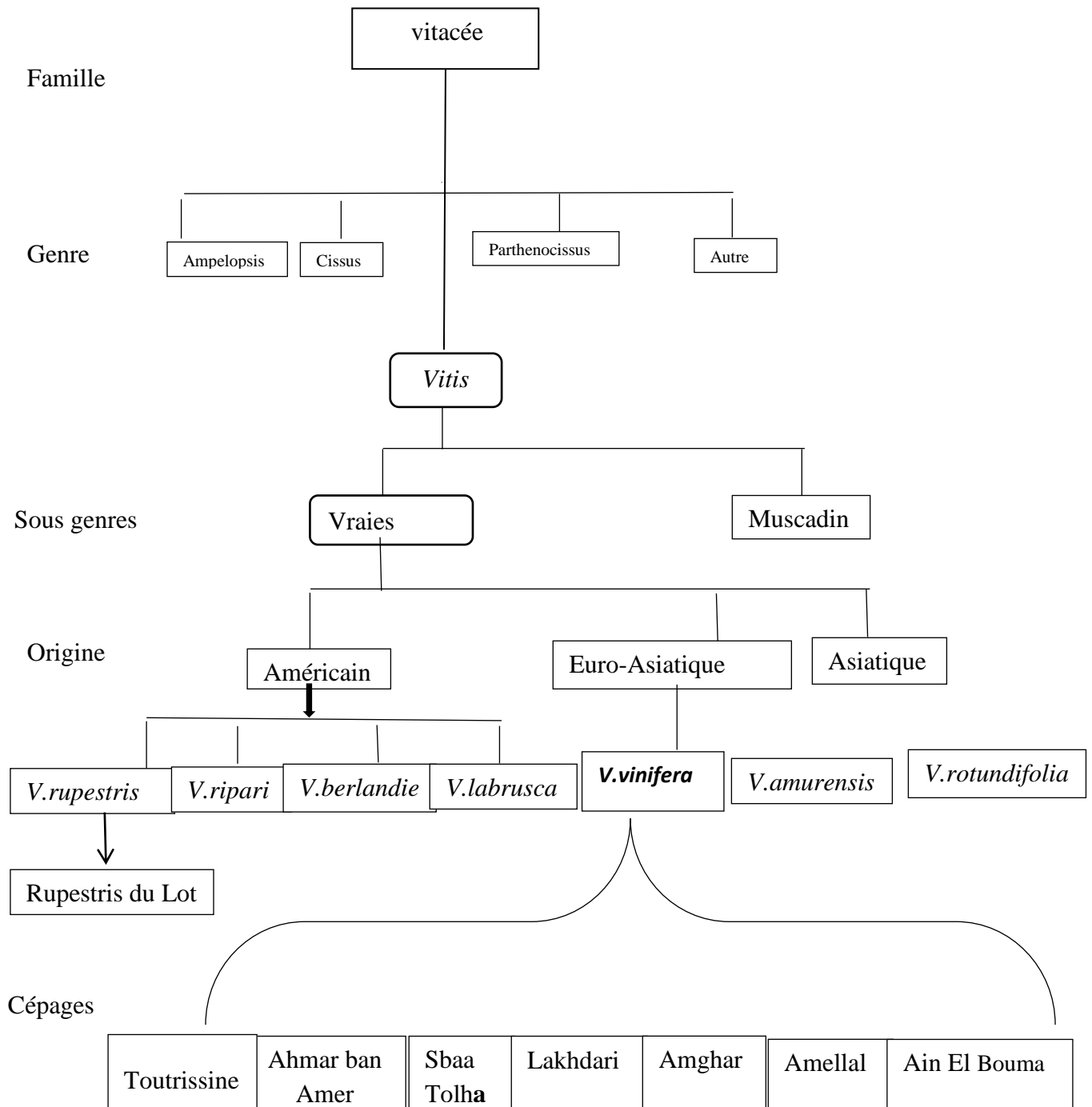


Figure 1 : Classification botanique de la vigne cultivée (REYNIER, 2007).

Selon **GALET (2000)**, la famille des vitacées était appelée autre fois *Ampélidées* ou *Ampélidacées* et elle compte plus d'un millier d'espèces. Les vitacées sont des phanérogames, elles appartiennent aux angiospermes de la classe des dicotylédones.

Les Vitacées appartiennent à l'ordre des *Rhamnales*, comprenant 18 genres dont *Vitis*, celui-ci est séparé en deux sous-genres, *Muscadinia* qui possède $2n = 40$ chromosomes et *Euvitis* à $2n = 38$ chromosomes.

A l'intérieur d'*Euvitis* on distingue trois groupes : un groupe euro-asiatique (formé par *Vitis vinifera* Linné et *Vitis vinifera silvestris*), un groupe asiatique (une dizaine d'espèces, peu étudiées) et un groupe américain (une vingtaine d'espèces de grande utilisation comme porte-greffe) (**HUGLIN, 1986**).

La vigne cultivée proprement dite, *Vitis vinifera* L. comprend des milliers de cépages, à l'intérieur desquels il n'a guère été possible de procéder à des classifications plus poussées (**GALET, 2000**), Cette espèce appartient à la vigne euro-asiatique.

La vigne américaine, elle rassemble une vingtaine d'espèces et elle est utilisée comme porte-greffe ou croisée avec *Vitis vinifera* pour produire des hybrides (**REYNIER, 2007**).

Classification de la vigne

Règne : plante

Embranchement : Angiospermes

Classe : Dicotylédones

Sous-classe : Archichlamydées

Ordre : Rhamnales

Famille : Vitacées

Genre : *Vitis*

Espèce : *Vitis vinifera* L.

3. Description botanique



Figure 2 : Aspect général d'un cep la vigne. (**CARBONNEAU et al., 2007**)

3.1. Système racinaire

Le système racinaire est constitué par le porte-greffe, choisi pour sa tolérance au phylloxéra. Certains porte-greffe sont tolérants à la contrainte hydrique et peuvent s'adapter au pouvoir chlorosant du sol (calcaire actif et teneur en fer) à l'acidité et à la teneur en sel. Système racinaire issu d'une multiplication asexuée est fasciculé (**DENIS, 2005**).

3.2. Rameau principal

Le rameau est le support de tout système végétatif aérien de la vigne. Il est constitué d'une succession des nœuds, tandis que l'intervalle compris entre deux nœuds consécutifs est appelé entre nœud ou mérithale (**GALET, 2000**).

Au niveau des nœuds se fixent les bourgeons, les feuilles et les vrilles (**LEVADOUX, 1967**).

3.3. Feuilles

Les feuilles ont une distribution alternée et sont pétiolées avec cinq nervures palmées. Elles possèdent un sinus pétiolaire et sont plus ou moins découpées, constituées d'un ou plusieurs lobes plus ou moins découpés (**VIALA et VERMOREL, 1910**).



Figure 3 : feuille trilobée de vigne (Institut de l'ITAFV)

3.4. Vrilles

Les vrilles sont opposées aux feuilles (SIMON *et al.*, 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).

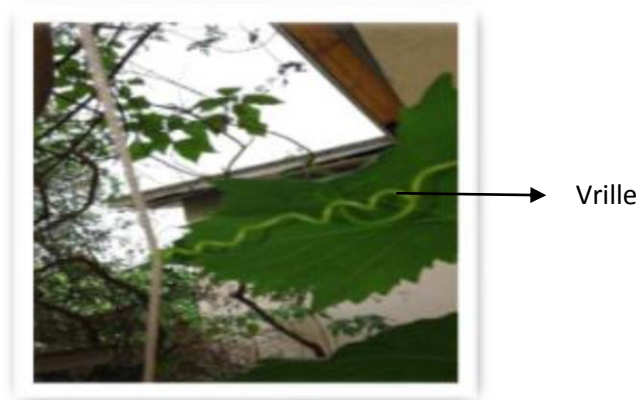


Figure 4 : Vrilles de la vigne (CARBONNEAU *et al.*, 2007)

3.5. Fleurs

Les fleurs de la vigne possèdent un petit calice de 5 pétales soudés leur sommet, formant un capuchon .celui-ci protège les 5 étamines et d'un ovaire comprenant 2 carpelles renfermant chacun 2 ovules. Pendant la période de la pleine floraison, les étamines soulèvent le capuchon de pétales et le font retomber. Cette opération ne peut s'effectuer que par temps sec et à une température minimum de 15 °C (RIBEREAU *et al.*, 1971).

3.6. Fruits

Les dernières sont composées d'un ensemble de ramification parmi lesquelles s'identifie, le pédoncule, l'axe principal ou rachis est les pédicelles qui portent les bais ou grains. Le rachis porte également le nom de la rafle (GALET, 2000).

3.7. Bourgeons

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 (GALLET, 1993).

4. Cycle végétatif et reproducteur de la vigne

La vigne est une plante à feuilles caduques, elle rentre en dormance après la chute de ses feuilles. L'élévation de températures au printemps s'accompagne du débourrement en février-mars, de la sortie des feuilles et d'une croissance rapide des pousses. La pleine floraison a lieu généralement six à huit semaines après le débourrement. Les grappes florales se forment sur les rameaux âgés d'un an du printemps précédent. L'époque de

la différenciation des bourgeons floraux varie en fonction des cépages et des conditions climatiques. Elle a lieu généralement entre avril et juin. Les cultivars de *V. vinifera* présentent dans leur majorité des fleurs hermaphrodites qui sont auto-pollinisés. La nouaison est suivie de la maturité. En fonction des travaux culturaux et des conditions climatiques, la vigne peut vivre plusieurs dizaines d'années. Le rendement en raisin est variable selon les cépages (QUELENIS, 2008).



Figure 5 : Stades phénologiques de la vigne (CARBONNEAU *et al.*, 2007)

1- Dormance, 2- Bourgeon dans le coton, 3- Pointe verte, 4- Premières feuilles déployées, 5- Stade 2 - 3 feuilles déployées, 6- Stade 4-6 feuilles déployées, inflorescence bien visible, 7- Allongement de l'inflorescence, 8- Début floraison, chute du premier capuchon 25% floraison, 9- 80 % floraison, 10- Nouaison, 11- Baies de la taille d'un poids (7 - 10 mm), 12- Fermeture de la grappe, 13 et 14- Véraison - Baies moins fermes, pellicule translucide (baies vertes), apparition de pigments (baies bleues, rouges), 15- Récolte à maturité

5. Description de deux cépages étudiés :

5.1. Cépage BOUANI

- Caractéristiques phénologiques :
- Débourrement : 3^{ème} décade de mars
- Floraison : 2^{ème} décade de mai
- Véraison : 2^{ème} décade d'Août
- Maturité : 1^{ère} décade de septembre

➤ La grappe

- Longueur : 32cm.
- Forme : Ailée.
- Poids : 690gr.

➤ Baies

- Couleur : Blanche
- Consistance : Charnue.
- Forme : Tronc ovoïde présence de deux pépins.
- Poids de 100 baies : 355gr.

5.2. Cépage AMELLAL :

- C'est un cépage autochtone cultivé dans toute la Kabylie
- Sa maturité s'entend du 15 septembre au 15 Novembre.
- C'est un bon cépage de table à grappe Cylindrons conique, moyennement compactes (poids de grappe : 500 gr et la longueur de 23 ,5 cm, diamètre de bais : 18mm).
- Le fruit c'est un bais arrondie de couleur jaune doré.
- Il est très sensible aux maladies et parasites : sensible au mildiou et à l'oïdium (ITAFv, 2004)

6. Exigences de la vigne

Les principaux facteurs qui limitent la culture de la vigne sont d'ordre climatique. Ainsi, la pluviométrie ne doit pas être trop élevée au cours de la période de floraison ni de celle de la maturation (CARBONNEAU et *al.*, 2007).

6.1. Climat

La vigne supporte des températures de -20°C cependant au gonflement des bourgeons .le seuil de résistance est de -5°C, en préfloraison il est 0 ,5°C ; à la floraison de 0°C.

Au printemps les jeunes bourgeons sont donc détruits par les gelées blanches de -2 à -3°C fréquentes à cette période de l'année dans les zones sensibles.

La vigne débourre entre 8 et 12°C et fleurit entre 16 et 20°C (**CARBONNEAU et al., 2007**).

6.2. Précipitations

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

6.3. Sol

Le sol interagit avec le climat au niveau des effets limitant de l'eau, soit vis-à-vis de la sécheresse, ou l'asphyxie (**CARBONNEAU et al., 2007**).

Pour maximiser la production, le sol doit être labouré, irrigué, fertilisé et le plant bien conduit (**GALET, 2000**).

7. Génome de la vigne

Le génome de *Vitis vinifera* L. est composé de 19 paires de chromosomes (n=38).

La taille du génome est évaluée à 470 Mb (Séquençage PN40024, 12X), similaire à celle du peuplier (485 Mb) et du riz (430 Mb) mais environ quatre fois plus importante qu'*Arabidopsis thaliana* L. (125 Mb). La taille des chromosomes varie de 16,6 Mb pour le chromosome 17, à 29,7 Mb pour le chromosome 14 (**GREGORY, 2011**).

1. Multiplication de la vigne

La vigne se multiplie par voie asexuée ou végétative. L'utilisation du procédé sexuée peut être réalisée uniquement pour la création de nouveaux hybrides.

1.1. Multiplication sexuée

Elle se fait par graines. Ce procédé de semis est réservé aux sélectionneurs et aux hybrideurs pour la création de cépages et de nombreux porte-greffes. Le semis ne reproduit pas intégralement les caractères génétiques du plant mère (**LEVADOUX, 1956**).

1.2. Multiplication asexuée

La multiplication végétative est un mode de reproduction asexuée, à la différence du semis qui donne une population hétérogène, la multiplication végétative génère des clones (**REYNIER, 2000**).

La régularité des plants obtenus et le maintien de l'identité du matériel végétal sont les principaux avantages de la multiplication végétative. Les plants obtenus par cette voie présentent fidèlement et intégralement les caractères du pied mère et sont semblables entre eux (**BOUQUET et al., 1989**). Cette multiplication peut être réalisée par différentes méthodes qui dont les plus importantes sont :

1.2.1. Marcottage

Il suffit de coucher dans le sol un rameau de vigne âgé d'un an, tout en maintenant l'extrémité hors de terre. Afin de faciliter la transplantation, il est recommandé de coucher le sarment dans un panier grillagé qui permettra l'arrachage en motte. Les marcottes peuvent être séparées des plantes mères dès l'automne (**LEVADOUX, 1956**).

1.2.2. Bouturage

Les rameaux boutures sont coupés en janvier et conservés en stratification dans du sable, à exposition nord, jusqu'au moment de leur plantation.

Les boutures à talon s'enracinent plus facilement que les boutures simples, mais si l'on ne dispose que de quelques rameaux, on peut très bien préparer des boutures d'yeux.

Les yeux munis d'une portion de sarment de 10 à 15 mm sont enfoncés en terre, dans du sable humide ; le tout étant ensuite placé à chaud en serre à multiplication ou sur couche.

Les rameaux boutures s'enracinent facilement en plein air ; il suffit de les enterrer presque complètement dans une terre riche et légère, que l'on maintient convenablement humide (MARGARA, 1989).

1.2.3. Provignage

Le provignage consiste à coucher en terre le cep entier, afin de permettre l'enracinement des sarments qu'il porte ; c'est un procédé qui était utilisé avant l'invasion phylloxérique mais abandonné depuis (BOUQUET *et al.*, 1989).

1.2.4. Greffage

C'est le procédé classique de multiplication. Les systèmes de greffage les plus utilisés sont :

- Greffe bouture à l'anglaise compliquée ; ces greffes s'opèrent sur table durant le mois d'avril et le début de mai, la soudure et l'enracinement sont obtenus dans des chambres chaudes (25 à 28°) durant les 10 premiers jours.
- Greffes d'yeux : on opère à œil dormant, fin août début septembre, soit à la main, soit à l'aide de machines spéciales (MARGARA, 1989).

2. 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.

Les premiers résultats intéressants de culture de tissus végétaux furent obtenus par GAUTHERET et WHITE, (1934). Elles se font hors sol en conditions stériles et très contrôlées, dans des flacons ou tubes fermés, sur des milieux synthétiques solides ou liquides. Ces derniers contiennent des sels minéraux, une source énergétique et des adjuvants (ZRYD *et al.*, 1988).

Quelle que soit la technique utilisée, les cultures in vitro requièrent des conditions très précises de milieux et d'environnement. Les conditions peuvent changer au cours de la culture, ce qui rend la maîtrise de la technique plus délicate (AUGE *et al.*, 1989).

Selon (AUGE, 1992), toute cellule végétale vivante, quelle que soit sa spécialisation, est capable de reproduire la plante entière dont elle est issue. C'est grâce à cette totipotentialité que la culture in vitro d'organe ou de tissus provoque la reprise des mitoses.

2.1. Catégories de la culture

2.1.1. 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 (**RAJNCHAPEL A et al., 1985**). la culture de méristèmes depuis les travaux de **MOREL et MORTIN (1950)**, a permis de guérir les plantes atteintes de virus .La micro propagation *in vitro* est plus ou moins utilisée dans la production de plantes conformes pour les premières générations de multiplication. Selon **MARGARA, (1989)** pour produire des plantes génétiquement modifiées, la régénération doit donner des plantes conformes.

2.1.2. Catégorie de la culture *in vitro* non conforme

D'après **BEAUCHESNE G., (1989)**. On appelle variation soma clonale 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 soma clonale 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 les chercheurs constatent 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*.

2.2. Techniques de culture *in vitro*

2.2.1. Culture de méristèmes

Les méristèmes sont des zones de cellules à division intense situées au cœur des bourgeons et des extrémités des racines (**AUGE et al., 1989**).

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 (**TOUTE, 1998**).

Cette technique est utilisée pour obtenir des plantes saines à partir des plantes viroses (**AUGE, 1992**).

2.2.2. 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 micro-propagation *in vitro* apporte un progrès considérable par rapport aux méthodes traditionnelles avec un taux de multiplication de 100 à 1000 fois plus élevé (**TOUTE, 1998**).

La micro propagation 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 (**AUGE et al., 1992**).

L'application de la technique de la micro propagation des plantes ligneuses, fruitiers forestiers, permet l'amélioration de leurs capacités d'enracinement notamment sur le porte greffe reconnue difficile (**BOXUS, 1995**).

2.2.3. 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.

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 (**STEWART et al., 1958**).

2.2. 4...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 (Une revue fait mention d'une vingtaine d'espèces ligneuses capables de révéler une potentialité embryogène souvent décelée à partir d'embryons zygotique (**MARGARA ,1989**).

Il existe 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 (**ROUGET, 1989**). Elles 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 laquelle une prolifération cellulaire est requise. Les travaux de (**RUGHLA, 1998**), 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). Leurs multiplications aboutissent à la formation de groupes de cellules embryogénèses "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).

2.3. Conditions et composition des milieux

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

2.3.1. Sel minéraux :

2.3.1.1. 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).

2.3.1.2. Microéléments

Ce sont les 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 nécessaire à la plante qu'en faible concentration.

2.3.2. 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).

2.3.3. 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).

2.4. Facteurs de milieu

2.4.1. 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 : cette technique consiste à propulser de l'air stérile vers les vitro plantes. Les conditions stériles sont primordiales à obtenir afin qu'aucun champignon ou bactérie ne vienne coloniser les milieux de culture, très favorables à leur prolifération, sous peine de nécrose de l'explant (**CARBONNEAU *et al.*, 2007**).

2.4.2. Lumière et 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).la longueur de jour affecte la vigueur et le développement des proliférations et la croissance des cals, (**HUSSEY *et al.*, 1981**)

Cette dernière pourrait aussi contribuer à la formation des cals (**BRIGGS, 1964**), en général, le début de croissance nécessite une faible intensité lumineuse (500à 1000 lux) avec 12 à 16 heures de photopériodes. Lorsqu'il s'agit de préparer la plantule au repotage en serre, il apparait souvent préférable d'augmenter l'intensité de l'éclairement (par exemple 10000 lux) (**MARGARA, 1989**).

2.4. 3. Température

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

2.4.4. Régulateurs de croissance

Les régulateurs naturels de croissances des végétaux, appelés souvent hormones de croissance, se répartissent actuellement en cinq groupes : auxines, cytokinines gibbérellines, acides abscissiques, éthylènes (**MARGARA, 1989**).

Les facteurs de croissance suivants les auxines (AIA, AIB, AIP) et les cytokinines (la kinétine et la benzylaménopurine) sont des régulateurs de croissance indispensables au bon démarrage et à l'entretien des cultures de tissus végétaux *in vitro* (**MAZLIAK, 1999**).

Les cytokinines y sont impliquées en augmentant le nombre de cellules ; ceci fait en fonction de l'équilibre auxines /cytokinines qui détermine l'organogénèse (**MARGARA, 1989**).

2.4.4.1. Auxine :

L'auxine la plus connue est l'acide indol-acétique (AIA).

Le terme d'auxines a ensuite été élargi à un ensemble de substances qui possèdent des propriétés physiologiques voisines et une conformation chimique apparentée .

2.4.4.2. Cytokinine

Environ 200 cytokinines ont été identifiées et isolées. Leur formule est à base d'adénine substituée : au lieu du H du groupement amine en position 6 on retrouve un autre groupement. De plus, beaucoup de cytokinines sont sous forme conjuguée : dans ce cas, il s'agit le plus souvent de glycosides (**MARGARA, 1989**).

2.4.4.3. Gibbérellines

Le terme gibbérelline désigne l'acide gibbérellique (GA3) et bien d'autres substances (on connaît plus de 110 gibbérellines différentes). Ce sont cependant des di terpènes, possédant toutes un noyau énantiomère du gibbérelane (**AUGE, 1992**).

Notre étude a été réalisée au niveau du laboratoire central, service culture *in vitro* de l'Institut Technique de l'Arboriculture Fruitière et de la Vigne (ITAFV) situé à Tessala El Merdja, Birtouta (Alger), durant la période allant de mars à septembre 2017.

Ce travail vise la régénération *in vitro* de la vigne autochtone *Vitis vinifera* L.

L'objectif de notre travail est de déterminer l'effet du génotype et de la balance hormonale sur l'induction de la callogénèse *in vitro* des explants à partir de fragments de feuilles et de pétioles cultivés sur un milieu de culture **MURASHING** et **SKOOG, (1962)** additionné à une cytokinine (**BAP** : benzyl adénine (6 benzyl aminopurine) et à deux auxines (**ANA** : Acide naphthaléne acétique et (**NOA** : Acide 1 naphthalhoxyacétique).

1. Matériel végétal utilisé

Tout le matériel végétal utilisé au cours de notre expérimentation est représenté par des feuilles et des pétioles (Figure 6) de deux cépages autochtones :

- AMELAL (AL)
- BOUANI (BN)

Les échantillons ont été récoltés tôt le matin dans la ferme de démonstration de Teghenif de la wilaya de Mascara, durant le mois de Mai.

D'autres échantillons ont été prélevés de la serre d'élevage du laboratoire central de l'ITAF.



Figure 6 : Echantillons du cépage AMELAL (**A** : Pétioles, **B** : Feuilles)

Pour les deux cépages (AMELAL et BOUANI), le prélèvement des tiges herbacées pourvus d'explants de feuilles et de pétioles ont été effectués sur le même pied.

Après récolte, les tiges herbacées sont mises dans des sachets en plastique transparents, identifiées (nom du cépage, la rangée et le pied) étiqueté, transportés dans une glacière.

Au laboratoire, les échantillons ont été conservés au réfrigérateur à une température de 4°C durant toute la période de travail.

2. Préparation du milieu de culture

2.1. Préparation des solutions mères

2.1.1. Solutions-mères de macroéléments (x10) et Microéléments (x100)

- Verser approximativement 1 litre d'eau distillée dans un bécher.
- Peser et dissoudre chacun des sels indiqués dans des petits béchers avec de l'H₂O distillée.
- Transférer les solutions dans un flacon et compléter à 1 litre avec de l'eau distillée.
- Identifier le flacon puis le ranger au réfrigérateur.

2.1.2. Solutions-mères de Fer (MS) (x100)

- Verser 500 ml d'eau distillée dans un bécher de 1L
- Peser 1.3 mg **FeSO₄** et la diluer dans un peu d'eau distillée.
- Peser 1.8 mg de **Na₂ EDTA**, et diluer dans un peu d'eau distillée.
- Mélanger les deux solutions des deux produits et ajuster jusqu'à 500 ml avec de H₂O distillée.
- Transférer la solution dans un flacon fumé, identifier puis le ranger au réfrigérateur.

2.1.4. Solutions-mères de vitamines (MS) (x100)

- Verser approximativement 100 ml d'eau distillée dans un bécher.
- Peser et dissoudre chacune des vitamines indiquées.
- Transférer la solution à flacon volumétrique et compléter à 100 ml avec de l'H₂O distillée.
- Verser dans des tubes à visse à raison de 10 ml de cette solution.
- Ranger au réfrigérateur et identifié.

La myo-inositol est additionnée au moment de la préparation de milieu de culture

2.1.5. Solutions-mères des régulateurs de croissance :

Ces composés, contrairement aux éléments nutritifs et aux vitamines, ne sont pas solubles dans l'eau. Ils doivent donc être préalablement solubilisés dans un solvant approprié.

Si la quantité désirée est inférieure à 2 mg, il est conseillé pour plus de précision de procéder à la préparation d'une solution mère.

Ainsi, on peut concentrer 10, 100 à 1000 fois le composé requis dans un volume de 100 ml.

Peser 50 mg de régulateur de croissance 50 mg et le dissoudre dans quelques gouttes du solvant approprié.

Etendre avec un peu d'eau, vérifier l'état de dissolution et ajouter un peu de solvant au besoin.

Transférer la solution dans un bécher et compléter à 50 ml avec de l'eau (v/v).

Compléter au volume prévu dans un flacon volumétrique avec H₂O distillée.

Transférer dans un flacon hermétique et l'identifier et le ranger au réfrigérateur à une température de 4°C.

Distribuer la solution dans des eppendorfs à raison de 0,5 ml chacun et les conserver au congélateur à -20°C pour une éventuelle utilisation.

Tableau 1 : Types de régulateurs de croissance utilisés

Régulateurs		Solvants
1- Auxines	2-4 D	<u>NaOH 1N</u>
	AIA	<u>NaOH 1N</u>
	NOA	<u>NaOH 1N</u>
	ANA	<u>NaOH 1N</u>
2- Cytokinines	Adénine	NaOH ou HCl
	Adénine sulfate	HCl 1N ou NaOH
	BAP	NaOH 1N
	BA	NaOH 1N
	2ip	NaOH 1N
	Kinéline	NaOH 1N
	Thidiazuron	DMSO
	Zeatine	NaOH 1N

2.2. Préparation des milieux de culture

Afin de déterminer les conditions nutritives favorables à la croissance des explants, ces derniers ont été mis dans le milieu de culture MS, riche en sels minéraux (**tableau 2**), qui se répartissent en deux groupes,

Les macroéléments (N, P, K, S, Mg, Ca) et microéléments (Fe, B, Mn, Zn, Cu, N, Co, Mo, I). Dans tous les essais utilisés, la source énergétique de carbone est assuré par le le saccharose utilisé à raison de 30 g/l. Ce milieu contient aussi les vitamines, chélates de fer, additionné à des régulateurs de croissance. Le milieu est solidifié par l'Agar Agar. Le pH du milieu est ajusté à 5,7-5,8 soit par une solution acide (HCl) ou une solution de NaOH.

Tableau 2 : Composition de milieu MURASHINGE ET SKOOG (MS, 1962)

Constituants	Concentration finale (mg/l)
<u>Macro-éléments (x 10)</u>	
NH ₄ NO ₃	1650
KNO ₃	1900
CaCl ₂ , 2 H ₂ O	440
MgSO ₄ , 7 H ₂ O	370
KH ₂ PO ₄	170
<u>Micro-éléments (x 100)</u>	
MnSO ₄ .4 H ₂ O	22,3
ZnSO ₄ .7H ₂ O	8,6
H ₃ BO ₃	6,2
KI	0,83
Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	0,25
CuSO ₄ .5H ₂ O	0,025
CoCl ₂ .6H ₂ O	0,025
<u>Chélates de Fer (x 100)</u>	
Na ₂ EDTA	37,3
FeSO ₄ .7H ₂ O	27,8
<u>vitamines (x 100)</u>	
Glycine	
Acide nicotinique	2,0
PyridoxineHCl	0,5
Thiamine HCl	0,5
	0,1
Myo-inositol	100
Sucres (sucrose)	30
Agar	8

Le milieu de culture est additionné à 8 balances hormonales (MS0, MS1, MS 2, MS3, MS4, MS5, MS6, MS7, MS8) (**tableau 3**). Le milieu dépourvu d'hormones (MS0), est considéré comme témoin.

Tableau 3 : Balance hormonale testé.

Les hormones Les milieux	BAP Mg/l	NOA Mg/l	ANA Mg /L
MS0	0	0	0
MS1	1	1	/
MS2	1	2	/
MS3	2	1	/
MS4	2	2	/
MS5	1	/	1
MS6	1	/	2
MS7	2	/	1
MS8	2	/	2

Le milieu est préparé avec les volumes calculés à partir des concentrations des solutions mères de chaque constituant préalablement préparées et ce, selon le protocole suivant :

- Verser approximativement 500 ml d'eau dionisée dans un bécher.
- Prélever de chaque solution le volume de concentration calculée pour 1litre de milieu de culture (macroéléments, microéléments, chélates de fer et vitamines).
- Peser le saccharose, la myo-inositol et l'agar agar et les dissoudre dans le mélange des solutions mères.
- Compléter à 1litre avec de l'eau distillée.
- Ajuster le pH à froid à 5.7 ± 0.1 avec du HCl (0.1N) ou NaOH (0.1N) selon le besoin.

3. Préparation des stérilisants

3.1. Solution de chlorure de mercure

La solution de l'hypochlorite de mercure est préparée à raison de 0.1g/l dans des conditions de protection maximales parce que ce produit est très toxique et cancérigène. La manipulation se réalise donc sous une hotte chimique avec l'utilisation de gants et de masques.

Ont pesé la quantité utilisée de produit à dissoudre dans un volume d'eau distillée stérile et compléter le jusqu'à 1 litre. Agiter la solution pendant 10 minutes sur un agitateur avec l'utilisation d'un barreau magnétique.

3.2 .Solution de l'hypochlorite de sodium

Dans une éprouvette graduée, prélever un volume de la solution de l'hypochlorite de sodium à 15% et ajuster avec deux volumes d'H₂O distillée stérile pour obtenir une concentration de 5%.

4. Moyens d'asepsie

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.

Avant de démarrer le processus de travail, la hotte à flux laminaire horizontal est désinfectée avec de l'alcool à 70° tout en mettant la mise en marche des rayons ultra-violet pendant 15mn au minimum pour limiter les sources de contamination de l'air (bactéries et champignons). Les icones et les eppendorfs ont été préalablement stérilisés à l'autoclave à 120°C pendant 20 mn. La solution des hormones est stérilisée à partir des filtres stérilisants de 0.2 µm (filtres NALGEN), en utilisant des seringues stériles).

Le milieu de culture est stérilisé à l'autoclave à 120°C et une pression d'1 bar pendant 20 minutes, versé sous hotte sous conditions totalement stériles dans des boîtes de Pétri stériles à raison de 20 ml par boîte puis scellées par la suite avec du parafilm et conservées pour l'utilisation.

Les instruments de travail de laboratoire (pinces, boîtes, manche à bistouri) et consommable (verrerie, papier filtre) sont recouverts avec du papier aluminium, stérilisés à sec dans une étuve à 200°C pendant 2 heures (Annexe 1).

4.1. Désinfection du matériel végétal

Au laboratoire, les tiges herbacées sont lavés abondamment avec de l'eau courante, ensuite, elles sont débarrassées de leurs feuilles, les pétioles à leur tour sont coupés des feuilles et mis toutes les deux dans des bocal en verre. Elles ensuite lavées à l'eau

courante additionnée de 2 gouttes de détergent + 1ml d'hypochlorite de sodium 3 fois durant 5 minutes chacune. Puis ces explants sont trempés dans de l'eau distillée stérile pendant 20 minutes pour éliminer les traces des produits qui peuvent altérer les tissus du végétal.

4.2. Stérilisation du matériel végétal

Avant chaque manipulation, la surface de travail de la hotte doit être désinfectée d'abord avec de l'hypochlorite de sodium à 12%, puis avec de l'éthanol à 70%. L'ultraviolet est allumé 15 minutes puis, le flux de désinfection et le stérilisateur à billes doivent être allumés 30 minutes avant toute manipulation de stérilisation du matériel végétal. Au cours des manipulations, les instruments sont plongés dans de l'alcool à 96°C, brûlés à la flamme du bec bunsen puis, stérilisés au stérilisateur à billes pendant quelques secondes

Le matériel végétal (feuilles et pétioles) est stérilisé selon la méthode classique, qui consiste à un trempage rapide dans de l'éthanol à 70%, trempage dans le stérilisant additionné de deux gouttes de tween enfin, au rinçage à l'H₂O distillée stérile. Deux stérilisants ont été utilisés dans notre travail à savoir l'hypochlorite de sodium et le chlorure de mercure, dans le premier cas les explants ont été rincés trois fois pendant 5mn chacune, alors que pour le deuxième, ils ont été rincés cinq fois avec la même durée pour chacune.

La stérilisation a été effectuée dans des conditions aseptiques, elle est réalisée sous hotte à flux laminaire horizontal. La stérilisation des explants est faite selon plusieurs essais afin de retenir la plus appropriée à notre matériel végétal et pour obtenir les meilleurs résultats :

1-Trempage dans l'alcool 70%, et trempage dans l'hypochlorite de sodium à 3% pondons 20 min additionné de quelque gouttes de Tween à différentes concentrations (2 gouttes par 100ml) et additionné le rinçage à l'eau distillé stérile 5 fois pondons 15min.

2-pour le 2^{ème} essai nous avons éliminé le Trempage dans l'alcool 70%, et nous avons changé le trempage dans l'hypochlorite de sodium à 7% par Trempage dans chlorure de mercure 0.3% pondons 15min additionné de quelque gouttes de Tween, en modifiants la durée de trempages des explants dans la solution stérilisante.

3-pour le 3^{ème} essai nous avons augmenté la concentration de chlorure de mercure à 0,5% pondons 15 minutes et additionné de quelque gouttes de Tween à différentes concentrations (2 gouttes par 100ml) additionné le rinçage à l'eau distillé stérile 5 fois pondons 15min.

Tableau 4 : Essais de désinfection du matériel végétal

1 ^{er} Essai	2 ^{eme} Essai	3 ^{eme} Essai	4 ^{eme} Essai
<ul style="list-style-type: none"> - Trempage dans l'alcool à 70° / quelque secondes - Trempage dans l'hypochlorite de sodium à 3% / 20min -Rinçage à l'eau distillé stérile 5 fois / 15min. 	<ul style="list-style-type: none"> - Trempage dans chlorure de mercure 0.3% / 15min - Rinçage à l'eau distillé stérile 5 fois / 15 min. 	<ul style="list-style-type: none"> -Lavage des explants à hysacryllaurylé une fois / 5 min. - Trempage dans chlorure de mercure 0.3% / 20min - Rinçage à l'eau distillé stérile 5 fois / 15 min. 	<ul style="list-style-type: none"> -Trempage dans chlorure de mercure 0.5% / 15min -Rinçage à l'eau distillé stérile 5 fois / 15 min.

5. Mise en culture des explants

Une fois les explants stérilisés, ils sont séchés sur papier filtre avant leur mise en place dans leurs milieux appropriés. Les feuilles et les pétioles sont manipulés dans des boites en verre stériles. Les feuilles sont coupées longitudinalement en portions sous forme de petits carrés (Figure 7 : **A**) et de rectangle. Les pétioles sont coupés longitudinalement en deux parties symétriques puis fragmentés en petits segments (Figure 7 : **B**).

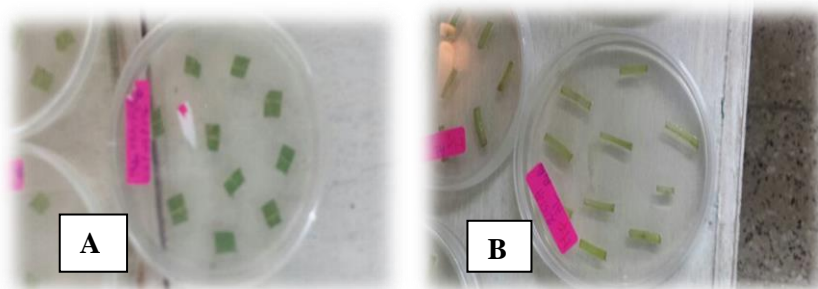


Figure 7 : Mise en culture des explants (A : Feuilles, B : Pétioles)

Les explants sont repiqués de manière que la coupe soit en contact du milieu, dans des boîtes de Pétri contenant le milieu MS additionné de 9 balances hormonales (M1, M2, M3, M4, M5, M6, M7, M8) à raison de 10 explants par boîte, soit 2 répétitions pour chaque traitement. Le milieu dépourvu d'hormones (M0) est considéré comme témoin, soit un total de 240 traitements.

Pour tous les essais réalisés, les boîtes de Pétri ont été placées dans une chambre de culture suivant un dispositif complètement aléatoire.

La croissance des cultures a été réalisée sous les conditions contrôlées, une photopériode de 16 heures de lumière et 8 heures d'obscurité, une température de $25 \pm 2^\circ\text{C}$, et une intensité lumineuse de 2000 lux fournie par des lampes fluorescentes blanches.

Les observations ont été faites au début chaque 3 jours depuis la mise en culture pour détecter les contaminations et les brunissements. Le taux d'induction des cals et l'intensité de prolifération des cals ont été évalués après quatre semaines de culture. Les résultats finaux ont été relevés après 3 mois.

6. Paramètres étudiés

Au cours de nos essais, nous avons évalué les paramètres suivants :

- Taux de contamination exprimé en pourcentage (%).
- Taux de brunissement exprimé en pourcentage (%).
- Taux d'explants présentant des cals (%).
- Aspect qualitatif des cals (la nature, la taille et la couleur).

1. Désinfection des explants

1.1 Explants prélevés du champ

La mise en culture des tissus végétaux est l'une des étapes les plus difficiles dans les techniques de culture *in vitro* particulièrement chez les espèces ligneuses. Dans notre expérimentation, nous avons utilisés deux sortes de prélèvement l'un à partir de champ et l'autre à partir la serre.

Les résultats de la désinfection des explants prélevés du champ sont illustrés dans le Tableau 5.

Tableau 5 : Désinfection des explants prélevés du champ

Paramètre Essais	Méthode de désinfection	Taux de brunissement		Taux de contamination	
		AL	BN	AL	BN
1 ^{er} Essai	Trempage dans l'alcool à 70° (quelques secondes) - Trempage dans NaClO à 3% (20 min) - Rinçage à H ₂ O stérile 5 fois (15min).	26%	26%	82%	60.5%
2 ^{eme} Essai	Trempage dans HgCl ₂ à 0.3% (15min) - Rinçage à H ₂ O distillée stérile 5 fois (15 min).	15%	14%	70%	50%

L'effet de la désinfection des explants prise directement du champs dans les différents essais testés nous a permis déduire que pour la désinfection à base d'hypochlorite de sodium(NaClO_2) à 7% pendant 15min après trempage à l'alcool 70° pendant 1min a donné un taux de contamination total de 82% et ce pour le cépage AMELLAL et 60,5% pour le cépage BOUANI.

Ces résultats sont similaires à celui **BOCCON-GIBOD (1989)**, l'utilisation de l'hypochlorite de calcium est plus efficace, 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 la contamination des tissus mise en culture *in vitro*. Ces résultats n'est pas similaire de **AISSANI, KHETTOU (2016)**, qui eux ont obtenus un taux de contamination total de 26.19% et un taux de brunissement de 47.61% avec la désinfection par 7% hypochlorite de sodium.

Pour le brunissement des explants, nous avons constaté un faible pourcentage (26%) et ceux pour les deux cépages testés, ce résultat n'est pas similaire à celui de **BENIN, (1988)** qui confirme est que la vigne est parmi les espèces ayant dans leurs tissus des quantités importantes des produits phénoliques de type ortho phénols et les tannins. Aussi ce résultat peut être expliqué par des explants qui proviennent de champs.

1.2. Explants prélevés de la serre

Les résultats des échantillons prélevés de la serre et fragmentés pour être désinfectés sont reportés dans le tableau 6.

Tableau 6 : Désinfection des explants prélevés de la serre.

Paramètres Essais	Méthode de désinfection	Taux de Brunissement		Taux de contamination	
		AL	BN	AL	BN
1 ^{er} Essai	Trempage dans l'alcool à 70° (quelques secondes) - Trempage dans NaClO à 3% (20min) - Rinçage à H ₂ O stérile 5 fois (15min).	46%	48%	45%	55%
2 ^{eme} Essai	Trempage dans Hgcl ₂ à 0.5% (15min). - Rinçage à H ₂ O distillé stérile 5 fois (15 min).	16%	3%	18%	14%

La désinfection de ces explants par le chlorure de mercure Hg Cl₂ seul à 5% pendant 15min, nous a permis de réduire le taux de contamination à 16% et le taux de brunissement de 8% pour les deux cépages.

Suite à ces résultats, nous avons opté pour l'utilisation du HgCl₂ à 5% pour désinfecter nos explants provenant de la serre, cette désinfection a été également utilisée par **KLUNGER (1984)** sur un matériel issu de serre

2. Mise en culture des explants prélevés du champ

2.1. Cépage AMELLAL

Les résultats de contamination (figure 9) sont enregistrés après 8 jours de la mise en culture des feuilles et des pétioles dans les huit milieux de cultures à base de **MURASHIGE et SKOOG (1962)**

2.1.1. Taux de contamination

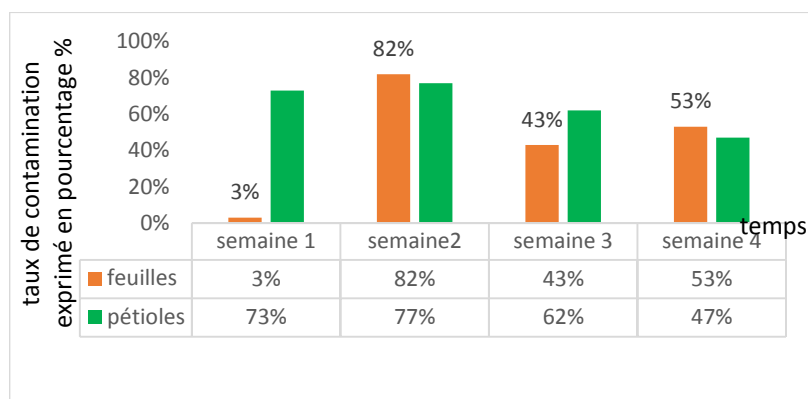


Figure 8 : Taux de contamination du cépage

Nous avons enregistré un taux élevé de contamination pour des échantillons feuilles et les pétioles de cépage AMELLAL, respectivement 55,45% et 64,75%, ce qui nous a permis de conclure que le chlorure de mercure a une efficacité certaine pour élimination des contaminations. Ces résultats corroborent avec ceux de **RUGINI (1984)** et **MARGARA (1989)**, le taux de contamination est lié à la durée des cultures qui est longue au minimum 30 jours, 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 végétal, aboutit à l’envahissement de la culture.

Pour la majorité des contaminations observées, nous avons constaté le développement d’un voile d’aspect laiteux de couleur blanchâtre, il s’agit bien de la contamination bactérienne.

2.1.2. Taux de brunissement

Un faible taux de nécrose est observé pour le cépage AMELLAL, nous avons enregistré 14% pour les feuilles et 26% pour les pétioles. D’après **MARGARA (1989)**, le brunissement de l’explant est dû à la sécrétion des composés phénoliques qui provoquent une inhibition de la croissance.

2.2. Cépage BOUANI

Pour le cépage BOUANI, nous avons enregistré un taux diffère de contamination et de brunissement par rapport le cépage AMELLAL.

2.2.1. Taux de contamination

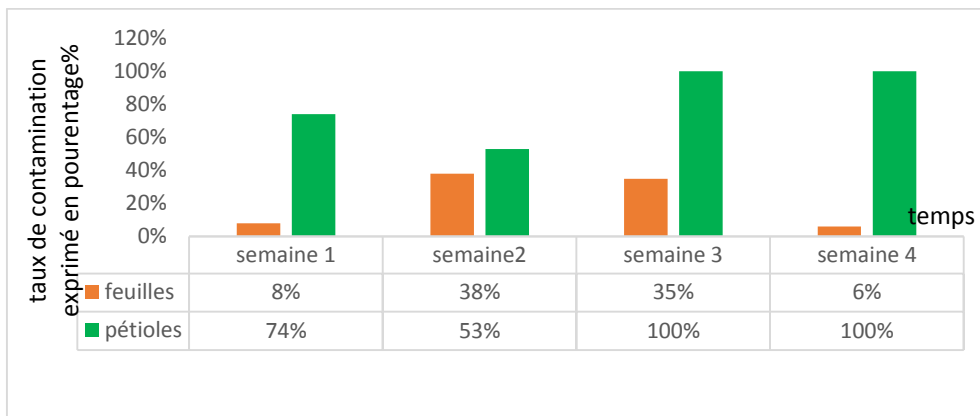


Figure 9 : Taux de contamination du cépage BOUANI

D'après les résultats de contamination illustrés dans la figure 10, nous avons enregistré un taux faible de contamination pour les feuilles (41,75%), par contre pour les pétioles ce taux est plus élevé 81,75%.

2.2.2. Taux de brunissement

Nous avons enregistré un taux de brunissement de 11% pour les feuilles et 0% pour les pétioles pour le cépage BOUANI.

3. Mise en culture des explants prélevés de la serre

Du moment que les résultats des explants prélevés du champ ont donné un taux élevé de contamination, nous avons donc opté à prélever les échantillons uniquement de la serre. Les plantules sont en pleine végétation avec tiges herbacées.

3.1. Cépage AMELLAL

Les résultats des contaminations et du brunissement sont illustrés dans le tableau 7.

Tableau 7 : Contaminations et brunissement des feuilles et des pétioles.

Paramètres	Nombre des échantillons	Taux de Brunissement	Taux de Contamination
MS0	10	0	0
MS1	20	0	0
MS2	20	4	0
MS3	20	2	0
MS4	20	0	11
MS5	20	3	3
MS6	20	0	3
MS7	20	0	0
MS8	20	0	0

Les résultats enregistrés dans le **tableau 7**, montrent que le taux de contamination est de 10% avec un taux de brunissement de 5.29 %. Les résultats sont montrant que probant car le taux de contamination et de brunissement sont très faibles par rapport à ceux obtenus au champ. Ce faible taux peut être dû à l'efficacité de produit de désinfection utilisé chlorure de mercure où la dose adéquate pour cet essai est de 0,5g /L (**MARGARA ,1989**).

3.2. Cépage BOUANI

3.2.1. Taux de contamination

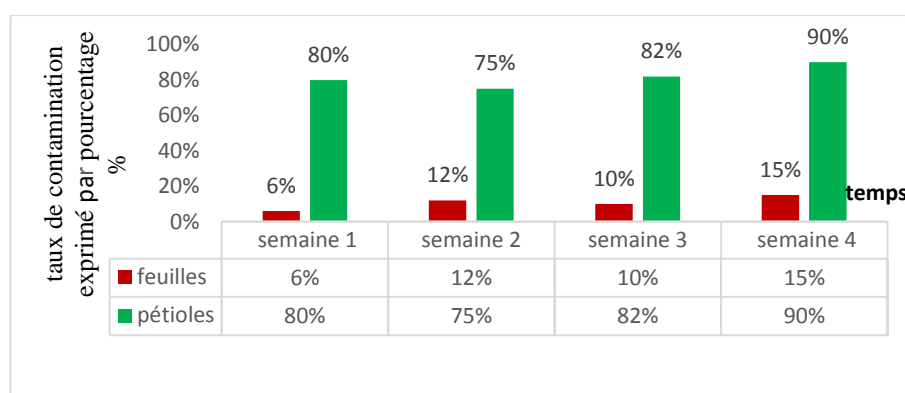


Figure 10 : Taux de contamination du cépage BOUANI prélevé de la serre.

Pour le taux de contamination du cépage BOUANI prélevé de la serre nous avons enregistré un faible pourcentage au niveau des feuilles avec 10,65% par contre pour les pétioles le taux de contamination est plus élevé avec 81,71%.

3.2.2. Taux de brunissement

Nous avons enregistré un taux faible de brunissement pour le cépage BOUANI de 7%

4 .Taux (%) de callogènes pour les deux cépages

L'aptitude à la callogénèse dépend de l'origine de l'explant mis en culture donc la callogénèse est défèrent d'un cépage a une autre

Les résultats de callogénèse sont illustres dans le tableau suivant :

Tableau 8 : Taux d'explants callogènes de deux cépages

Période	Taux des explants callogènes (cépage AMELLAL)	Taux des explants callogènes (cépage BOUANI)
1 ^{er} semaine	0%	0%
2 ^{eme} semaine	40%	12%
3 ^{Eme} semaine	27%	55%
4 ^{eme} semaine	45%	53%



Figure 11 : Cals produits par les pétioles du cépage AMELLAL (Milieu MS).

5. Aspect qualitatif des cals

L'aspect qualitatif des cals regroupant ainsi la nature, la taille et la couleur des cals varie selon le traitement hormonal .Le meilleur aspect du cal embryogène est obtenu avec l'hormone BAP et qui est représenté par des cals de gros calibre, ils sont friables et blanchâtres. Les traitements hormonaux (ANA+BAP) ont donné des cals de très petite taille par rapport à ceux formés avec les autres hormones .Aussi, ils ont une couleur presque jaune à brunâtre. Selon (PIATTI, 1988), les cals mis à l'abri de la lumière sont généralement de couleur beige à jaune, de texture friable à consistance molle, caractéristiques morphologiques des cals embryogénèse (Figure 12 et 13).

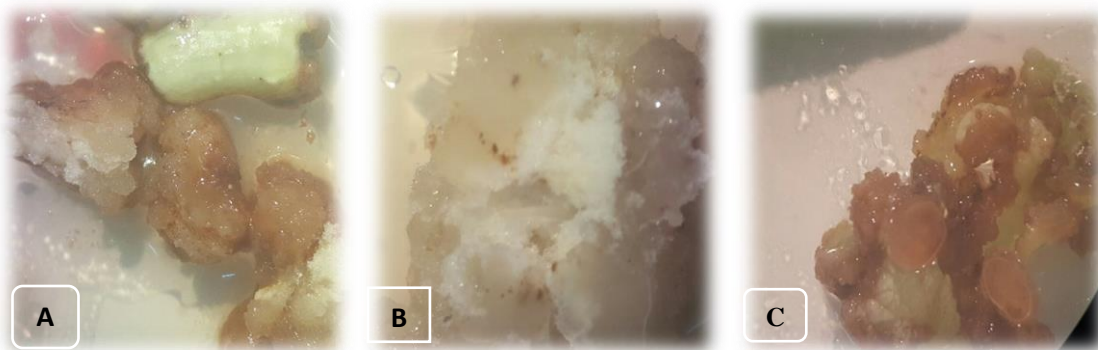


Figure 12 :Cals repiqués sur le milieu MS observés après 20jours sous loupe binoculaire (Cépage AMALLAL **A et B** : Pétioles, **C** : Feuilles)



Figure 13:Cals repiqués sur le milieu MS observés après 20 jours sous loupe binoculaire (Cépage BOUANI **A et B** : Pétioles, **C** : Feuilles).

Discussion

L'effet de la désinfection à base d'hypochlorite de sodium à 7% pendant 15min après trempage à l'alcool 70° pendant 1min, montre un taux de contamination total (82%) Pour AMELLAL et (60,5%) pour BOUANI, par contre, nous avons constaté un faible pourcentage de brunissement (26%) et ceux pour les deux cépages testés. Ces résultats sont similaires à celui **BOCCON-GIBOD (1989)**, l'utilisation de l'hypochlorite de sodium où les ions de sodium peuvent dans certains cas gêner la croissance, d'où le brunissement et la contamination des tissus mise en culture *in vitro*.

Pour la désinfection de matériel végétale par chlorure de mercure, Nous avons enregistré un taux de brunissement de 14% pour les feuilles et 26% pour les pétioles. Ce faible taux peut être dû à l'efficacité de produit de désinfection utilisé (chlorure de mercure) et utilisation d'une doses adéquate (0,5g /L) effectivement **MARGARA (1989)**, le brunissement de l'explant est dû à la sécrétion des composés phénoliques qui provoquent une inhibition de la croissance

L'initiation à la callogénèse a été observée chez les feuilles des deux cépages après deux semaines de culture, contrairement aux pétioles qui a présenté une callogénèse faible à nulle.

Effectivement, **MARTIN (1980)** a signalé qu'un milieu favorable à une espèce ne convient pas forcément à une autre même très voisine, 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 peut être génotypiquement contrôlée (**GEORGE ET SHERRINGTON, 1984**), (**BROWN, 1988**).

L'aptitude à la callogénèse dépend de l'origine de l'explant mis en culture (**ZRYD et al., 1989**).

Nous avons enregistré un taux de callogénèse de 45 % pour les feuilles et 1% pour les pétioles pour le cépage AMELLAL, par contre pour le cépage BOUANI., nous avons obtenu 53 % pour les feuilles et 3 % pour les pétioles. En effet, **GROSSER et GMITTER (1909)**, mentionnent que les auxines sont généralement utilisées pour stimuler l'induction des cals embryogénèses.

Nous avons enregistré aussi un taux élevé pour les milieux de **MURASHING** et **SKOOG** qui contient la **BAP+I'ANA** soit (MS5, MS6, MS7) pour le cépage **AMELLAL** et (M3, M4, M5) pour le cépage **BOUANI**. Ces résultats confirment ceux obtenus par **AUGE et al., (1989)** que la BAP est une cytokinine qui favorise la division cellulaire. De même **RAHAMAN et al., 1996**. Ont mis en évidence le rôle de la BAP sur l'induction des cals pour plusieurs espèces du genre *Citrus*.

Le pourcentage de callogénèse diffère d'un cépage à un autre et la réussite de processus callogénèse est lié aux type de phytohormones utilisées dans le milieu de culture, à leurs balances et leurs combinassions (**MARGARA, 1996**). Nos résultats corroborent avec ceux de **GAJ, 2004** qui ont constaté que le choix des hormones de croissance détermine deux phénomènes, la capacité de réponse des explants et leur réaction morphogénique, et généralement l'embryogénèse somatique est induite avec la présence des auxines seules ou en combinaison avec les cytokinines.

Aucune callogénèse n'a été observée avec le traitement sans hormones (témoin), Effectivement **OUKARA, 2007** a obtenu le même résultat pour la variété du pistachier de l'atlas.

Conclusion

Dans le cadre des travaux de recherche de l'ITAF sur la production et la régénération de plantes par micro propagation, nous avons entrepris notre expérimentation.

Cet essai a été réalisé pour l'obtention de vitro plants de deux cépages autochtones de vigne (AMELLAL et BOUANI) afin de les régénérer et de les multiplier par la suite.

Au cours de notre expérimentation, nous avons été confronté aux problèmes de la contamination, dans des essais répétés nous ont permis de retenir la méthode de désinfection la plus appropriée en faisant un trempage des explants dans le chlorure de mercure à une concentration de 0.5mg pendant 15 minutes.

Au terme de notre étude nous pouvons déduire que la durée du déclenchement de la callogenèse après la mise en culture des explants diffère d'un cépage à un autre.

La durée maximale est enregistrée après 10 jours de mise en culture dans le milieu **MURASHING et SKOOG (1962)**.pour le cépage BOUANI en utilisant la cytokinine BAP additionnée à l'auxine ANA.

Le traitement à la cytokinine BAP additionné avec l'auxine ANA a induit la callogenèse des deux cépages étudiés, le meilleur taux des explants ayant formés des cals était données par ce traitement.

Ainsi, le taux le plus important est obtenu avec les milieux MS5 (BAP 1mg+ ANA 1mg), MS6 (BAP 1mg+ ANA 2mg), MS7 (BAP 2mg+ ANA 1mg) et les plus faibles taux sont obtenus par les milieux MS1 (BAP 1mg+NOA 1mg), MS2 (BAP 1mg+NOA 2mg) .

PERSPECTIVES

Il est nécessaire de tester d'autres milieux de culture pour connaître quel serait le milieu de d'expression de la callogenèse induite ainsi de micro propagation le plus approprié pour les explants des cépages AMELLAL et BOUANI.

L'utilisation d'autres combinaisons et concentrations s'avèrent nécessaires. Au terme de notre travail de recherche nous pouvons conclure que la technique de micro propagation *in vitro* semble prometteuse et ouvre de nouvelles voies dans le domaine biologique et agricole.

Afin de préserver et conserver les cépages autochtones, il est souhaitable de confirmer et poursuivre les travaux déjà entrepris.

- AGGAD H., 1988.** Matériels, méthodes et techniques de détection des maladies à virus sur la vigne. Rapport de stage pratique. Italie. Pp. 22.
- AISSANI A, KHETTOU O., 2016.** contribution à la régénération de deux variétés autochtones (AMELLALE et AHCHICHEN) de la vigne par embryogénèse somatique. Thèse. Uni Blida 76P.
- AOUF M., 1972.** La conversion-reconstitution du vignoble algérien. Option méditerranéenne. Pp. 65-67.
- AUGE R, BEACHESNE G, BOCCON-GIBOD., 1989.** La culture *in vitro* et ses applications horticoles. Ed. France. 225 P.
- AUGE R., 1992.** La nouvelle botanique culture *in vitro* : revue Sciences et vie. Ed, Paris. Pp. 48-55.
- BEAUCHESNE G., 1989.** La culture *in vitro* et ses applications horticoles. 269 P.
- BENIN R., 1988 .**Regeneration of plant through isolated scirtelum culture of durum. Heath .plant .SCI. Pp.116- 197.
- BOCCON-GIBBOD J., 1989.** La culture *in vitro* et ses applications horticoles. Ed. Lavoisier Tec et Doc. J.B Bailliere. 25 P.
- BOUBY L, TERRAL J., 2010.** La vigne sauvage (*Vitis vinifera* L.) : une plante cultivée dans les établissements de la Narbonnaise. Exploitation Du milieu et gestion Des ressources végétales De la préhistoire à nos jours. Ed. APDCA, Antibes. 12 P.
- 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).Pp . 565-574.
- BOXUS PH., 1978.** Cultures de tissus et assainissement. Extrait du compte rendu de la journée d'étude belgian. I.S.H.S., Pp.75-80.
- BRIGGS DE., 1964.** Origin and distribution of an amylase in malt.J. Inst Brew. 14 P.
- BROWN C.D.W., 1988.** Germplasm of *in vitro* somatic embryogenesis in alfalfa. Hortscience. 23(3):526-531.
- CARBONNEAU A, DELOIRE A, BENOIT J., 2007.** La vigne physiologie, terroir, culture, Ed.Dunod, Paris (1). 441 P.
- COUTIN R., 2002.** Acariens et insectes de la vigne. Insectes 126 (3).Pp. 20-23.
- DENIS R., 2005.** La vigne : le choix des cépages .La taille. Les soins. Ed. Paris. Pp. 25-66.
- DUBOIS J, DESHAIES L., 1997.** Guides de vignobles du Québec: sur la route des vins. Les presses de l'université Laval. (QC). 297 P.

GAJ MD., 2004. factors influencing somatic embryogenesis induction and plant regeneration with particular reference to *Arabidopsis thaliana* L. Huynh .plant growth regular 43: Pp.27-47.

GALET P., 1993. Précis de viticulture. Ed. Déhan, Montpellier. 582 P.

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

GAUTHERET R., 1959. La possibilité de réaliser les cultures indéfinies des tissus de tubercules de carottes. C.R. Acad. SCI. 208. Pp .118-129.

GEORGE E, SHERRINGTON, P., 1984. Plant propagation by Tissue Culture. Eastern Press. England. 344P.

GREGORY C., 2011. Bases moléculaires de la variation clonale chez la vigne (*Vitis vinifera* L.).Ecole doctorale SIBAGHE : Systèmes Intégrés en Biologie, Agronomie, Géosciences, Hydro sciences, Environnement. 176 P.

GROSSER JW et GMITTER FG .,1990. Protoplast fusion in citrus improvement Plant Breed .Rev 8.Pp339-374.

HUGLIN P., 1986. Biologie et écologie de la vigne. Ed. Payot Lausanne, Paris. 204 P.

HUSSEY G, STACEY NJ., 1981. *In vitro* propagation of potato (*Solanum tuberosum*) of photoperiod on *in vitro* tuberisation of potato- *S tuberosum*- .JEA Seabrook shirlyn m CD. Levy. Plant cell m tissue and organ culture .Pp. 43-51.

JULLIEN M., 1991. La multiplication végétative *in vitro* .base méthodologique et physiologique .D.E.A. Resource génétique et amélioration des plantes .INA Paris grignon .101P.

KLUNGER S., 1984. Recherche sur la multiplication végétative *in vitro* da quelques variétés de Pommiers. Thèse 3ème cycle, Clermont II, P 125.

L'horticulture. Station de physiologie INRA, Dijon, Pp. 222-231.

LERY., 1982. L'agriculture au Maghreb G.P. Ed. Maisonneuve et Larose. Pp 284-286.

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). Pp.59-115.

MARCHIVE C., 2006. Identification et caractérisation fonctionnelle d'un gène codant un facteur de transcription de type WRKY chez la vigne. Implication dans les mécanismes de défense. Thèse. Doc. Uni. Bordeaux 1, en Sciences des Aliments. 346P.

MARGARA J., 1989. Base de la multiplication végétative. Les méristèmes et l'organogénèse. Institut National de la recherche Agronomique.262P.

- MARIO C., 1996.** La culture de la vigne. Ecological agriculture projects. 21: Pp 637-644.
- MARTIN N., 1980.** La culture de méristème : la recherche au service de l'agriculture et de
- MAZLIAK P., 1999.** Physiologie végétative : croissance et développement .Ed .Hermann.99p.
- MOREL G, MARTIN C., 1952.** Guérison de pommes de terre atteintes des maladies à virus CR, Acad, Agro. Fr, 41. Pp432-475
- OUKARAA FZ., 2007.** Micro propagation du pistachier de l'atlas (*pistacia Atlantica L.*) par l'embryogenèse somatique .Thèse de magister. Uni .BLIDA .188P .
- PIATTI MF., 1988.** Embryogenese somatique et synchronisation du développement embryonnaire. Thèse de doctorat .paris .130P.
- QUELENIS N., 2008.** La vigne dans le monde : CCI. Champagne-Ardenne. Quincidence of togninia minima perithecia in esca affected vineyards in California, Plant Dis. 89. Pp. 857-871.
- RAHMAN MH., GROSAL SS., BRAR D., 1996.** Plants regeneration from callus cultùres of citrs limon .Crop.IMPR., 19(2) . Pp .100-103.
- RAJNCHAPEL A, GUERCHE PH., 1985.** Méthodes *in vitro* et productions végétales Biofutur octobre. 1985. Pp.31-43.
- REYNIER A., 1991.** Manuel de viticulture. Ed. J.B Bailliére. Paris. 6 Emme. Ed. 411 p.
- REYNIER A., 2007.** Manuel de viticulture. Ed.TEC & DOC. Paris. 10éme. Ed. 527 P.
- RIBEREAU-GAYON J ., PEYNAUD E., 1971.** Sciences et techniques de la vigne Tome
- ROUGET., Y 1989.** Embryogenèse somatique de la laitue (*lactuca sativum. L*), these de doctorat. Uni .d'Orsay.147P. **SAADI A., 1991.** Régénération de plantes de pois, (*pisum sativum . L*) par embryogenèse somatique. Thèse de doctorat. Paris Grignon. p 162.
- RUGHLA A., 1998.**Somatic Embryogenesis and plantlet formation in *santatum album L.* and *S .Spicatum*.Jou.Exp Bot 49(320): Pp.155-162.
- RUGINI E., 1984** *in vitro* propagation of some olive (*olea-eiropaea.L*) cultivar with défèrent roop-ability, and medium développement, eising analypital, DATA forme développement, shoop-and Embryon, Spi, Hordtes, 24.PP123-124.
- SIMON J., EGGENBERGER W, KOBLET W, MISCHLER M SCHWARZENBACH J., 1992.** Viticulture. Ed. Payot, Lausanne. Pp. 223.
- Steward D, NELSEN J, STRICKLAND S, WELKER K., 1958.**Physiology of the development of somatic embryo in cell culture of alfalfa and celery. Biotechnology in science Academic press. Pp .35-47.
- TOUTE Y ., 1998.**Génie génétique et biotechnologie, concept et méthodes candidatures à l'agronomie et aux bio-industries .Ed. DUNOD. 209 P.

VIALA P, VERMOREL V., 1910. Traité général d'ampélographie. Ed. Masson vol. 2, Paris, 255 P.

Villa P., 2005. La culture de la vigne. Ed. De Vecchi, 156 P.

WHITE R., 1934. Potentially unlimited growth of excised tomato root tip in a liquid medium. Plant physiology, 9. Potentially unlimited growth of excised tomato root tip in a liquid medium. Plant physiology, Pp. 585-600.

ZRYD J, BRETELLE. R, DERREUDRE .J, DUHOUX E, GASPAR T., 1988 .Culture des cellules -tissus et organes végétaux Fondement technique et utilisation pratique, Paris, Lavoisier. 308 p.