

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 Biotechnologie

*Mémoire de fin d'études*

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

Option : Agro-ressources et Environnement

Thème

Effet de génotype et de l'explant sur la capacité  
calogène in vitro des cépages autochtones de la vigne  
(*Vitis vinifera* L.)

Présenté par :

**Lamri Walid**

Devant le jury :

<b>Mme BENRBIHA F.Z.</b>	Professeur	Université BLIDA 1	Président de jury
<b>Mme TOUAIBIA M.</b>	Maitre assistante A	Université BLIDA 1	Examinatrice
<b>Mme CHAOUIA C.</b>	Professeur	Université BLIDA 1	Promotrice
<b>Mme ATTEUR N.</b>	Magister	Chef de services à ITAF	Co-promotrice

Promotion 2016/2017

# *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 cher frère et ma chère sœur.*

*Spécial dédicace à mon Nina Shona.*

*A toutes les personnes que j'aime et spécialement islam, lamine,*

*Mohamed, abd arazek, Omar, Hamid, Fayçal, moh Bagio, Amine, khiro et*

*Balilo*

*A toute ma famille maternelle et paternelle,*

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

*Je dédie le fruit de cette modeste recherche.*

# Remerciements

*Au terme de ce travail, je tiens à exprimer mes remerciements les plus sincères*

*À*

*Mme HADDAD N, mon Co promotrice j'aimerais tout d'abord vous remercier de mon accueil dans votre laboratoire et l'opportunité de réaliser cette thèse et d'élargir mes 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.*

*Profond respect à Madame CHAOUIA C. a professeur à l'université BLIDA I pour ses orientations, ses conseils et son suivi permanent.*

*J'exprime ma gratitude et ma profonde reconnaissance à Mme BENRBIHA F.Z. Professeur à Université BLIDA I pour sa disponibilité, son aide et ses conseils judicieux et qui me fait l'honneur de présider le jury.*

*Mes sincères remerciements vont à Madame TOUAIBIA, M. Maître assistante à l'université BLIDA I pour son aide, sa sympathie et d'avoir accepté d'examiner ce travail.*

*Mes remerciements les plus chaleureux s'adressent à Madame GHAZLI le chef de département de laboratoire central de l'ITAF*

*Agréable remerciement et reconnaissance à Mme TAIBI, Mme RAHEL et Mme BRANCI Souhila techniciennes de laboratoire d'amélioration de plantes pour leurs aides, leurs précieux conseils et leur disponibilité à tous moments,*

*Sont gentilles et sont de 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.*

*Enfin on tient à remercier tout le personnel de la station régionale de l'ITAF de Tessalat EL Merdja : et tous les autres membres.*

**Synthèse bibliographique****Chapitre I : Généralités sur la vigne**

1. Historique.....	3
I.2. Taxonomie et origine.....	3
I.3. Répartition géographique.....	4
I.4. Description Botanique.....	5
I.5. Position systématique de la vigne.....	5
I.6. Organes de la vigne.....	6
I.6.1. Racines.....	7
I.6.2. Rameau.....	7
I.6.3. Mérithalles et nœuds.....	7
I.6.4. Feuille.....	7
I.6.5. Bourgeons.....	7
I.6.6. Vrille.....	7
I.6.7. Inflorescence.....	7
I.6.9. Grappes et baies.....	8
I.7. Cycle végétatif.....	9
1.8. Reproduction.....	11
1.8. Multiplication sexuée.....	11
I.8.2. Multiplication asexuée.....	11
I.9. Exigence pédoclimatiques de la vigne.....	12
2. Superficie et production des vignobles.....	14
2.1. Dans le monde.....	14
2.2. En Algérie.....	15

2.3. Intérêt économique de la vigne.....	16
2. 3.1. Utilisation dans l'alimentation.....	16
2.3.2. Utilisation en pharmacopée.....	17
2.3.3. Autres utilisations.....	17

**Chapitre II : Micro propagation**

1. Historique et développement de la culture in vitro.....	18
2. Catégorie de la culture in vitro Conforme.....	19
3. Catégorie de la culture in vitro non conforme.....	19
4. Facteurs influençant la culture in vitro.....	20
4.1. Lumière et photopériode.....	20
4.1.1. Température.....	20
4.1.2. Hygrométrie.....	20
4.2. Stérilité.....	20
4.3. Support de milieux de culture.....	20
4.3.1. Saccharose.....	21
4.3.2. Vitamines.....	21
4.3.3. Régulateurs de croissances.....	21
4.4. Conditions stériles.....	22
5. Application de culture in vitro.....	22
5.1. Micro propagation.....	23
5.2. Culture de méristèmes.....	23
5.4. Haplo-diploïdisation.....	24
5.5. Culture de protoplastes.....	24
5.1. Avantages de la culture in vitro.....	24
5.2. Inconvénients.....	25

**Chapitre III : Embryogénèse somatique**

1. Historique.....	26
2. Induction de l'embryogenèse somatique.....	28
3. Modèles de l'embryogenèse somatique.....	28
3.1. Embryogenèse directe.....	28
3.2. Embryogenèse indirecte.....	28
4. Les stades de l'embryogenèse somatique.....	29
5. Origine des structures embryonnaires.....	29
6. Androgenèse.....	30
6.1. Historique.....	30
6.2. Etapes de l'androgenèse.....	31
6.2.1. Phase de prétraitement.....	31
6.2.2. Phase de culture.....	31
6.2.3. Phase de régénération.....	32
6.2.4. L'étape de diploïdisation.....	32
6.3. Facteurs influençant l'androgenèse (culture d'anthère).....	32
6.3.1. Influence du génotype.....	32
6.3.2. Influence des conditions de culture des plantes.....	32
6.3.1. Influence de la composition des milieux de culture.....	32
6.3.2. Influence de la densité des anthères.....	32
6.3.3. Influence du prétraitement.....	32
6.4. Conséquences d'un rejet.....	33
6.5. Culture d'ovaire.....	33
6.5.1. Application.....	34
6.5.2. Avantages.....	35

6.5.3. Inconvénients.....	35
---------------------------	----

**Partie expérimentale**

1. Lieu de travail.....	36
2. Objectif de l'étude.....	36
3. Matériel végétal utilisé.....	36
4. Préparation des solutions mères.....	38
4.1. Solution mère de macro éléments.....	38
4.2. Solution mère de micro éléments.....	38
4.3. Solution mère de chélates de fer (Fe-EDTA).....	38
4.4. Solution mère de vitamine.....	38
4.5. Solution de régulateurs de croissance.....	39
5. Préparation des milieux de culture.....	39
6. Préparation des stérilisants.....	42
6.1. Solution de chlorure de mercure.....	42
6.2. Solution de l'hypochlorite de sodium.....	42
7. Stérilisation.....	42
7.1. Stérilisation du matériel végétal.....	42
8. Mise en culture des explants.....	44

**Résultats et discussions**

1. Taux de contamination.....	46
1.1. Cépage Amellal (AL).....	46
1.2. Cépage Bouani (VBN).....	47
1.3. Cépage Ahmer Bou Aneur (VHB).....	48
2. Essais de désinfection des explants.....	49
2.1. 1 <sup>er</sup> essai de désinfection à l'hypochlorite de sodium (7%).....	49

2.1.1. Amellal.....	49
2.2.2. Bouani.....	49
2.2. 2 <sup>ème</sup> essai de désinfection au chlorure de mercure (0.1g/l).....	50
2.3. 3 <sup>ème</sup> essai de désinfection au chlorure de mercure (0.3g/l).....	52
3. Taux de dessèchement.....	53
3.1. Demi-fleur (DF).....	53
3.2. Ovaire (OV).....	53
3.3. Anthère (ANT).....	55
4. Taux d'explants ayant survécus.....	55
4.1. Cépage Amellal (AL).....	55
4.1.1. Mise en culture des explants.....	55
4.2. Cépage Bouani (VBN).....	58
4.2.1. Mise en culture des explants.....	58
4.3. Cépage Ahmar Bou Ameer (VHB).....	60
4.3.1. mise en culture des explants.....	60
4.3.1. mise en culture des explants.....	63
5.1. Cépage Amellal (AL).....	63
5.2. Cépage Bouani.....	66
5.3. Cépage Ahmar Bou Ameer (VHB).....	69
6. Couleur et aspect qualitatif des cals.....	72
7. Discussion.....	73
Références bibliographiques.....	79
Annexe.....	91

## Résumé

---

Le présent travail porte sur l'Effet de génotype et de l'explant sur la capacité calogène in vitro des trois cépages autochtones de la vigne (Amellal, Bouani, Ahmar Bou Ameer) (*Vitis vinifera* L.).

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 de sodium à 7% pendant 10min puis rinçage avec de l'eau distillée stérile. La désinfection à basse de chlorure de mercure (0.1g/l) donne aussi des résultats moins efficaces qu'il faut prendre en considération.

Après 3 semaines de la mise en culture de différents types d'explants (demi-fleurs, ovaires et anthères) dans le milieu MURASHIGE et SKOOG (1962) avec différentes balances hormonales, nous avons constaté que :

- La mise en culture des demi-fleurs du cépage Amellal à induit un meilleur taux d'explants ayant formés des cals de 40% au milieu MS7 additionné à une balance hormonale (2ml BAP + 2ml ANA). La culture d'ovaire présente une réponse de 40% au milieu MS4 additionné à la balance (2ml BAP + 4ml NOA). Pour la culture des anthères enregistre un meilleur pourcentage calogène de 90% dans le milieu MS4 additionné au balance (2ml BAP + 4ml NOA) suivi par taux de 40% sur le milieu MS3 additionné de (2ml BAP + 2ml NOA).
- L'induction de la calogénèse chez le cépage Bouani donne une meilleur réponse de 60% sur le milieu MS3 additionné à la balance (2ml BAP + 2ml NOA), pour la culture de demi-fleur, un maximum pourcentage d'explants ayant formés des cals de 100% dans les milieux MS2, MS3 et 80% sur le milieu MS4 additionnés au balances respectivement de (1ml BAP + 2ml NOA, 2ml BAP + 2ml NOA et 2ml BAP + 4ml NOA ).Concernant la culture d'anthère on remarque une réponse efficace de 80% sur le milieu MS8.

Le cépage Bouani est le plus réactif à l'induction calogène qui présente un pourcentage de 13.95% suivi par le cépage Amellal avec un taux calogène de 13.33% et le cépage Ahmer Bou Ameer qui enregistre un taux de 12.49%.

Mots clés : *Vitis vinifera* L. , Amellal, Bouani, Ahmer Bou Ameer, capacité callogène,

Milieu de culture.

## Résumé

---

### ABSTRACT

This work deals with the effect of genotype and explant on the in vitro calogenic capacity of the three indigenous grape varieties (Amellal, Bouani, Ahmar Bou Ameer) (*Vitis vinifera* L.).

The best method of disinfection is the rapid passage of the explants in the 70 ° ethanol solution followed by soaking in the 7% hypochlorite solution for 10 minutes and then rinsing with sterile distilled water.

Mercury chloride disinfection (0.1 g / l) also gives more or less effective results that need to be considered.

After three weeks of culturing different types of explants (half flowers, ovaries and anthers) in the MURASHIGE and SKOOG (1962) medium with different hormonal balances, we found that:

The cultivation of the half-flowers of the Amellal grape variety induces a better rate of explants that have formed a 40% calli in the medium MS7 supplemented with a hormonal balance (2ml BAP + 2ml ANA).

The culture of ovary has a 40% response to the medium MS4 added to the balance (2ml BAP + 4ml NOA). For the culture of the anthers, a 90% better calcium percentage is recorded in the MS4 medium added to the balance (2ml BAP + 4ml NOA) followed by a 40% rate on the MS3 medium supplemented with (2ml BAP + 2ml NOA).

The induction of calogenesis in the Bouani vine gives a better response of 60% on the medium MS3 added to the balance (2ml BAP + 2ml NOA), for the half-flower culture, a maximum percentage of explants having formed 100% calluses in the MS2, MS3 and 80% media on the MS4 medium added to the scales of (1ml BAP + 2ml NOA, 2ml BAP + 2ml NOA and 2ml BAP + 4ml NOA. Concerning the culture of anther one notices an effective response of 80% on the medium MS8.

The comparison between the varieties tested shows that the Bouani grape variety is the most reactive with calogenic induction, giving a percentage of 13.95% followed by Amellal with a calogene rate of 13.33% and the Ahmer Bou Ameer grape variety recording a 12.49%.

Key words: *Vitis vinifera* L., Amellal, Bouani, Ahmar Bou Ameer, callogene capacity,

Cultivation medium

## ملخص

يتناول هذا العمل تأثير التركيب الوراثي و المستكشف على القدرة الكالوجينية في المختبر لأصناف العنب ا لمحلية الثلاثة من الكرمة (أمليل، بواني، احمر بو عمر ) (فيتيس فينيفيرا L..)

أفضل طريقة للتطهير هي مرور سريع إكسيلنتس في محلول الإيثانول 70 درجة تليها التميرير في محلول هيبوكلوريت الصوديوم 7% لمدة 10 دقيقة ثم الشطف مع الماء المقطر المعقم

تعقيم كلوريد الزئبق (0.1 جم / لتر) يعطي أيضا نتائج أكثر أو أقل فعالية التي تحتاج إلى النظر فيها.

بعد ثلاثة أسابيع من زراعة أنواع مختلفة من إكسيلنتس (نصف الزهور والمبيض و أنثرز) في موراشيج و سكوغ (1962) المتوسطة مع التوازنات الهرمونية المختلفة، وجدنا أن:

زراعة نصف الزهور من العنب متنوعة العنب يدفع معدل أفضل من إكسلانتس التي شكلت كالي 40% في المتوسطة MS7 تستكمل مع التوازن الهرموني (ANA ML 2 +BAP ML 2). زراعة المبيض لديه استجابة 40% في الوسط MS4 تضاف إلى التوازن (NOA ML 4 +BAP ML 2)

بالنسبة لزراعة أنثرز، يتم تسجيل نسبة أفضل من الكالوجين بنسبة 90% في وسط MS4 المضاف إلى التوازن (ML 2 + BAP (NOA ML 4 + BAP) يليه معدل 40% على وسط MS3 المستكمل ب (NOA ML 2 +BAP ML 2).

تحريض الكالوجين في صنف بواني اعطي أفضل استجابة تقدر ب 60% في الوسط MS3 إضافة إلى التوازن (ML 2 + BAP (ML NOA 2 + BAP)، زراعة نصف الزهرة أعطت نسبة مئوية قصوى من الكالوجين التي شكلت كال بنسبة 100% في الاوساط MS2 و MS3 و 80% في الوسط MS4 تضاف الى التوازنات (ML NOA 2 +ML BAP 1، ML NOA 2 +BAP (ML NOA 4 +ML BAP 2 و ML NOA 2 +BAP) وفيما يتعلق بزراعة الأثير، لوحظ استجابة فعالة بنسبة 80% على الوسط MS8.

أظهرت المقارنة بين الأصناف التي تم اختبارها أن صنف العنب البونية هي الأكثر تفاعلا مع تحريض الكالوجين، حيث تعطي نسبة 13.95% تليها أملال بمعدل كالوجين 13.33% والصنف احمر بو عمر بنسبة 12.49%.

الكلمات المفتاحية: فيتيس فينيفيرا L..، أملال، بواني، أحمر بو عمار، زراعة الوسط

- **MS:** Murashinge and Skoog.
- **ANA:** Acide naphthyl-1-acétique.
- **NOA:** Acide 2-naphthoxy acétique.
- **AIA:** acide-3-indole acétique.
- **BAP:** Benzyl amino-purine ou N<sup>6</sup>-Benzyladénine.
- **AL :** Amellal.
- **VBN :** Bouani.
- **VHB :** Ahmar Bou Ameer.
- **ANT :** Anthère.
- **OV :** Ovaire.
- **DM :** Demi-fleur.

---

<b>Figure 1:</b> Hypothèses de spéciation des espèces du genre <i>Vitis</i> durant la dernière glaciation (PEROS <i>et al.</i> , 2010).....	4
<b>Figure2 :</b> Localisation géographique des groupes de <i>Vitis</i> américains, asiatiques et européens.....	5
<b>Figure 3:</b> Rameaux de <i>Vitis Vinifera</i> L. (Originale, 2016).....	5
<b>Figure4:</b> La vigne, présentation des différents organes (GALET, 2000).....	6
<b>Figure5 :</b> Diagramme floral de la vigne (GERRATH, 1993).....	8
<b>Figure6 :</b> Grappes de raisin (KOEHLER'S, 2002).....	9
<b>Figure7 :</b> Cycle annuel de développement de la vigne (GUILPART, 2014).....	10
<b>Figure8:</b> Cycle physiologique de la vigne (GALET, 2000).....	10
<b>Figure9:</b> Méthodes de multiplication végétative. A: Marcottage, B: Greffage, C: Culture <i>in vitro</i> (POUGET, 1990).....	12
<b>Figure10 :</b> Répartition mondiale du vignoble (Mullins <i>et al.</i> 1992).....	15
<b>Figure11:</b> Influence des équilibres hormonaux sur l'organogénèse (NOVELLO et TAP, 2005).....	22
<b>Figure12 :</b> Méthodes d'application de la culture <i>in vitro</i> (Gnis, 2007).....	22
<b>Figure13 :</b> Etapes de développement d'embryogénèse (Wyss ; Haring, <i>et al.</i> , 2001).....	27
<b>Figure14 :</b> Etapes de la culture d'anthère (Wyss E. Haring M., <i>et al</i> 2001).....	30
<b>Figure15 :</b> Etapes de culture d'ovaire (WYSS, HARING <i>et al.</i> , 2001).....	34
<b>Figure16 :</b> Lieu de stage ITAF Tessala El Merdja. ....	36
<b>Figure17 :</b> Grappe de boutons floraux immature (originale 2017).....	37
<b>Figure18 :</b> Localisation du site de prélèvement (Anonyme 2017).....	37
<b>Figure19 :</b> Stérilisation des explants sous hotte (photographie originale 2017).....	43
<b>Figure20 :</b> Etapes de démarche expérimentale.....	43

---

<b>Figure21</b> :Prélèvement et séparation des pièces florales sous loupe binoculaire (originale2017).....	44
<b>Figure22</b> : Mise en culture de demi-fleurs (originale 2017).....	44
<b>Figure23</b> : Mise en culture des ovaires (originale 2017).....	45
<b>Figure24</b> : Prélèvement des anthères sous la loupe binoculaire (originale 2017).....	45
<b>Figure25</b> : Mise en place de l'essai dans la chambre de culture (originale 2017).....	46
<b>Figure26</b> : Taux de contamination cépage Amellal.....	47
<b>Figure27</b> : Taux de contamination cépage Bouani.....	48
<b>Figure28</b> : Taux de contamination du cépage Ahmeur Bou Ameur .....	49
<b>Figure29</b> : Taux de contamination au chaque essai cépage Amellal.....	49
<b>Figure30</b> : Taux de contamination du cépage Bouani.....	51
<b>Figure31</b> : Taux de contamination du cépage Amellal.....	50
<b>Figure32</b> : Taux de contamination du cépage Bouani.....	51
<b>Figure33</b> : Taux de contamination du cépage Ahmar BouAmeur.....	51
<b>Figure34</b> : Taux de contamination pour cépage Ahmar Bou Ameur.....	52
<b>Figure35</b> : Taux de dessèchement (Explants de demi-fleur).....	53
<b>Figure36</b> : Taux de dessèchement (Explants de l'ovaire). .....	54
<b>Figure37</b> : Taux de dessèchement (Explants de l'anthère).....	55
<b>Figure38</b> : Effet de l'interaction (explants x milieux).....	57
<b>Figure39</b> : Effet de l'interaction (explants x milieux). .....	60
<b>Figure40</b> : Effet de l'interaction (explants x milieux). .....	62
<b>Figure41</b> : Effet de l'interaction (explants x milieux). .....	65
<b>Figure42</b> : Effet de l'interaction (explants x milieux). .....	68
<b>Figure43</b> : Cals produits par les anthères du cépage VBN, cultivés sur le milieu MS5. ....	68
<b>Figure44</b> : Effet de l'interaction (explants x milieux).....	71

<b>Figure45</b> : Aspect des cals produites sur le milieu MS3 (VHB anthère <b>A</b> ) et (VBN anthère <b>B</b> ). .....	71
<b>Figure46</b> : Cals issus sur le milieu MS4 du cépage <b>VHB</b> . A,C : anthère, B,D : ovaire.....	72
<b>Figure47</b> : Fruit de cépage Amellal (Anonyme 2017).....	91
<b>Figure48</b> : Fruits de cépage Bouani (Anonyme 2017).....	92
<b>Figure49</b> : Fruit de cépage Ahmar Bou Ameer (ITAF, 2009).....	93
<b>Figure50</b> : Autoclave, pH mètre et Hotte à flux laminaire horizontal.....	94

<b>Tableau1</b> : Principaux pays viticoles en 2000.....	15
<b>Tableau2</b> : Evolution des superficies.....	16
<b>Tableau3</b> : Production moyenne de raisin en 2007.....	16
<b>Tableau4</b> : Type d'hormones de croissance utilisées.....	39
<b>Tableau5</b> : Composition du milieu Murashinge et Skoog (MS), 1962.....	41
<b>Tableau6</b> : Balance hormonale utilisée.....	39
<b>Tableau7</b> : Evaluation du taux de dessèchement en fonction de temps. (Explants de demi-fleur).....	53
<b>Tableau8</b> : Taux d'explants survécus fonction des milieux utilisés. (Demi-fleur ; Ovaire Anthère).....	56
<b>Tableau9</b> : Test ANOVA des explants ayant survécus.....	57
<b>Tableau10</b> : Taux d'explants survécus en fonction des milieux utilisés. (Demi-fleur ; Ovaire Anthère).....	58
<b>Tableau11</b> : Test ANOVA des explants ayant survécus.....	59
<b>Tableau12</b> : Taux d'explants survécus en fonction des milieux utilisés (Demi-fleur ; Ovaire Anthère).....	61
<b>Tableau13</b> :.. Test ANOVA des explants ayant survécus.....	62
<b>Tableau14</b> : Taux d'explants ayant formés des cals en fonction des milieux testés ((DF) Demi-fleur, (OV) Ovaire et (ANT) Anthère).....	63
<b>Tableau15</b> : Test ANOVA des d'explants ayant formés des cals.....	64
<b>Tableau16</b> : Taux d'explants ayant formés des cals en fonction des milieux testés (Demi-fleur ; Ovaire Anthère).....	66
<b>Tableau17</b> : Test ANOVA des d'explants ayant formés des cals.....	67
<b>Tableau18</b> : Taux d'explants ayant formés des cals en fonction des milieux testés (Demi-fleur ; Ovaire Anthère).....	69
<b>Tableau19</b> : Test ANOVA des d'explants ayant formés des cals.....	70
<b>Tableau20</b> : Test de Newman-Keuls ; variable % d'explants survécus Groupes Homogènes, alpha =,05000 pour le cépage AL.....	96
<b>Tableau21</b> : Test de Newman-Keuls ; variable % d'explants survécus Groupes Homogènes, alpha =,05000 pour le cépage VBN.....	97

<b>Tableau22</b> : Test de Newman-Keuls ; variable % d'explants survécus Groupes Homogènes, alpha =,05000 pour le cépage VHB.....	98
<b>Tableau23</b> :Evaluation du taux de contamination des trois explants (Cépage Amellal).....	99
<b>Tableau24</b> : Evaluation du taux de contamination des trois explants chez le cépage VBN...	99

- ❖ **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.
- ❖ **Calogénèse** : Néof ormation d'une 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.

La Vigne (*Vitis vinifera* L.) est un arbre ligneux très anciennement cultivé qui caractérise certains paysages. De nombreux noms de lieux : Vignes, Vié vigne (vieille vigne), Vigneux, Vignieu, Vignier, Vignol évoquent sa présence (**COUTIN, 2002**).

**THIS et al., 2006**, démontré que la vigne traditionnellement cultivée est une espèce à vocation agronomique remarquable, chargée d'histoire et des symboles, et offrant une diversité exceptionnelle.

A l'échelle mondiale l'espèce *Vitis vinifera* L. est la plus commune et la plus importante au niveau économique (**GALET, 1993**). Selon **ATTIA, 2007**, le raisin produit à partir du genre *Vitis* est le fruit au premier rang parmi les productions fruitières dans le monde, du point de vue de sa production ainsi que son importance économique avec une production totale de raisin estimée.

La majorité de la production de la vigne (71%) est transformée en vin, produit à haute valeur ajoutée possédant une symbolique gastronomique religieuse et sociale qui n'a pas son pareil.

. Selon **DUTRUC-ROSSET (2001)**, la superficie mondiale des vignobles s'étend sur 7,9 millions d'hectares et est toujours en progression avec l'augmentation des surfaces notamment en Australie .En 2009 à 67 millions de tonnes pour une valeur économique de 32 milliards de dollars (**Anonyme, 2009**), elle est la 14<sup>ème</sup> culture d'importance économique au niveau mondial alors qu'elle ne représente qui seulement 0,5% des terres cultivées.

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 Algérien : 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 viticoles appliquées (fertilisation, entretien du sol, traitements phytosanitaires utilisation anarchique des portes greffes et variété) et d'après **BLOUIN (2005)**, il existe des maladies fongiques, bactériennes, virales et des maladies dues à des prédateurs.

Depuis le début 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 basée 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-dire 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 existantes 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 cépages intéressants de la vigne, nous fixons comme objectifs à travers ce travail à étudier :

l'effet de génotype et de l'explant sur la capacité calogène *in vitro* de Amellal, Bouani et Ahmeur Bou Ameer, trois cépages autochtones de la vigne (*Vitis vinifera* L.) cultivés dans le milieu MS (MURASHIGE et SKOOG, 1962) additionné aux différentes balances hormonales, en utilisant trois types d'explants : demi-fleur, l'ovaire et l'anthère.

### 1.1. Historique

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

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. La domestication de la vigne semble liée à la découverte du vin (THIS *et al.*, 2006). Le vin est depuis des milliers d'années considéré comme une boisson divine chargée de signification mystique : les égyptiens ont attribuée le don de vin à Osiris, les grecs à Dionysos et les romains à Bacchus (Mullins MG *et al.*, 1992).

La vigne a été multipliée par bouturage puis domestiquée par la conduite de la taille, de là proviennent les cépages, c'est-à-dire des sélections faites dans les populations de Lambrusques. La migration 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 .

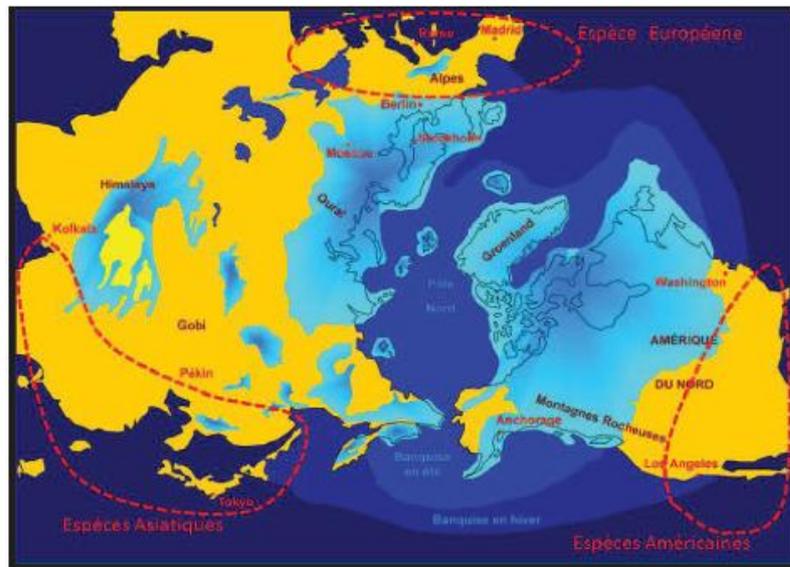
SPAHNI et LABYS (1992), soulignent que la culture de la vigne s'est étendue graduellement, au fil des siècles, du Moyen-Orient aux zones tempérées d'Afrique du nord et d'Europe, puis de là aux Amériques, en Afrique du sud, en Australie et en extrême orient.

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*, existante en Europe, en Asie et en Afrique du nord.

### 1.2. Taxonomie et origine

La vigne appartient à la famille des *Vitaceae* qui comporte 17 genres, parmi lesquels le genre *Vitis* qui signifie « baguette courbée » en grec ancien (Gaffiot, 1934). Les premières traces attestant de la présence de vigne apparaissent dans des fossiles vieux de soixante millions d'années. A la fin de l'ère tertiaire, la vigne sauvage devient très répandue dans tout l'hémisphère nord. Au début du quaternaire, il y a environ 1,8 millions d'année, une série de glaciations successives a conduit a la fragmentation des populations de vignes dans différents refuges.

Les périodes de réchauffement inter-glaciations ont permis à ces populations de se retrouver et de se croiser à nouveau. Ces variations se sont alternées quatre à cinq fois successivement sur un million d'années, ce qui conduit à un important brassage génétique des populations de vigne (FREGONI, 1991). D'après PEROS *et al.*, (2010), L'origine du genre *Vitis* est située en Eurasie et il s'est ensuite étendu vers l'Ouest sur le continent américain.



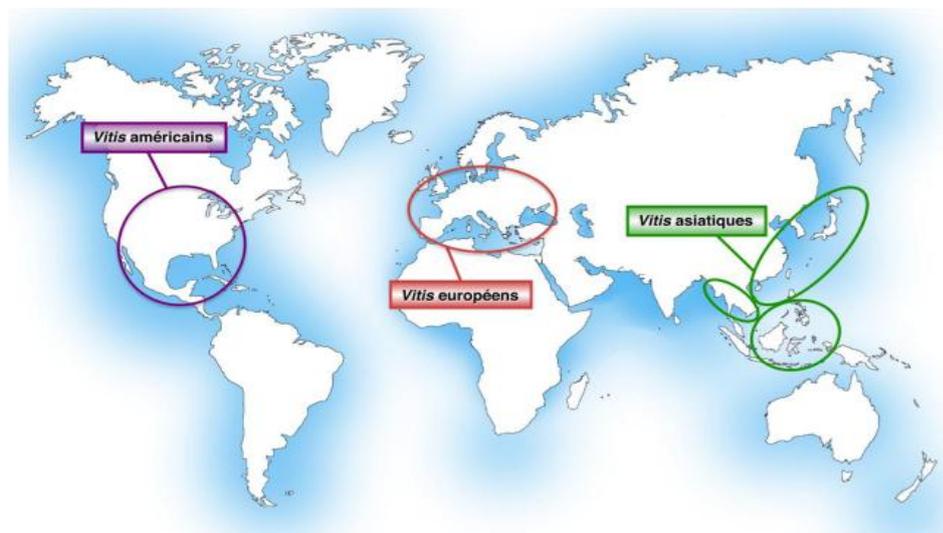
**Figure 1:** Hypothèses de spéciation des espèces du genre *Vitis* durant la dernière glaciation (PEROS *et al.*, 2010).

### I.3. Répartition géographique

L'ensemble du genre *Vitis* comprend aujourd'hui près de 60 espèces diploïdes ( $2n=38$  chromosomes), se répartissant en trois groupes géographiques distincts :

- ✓ les vignes américaines, qui sont composées d'une vingtaine d'espèces, parmi les quelles *V. rupestris*, *V. riparia*, *V. labrusca* et *V. cinerea*. les vignes asiatiques, qui comprennent une quinzaine d'espèces dont *V. amurensis* et *V. coignetiae*, sont des vignes orientales.
- ✓ La vigne européenne, qui n'est quant à elle constituée que d'une seule espèce, *V. vinifera* L. Cette dernière espèce comprend un cultivé, *V. vinifera ssp. sativa*, ainsi que des vignes sauvages de types dioïques. *V. vinifera ssp. silvestris* ou lambrusque.

Le compartiment cultivé de l'espèce, *V. vinifera ssp. sativa*, regroupe la très grande majorité des cépages communément cultivés en Europe et dans le monde (Alleweldt et Possingham, 1988).



**Figure 2 :** Localisation géographique des groupes de *Vitis* américains, asiatiques et européens

#### 1.4. Description Botanique

Les vignes spontanées ou cultivées appartiennent à la famille des Vitacées (famille Appelée autrefois Ampélidacées ou Ampelidées) qui compte plus d'un millier d'espèces, vivant principalement dans les régions tropicales et subtropicales du globe, ainsi que sous les climats tempérés où se trouve la majorité des vignobles cultivés (GALET, 2000).

La description botanique des cépages de vigne et la connaissance de leurs aptitudes constitue l'ampélographie (HUGLIN et SCHNEIDER, 1998).

#### 1.5. Position systématique de la vigne

La vigne est une plante Angiosperme Dicotylédone appartenant à l'ordre des Rhamnales, largement cultivée pour ses fruits en grappes.



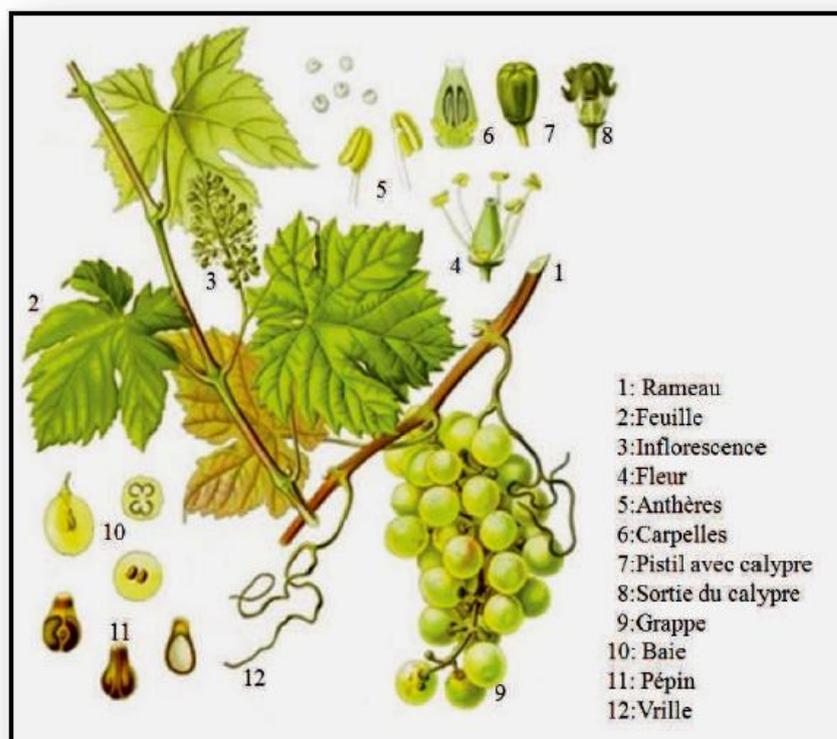
**Figure 3:** Rameaux de *Vitis Vinifera* L. (Originale, 2016).

- ❖ **Embranchement** ..... Phanérogames
- ❖ **Sous-Embranchement** ..... Angiospermes
- ❖ **Classe** ..... Dicotylédones
- ❖ **Sous-class.** ..... Dialypétales
- ❖ **Ordre** ..... Rhamnales
- ❖ **Famille** ..... Vitacées
- ❖ **Genre** ..... Vitis
- ❖ **Sous-genre** ..... Euvitis
- ❖ **Espèce** ..... *Vitis Vinifera* L.

### 1.6. Organes de la vigne

Comme toute plante supérieure, la vigne comprend des racines, une tige et des feuilles (organes végétales), les bourgeons sont situés à l'aisselle des feuilles tandis que les vrilles et les inflorescences paraissent être opposées à ces organes.

Les fleurs (organes reproducteurs), groupées sur les inflorescences, donneront après fécondation, les graines de raisin.



**Figure 4:** La vigne, présentation des différents organes (GALET, 2000).

**1.6.1. Racines**

Les racines d'une souche de vigne sont des racines adventives nées en majeure partie sur le nœud inférieur de la bouture ou greffe - bouture dont elle est issue. Dans des conditions chaudes et humides on peut observer le développement des racines adventives aériennes (**HUGLIN, 1986 ; HIDALGO, 2005**).

**1.6.2. Rameau**

Chez la vigne, comme chez d'autres plantes, les pousses grossissent précisément à l'endroit où s'insèrent les feuilles, les bourgeons, Les vrilles et les petites grappes de fleurs qui se transformeront ultérieurement en grappes de fruits (raisins).

**1.6.3. Mérithalles et nœuds**

**GALET, (2000)** précise que les nœuds se distinguent des mérithalles par leurs renflements qui sont plus ou moins accentués selon les espèces et les cépages. Ils sont les lieux d'insertion des feuilles, des yeux latents, des prompt-bourgeons, des vrilles et des inflorescences (**HUGLIN et SCHNEIDER, 1998 ; GALET, 2000**).

**1.6.4. Feuille**

Les feuilles apparaissent sur les rameaux dès le débourrement et leur nombre augmente jusqu'à l'arrêt de croissance. Elles jouent un rôle physiologique primordial, puisqu'elles permettent l'élaboration des sucres qui vont s'accumuler dans les baies (**BRETAUDEAU et FAURE, 1990**).

**1.6.5. 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. Ces écailles protègent les cônes végétatifs (**Huglin. P, 1986**).

**1.6.6. Vrille**

Les vrilles sont des organes d'une extrême utilité, se sont des excroissances au moyen desquelles la plante peut s'attacher aux arbres qui l'entourent (**ARTHAUD, 1858**).

**1.6.7. Inflorescence**

L'inflorescence est une grappe composée dont la dimension et la ramification dépendent de l'espèce, de cépage, de sa position sur le rameau et de la vigueur.

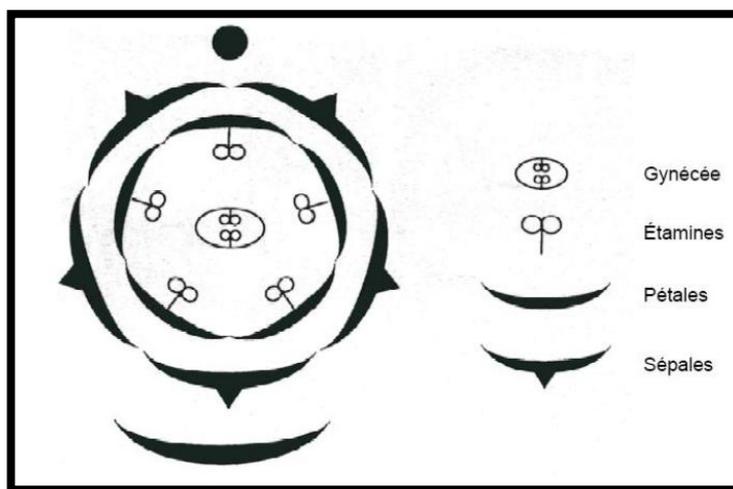
Elle comprend un axe principal sur lequel partent des ramifications secondaires qui peuvent se ramifier à leur tour pour se terminer par un bouquet de deux à une fleur (REYNIER, 2007).

Dès l'apparition de bourgeons fertiles sur le rameau et dans les cônes végétatifs des bourgeons, des groupes spécifiques de cellules se multiplient rapidement.

Le bourgeon et le rameau qui le porte poussent et donnent naissance aux fleurs il n'est pas inutile de rappeler que les inflorescences (ébauches de grappes) sont définitivement formées, en miniature, dans le bourgeon, c'est à dire que leur arborescence est le nombre de fleurs qui verront le jour à la fin de la phase de croissance de la vigne sont déjà établis.

La formule florale des fleurs de vigne selon (GERRATH, 1993) est :

$$(5S) + (5P) + (5E) + (2C)$$



**Figure 5 :** Diagramme floral de la vigne (GERRATH, 1993).

### 1.6.9. Grappes et baies

HUGLIN et SCHNEIDER, (1998) précisent qu'après la nouaison des fleurs, les inflorescences sont communément appelées grappes.

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



**Figure 6** : Grappes de raisin (KOEHLER'S, 2002).

### 1.7. Cycle végétatif

Le cycle végétatif débute avec les pleurs précédant le débourrement au départ des bourgeons en végétation donnant naissance à la croissance des rameaux et des feuilles pour se terminer à l'automne par la défeuillaison ou chute des feuilles, qui marque la fin de la vie active.

La vigne entre alors en vie ralentie, car il n'y a plus aucune manifestation extérieure visible : c'est le repos hivernal, encore appelé plus généralement dormance (GALET, 2000).

L'élévation des 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 des pousses de l'année, apparaissant sur les baguettes âgées 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 (Anonyme1, 2016).

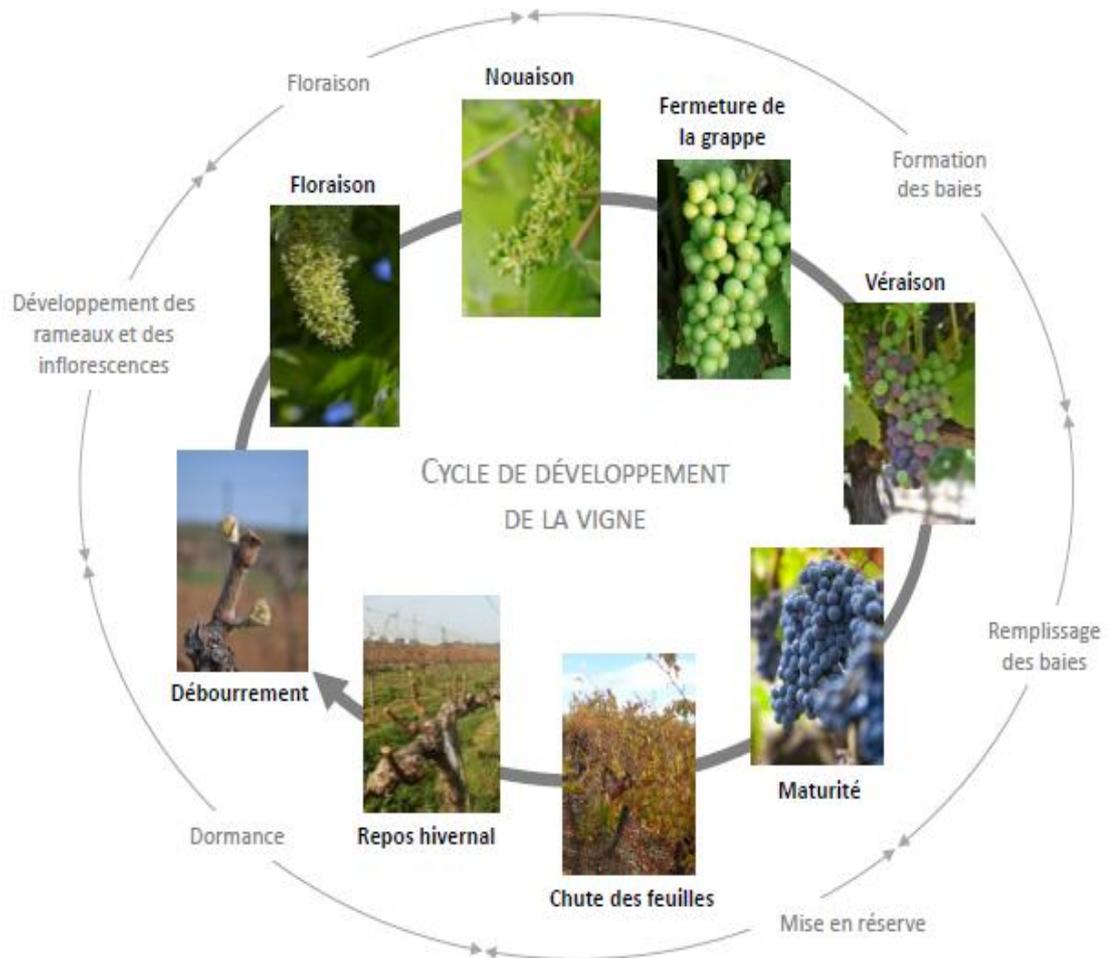


Figure 7 : Cycle annuel de développement de la vigne (GUILPART, 2014).

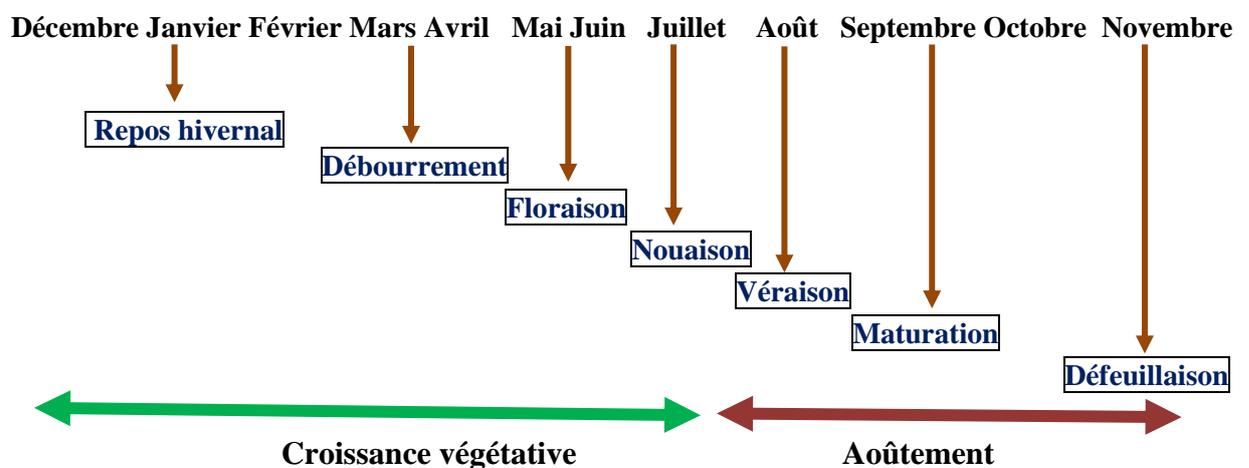


Figure 8: Cycle physiologique de la vigne (GALET, 2000).

## 1.8. Reproduction

La vigne peut se reproduire par voie sexuée ou par voie végétative (**VIALA & VERMOREL, 1910**). Pour maintenir les caractères du cépage, la vigne cultivée se multiplie essentiellement par voie végétative ou asexuée. La reproduction sexuée est utilisée pour la création de nouveaux cépages.

### 1.8. Multiplication sexuée

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. On suppose que 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. Ainsi par exemple, les croisements entre le Pinot et le Gouais ont donné naissance à plus de 20 cépages, dont le Chardonnay ou encore le Gamay (**BOWERS et al., 1999**).

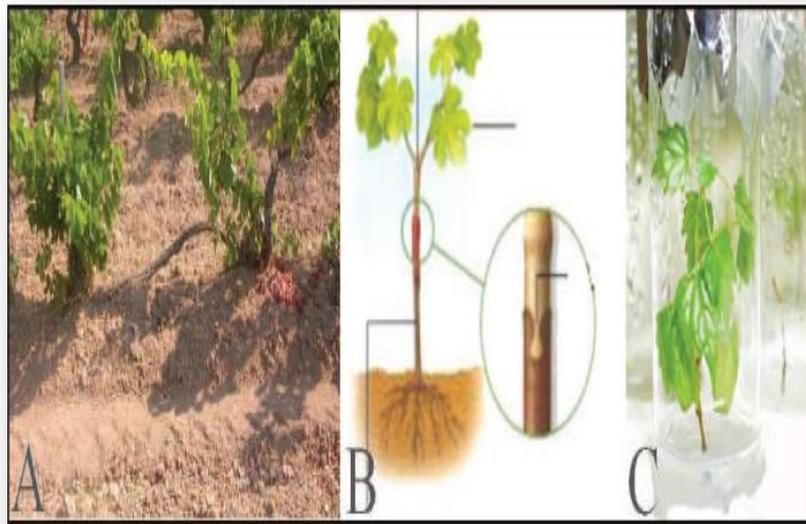
### 1.8.2. Multiplication asexuée

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.



**Figure 9** : Méthodes de multiplication végétative. A: Marcottage, B: Greffage, C: Culture *in vitro* (POUGET, 1990).

Après la crise phylloxérique, les procédés de multiplication de *Vitis Vinifera* L. comme le bouturage et le marcottage ont été abandonnés pour être remplacés presque exclusivement par le greffage (**Figure 9**). Celui-ci peut être réalisé de plusieurs manières : en fente, à l'anglaise ou en oméga.

## 1.9. Exigence pédoclimatiques de la vigne

### 1.9.1. Exigences climatiques

Selon **BRICHE (2011)**, pour se développer, la vigne a besoin d'un climat favorable avec notamment des exigences quant au rayonnement solaire, à la température et également à l'eau.

### 1.9.2. Lumière

La vigne entre dans le processus complet de la photosynthèse. Lors de la phase lumineuse de la photosynthèse, une partie de l'énergie fournie par les rayons lumineux est captée par les pigments des cellules chlorophylliennes appelées chloroplastes. Lors de la phase obscure, d'autres phases physico-chimiques ont lieu notamment pour la synthèse des sucres (**HUGLIN, 1986**).

Selon **GALLET, (2000)**, la vigne est une plante héliophile qui exige des climats lumineux, car ses fleurs nouent mal à l'ombre ou par temps brumeux.

Ainsi, les années de grande insolation donnent des raisins sucrés, peu acides et inversement, cependant les excès de lumière dans les pays méditerranéens et de chaleur nuisent à la qualité des produits en donnant des raisins insuffisamment acides.

D'après **SIMON *et al.* (1992)**, la vigne est une plante de jour long, qui nécessite un ensoleillement entre 1500 et 1600 heures/ an.

### 1.9.3. Température

La température joue un rôle primordial : en effet, le développement optimal de la vigne est limité par des seuils thermiques aux différents stades du cycle végétatif, notamment d'avril à septembre quand la vigne est en activité (**BRICHE, 2011**).

Dès la sortie de dormance, au moment du débourrement, seules les températures dites actives sont prises en compte. Sont considérées comme « actives » les températures supérieures ou égales à 10°C. (**HUGLIN, 1986 ; GALET, 2000, BRICHE, 2011**).

Les deux principaux seuils thermiques et défavorables à la vigne sont d'abord celui observé au printemps quand le seuil des températures est inférieure à -2°C au moment du débourrement, car il peut favoriser le gel des bourgeons et compromettre le développement de la vigne (**HUGLIN, 1986 ; GALET, 2000 ; BRICHE, 2011**) le deuxième seuil critique est celui des températures estivales supérieures à 35°C. en effet dans un contexte de réchauffement, de longues périodes de températures supérieures à 35°C sont défavorables à la bonne maturité des baies qui s'assèchent sous l'effet de cumuls thermiques trop élevés (**BRICHE, 2011**).

Ce phénomène favorise l'échaudage ou le grillage des baies. Les baies se flétrissent et se dessèchent sous l'action de la sécheresse et de l'insolation (**Anonyme, 2000**).

### 1.9.4. Source hydrique

L'eau assure la turgescence, et le port du végétal. Elle permet le transport des substances minérales, nutritives, d'éléments issus du métabolisme, de facteurs de croissance (**CALU, 2004**).

L'alimentation hydrique affecte différemment les cépages au niveau de la morphologie des baies essentiellement la proportion des différents compartiments de la baie, ainsi la contrainte hydrique montre un effet spécifique des cépages sur la modification de la taille de la baie au cours de la maturité, dont les proportions des différents compartiments en dépendent (**ATTIA, 2007**).

Selon **SIMON *et al.* (1992)**, la vigne exige des précipitations de 600 mm/an en fonction de la texture de sol.

Ainsi selon **AGENIS-NEVERS (2006)**, lorsque la sécheresse se produit avant la véraison (maturation), elle a des effets notables sur la croissance de la vigne, si en revanche, elle a lieu pendant la véraison, elle diminue sa durée totale de quelques jours et influence le stockage des sucres.

### 1.9.2. Exigences édaphiques

**MORLAT *et al.*, (2010)** se sont intéressés à l'étude de l'influence du milieu édaphique sur l'enracinement de la vigne, et les conséquences sur la qualité du vin dans la mesure où selon ces auteurs, l'enracinement est le principal siège de transfert entre le milieu édaphique et la vigne et qu'il est confronté à des « ambiances » physico-chimiques très diversifiées qui peuvent agir fortement sur la croissance de la vigne, sa production et suivant l'état physiologique de la plante résultant des conditions trophiques, la qualité du moût et du vin, il en résulte de leur étude que le vin présente une qualité supérieure sur sol limono-sablo-carbonaté sur craie.

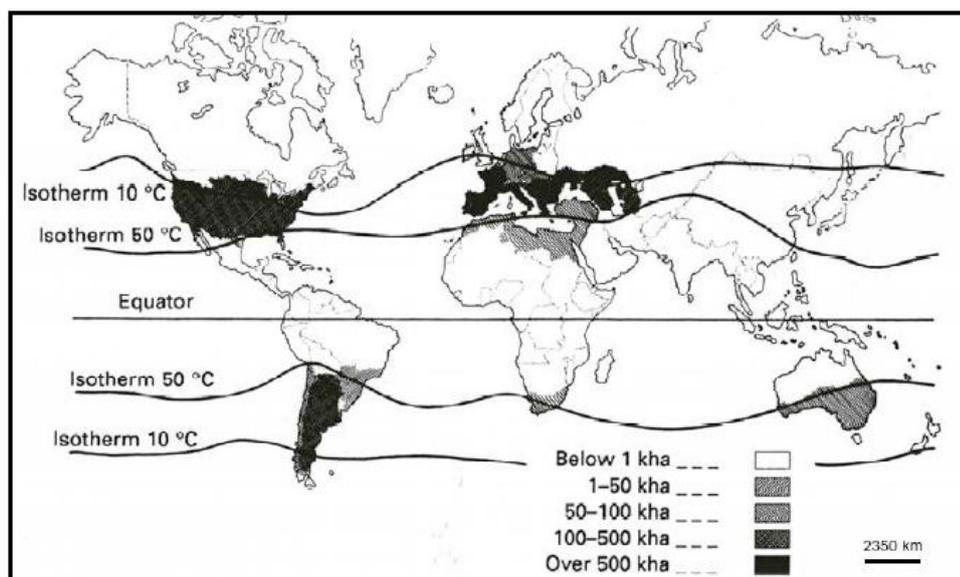
D'après **ATTIA, (2007)** la vigne est une culture dont on attend des performances au travers d'une valorisation des milieux pauvres du point de vue agronomique Selon **HUGLIN et SCHNEIDER (1998)**, la vigne s'adapte à une large gamme de sol, depuis les sols secs, pauvre jusqu'aux sols argilo-calcaire.

## 2. Superficie et production des vignobles

### 2.1. Dans le monde

La vigne dans son ensemble peut se développer dans presque tous les climats et dans toutes les régions du monde de par les grandes capacités d'adaptation de ses nombreuses espèces (**ATTIA, 2007**).

D'après **KRIEDEMANN (1968)**, **STOEV et SLAVTCHEVA (1982)**, in **DOWNTON *et al.* (1987)**, **LEBON, (2005)** l'optimum de température pour la culture de la vigne se situe entre 21 et 32°C selon les régions ; et c'est pour cette raison que le vignoble mondial est donc principalement localisé dans les hémisphères Nord et Sud compris entre les isothermes 10°C et 50°C (**MULLINS *et al.*, 1992**).



**Figure10** : Répartition mondiale du vignoble (Mullins *et al.* 1992)

CARISSE *et al.*, 2006 précisent durant le congrès de l'organisation internationale de la vigne et de vin la superficie viticole mondiale en 2000 atteint 7,886 millions d'hectares, elle est de 8 millions d'hectares (ha) (DELROT *et al.*, 2008).

**Tableau1** : Principaux pays viticoles en 2000 (CARISSE *et al.* 2006)

<b>Europe</b>	62, %	France 11,6%, Italie 11,5%, Espagne 14,9%,
<b>Asie</b>	19,2%	Chine 3,3%
<b>Amérique</b>	11,9%	Etats-Unis 5,2%, Argentine 2,7%, Chili 2,2%
<b>Afrique</b>	4,3%	Afrique du Sud 1,5%
<b>Océanie</b>	1,9%	Australie 1,8%

## 2.2. En Algérie:

La viticulture en Algérie est le plus souvent associée à l'agriculture coloniale et aux tentatives de reconversion menées depuis 1962.

Au lendemain de l'indépendance de l'Algérie, le vignoble algérien a eu de graves difficultés, avec une production de près de 15 millions d'hectolitres de vin, elle trouve leur écoulement (AOUF, 1972).

Actuellement, la viticulture algérienne est localisée essentiellement à l'Ouest du pays, avec environ 8000 ha de vignes plantée contre plus de 14000 avant l'arrachage en 2007, la wilaya d'Ain Témouchent est la première wilaya viticole du pays (KALI, 2010).

**Tableau2** : Evolution des superficies (**Anonyme, 2007**).

	Vigne de table	Vigne de cuve	Raisin sec	Champ de pied mère
Superficie totale en ha	53.772	38.044	114	778
Superficie en rapport	42.255	34.392	107	
Superficie totale	<b>92.708</b>			

La viticulture en Algérie est un peu partout à travers le pays à l'Ouest : Tlemcen, Sidi Bel Abbés et Ain Témouchent sont les principales villes productrices de la vigne, à l'Est : Skikda et Bejaia et au centre se sont les collines de Sahel, Blida, Médéa, Mitidja et la Kabylie (**LERY, 1982**).

**Tableau3** : Production moyenne de raisin en 2007 (**Anonyme, ITAF 2007**).

	Rendement en Qx
<b>raisin de table</b>	<b>2.164.356</b>
<b>raisin de transformation</b>	<b>549.601</b>
<b>raisin sec</b>	<b>2.660</b>

La multiplication de l'encépagement de la viticulture de table algériennes trouve sa justification : dans la grande hétérogénéité des conditions culturales de production.

### 2.3. Intérêt économique de la vigne

La vigne à une grande importance économique, la production viticole est une activité économique exercée par les viticulteurs dans le but de produire des raisins transformés en vin ou consommés à l'état frais (**REYNIER, 1991**). Les parties utilisées de la vigne sont les fruits, les feuilles, la sève, le bois et les sarments (**JUDD et al., 2002 ; ISERIN, 2001**).

#### 2.3.1. Utilisation dans l'alimentation

La vigne est utilisée dans la production de boissons à base de raisins (jus de raisin et alcool de distillation), de raisins secs et de raisins frais tels que le dattier de Beyrouth, le muscat et le raisin noir (**BARTELS, 1998**).

Le raisin est utilisé aussi dans la production de vinaigre, huile de pépins de raisin, gelées et confitures (**JUDD et al., 2002**).

### **2.3.2. Utilisation en pharmacopée**

Les feuilles la vigne sont astringentes et anti-inflammatoires, elles sont utilisées sous forme d'infusion. Elles soignent les diarrhées, hémorragies utérines et les problèmes menstruels. Elles soignent également les aphtes (**ISERIN, 2001**).

Les bienfaits de la vigne rouge résident dans les feuilles qui renferment des anthocyanes à l'activité reconnue pour diminuer la perméabilité capillaire et augmenter leur résistance, et les fruits contiennent de nombreux tanins qui favorisent le retour veineux, allègent les jambes et améliorent les troubles circulatoires. Les raisins traitent les varices, les hémorroïdes et la fragilité capillaire (**BOULLARD, 2001**).

Les feuilles participent aussi aux soulagements des troubles de la ménopause et améliorent l'aspect de la peau de visage (**ISERIN, 2001**).

### **2.3.3. Autres utilisations**

Le bois des ceps de vigne, se conserve longtemps, et sert à fabriquer divers objets, notamment des cannes. Les sarments de vignes se substituent parfaitement aux charbons utilisés pour les barbecues (**JUDD et al., 2002**).

## Chapitre II : Micro propagation

### 1. Historique et développement de la culture *in vitro*

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 ces besoins. Tout d'abord assez empiriques, ces techniques d'amélioration ont évolué grâce en particulier à l'apport de la génétique. L'objectif de l'amélioration des plantes est de créer, de nouvelles variétés combinant un certain nombre de caractères définis par le sélectionneur.

Les biotechnologies cellulaires et moléculaires laissent entrevoir des possibilités de contourner ces difficultés (**Scriban, 1993**).

Les méthodes de culture *in vitro* sont de plus en plus employées pour assurer la propagation clonale des génotypes élités afin de satisfaire les besoins en agriculture et en horticulture (**HAICOUR, 2002, SEMAL et LEPOIVRE, 1989**).

La multiplication *in vitro* trouve son fondement dans le concept de totipotence cellulaire, énoncé par Haberlandt : en effet la cellule est l'unité morphologique et physiologique de l'être vivant est capable d'autonomie.

Elle possède toute l'information génétique nécessaire pour régénérer la plante entière, à condition de créer les conditions favorables à ce développement.

En 1902, Haberlandt avait mis en culture des cellules végétales (quelques petits amas) mais il avait échoué à les faire diviser. Il faudra attendre 1935 pour que, grâce aux travaux de Went et Thiman sur l'auxine, Gautheret obtienne dans un laboratoire en France la multiplication, pendant quelques mois, de cellules cambiales de saule en multiplication (**QUASHIE, al 2009**).

Dés, 1941, on savait obtenir des plantes entières à partir de petits fragments d'organes ou colonies tissulaires ; leur enracinement ne posait aucun problème grâce aux auxines rhizogènes dont le maniement était connu (**MARGARA, 1984**).

En 1946, partant d'apex, BAL aux USA in **MARGARA, 1984** obtient quelques plantes de lupin à partir d'apex. Tandis que WETMORE et MOREL régénèrent des fougères en 1949. A la même époque l'équipe de Limasset et Cornuet en France démontrent l'absence de particules virales dans les apex de tabac (**ZRYD, 1988**).

Ces dernières observations ont été mises à profil, vers les années 1952, par MOREL et MARTIN qui ont réussi à obtenir, par culture *in-vitro* de méristèmes, des plantes saines (indemnes de viroses) à partir de plants de Dahlia (**CHEVRE A., 1985**).

L'année 1955 était marqué par la découverte de la Kinétine par Skoog (substance dotée d'un grand pouvoir calogène) a permis de provoquer, presque à volonté, la néoformation de bourgeons adventifs qui, traités par de l'acide gibbérellique et des auxines, s'enracinaient pour donner des plantes entières (**TOUTE, 1998**).

En 1958, STEWARD et son équipe régénèrent les premiers embryons dits somatiques à partir de cellules de carotte et confirment que certaines plantes développées à partir de culture de cellules sont issues d'embryogenèse asexuée. Dès lors, les expériences s'accumulèrent avec des plantes aussi diverses que le tabac, la carotte, le trèfle, le pois, le soja et autres après (**SCHMID et KELLER ,1981; MARGARA, 1989; TOUTE, 1998**).

## **2. 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 dont ils sont issus (**NOZORON et BENACILHON, 1972**). Selon **Rousselle et al .,(1996)** la culture de méristèmes a permis de guérir les plantes atteintes de virus. La micropropagation in vitro est plus ou moins utilisée dans la production de plantes conformes pour les premières générations de multiplication pour produire des plantes génétiquement modifiées, la régénération doit donner des plantes conformes (**LÊ C, 2001**).

## **3. Catégorie de la culture in vitro non conforme**

D'après **Nowbuth et al., (2005)** on appelle variation somaclonale des modifications du phénotype des plantes qui apparaissent le plus souvent lors de la régénération de nouvelles plantules à partir de tissus déjà différenciés.

De très nombreux travaux ont porté sur la variation somaclonale et sont d'un éventuel intérêt pour la création variétal. Le problème rencontré est souvent celui du crible puisque l'apparition d'un caractère utile est un événement rare et il ont constaté souvent l'apparition de caractères défavorables (**BAJAJ, 1987**).

#### 4. Facteurs influençant la culture *in vitro*

##### 4.1. Lumière et photopériode

La lumière est un facteur déterminant pour la culture *in vitro* des plantes, elle à une grande influence de part que la durée d'exposition (photopériode), **HUSSEY et al.,(1981) et BRIGGS ,1964** signalent d'autre part la longueur de jour affecte la vigueur et le développement des proliférations et la croissance des cals, cette dernière pourrait aussi contribuer à la formation des cals .

De façon générale le début de croissance nécessite une faible intensité lumineuse (500 à 1000 lux) avec 12 à 16 heures de photopériodes (**BOMMENENI et JAUHAR, 2003**).

Lorsqu'il s'agit de préparer la plantule au repotage en serre, il apparaît souvent préférable D'augmenter l'intensité de l'éclairage (par exemple 10000 lux) (**MARGARA ,1989**).

##### 4.1.1. Température

La température de la chambre à culture est plus ou moins constante elle est de 22 à 25°C (**MARGARA ,1989**) Cependant, la température réelle des tissus à l'intérieur des récipients de culture peut être supérieure de 2 à 4° C, c'est pourquoi il est préférable de régler la température de la salle à 22°C au-dessous de celle recommandées.

##### 4.1.2. Hygrométrie

Elle doit atteindre les 100% d'humidité relative dans les flacons. Cependant, il faut veiller à ne pas noyer les explants par un excès de condensation à la surface du milieu.

##### 4.2. Stérilité

La culture végétale se déroule dans un laps de temps important entre les repiquages (Jusqu'à 3 mois). Comme les milieux sont riches et les conditions de cultures chaudes et humides, toutes les conditions d'un développement bactérien ou fongique sont réunies. Les causes d'infection sont nombreuses. il est nécessaire de manipuler dans des conditions d'asepsie rigoureuses.

##### 4.3. Support de milieux de culture :

Le processus de croissance développement des plantules est en grande partie liée à la composition du milieu de production.

Le choix du milieu de culture est arbitraire dans la culture *in vitro*. Selon **MONNIER, 1995** la croissance et la survie des embryons sont considérablement affectés par la composition minérale du milieu.

Les macroéléments nécessaires à la croissance sont (N, P, S, K, Mg, Ca) ils sont absorbés sous forme d'ions (**MARGARA, 1989**). Le potassium occupe la première position, il existe dans le milieu sous forme de nitrate ou chlorure avec une concentration de 20 à 30 mM.

Le phosphore est absorbé sous la forme orthophosphorique ( $H_2PO_4$  ou  $HPO_4$ ), les besoins de la croissance dans les cultures des tissus varient de 1-30Mm, il augmente la densité des racines. Pour le calcium, les besoins en cet élément varient de 1-3 mM, le rôle du calcium, est le maintien de la structure cellulaire. Le magnésium à un rôle de construction de la molécule de chlorophylle et finalement les composés azotiques qui représentent la principale source d'alimentation azotée (**YVES, 1984**).

#### **4.3.1. Saccharose**

Pour la culture in vitro le saccharose constitue une source d'énergie car la plante n'est pas encore arrivée à satisfaire ses besoins énergétiques, on peut dans un cas particulier utiliser d'autres sources, tels que le galactose et le lactose (**TEOULE, 1999**).

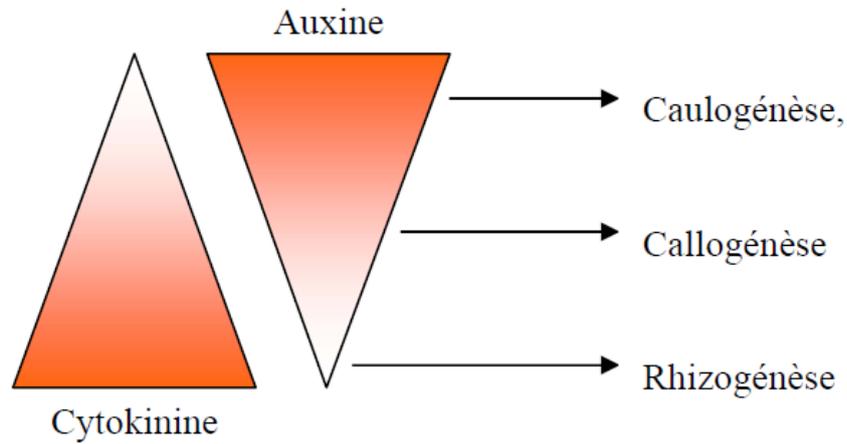
#### **4.3.2. Vitamines**

En culture in vitro certaines vitamines sont favorables aux croissances des tissus, parmi les principales, citons : la thiamine, l'acide nicotinique, la pyridoxine, leurs concentrations sont fréquemment de l'ordre de 1mg/l.

#### **4.3.3. Régulateurs de croissances**

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

Les facteurs de croissance notamment les auxines (AIA, AIB, AIP) et les cytokinines (la kinétine et la benzylamenopurine) sont des régulateurs de croissance indispensables au bon démarrage et à l'entretien de ces cultures de tissus végétaux in vitro. D'ailleurs, les prédictions de Gottlieb Haberlandt sur la potentialité des cellules végétales n'ont pu recevoir une confirmation qu'à partir de 1939, après la découverte des facteurs de croissance et notamment des auxines (**TOURTE et al., 2005**). Ces dernières participent aux croissances en augmentant le nombre de cellules et provoquent l'élongation cellulaire. Les cytokinines y sont impliquées en augmentant le nombre de cellules ; l'équilibre auxines / cytokinines détermine l'organogénèse.



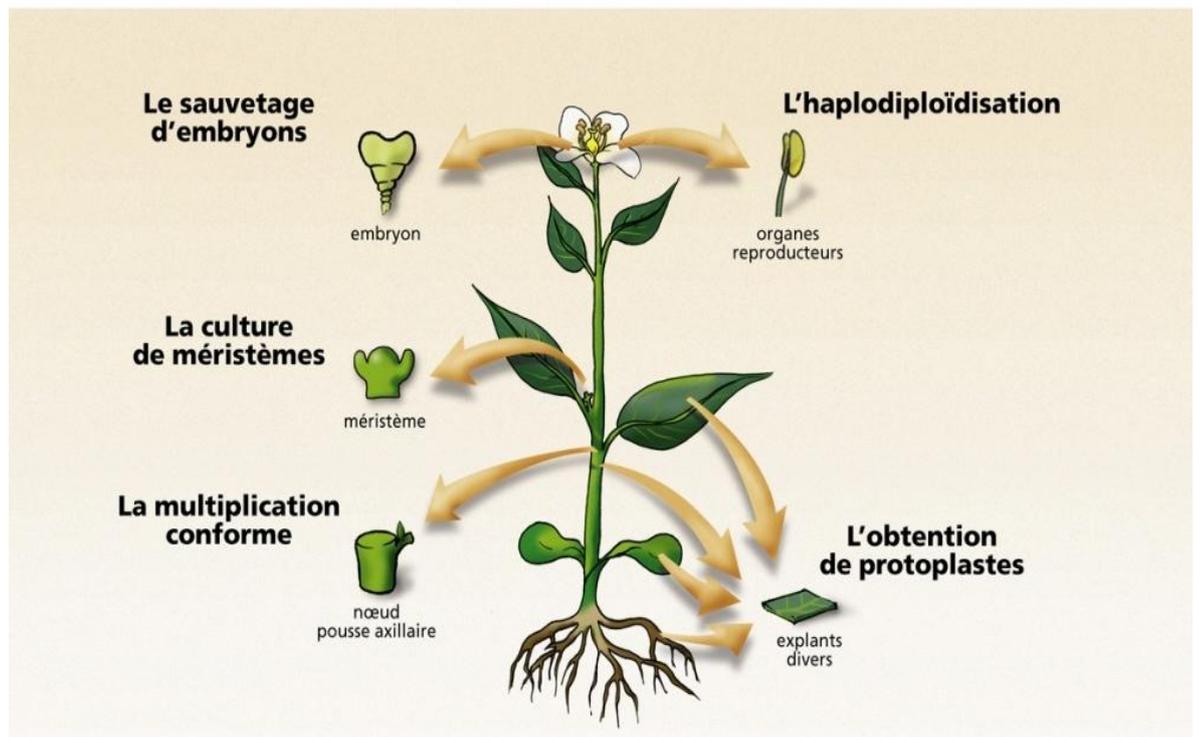
**Figure11** : Influence des équilibres hormonaux sur l'organogénèse (NOVELLO et TAP, 2005).

**4.4. Conditions stériles**

La technique de culture in vitro exige beaucoup de soin pour le maintient des cultures en condition d'asepsie. Lorsque l'on a des cultures infectées, cela peut provenir de différentes causes.

**5. Application de culture in vitro**

Pour les applications de culture in vitro il n'existe pas malle de méthode permis l'quelle le plus utilisé sont :



**Figure12** : Méthodes d'application de la culture in vitro (Gnis, 2007).

### 5.1. Micro propagation

. 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 (**OCHATTE et al ., 2005**). La particularité de cette reproduction est que les plantes filles qui en sont issues sont identiques génétiquement à la plante mère: c'est le clonage végétal, La micro propagation *in vitro* dérive de ce phénomène naturel.

On cultive des explants végétaux stérilement, sur un milieu artificiel et dans un environnement contrôlé. Suite aux subcultures successives, on obtient alors des plantes identiques à la plante de départ et que l'on peut multiplier à l'infini.

La micro propagation *in vitro* peut suivre deux voies différentes :

1. En provoquant le développement de bourgeons axillaires présents naturellement à la base des feuilles (multiplication par bourgeonnement axillaire).

Le même développement peut être provoqué à partir de tiges ou d'inflorescences pour autant qu'ils comportent des nœuds, et par conséquent des bourgeons axillaires.

Cette technique ne fait donc qu'accélérer *in vitro* le fonctionnement normal des méristèmes de bourgeons déjà formés sur une plante.

2. En provoquant l'apparition de bourgeons adventifs a des endroits inhabituels (multiplication par bourgeonnement adventif).

L'initiation de tels bourgeons peut être en principe induite sur n'importe quel type d'organe ou de tissu (feuille, tige ou racine).

Cette technique permet de produire en grande quantité des cultivars et aussi la multiplication végétative de plusieurs plantes médicinales et horticoles (**BRETAUDEAU, 2006**).

### 5.2. Culture de méristèmes

Les premiers résultats de cultures de méristèmes appelées communément "cultures d'apex" furent obtenus par KOTTE et ROBBINS, dès 1922 à partir de méristème radiculaires de fève et de maïs (**TOUTE, 1998**).

Les méristèmes sont des tissus de formation, en expansion continue, confèrent à la plante une organogenèse permanente chez les végétaux supérieurs.

Ils représentent des petits massifs de cellules indifférenciées (0.1mm) et conservent la capacité de se diviser activement. Ces zones méristématiques gardent jusqu'à leur mort le caractère juvénile. Ils jouent un rôle capital dans le développement végétal puisqu'elles édifient tous les organes (**CAMEFORT, 1977; MARGARA, 1989**).

**5.3. Embryogenèse somatique**

Un apport important de la technique des cultures *in vitro* à la biologie a montré que des cellules somatiques pouvaient produire des structures comparables à des embryons, méritant l'appellation d'embryons somatiques (**MARGARA, 1989**). Ces embryons peuvent se développer à partir des cellules à 2n chromosomes issues de feuilles, racines ou tige (**BOCCON-GIBOD et JALOUZOT, 1989**).

**5.4. Haplo-diploïdisation**

Ces techniques ne démarrent pas des cellules somatiques mais de cellules gamétiques (**KASHA et KO, 1970 ; KELLER et AMSTRONG, 1979 ; DE BUYSER, 1980**) et (**DEMERLY, 1985**)

Les plantes haploïdes sont issues d'une cellule sexuelle mâle ou d'une cellule sexuelle femelle sans fécondation.

Les plantes obtenues n'ont qu'un seul lot de chromosomes au lieu de 2 normalement, qui est doublé naturellement ou artificiellement afin qu'elles deviennent fertiles. Elles peuvent être obtenues par androgenèse, par gynogenèse, par fécondation avec du pollen irradié ou par croisements interspécifiques.

Ces processus permettent d'obtenir des lignées pures, Il existe dans la nature à des pourcentages très faibles des plantes haploïdes, non issues de fécondation normale (**Anonyme 2016.TECHNIVIT Lab.**)

**5.5. Culture de protoplastes**

Les biologistes ont constaté, au cours des manipulations cellulaires, que l'on pouvait obtenir des agrégations entre des cellules débarrassées de leurs parois pectocellulosiques appelées protoplastes (**DEMARLY et SIBI, 1996**).

La technique de culture de protoplastes est très fortement inductrice de variabilité ; cela a été étudié et montré chez la pomme de terre (**SHEPARD, 1982 ; KARP et al., 1982**). Les variations portent souvent sur le nombre de chromosomes.

**5.1. Avantages de la culture in vitro**

- La possibilité de conservation de ressources végétales et faire une banque de génotypes et réaliser ainsi des plantations hors la période de croissance (**LÊ et al., 2002**).
- L'amélioration des conditions sanitaires par les techniques de cultures in vitro souvent associées à l'éradication des viroses (**SIBI, 1981**).
- La facilité de leur transport d'une région à l'autre ou d'un pays à l'autre.

- La multiplication rapide, cette dernière est due à l'augmentation de diffusion cellulaire par ces techniques (SMITH *et al.*, 1985 ; COLLET et LÊ, 1988).
- Possibilité de pouvoir les planter mécaniquement en plein champ (semoir de précision à pois chiche), et possibilité d'enrobage (régulateurs de croissance, engrais et produits phytosanitaires) (OULD RAMOUL, 1997).

### 5.2. Inconvénients

1. Le problème de contamination est dû à deux causes : Le premier c'est l'explant et le deuxième c'est la technique CASSELLE, 1987.
2. La perte de caractères intéressants :
  - la production répétée de grands nombres de plants uniformes (clones) peut entraîner la perte des gènes nécessaires, par exemple, à la résistance aux maladies nouvelles; il faut donc conserver le pied mère et à certains moments, repasser par la reproduction sexuée.
  - Problèmes inhérents à la technique :

L'asepsie des explants : la présence de micro-organismes, bactéries, champignons, virus, qui, s'ils ne sont pas totalement éliminés, contaminent la culture et tuent les jeunes plantules.

L'acclimatation : le passage à des conditions de culture normale est parfois délicat. En effet, durant son séjour *in vitro*, la plante est à l'abri des stress.

L'exigence d'une main d'œuvre qualifiée pour les repiquages axéniques et pour la Récolte (DEZA, 1991).
  - L'exigence de main d'œuvre qualifiée
  - certains accidents, non prévisibles au départ, peuvent intervenir en cours de culture *in vitro*, comme des malformations dues à un déséquilibre hormonal : la vitrification.

## I. Embryogénèse somatique

Chez les végétaux supérieurs, l'embryogenèse est une phase clé du développement au cours de laquelle l'embryon établit les principales structures qui formeront la future plante et synthétise et accumule des réserves définissant le rendement et la qualité nutritionnelle des graines.

La compréhension des événements moléculaires et physiologiques menant à la formation de la graine est donc d'un intérêt agronomique majeur.

D'autre part, les protoplastes qui sont utilisés pour des manipulations génétiques permettent de régénérer des embryons somatiques transformés. Les embryons somatiques peuvent aussi servir au stockage à long terme des végétaux.

### 1. Historique

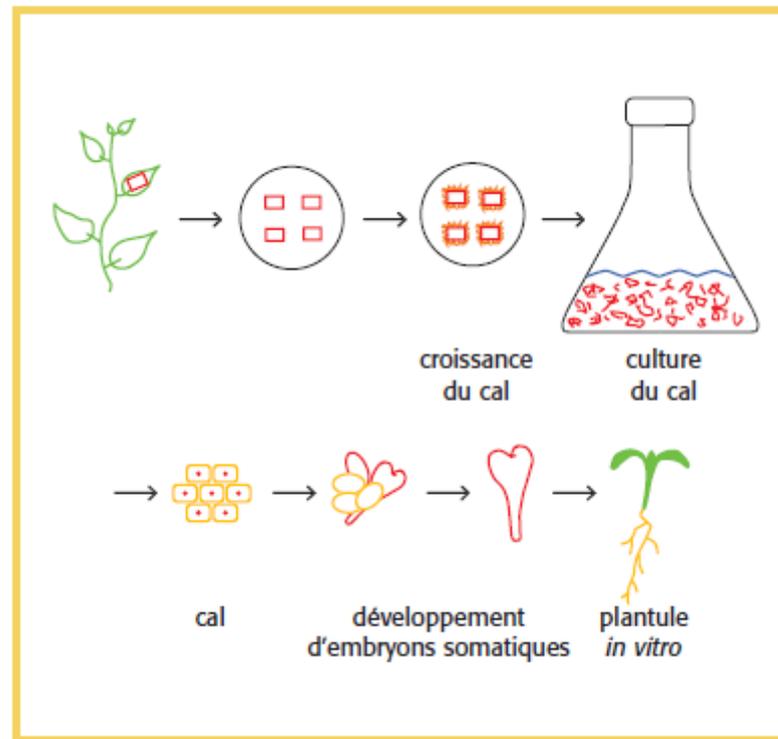
Classiquement, l'embryon est défini comme étant une plante se trouvant au stade initial de son développement. Il s'agit en fait d'une structure bipolaire (munie de deux méristèmes : l'un caulinaire et l'autre racinaire) qui, suite au processus de germination, donne naissance à une nouvelle plante.

Habituellement, l'embryon s'édifie à partir d'une cellule initiale, le zygote, formé lors de la reproduction sexuée (embryon zygotique). Cependant, d'autres types d'embryons peuvent également se développer à partir de cellules du sporophyte ou du gamétophyte, embryons qui ne sont pas le produit d'une fusion gamétique et qui sont appelés « embryons somatiques ». Parfois, chez certaines espèces, ils résultent d'une embryogenèse somatique naturelle qualifiée d'apomixie. Dans certains cas en effet, les anthérozoïdes, l'oosphère, voire d'autres cellules gamétophytiques peuvent engendrer des embryons parthénogénétiques.

Dans d'autres cas, certaines cellules saprophytiques localisées au niveau des tissus intra-ovulaire, en particulier le nucelle, fournissent naturellement des embryons apoméiotiques appelés aussi "embryons nucellaires". Ce type d'embryogenèse est très développé dans la famille des Rutacées, spécialement chez les Citrus (TISSERAT *et al.*, 1979; VARDI *et al.*, 1990).

Toutefois, cette appellation est essentiellement appliquée, selon certains auteurs, les embryons obtenus à partir de culture de tissus *in-vitro* du sporophyte (PIATTI, (1988) et MARGARA, 1989).

L'embryogenèse somatique est un processus par lequel des cellules somatiques subissent une séquence de développement similaire à celle d'un embryon zygotique (YEUNG, 1995).



**Figure 13 :** Etapes de développement d'embryogenèse  
(Wyss ; Haring, et al., 2001)

Il est généralement admis que l'embryogenèse expérimentale a été observée sur la carotte pour la première fois par **REINERT, (1958)** puis par **STEWART, (1958)**.

Steward 1958 a attribué beaucoup d'importance au lait de coco comme nutriment dans la stimulation de l'embryogenèse. Cependant, Wetherell et Halperine, (1963), choisissent comme matériel d'expérience la carotte sauvage, qui donne des embryons mieux formés que ceux provenant de la carotte domestique, ces auteurs estiment que le lait de coco n'est pas indispensable au déclenchement de l'embryogenèse alors que l'ion ammonium par contre joue un rôle essentiel.

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.

## 2. Induction de l'embryogenèse somatique

Il est indispensable que l'explant soit, dans un premier temps placé dans un milieu primaire contenant de l'auxine où les cellules subissent un processus de différenciation. Durant cette période, les cellules se multiplient pour former des amas globulaires ou amas pro-embryogène. Les cellules constituées de ces amas sont caractérisées par un cytoplasme dense et une taille réduite.

Après cette période d'initiation embryonnaire, le transfert dans un milieu secondaire sans auxine permettra le développement des embryons somatiques.

Ces structures sont hautement organisées et s'édifient soit en primordial racinaire soit en tissus méristématiques capables de régénérer des pousses feuillées et des racines (**CURE et MOTT, 1978 ; WERNICKE et al., 1982**).

## 3. Modèles de l'embryogenèse somatique

L'hypothèse émise par **SHARP et al., (1980)** stipulent qu'il y a deux modèles pour l'embryogenèse :

### 3.1. Embryogenèse directe

Dans ce cas, l'embryon apparaît directement sur l'explant mis en culture. Ces embryons sont issus de cellules déjà prédéterminées. Elles sont appelées : « PEDC » : Pre-Embryonic Determined Cells.

L'environnement *in vitro* sert uniquement à déclencher le processus de divisions organisées menant à l'embryogenèse.

L'embryon peut se former au sein d'une masse qui peut être assimilée à une cal. Cependant, sur le plan histologique cette masse est formée presque entièrement de pro-embryons. Ce cas est généralement considéré comme faisant partie de l'embryogenèse directe.

La masse résulte de la multiplication des cellules PEDC et donc de leur clonage (PEDC cloning).

### 3.2. Embryogenèse indirecte

Dans ce cas, une phase intermédiaire de callogenèse est nécessaire à l'embryogenèse. La culture *in vitro* conduit à la reprise de la mitose mais aussi à la détermination de certaines cellules dites « IEDC » : Induced Embryonic Determined Cells.

#### 4. Les stades de l'embryogenèse somatique

Afin de clarifier le vocabulaire et de permettre ainsi des comparaisons plus rigoureuses, **HAKMAN and VON ARNOLD, 1988** quatre stades au cours de l'embryogénèse somatique :

❖ **Stade 1 :**

- Une région embryonnaire constituée de petites cellules au cytoplasme dense.
- Une région du suspenseur constituée de cellules longues et très vacuolisées.

❖ **Stade 2 :**

- La région embryonnaire devient proéminente, plus opaque, avec une surface lisse et luisante.

❖ **Stade 3 :**

- Les cotylédons sont visibles.
- Les embryons ressemblent aux embryons zymotiques.

❖ **Stade 4 :**

- Les cotylédons et les hypocotyles sont allongés.
- On observe un développement radicaire rudimentaire.

Les cultures passent d'abord par le stade d'un cal embryogénie (ou masse embryogénie) forme de cellules embryonnaires et de cellules du suspenseur.

Mais dans certains cas, il a été observé le développement spontané d'embryons somatiques sans passer par le stade d'un tissu embryogénique.

#### 5. Origine des structures embryonnaires

Ces structures ont été étudiées par **MO et VON ARNOLD, 1991** avec des semis de 18 à 36 jours. Les structures embryonnaires peuvent se différencier à partir de l'hypocotyle ou des cotylédons de l'explant mis en culture.

Elles sont issues de cellules épidermiques ou sub-épidermiques, ou parfois de cellules corticales.

**LELU et al., 1990**, suggèrent l'existence de 2 populations cellulaires parmi ces cellules épidermiques et sub épidermiques : l'une sensible à un rapport auxine/cytokinine élève (12/1 ou 24/1), l'autre sensible à un prétraitement avec un rapport cytokinine/auxine élève (90/1).

Ce prétraitement conduisant à une embryogenèse s'il est de courte durée (1 semaine), à la formation de bourgeons adventifs s'il est plus long.

## 6. Androgenèse

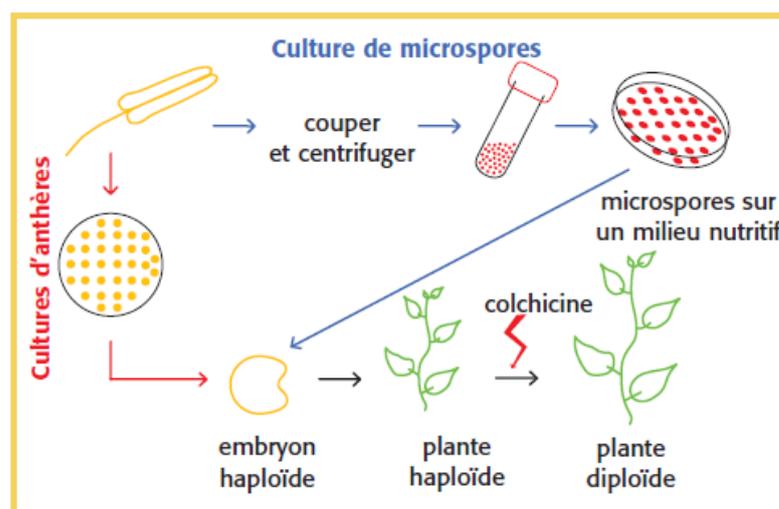
L'androgenèse consiste à mettre en culture des anthères prélever les fleurs sur un milieu nutritif artificiel ou quelque unes des microspores des anthères se divisent pour donner des cals ou des d'embryon. Ces structure se différencient ensuite pour former des plantes haploïdes ou haploïde doublé (**Larouche, 1998**), l'androgenèse peut être réaliser aussi par la culture des microspore isolées ; dans ce cas les microspores sont extraites des anthères avant d'être mise en culture (**Jacquard C., 2007**).

### 6.1. Historique

La méthode la plus utilisé pour la production des plantes haploïdes est la culture d'anthères, Guha et Maheshwari décrivent pour la première fois en 1964, l'indiction des embryons à partir de pollen immature d'anthères de *Datura innoxia* cultivées in vitro à partir de la technique a été appliquée avec succès chez de nombreuses espèces végétales.

des anthères ou des graines de pollen immatures sont cultivés in vitro pour forcer les graines de pollen à développer des structures pluricellulaires et en particulier des embryons avec un seul jeu de chromosomes (plantes haploïdes).lorsque de telles plantes ou embryons haploïdes sont traités avec des produits provoquant un doublement des chromosomes, par exemple de la colchicine, ils retrouvent leur nombre normal de chromosomes (et donc leur fertilité ).

Les plantes ainsi obtenues forment des lignées pures (homozygotes, autofécondées, consanguines).dans certains cas, le doublement des chromosomes peut survenir spontanément au cours de la culture *in vitro*.



**Figure14** : Etapes de la culture d'anthère (**Wyss E. Haring M., et al 2001**).

Les cultures d'anthères sont normalement utilisées au début d'un programme de sélection. Ces techniques ont pour simplifier le processus de sélection et d'accélérer la production de lignées pures destinées à la production d'hybride F1. elle ne servent cependant pas à ajouter de nouveaux caractères.

D'un point de vue purement génétique, les plantes issues de culture d'anthères sont identiques aux lignées pures obtenues par autofécondation.

La sélection traditionnelle peut donc obtenir les mêmes résultats, mais elle demande plus de temps et de travail. Elles sont couramment utilisées dans la sélection de l'orge, des crucifères et des solanacées.

Malgré les progrès réalisés ces dernières années dans le cadre de l'optimisation de la culture d'anthères, un certain nombre de paramètres influencent fortement l'efficacité de la technique. Parmi ceux-ci, mentionnons les conditions de culture des plantes, le stade de récolte.

## **6.2. Etapes de l'androgénèse**

Le processus de l'androgénèse comporte quatre étapes (**Jacquard, 2003**):

### **6.2.1. Phase de prétraitement**

Cette première étape consiste en l'acquisition du potentiel embryonnaire de la microspore, obtenu par l'application d'un stress (stress physique, chimique ou physiologique) permettant la répression du programme gamétophytes et menant à la différenciation cellulaire et la formation d'un embryon (**Maraschin et al. 2005**).

Ce changement de programme peut avoir lieu grâce à la totipotence des cellules végétales et nécessite l'application d'un stress.

Le prétraitement engendre un grossissement de la microspore, ce changement morphologique coïncide avec le début de la réorientation du programme.

### **6.2.2. Phase de culture**

Les anthères sont transférées sur un milieu de culture, permettent aux microspores de subir une division symétrique (in Młodzianowzki et Idzikowska, 1978 ; Sunderland et Huang, 1985) et de former des structures embryoides (embryogenèse directe) ou des cals (embryogenèse indirecte) au cours de la phase de culture.

Les embryons et les cals sont ensuite libérés après rupture de l'exine et le développement saprophytique commence (**MARASCHIN et al., 2005**).

### 6.2.3. Phase de régénération

Après l'étape de culture, intervient la phase de régénération de la plantule par l'entrée en activité des méristèmes apicaux et racinaires.

Après environ 3 à 4 semaines de culture, les embryons ou les cals sont transférés sur un milieu de régénération (Lyne *et al.*, 1986 ; Olsen 1987 ; Jacquard *et al.*, 2003 ; Maraschin *et al.*, 2005). Au cours de cette étape, les formations haploïdes vont former des plantules qui sont ensuite entretenues en chambre de culture.

### 6.2.4. L'étape de diploïdisation

La dernière étape de l'androgenèse consiste à obtenir des plantes haploïdes.

## 6.3. Facteurs influençant l'androgenèse (culture d'anthère)

La réorientation de la microspore n'est pas uniquement due à l'isolement des anthères et à leur mise en culture sur des milieux optimisés. Elle est dépendante d'un certain nombre de facteurs (Jacquard, 2007).

### 6.3.1. Influence du génotype

La réponse des anthères et le pourcentage de plantules chlorophylliennes régénérées sont génotype-dépendants.

### 6.3.2. Influence des conditions de culture des plantes

Les conditions de culture des plantes mères influencent de manière décisive le succès de la culture d'anthères, le nombre d'anthères répondant peut varier significativement à l'intérieur d'une même variété. L'état physiologique, la santé des plantes mères, les conditions de croissance (Température, lumière, nutrition minérale, condition hydrique et l'humidité relative), influencent de manière décisive le taux de la réussite de l'androgenèse et ce quelque soit la variété étudiée (DANIEL, 1993 ; RAINA *et al.*, 2003).

### 6.3.1. Influence de la composition des milieux de culture

La composition des milieux de culture est un facteur supplémentaire intervenant dans la réussite de l'androgenèse. La culture d'anthères peut se réaliser sur des milieux liquides ou solides (RIMBERIA *et al.*, 2005).

La culture en milieu liquide ajoute cependant un problème supplémentaire : les cellules immergées se retrouvent en conditions d'anaérobiose et l'acclimatation de lactate et d'acides organiques contribuent à la régénération de plantules albinos (KAO *et al.*, 1991).

l'ajout de Ficoll dans le milieu ou l'utilisation de membranes permettent de diminuer l'effet néfaste du milieu liquide sur le rendement en plantules chlorophylliennes (**LUCKETT et SMITHARD, 1992 et INGRAM et al., 2000**).

la source carbonés des milieux de culture et de régénération est le paramètre le plus important pour l'obtention des plantules chlorophylliennes (**FINNIE et al., 1989 ; OLSEN, 1991 ; CAREDDA et al., 1999**).

### **6.3.2. Influence de la densité des anthères**

La densité des anthères mis en culture par boîte influent sur le taux de callogénèse.

### **6.3.3. Influence du prétraitement**

Le principal et déterminant facteur pour la réussite de l'androgénèse est le stress appliqué aux anthères (**Herberle, 1985**). En effet, un stress, servant de facteur déclenchant est nécessaire à l'induction de l'androgénèse chez la majorité des espèces (**SHARIATPANAHI et al., 2006 ; MARASCHIN et al., 2005**).

La phase de prétraitement détermine la réorientation du programme de la microspore d'un programme gamétophytique vers un programme sporophytique et constitue l'étape clé de la technique (**SHARIATPANAHI et al., 2006**).

## **6.4. Conséquences d'un rejet**

- au niveau des variétés : un rejet total et rétroactif de cette technique nous priverait d'un certain nombre de variétés d'orge, de chou de Bruxelles et de poivron. il n'est cependant pas certain qu'on puisse retracer l'histoire de l'obtention des variétés «critiques».
- au niveau de la sélection : pour obtenir des lignées pures, il faudrait recourir à des techniques plus précises qui sont en général très lentes.

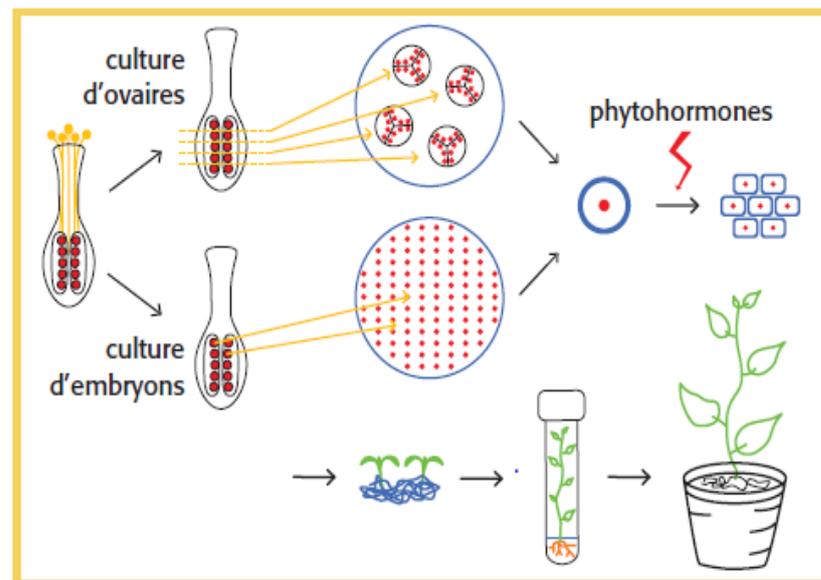
## **6.5. Culture d'ovaire**

Malgré la réussite de la fécondation, il peut arriver qu'un embryon ne se développe pas en graine fertile. Le but des cultures d'ovaires et d'embryons est de transférer très tôt l'embryon dans un milieu nutritif artificiel pour qu'il ne dépende plus des ressources de la plante.

Dans le cas des cultures d'ovaires, des ovaires entiers ou coupés en tranches sont placés sur le substrat.

Lorsque les ovules ont suffisamment gonflé, ils sont les séparé des ovaires pour pouvoir les cultiver. À ce stade, les ovules sont en fait devenus des graines capables de germer.

Dans le cas des cultures d'embryons, les embryons sont prélevés sur des fleurs fécondées puis placés sur un milieu nutritif pour les faire germer.



**Figure15** : Etapes de culture d'ovaire (WYSS, HARING *et al.*, 2001)

### 6.5.1. Application

Les cultures d'embryons ou d'ovaires sont les techniques les plus fréquemment utilisées pour croisement des gènes provenant d'une espèce (sauvage) proche parente.

Ces techniques ont souvent été utilisées pour la tomate. Le poivron, la courgette, la laitue, le blé et de nombreuses autres cultures. Entre 80 et 100 % des cultivars actuels proviennent de croisements interspécifiques.

Ils permettant de plus nombreuses combinaisons que les croisements standards :

Après les premières étapes de l'embryogénèse sur la plante, le développement se poursuit par culture d'embryon sur substrat.

**6.5.2. Avantages**

- Augmenté les chances minimales dans la nature,
- Élimination de toutes les barrières naturelles qui limitent les croisements.

**6.5.3. Inconvénients**

- violation de barrières naturelles en conditions artificielles et stériles.
- Utilisation des phytohormones de nature synthétique.
- Au niveau des variétés : Cette méthode et leur processus est contre les bases de l'agriculture biologique.
- Au niveau de la sélection : les techniques alternatives prennent beaucoup de temps.

## 1. Lieu de travail

Notre travail a été mené au niveau du laboratoire de culture *in vitro* de l'Institut Technique de l'Arboriculture Fruitière et de la Vigne (ITAF), situé à Tessala El Merdja, Birtouta, (Alger, durant la période février-Août 2017.



**Figure16** : Lieu de stage ITAF Tessala El Merdja.

## 2. Objectif de l'étude

Notre étude consiste en la mise en place d'un protocole de régénération *in vitro* de vigne *Vitis vinifera* L., en évaluant la réponse de trois génotypes autochtones (Amalal, Bouani et Ahmar Bou Ameer) vis-à-vis le milieu Murashige et Skoog (MS), 1962 et en étudiant la formation des cals, ainsi de comparer cette réponse vis-à-vis huit combinaisons hormonales de ce milieu.

## 3. Matériel végétal utilisé

Tous le matériel végétal utilisé au cours de notre expérimentation est représenté par des boutons floraux immatures de la vigne autochtone *Vitis vinifera* L. de trois cépages(**Figure17**) :

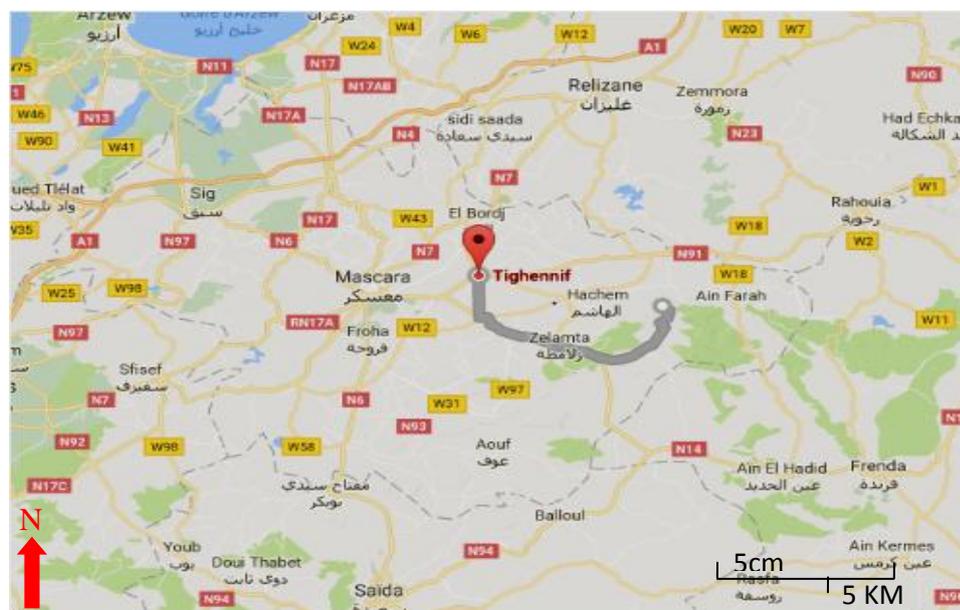
- Amalal (AL).
- Bouani (VBN).
- Ahmar Bou Ameer (VHB).

Pour la description des cépages voir **ANNEXE 1**



**Figure17** : Grappe de boutons floraux immature (originale 2017)

Les échantillons ont été récoltés tôt le matin de la ferme de démonstration de Tighennif de la wilaya de Mascara, durant le mois de Mai 2017 (**Figure18**).



**Figure18** : Localisation du site de prélèvement (Anonyme 2017)

L'échantillonnage a été réalisé pour chaque cépage sur le même pied. Après la récolte, les boutons floraux sont séparés puis identifiés (cépage, pied et rangé) par des étiquettes dans des boîtes de Pétri stériles fermées, transportés dans une glacière.

Une fois au laboratoire, les échantillons sont conservés au réfrigérateur à une température de 4°C pendant jusqu'à utilisation

## 4. Préparation des solutions mères

### 4.1. Solution mère de macro éléments

Elle consiste à :

- Verser 600 ml d'eau distillée dans un bécher d'1L.
- Peser et dissoudre chacun des sels indiqués (A) seul, en chauffant légèrement au besoin.
- Transférer la solution dans un flacon fumé et compléter à l'eau distillée stérile jusqu'à 1 litre.
- Identifier le flacon puis le ranger au réfrigérateur.

### 4.2. Solution mère de micro éléments

Elle consiste à :

- ❖ Verser 600 ml d'eau distillée dans un bécher d'1L.
- ❖ Peser et dissoudre chacun des sels indiqués (B) seul, en chauffant légèrement au besoin.
- ❖ Transférer la solution dans un flacon fumé et compléter à 1 litre avec l'eau distillée stérile.
- ❖ Identifier le flacon puis le ranger au réfrigérateur.

### 4.3. Solution mère de chélates de fer (Fe-EDTA)

Elle consiste à :

- ❖ Verser 500 ml d'eau distillée dans un bécher d'1 litre.
- ❖ Peser et diluer une quantité 2.78g de produit  $\text{FeSO}_4, 7\text{H}_2\text{O}$ , dans un peu d'eau distillée stérile ;
- ❖ Peser et diluer une quantité de 3.73g de produit  $\text{Na}_2\text{EDTA}$ , dans un peu d'eau distillée stérile ;
- ❖ Mélanger les deux solutions des deux produits et ajuster jusqu'à 500ml avec de  $\text{H}_2\text{O}$  distillée stérile ;
- ❖ Transférer la solution dans un flacon fumé, identifier puis le ranger au réfrigérateur.

### 4.4. Solution mère de vitamine

Elle consiste à :

- ❖ Verser 100ml d'eau distillée dans un bécher.
- ❖ Peser et dissoudre seuls les vitamines indiquées (D).
- ❖ Transférer dans un flacon et compléter à 100ml avec l'eau distillée stérile.
- ❖ Distribuer dans des tubes en verre à raison de 5ml par tube ;
- ❖ Identifier les tubes puis les ranger dans un portoir au réfrigérateur.
- ❖ la myo-inositol est additionné au moment de la préparation de milieu de culture.

#### 4.5. Solution de régulateurs de croissance

Ces hormones sont d'une importance considérable utilisées à des concentrations faibles variant entre 1 et 4 mg/l (NORSTOG, 1961).

- ❖ Peser la quantité des régulateurs de croissance en question et les dissoudre dans quelques gouttes de solvant approprié (**tableau4**)

**Tableau4** : Type d'hormones de croissance utilisées.

Hormone	Solvant approprié
ANA	1N NaOH ou EtOH
BAP	1N NaOH ou EtOH
NOA	1N NaOH ou EtOH

- ❖ vérifier la dissolution complète de l'hormone et ajuster avec de l'eau distillée stérile à la quantité recommandée.
- ❖ Distribuer la solution dans des éppendorfs à raison de 0,5ml chacun et les conserver au congélateur à -15°C pour une éventuelle utilisation.

#### 5. Préparation des milieux de culture

Afin de déterminer les conditions nutritives les plus favorables à la croissance des explants, ces derniers ont été mis dans le milieu de culture MS, riche en sels minéraux qui se répartissent en deux groupes, les macroéléments (N, P, K, S, Mg, Ca) et micro-éléments (Fe, B, Mn, Zn, Cu, N, Co, Mo, I) (**tableau5**).

Dans tous les essais, la source énergétique de carbone est le saccharose utilisé à raison de 30 g/l, ce milieu contient 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 par l'HCl ou le NaOH à l'aide de PH mètre.

**Tableau5** : Composition du milieu Murashinge et Skoog (MS), 1962

Constituants	Concentration des solutions mères		
Macro-éléments	mg/l	ml/l	
NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub> KNO <sub>3</sub> Ca(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> -4H <sub>2</sub> O MgSO <sub>4</sub> -7H <sub>2</sub> O KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	16500 19000 4400 3700 1700	<b>Concentré X [10],</b> Prélèvement de 100 ml de la solution mère dans 1l de milieu de culture	<b>A</b>
Micro-éléments	mg/l	ml/l	
MnSO <sub>4</sub> -4H <sub>2</sub> O ZnSO <sub>4</sub> -7H <sub>2</sub> O H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub> KI Na <sub>2</sub> MOO <sub>4</sub> -2H <sub>2</sub> O CuSO <sub>4</sub> -5H <sub>2</sub> O COCl <sub>2</sub> -6H <sub>2</sub> O	2230 860 620 83 25 0.25 0.25	<b>Concentré X [100],</b> Prélèvement de 10 ml de la solution mère dans 1l de milieu de culture	<b>B</b>
Chélate de Fer	mg/l	ml/l	
Na <sub>2</sub> EDTA FeSO <sub>4</sub> -7H <sub>2</sub> O	3730 2780	<b>Concentré X [50],</b> Prélèvement de 10 ml de la solution mère dans 1l de milieu de culture	
Acides aminés et vitamines	mg/l	ml/l	
Glycines Acide nicotinique Pyridoxine-HCl Thiamine-HCl Miyo-inositol	2 0.05 0.01 0.05 <b>100</b>	<b>Concentré X [50],</b> Prélèvement de <b>5 ml</b> de la solution mère dans 1l de milieu de culture  Ajouté au moment de la préparation de milieu	<b>D</b>
Autre	mg/L		
Saccharose Agar	30000 7000		

Le milieu Murashige et Skoog utilisé est additionné de 8 balances hormonales composées d'une cytokinine Benzyl amino-purine ou N<sup>6</sup>-Benzyladénine (**BAP**) et 2 auxines, Acide 2-naphthoxy acétique (**NOA**) et Acide naphthyl-1-acétique (**ANA**) et le milieu MS0 dépourvu d'hormones (**tableau6**).

**Tableau6** : Balance hormonale utilisée

Hormones	BAP	NOA	ANA
Les milieux			
M0	0	0	0
M1	1mg	1 mg	/
M2	1 mg	2 mg	/
M3	2 mg	1 mg	/
M4	2 mg	2 mg	/
M5	/	1 mg	1 mg
M6	/	1 mg	2 mg
M7	/	2 mg	1 mg
M8	/	2 mg	2 mg

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 distillée dans un bécher.
- ❖ Prélever de chaque solution le volume de concentration calculée pour 1litre de milieu de culture (macroéléments, micro-éléments, 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  $5.7 \pm 0.1$  avec du HCl (0.1N) ou NaOH (0.1N).

## 6. Préparation des stérilisants

### 6.1. 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 est cancérigène, La manipulation est réalisé donc sous une hotte à flux laminaire horizontal avec l'utilisation de gants et de masques.

On pesé une quantité de produits utilisé et le dissoudre dans un volume d'eau distillée stérile et le compléter jusqu'à 1litre, agiter la solution pendant 10 minutes sur un agitateur avec l'utilisation d'un barreau magnétique.

### 6.2. 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'H<sub>2</sub>O distillée stérile pour obtenir une concentration de 7%, doit être fraîchement préparé pour chaque désinfection.

## 7. Stérilisation

Avant de démarrer la manipulation, la hotte à flux laminaire horizontal est désinfectée avec de l'alcool à 70° tout en mettant la mise en marche des rayons ultra-violets pendant 15mn au minimum pour limiter les sources de contamination de l'air (bactéries, champignons).

Les icones et les eppendorfs ont été préalablement stérilisés à l'autoclave à 120°C pendant 20mn. 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. Il est ensuite versé sous hotte dans des boîtes de Pétri stériles à raison de 20 ml par boîte puis scellées avec du para film et conservées jusqu'à utilisation.

### 7.1. 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 (NaClO) à 12%, puis avec de l'éthanol à 70%, l'ultra violet 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.

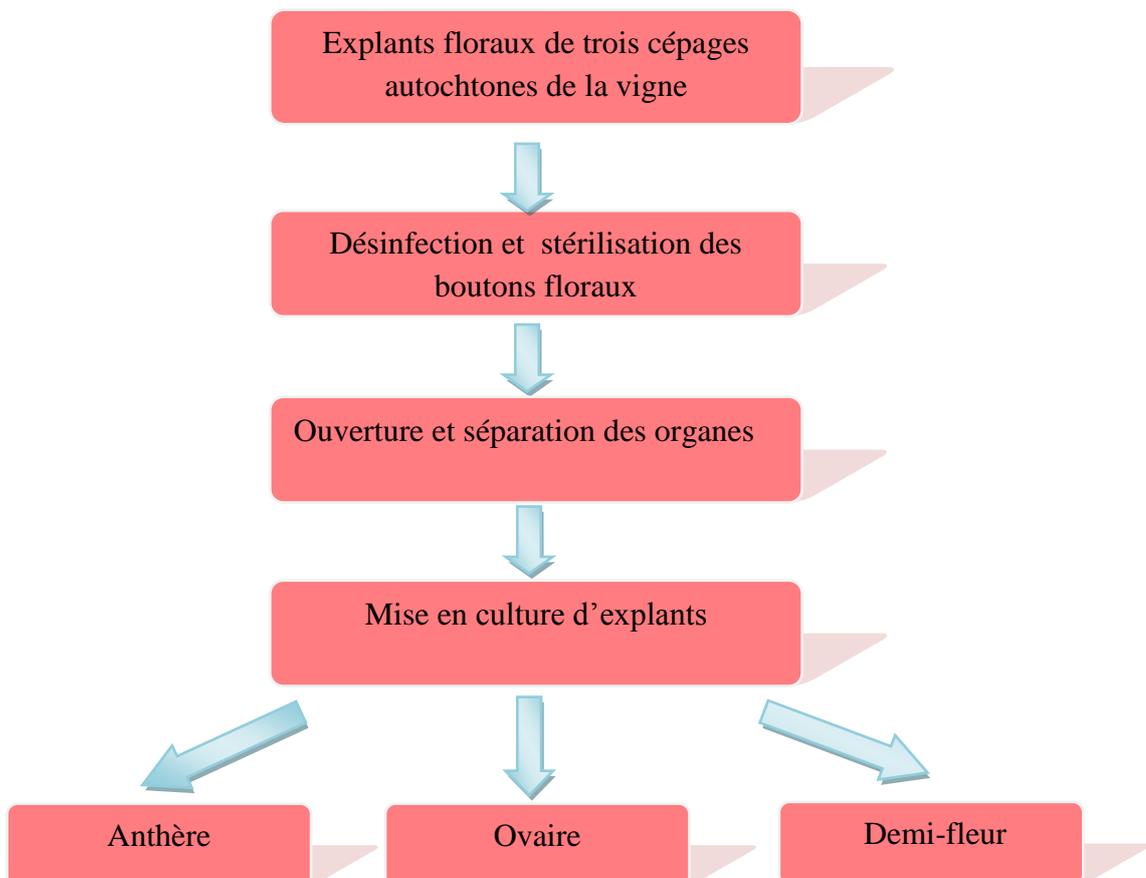
Au cours des manipulations, les instruments sont plongés dans de l'alcool à 96°C, brûlés à la flamme du bec bunsen puis, stérilisés au stérilisateur à billes pendant quelques secondes.

Le matériel végétal (anthères, ovaires et demi-fleurs) est stérilisé selon la méthode classique de **PRATIBHA et al., (2010)** et **PURKAYASTHA et al., (2010)**, qui consiste à un trempage rapide dans de l'éthanol à 70%, trempage dans le stérilisant additionné de deux gouttes de tween 20 enfin, rinçage à l'H<sub>2</sub>O distillée stérile.



**Figure19** : Stérilisation des explants sous hotte (photographie originale 2017).

Pour cela, une démarche expérimentale a été adoptée, expliquée comme suite :



**Figure20** : Etapes de démarche expérimentale.

### 8. 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, seul le 1/3 de l'inflorescence (partie basale) est utilisé. Les boutons floraux sont manipulés dans des boîtes en verre (**Figure21**) stériles, coupés longitudinalement en deux parties symétriques pour les explants de demi-fleurs ou bien découverts pour faire extraire les explants d'ovaires et d'anthères.

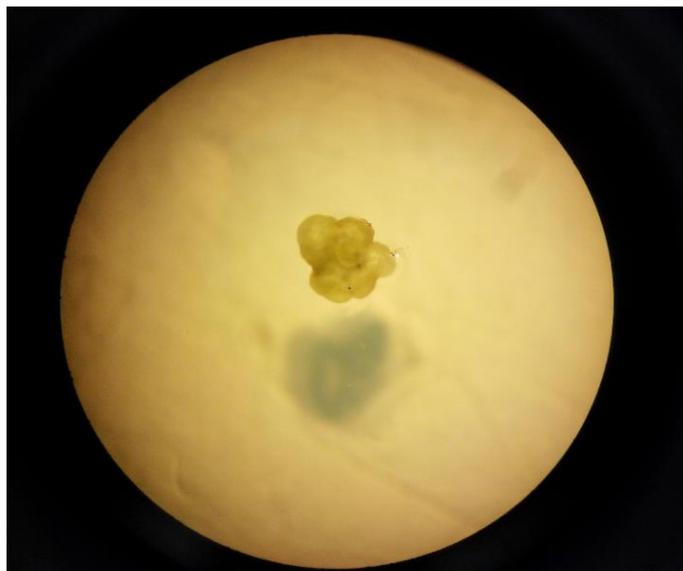


**Figure21** : Prélèvement et séparation des pièces florales sous loupe binoculaire (originale2017).

Les explants sont repiqués de manière que la coupe soit en contact du milieu, dans des boîtes de pétri contenant le milieu MS additionné avec 8 balances hormonales (MS1, MS2, MS3 jusqu'à MS8) à raison de 10 explants par boîte (**Figure22, 23, 24**), soit 3 répétitions pour chaque balance. Au total 240 pour chaque explant et 720 pour chaque cépage. Le milieu dépourvu d'hormones (MS0) est considéré comme témoin.



**Figure22** : Mise en culture de demi-fleurs (originale 2017).



**Figure23:** Mise en culture des ovaires (originale 2017)



**Figure24 :** Prélèvement des anthères sous la loupe binoculaire (originale 2017)

Pour tous les essais réalisés, les boîtes de pétri ont été placées sur les étagères de la salle de culture suivant un dispositif complètement aléatoire (**Figure25**).



**Figure25** : Mise en place de l'essai dans la chambre de culture (originale 2017).

La croissance des cultures a été réalisée sous les conditions suivantes : un cycle photopériodique de 16/8 h (16 h d'éclairage et 8 h 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 jour depuis la mise en culture pour déceler les contaminations et les brunissements, ensuite chaque 10 jour jusqu'à apparition des cals.

Le taux d'induction des cals et l'intensité de prolifération des cals ont été évalués après 45 jours de culture. Le pourcentage d'explants produisant des cals est noté après trois mois de l'initiation de la culture.

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

- Taux de contamination exprimé en pourcentage (%)
- Taux de brunissement exprimé en pourcentage (%)
- Taux d'explant survécus
- Taux d'explants ayant formés des cals
- Couleur et aspect qualitatif des cals

### **Analyse statistique**

- Analyse de variance (ANOVA).
- Newman et Keuls.

La régénération ainsi que l'assainissement des cépages de la vigne *Vitis vinifera* L. par l'embryogénèse somatique à partir de la culture de demi-fleur, ovaire et l'anthere *in vitro* a permis les résultats de notre expérimentation.

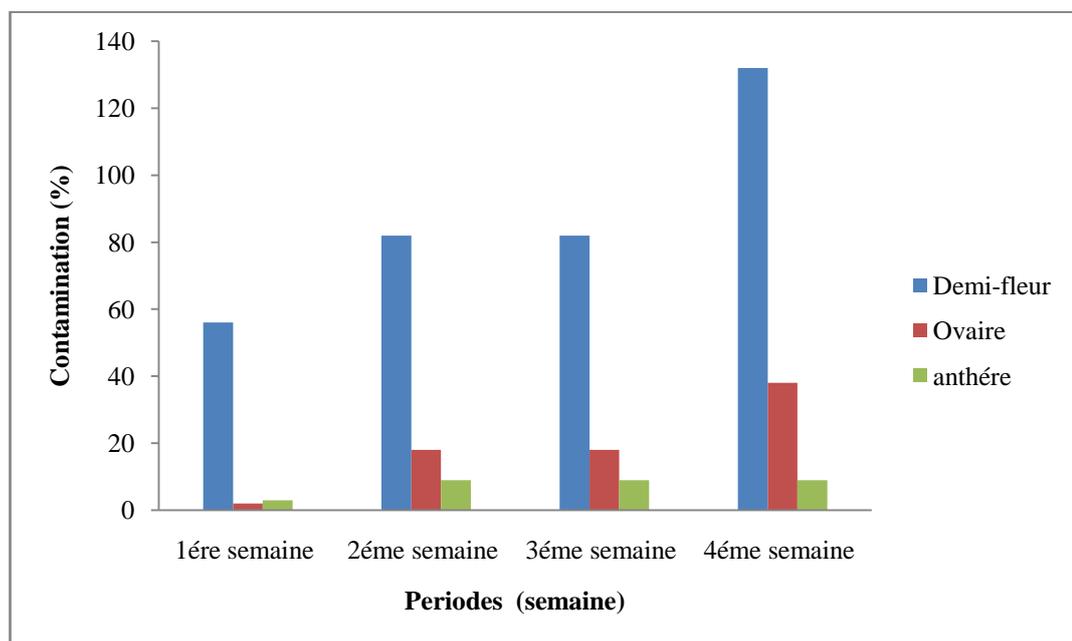
Nous avons aussi testé l'effet du milieu **Murashige et Skoog (MS), (1962)** additionné à quelques régulateurs de croissances à différentes doses, sur la capacité callogène de trois cépages autochtones de la vigne (**Amellal ; Bouani et Ahmar Bou Aneur**) et la détermination des doses adéquates des régulateurs de croissances.

### 1. Taux de contamination

Les résultats de taux de contamination des explants pour chaque cépage sont illustrés dans les **Figures (26, 27 et 28)**.

#### 1.1. Cépage Amellal (AL)

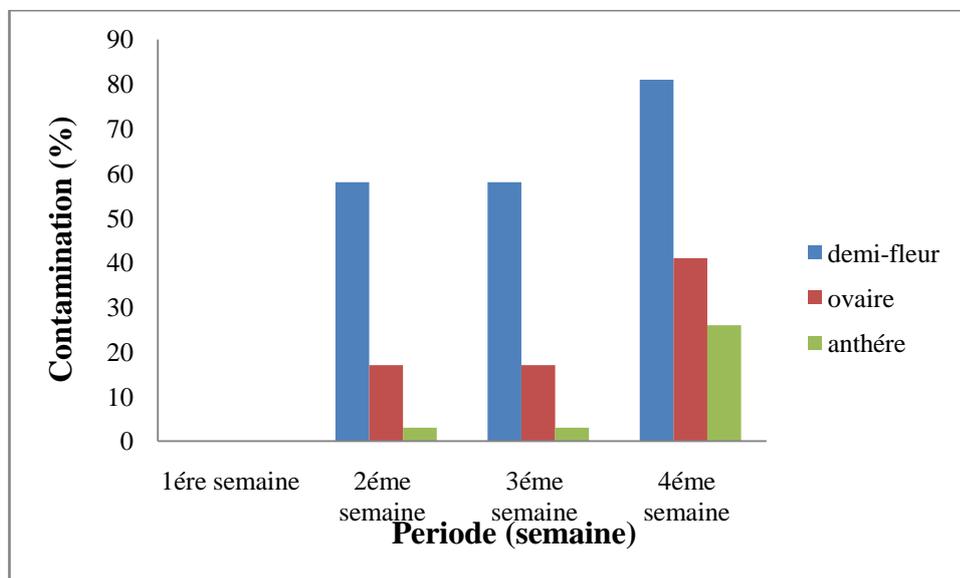
La contamination était très importante pour les explants de demi-fleurs (Figure26).



**Figure26** : Taux de contamination  
Cépage Amellal.

### 1.2. Cépage Bouani (VBN)

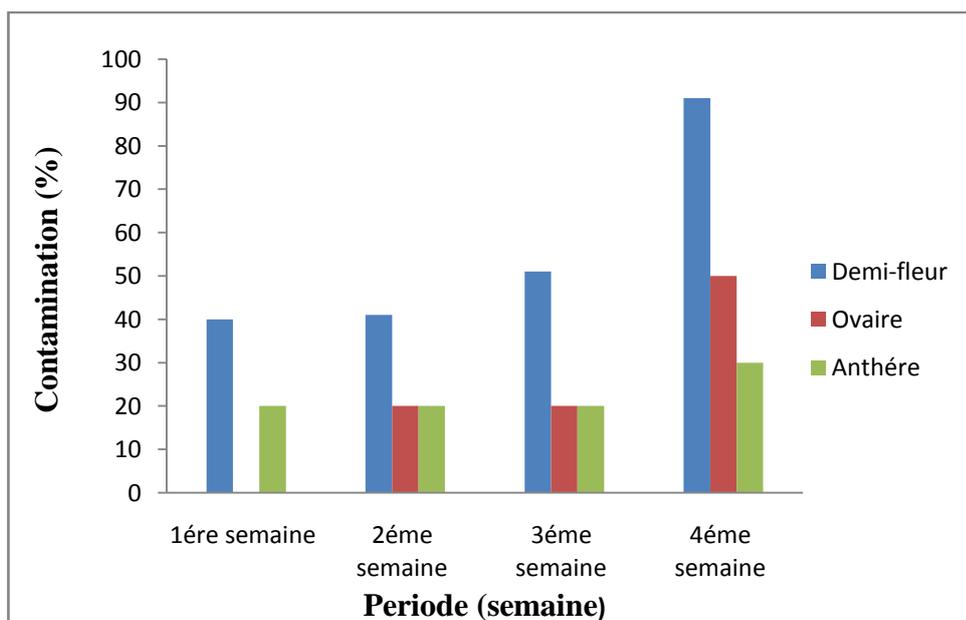
Les résultats de taux de contamination des explants pour le cépage VBN montre qu'à la première semaine, la contamination était nulle **Figure 27**.



**Figure27** : le Taux de contamination du cépage Bouani.

### 1.3. Cépage Ahmar Bou Ameer (VHB)

Le taux de contamination des explants pour le cépage VHB sont variables d'une période à une autre (**Figure28**).



**Figure28** : Taux de contamination du cépage Ahmar Bou Ameer.

## 2. Essais de désinfection des explants

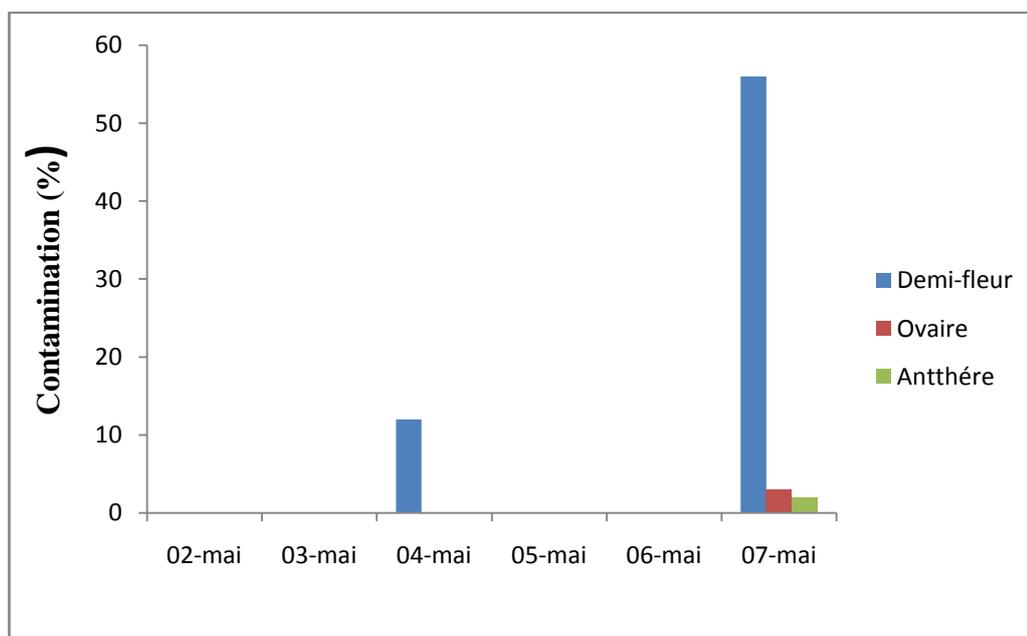
Nous avons testé l'effet de la désinfection des explants par l'hypochlorite de sodium (7%) et chlorure de mercure à différente concentration (0.1 et 0.3g/l) pendant une période de temps fixé de 10 min et rinçage avec de l'eau distillée stérile 5 fois pendant 3 minutes.

### 2.1. 1<sup>er</sup> essai de désinfection à l'hypochlorite de sodium (7%)

Les résultats de la désinfection des explants par la NaClO à 7% chaque cépage sont illustrés dans les figures (29 et 30).

#### 2.1.1. Amellal

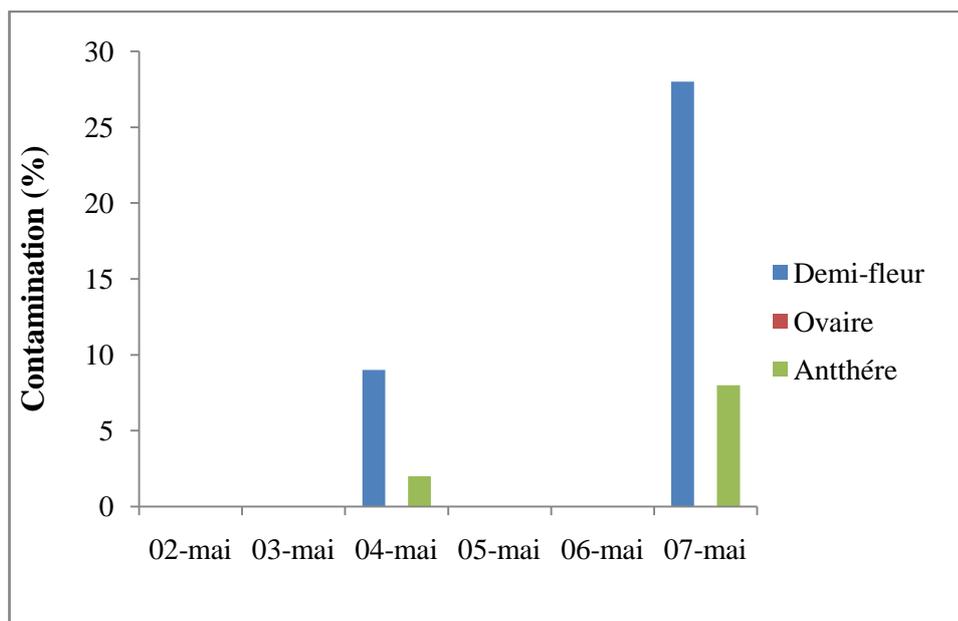
Les observations des résultats de désinfection du cépage AL sont représentées dans la **Figure29**.



**Figure29** : Taux de contamination au cours de Chaque essai Cépage Amellal.

#### 2.2.2. Bouani

Les résultats de désinfection à basse d'hypochlorite de sodium (7%) des trois explants du cépage VBN sont illustrés dans la figure suivante :



**Figure30 : Taux de contamination**

Du cépage Bouani.

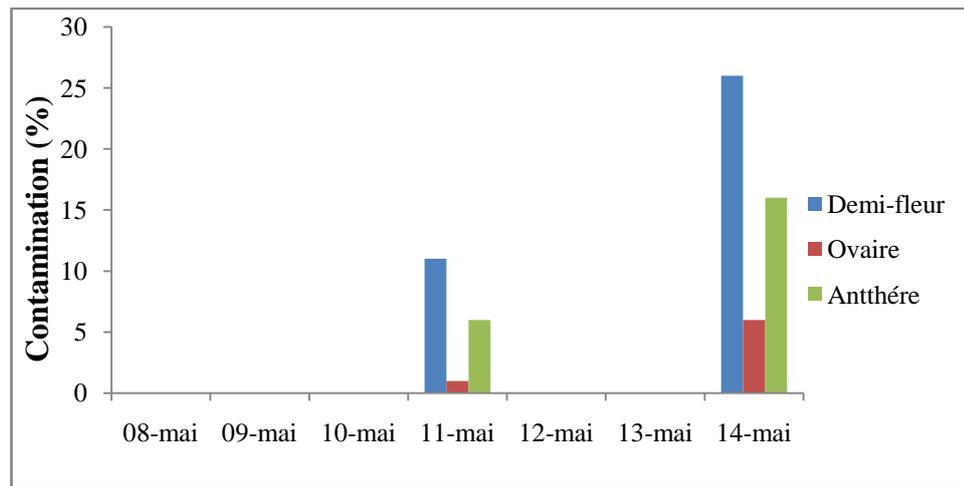
Pour la désinfection à base d'hypochlorite de sodium à 7% pendant 10 min montre un taux de contamination pour chaque cépage.

En effet, l'utilisation de l'analyse de variance montre que le cépage Amellal à enregistré une forte contamination pour les demi-fleurs avec 35,44% comparés aux explants de l'ovaire et de l'anthère où la contamination est très faible avec respectivement 1.89 et 1.26%.

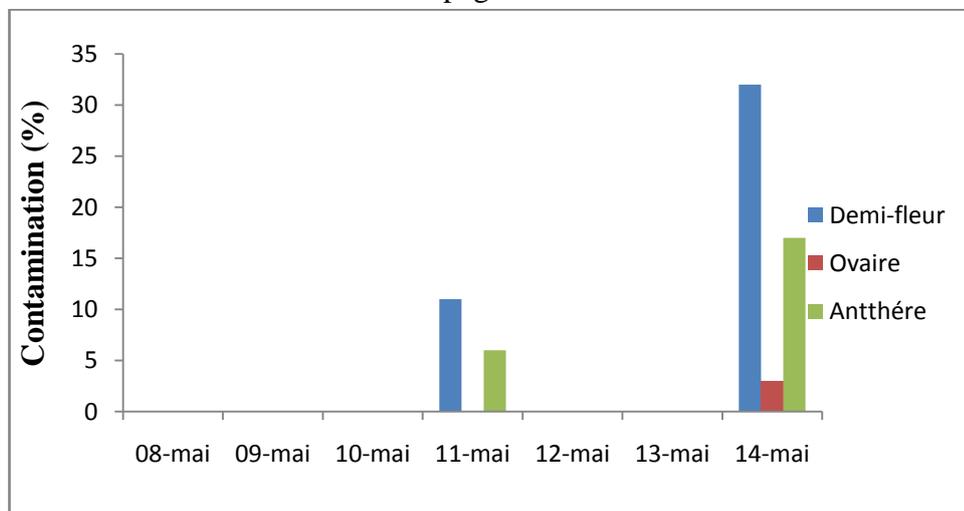
La contamination de cépage Bouani est plus faible comparé au cépage Amellal notons que les explants le plus sensibles notamment la demi-fleur ont eu un taux de contamination de 17.72% et les explants de l'ovaire enregistrent un taux de 5.06% et elle est nulle (0%) pour les explants de l'anthère.

## 2.2. 2<sup>ème</sup> essai de désinfection au chlorure de mercure (0.1g/l)

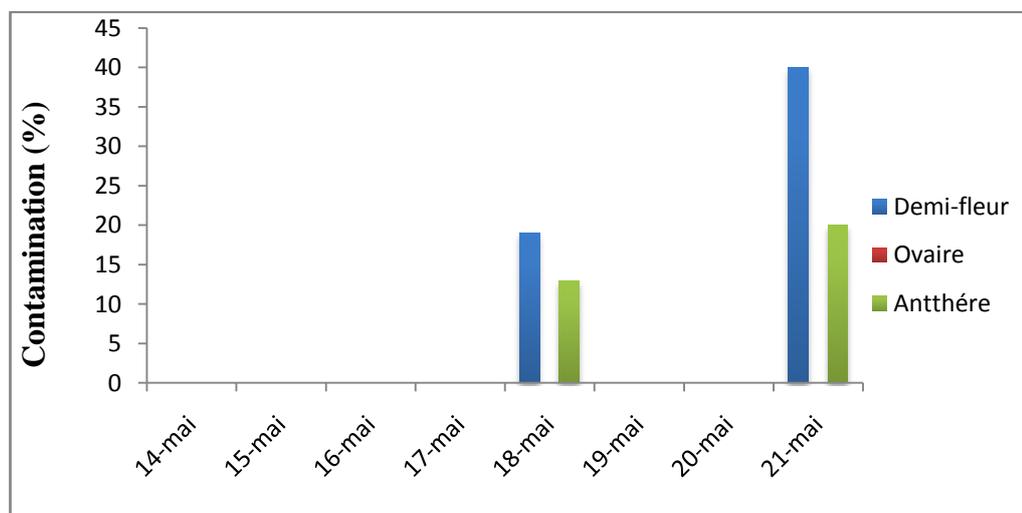
Les résultats de désinfection des explants pour chaque cépage sont illustrés dans les figures suivantes (31, 32 et 33).



**Figure31** : Taux de contamination du Cépage Amellal.



**Figure32** : Taux de contamination Du Cépage Bouani



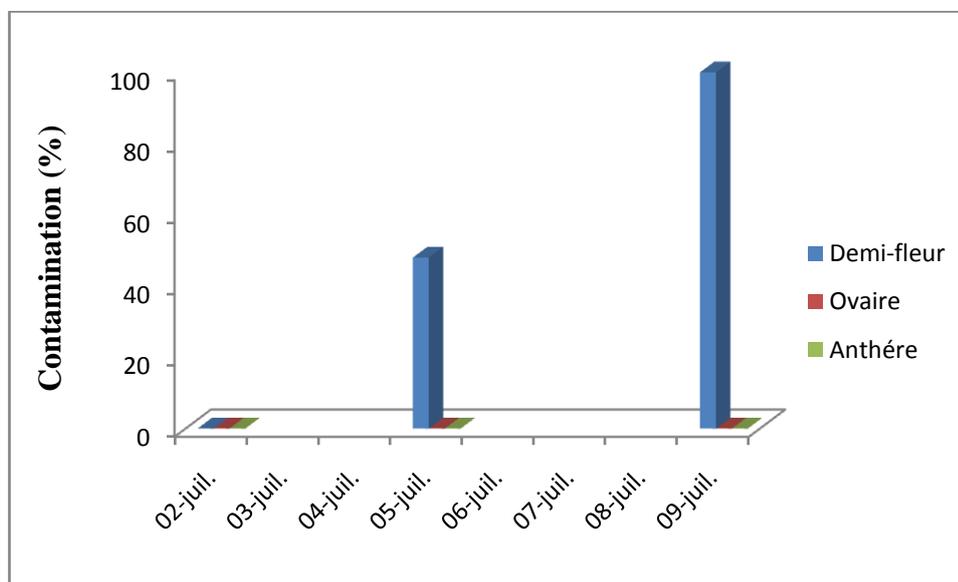
**Figure33** : Taux de contamination Du cépage Ahmar Bou Ameer

Pour la désinfection à base Chlorure de mercure  $HgCl_2$  (0.1g/l) pendant 10min pour les 3 cépages testés, le taux de contamination le plus élevé est enregistré pour les explants de demi-fleur avec respectivement 40% pour le cépage Ahmar Bou Aneur, 32% pour le cépage bouani et 26% pour le cépage Amellal.

Un taux de contamination nul (0%) a été observé pour les explants se l’ovaire du cépage Ahmar Bou Aneur.

### 2.3. 3<sup>ème</sup> essai de désinfection au chlorure de mercure (0.3g/l)

Nous avons tenté un 3<sup>ème</sup> essai de désinfection uniquement pour le cépage Ahmar Bou Aneur qui a montré une certaine résistance en augmentant la concentration de 0.1% 0.3% (figure34).



**Figure34 :** Taux de contamination du cépage Ahmar Bou Aneur.

Pour la désinfection à base d' $HgCl_2$  (0.3 g/l) pendant 10min montre un taux de contamination du cépage Ahmar Bou Aneur (100% pour la demi-fleur, 0% pour l’ovaire et l’anthère). Suite à ces résultats de désinfection ( $NaClO$  et  $HgCl_2$ ) nous remarquons que la méthode de désinfection la plus efficace est de  $HgCl_2$  à 0.3%. Le taux de contamination est lié à la durée des cultures, plus elle est longue plus la contamination est importante car 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, aboutissant à l’envahissement de la culture. Nous pouvons conclure que le génotype de cépage peut intervenir comme paramètre qui peut influencer le taux de contamination par ce que chaque génotype a des caractères spécifiques qui jouent le rôle de différenciation.

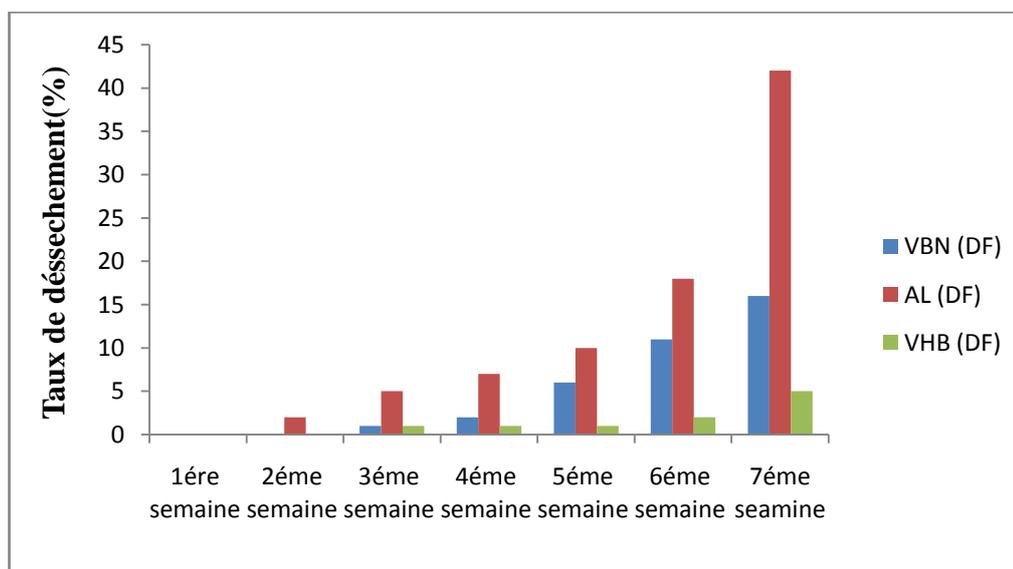
### 3. Taux de dessèchement

#### 3.1. Demi-fleur (DF)

Les résultats de dessèchement des explants pour chaque cépage sont illustrés dans la figure 35 et le tableau7.

**Tableau7** : Evaluation du taux de dessèchement en fonction de temps.  
(Explants de demi-fleur)

Temps	DF (AL)	DF (VBN)	DF(VHB)
1ère semaine	0	0	0
2ème semaine	0	2	0
3ème semaine	1	5	1
4ème semaine	2	7	1
5ème semaine	6	10	1
6ème semaine	11	18	2
7ème semaine	16	42	5



**Figure35** : Taux de dessèchement  
(Explants de demi-fleur)

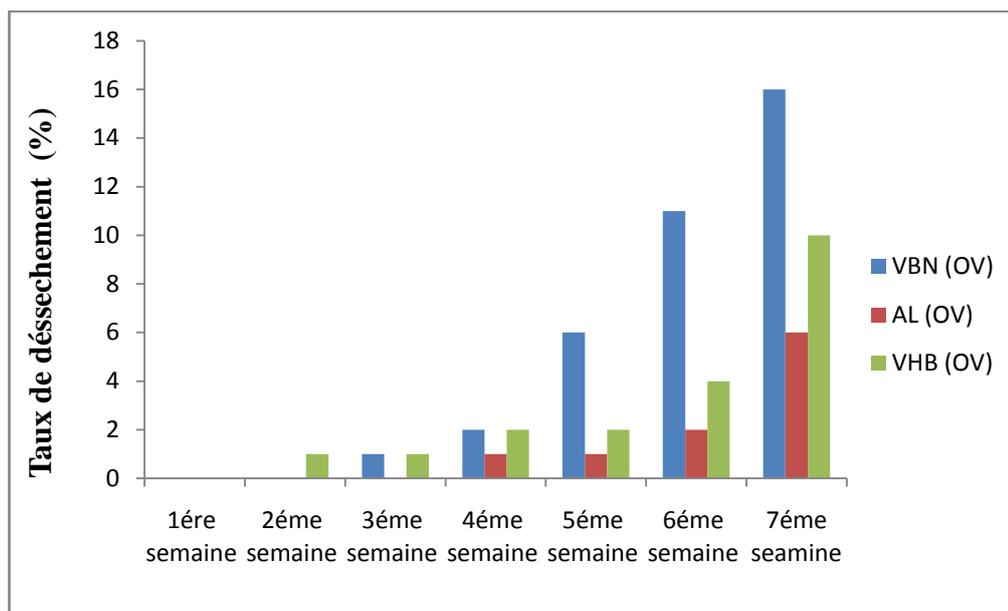
D'après la lecture des résultats représentés dans la **Figure35**, on observe un taux de dessèchement croissant de **2%** après 2 semaines de la mis en culture et il augmente après la 5<sup>ème</sup> semaine jusqu'à **10%** et continue cet accroissement jusqu'à **42%** après la 7<sup>ème</sup> semaine pour le cépage **Amellal (AL)**.

Pour le cépage **Bouani (VBN)**, nous avons observé un taux partiellement croissant démarrant à **1%** après la 4<sup>ème</sup> semaine de la mis en culture et il augmente jusqu'à **16%** après la 7<sup>ème</sup> semaine.

Le cépage **VHB** a présenté un faible taux de dessèchement de **1%** après la 2<sup>ème</sup> semaine de culture et reste stable jusqu'à la 5<sup>ème</sup> semaine, par la suite, il augmente pour atteindre les **5%** après la 7<sup>ème</sup> semaine.

### 3.2. Ovaire (OV)

Les résultats de dessèchement pour chaque cépage sont représentés dans la **Figure36** :



**Figure36** : Taux de dessèchement (Explants de l'ovaire).

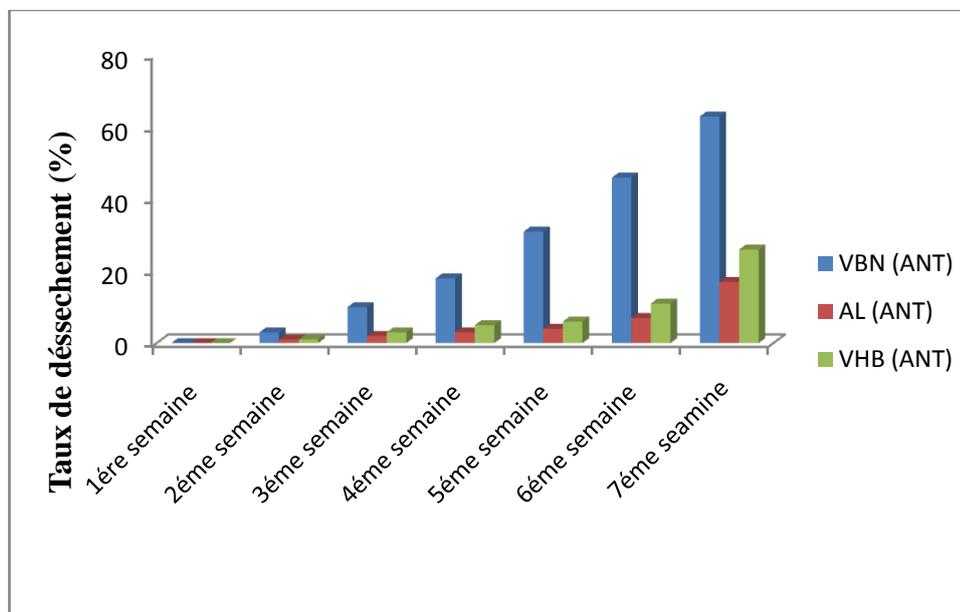
Les résultats du taux de dessèchement représentés dans l'histogramme montrent que le début de dessèchement des explants du cépage AL est déclenché après la 4<sup>ème</sup> semaine de la mise en culture des ovaires qui reste stable pour la 5<sup>ème</sup> semaine (1%), puis augmente à 2% pour atteindre les 6% après la 7<sup>ème</sup> semaine de la culture.

Pour le cépage VBN, on observe que le dessèchement des explants a démarré après 3 semaines de culture en donnant un taux de 1% qui augmente et atteint les 16% au 7<sup>ème</sup> semaine.

Les résultats montrent que le dessèchement du cépage VHB a commencé 3 semaines après la culture ou nous avons enregistré un faible taux de l'ordre de 1%, celui-ci ne cesse d'augmenter durant les semaines suivantes jusqu'à atteindre les 10% après la 7<sup>ème</sup> semaine de la mise en culture.

### 3.3. Anthère (ANT)

Les résultats de taux de dessèchement pour chaque cépage durant 3 mois sont représentés dans la **Figure37**.



**Figure37** : Taux de dessèchement  
(Explants de l'anthère).

Un taux de dessèchement des anthères élevé de 63% a été enregistré pour le cépage BOUANI suivi par un taux moyen de 26% pour le cépage Ahmar Bou Ameer. Le plus faible taux est observé pour le cépage AmellaL avec 17% à la 7<sup>ème</sup> semaine.

Nous pouvons conclure que l'augmentation du taux de dessèchement de l'explant est liée directement au temps, au génotype et à l'anatomie de l'explant ; Cependant, les anthères sont les explants les plus touchés parce qu'ils sont très sensibles, suivis par les boutons floraux et les ovaires.

## 4. Taux d'explants survécus

### 4.1. Cépage Amellal (AL)

#### 4.1.1. Mise en culture des explants

Après la mise en culture des explants des demi-fleurs, ovaires et anthères dans les milieux de base MS additionnés aux différentes balances hormonales testées, nous avons obtenu les résultats suivants (**Tableau8**).

**Tableau8** : Taux d'explants survécus fonction des milieux utilisés.  
(Demi-fleur ; Ovaire Anthère).

paramètre Milieux	Effectif	Taux d'explants survécus (%)		
		DF	OV	ANT
<b>MS0</b> Sans hormone	10	0	0	0
<b>MS1</b> 1ml BAP+1ml NOA	10	0	0	60
<b>MS2</b> 1ml BAP+2ml NOA	10	0	60	0
<b>MS3</b> 2ml BAP+2ml NOA	10	0	10	60
<b>MS4</b> 2ml BAP+4ml NOA	10	10	60	90
<b>MS5</b> 1ml BAP+1ml ANA	10	0	0	0
<b>MS6</b> 1ml BAP+2ml ANA	10	0	0	70
<b>MS7</b> 2ml BAP+2ml ANA	10	40	0	90
<b>MS8</b> 2ml BAP+4ml ANA	10	0	0	90

Il ressort du tableau10, que le pourcentage d'explants survécus du cépage Amellal varie selon la combinaison hormonale des milieux utilisés. L'utilisation du milieu sans hormones (MS0) n'a induit aucune formation de cals, malgré la richesse du milieu de base MS en sels minéraux, ceci pourrait être attribué à l'absence des hormones de croissance dans le milieu de culture.

Nous remarquons aussi que les explants d'anthères ont enregistré un taux important avoisinant les 90% comparés aux ovaires avec 70% et les demi-fleurs où le taux n'atteint que 40%).

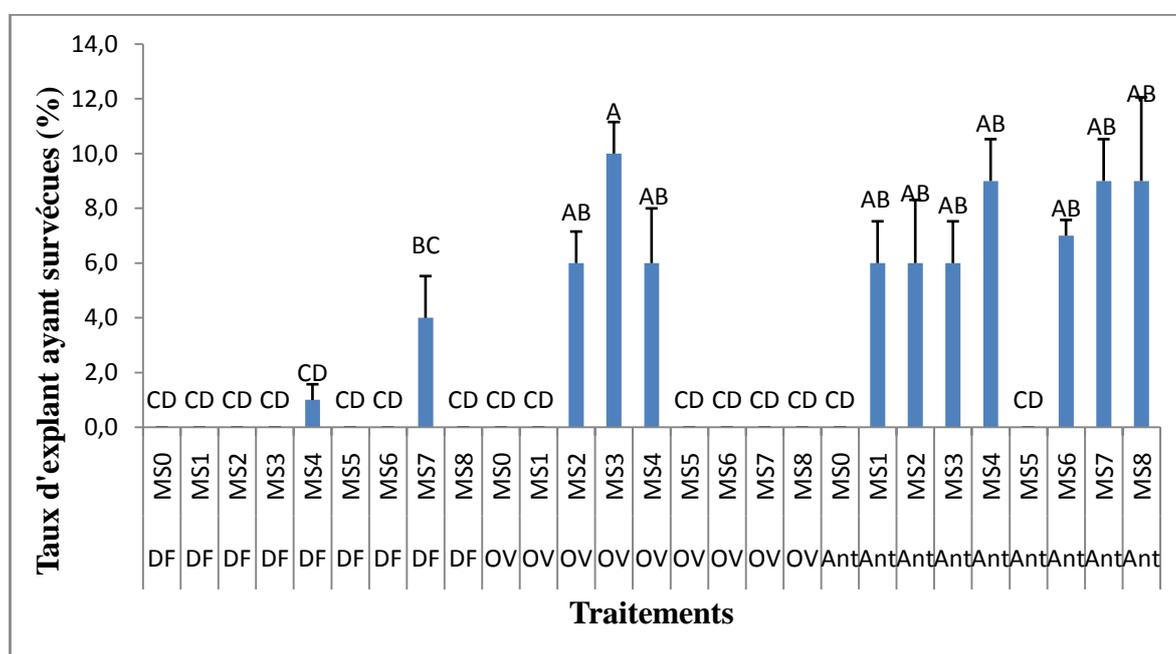
Le milieu MS5 additionné (1ml BAP+1ml ANA) n'a donné aucun résultat, en effet pour les 03 types d'explants testés le taux était nul.

L'effet de l'interaction (type d'explant x milieu) par le test ANOVA sur le pourcentage d'explants ayant survécus est très hautement significatif ( $P=0,00^*$ ), **Tableau9**.

**Tableau9** : Test ANOVA des explants ayant survécus.

	SC	Degr. de	MC	F	p
<b>Type d'explant</b>	377,5556	2	188,7778	50,4653	0,000000
<b>Milieu</b>	297,5556	8	37,1944	9,9431	0,000000
<b>Type d'explant*Milieu</b>	398,4444	16	24,9028	6,6572	0,000000
<b>Erreur</b>	202,0000	54	3,7407		

L'analyse descriptive de ces résultats par le test de Newman et Keuls au seuil de risque de 5% a donné les groupes homogènes (**Figure38**).

**Figure38** : Effet de l'interaction (explants x milieu).

Quatre groupes ont été obtenus (A ; AB ; BC et CD) dont un est individuel (A) qui comprend le traitement (ovaire (OV) x MS3), ce dernier enregistre un meilleur taux des explants ayant survécus avec 10%. Trois autres groupes chevauchants, AB contenant les traitements (ovaire (OV) x MS2) et (ovaire (OV) x MS4) et les traitements (anthère (ANT) x MS1, MS2, MS3, MS4, MS6, MS7 et MS8). Le deuxième groupe BC comprend le traitement (demi-fleur (DF) x MS7) avec un pourcentage légèrement moyen de 4%. Le troisième groupe CD comprenant (DF x MS3),(DF x MS4), (DF x MS5), (DF x MS6), (DF x MS8), (OV x MS0), (OV x MS1), (OV x MS5), (OV x MS6), (OV x MS7), (OV x MS8) et (ANT x MS0), (ANT x MS5), ce groupe a enregistré des résultats nuls (0%) à l'exception du traitement (DF x MS4).

Le plus faible taux a été enregistré par le traitement (DF x MS4) avec un pourcentage de 1% comparé au témoin.

## 4.2. Cépage Bouani (VBN)

### 4.2.1. Mise en culture des explants

Après la mise en culture des explants de demi-fleur, ovaire et anthère dans les milieux de base MS additionnés aux différentes balances hormonales testées, nous avons obtenu les résultats suivants (**Tableau10**).

**Tableau10** : Taux d'explants survécus en fonction des milieux utilisés.  
(Demi-fleur ; Ovaire Anthère)

paramètre Milieu	Effectif	Taux d'explants survécus (%)		
		DF	OV	ANT
<b>MS0</b> Sans hormone	10	0	0	0
<b>MS1</b> 1ml BAP+1ml NOA	10	0	70	0
<b>MS2</b> 1ml BAP+2ml NOA	10	0	100	0
<b>MS3</b> 2ml BAP+2ml NOA	10	30	100	0
<b>MS4</b> 2ml BAP+4ml NOA	10	0	80	0
<b>MS5</b> 1ml BAP+1ml ANA	10	0	60	0
<b>MS6</b> 1ml BAP+2ml ANA	10	0	70	0
<b>MS7</b> 2ml BAP+2ml ANA	10	0	0	0
<b>MS8</b> 2ml BAP+4ml ANA	10	0	80	80

Nous remarquons qu'il y'a une variabilité de réponses entre les trois types d'explants au sein du même milieu (**Tableau10**).

En effet, pour le même milieu MS3 le taux d'explants survécus est de 30% chez les demi-fleurs, 100% chez les ovaires et nul (0%) chez les anthères.

Nous remarquons aussi que l'ovaire a été plus réactif vis-à-vis de ce paramètre, comparé aux deux autres explants.

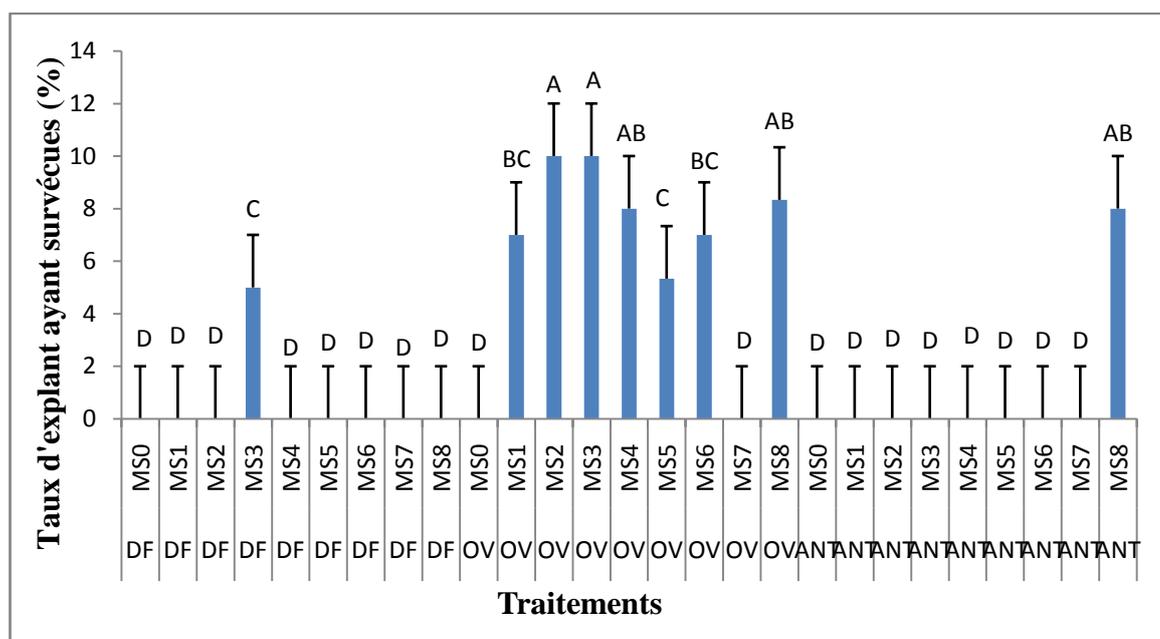
Pour mieux étudier cette différence, nous avons analysé ces résultats statistiquement.

L'analyse de la variance ANOVA montre un effet hautement significatif (**P=0,00\***) de l'interaction type d'explants x milieux sur le pourcentage d'explants ayant survécus (**Tableau11**).

**Tableau11** : Test ANOVA des explants ayant survécus.

	SS	Degr. De	MS	F	p
	523,9012	1	523,9012	446,6947	0,000000
<b>Type d'explant</b>	538,6914	2	269,3457	229,6526	0,000000
<b>Milieu</b>	258,3210	8	32,2901	27,5316	0,000000
<b>Type d'explant*Milieu</b>	325,7531	16	20,3596	17,3592	0,000000
<b>Errer</b>	63,3333	54	1,1728		

L'analyse descriptive de ces résultats par le test de Newman et Keuls au seuil de risque de 5% a donné les groupes homogènes (**Figure39**).



**Figure39** : Effet de l'interaction (explants x milieux).

En effet, le test de Newman et Keuls a permis de classer ces résultats en quatre groupes dont trois groupes individuels (A, C, D).

Le premier est nommé A contenant deux traitements (OV x MS2), (OV x MS3), en enregistrant le meilleur taux d'explants survivus de 10%, suivi par le groupe C contenant aussi deux traitements (DF x MS3), (OV x MS5) et le troisième groupe D qui regroupe tous les autres traitements restants.

Deux autres groupes chevauchants AB et BC dont le premier contenant les traitements (OV x MS8), (ANT x MS8), (OV x MS4). Le deuxième groupe comprend deux traitements (OV x MS1), (OV x MS4).

Le plus faible résultat a été donné par le traitement (DF x MS3) soit 5%, comparant aux traitements témoins qui ont présenté des résultats nuls. De même une grande partie des interactions ont donné des résultats nuls.

### 4.3. Cépage Ahmar Bou Ameer (VHB)

#### 4.3.1. mise en culture des explants

Après la mise en culture des explants de demi-fleur, ovaire et anthère dans les milieux de base MS additionnés aux différentes balances hormonales testées, nous avons obtenu les résultats suivants (**Tableau12**).

**Tableau12** : Taux d'explants survécus en fonction des milieux utilisés  
(Demi-fleur ; Ovaire Anthère).

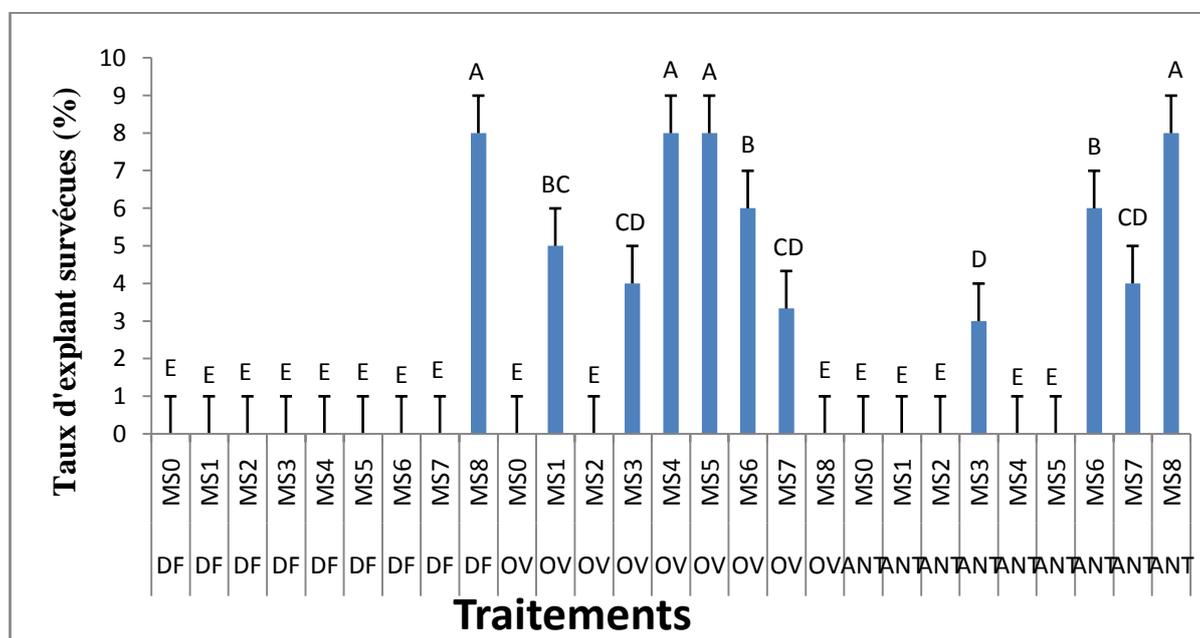
Milieu	paramètre	Effectif	Taux d'explants survécus (%)		
			DF	OV	ANT
	<b>MS0</b> Sans hormone	10	0	0	0
	<b>MS1</b> 1ml BAP+1ml NOA	10	0	50	0
	<b>MS2</b> 1ml BAP+2ml NOA	10	0	0	0
	<b>MS3</b> 2ml BAP+2ml NOA	10	30	40	30
	<b>MS4</b> 2ml BAP+4ml NOA	10	0	80	0
	<b>MS5</b> 1ml BAP+1ml ANA	10	0	70	0
	<b>MS6</b> 1ml BAP+2ml ANA	10	0	60	60
	<b>MS7</b> 2ml BAP+2ml ANA	10	0	10	40
	<b>MS8</b> 2ml BAP+4mlANA	10	80	0	80

D'après les résultats illustrés dans le **Tableau12**, nous remarquons qu'il ya une différence dans la réponse de trois types d'explants au sein du même milieu vis-à-vis du pourcentage ayant d'explants survécus. En effet pour le même milieu MS7 le taux d'explants survécus est de 40% chez les anthères, 10% chez les ovaires et nul (0%) chez les demi-fleurs. Nous remarquons aussi que le taux maximum d'explants survécus est de 80% et ce quelque soit le type d'explants utilisés, cependant l'ovaire et l'anthère ont été plus réactifs vis-à-vis le milieu, en comparant aux demi-fleurs. De même, l'ovaire est plus réactif que l'anthère. Pour mieux étudier cette différence, nous avons analysé ces résultats statistiquement. L'analyse de la variance ANOVA montre un effet très hautement significatif (**P=0,00\***), de l'interaction (types d'explants x milieux) sur le pourcentage d'explants ayant survécus. (**Tableau13**).

**Tableau13** : Test ANOVA des explants ayant survécus.

	SS	Degr. De	MS	F	p
	445,6790	1	445,6790	656,3636	0,00
<b>type d'explant</b>	115,5802	2	57,7901	85,1091	0,00
<b>milieu</b>	210,0988	8	26,2623	38,6773	0,00
<b>type d'explant*milieu</b>	443,9753	16	27,7485	40,8659	0,00
<b>Erreur</b>	36,6667	54	0,6790		

L'analyse descriptive de ces résultats par le test de Newman et Keuls au seuil de risque de 5% a donné les résultats illustrés dans la figure suivante :

**Figure40** : Effet de l'interaction (explants x milieux).

En effet, le test de Newman et Keuls a permis de classer ces résultats en quatre groupes homogènes distincts (A, B, D, E) et deux groupes chevauchants (BC, CD).

Le premier groupe A qui comprend les traitements (DF x MS8), (OV x MS4), (OV x MS5), (ANT x MS8) a enregistré le meilleur taux d'explants ayant survécus de 8%.

Le deuxième groupe B comporte deux traitements (OV x MS6), (ANT x MS6) avec un pourcentage de 6%, suivi du groupe D qui s'individualise par le traitement (ANT x MS3) avec un faible taux de 3% comparé aux explants témoins. Le groupe E qui englobe tous les traitements témoins et les autres traitements enregistre des taux nuls. Le groupe BC contenant le traitement (OV x MS1) avec un taux moyen de 5%.

Le deuxième groupe CD comprend les traitements (OV x MS3), (OV x MS7) et (ANT x MS7) avec un pourcentage légèrement moyen de 4%. Tous les traitements (ovaire x Milieux) ont été réactifs à l'exception du traitement (MS2) qui a présenté des résultats nuls.

## 5. Taux d'explants ayant formés des cals

### 5.1. Cépage Amellal (AL)

Après la mise en culture des explants de demi-fleur, ovaire et anthère dans les différentes balances hormonales utilisées, nous avons obtenu les résultats suivants (**Tableau14**).

**Tableau14** : Taux d'explants ayant formés des cals en fonction des milieux testés ((DF) Demi-fleur, (OV) Ovaire et (ANT) Anthère).

paramètre Milieu	Effectif	Taux d'explants ayant formés des cals		
		DF	OV	ANT
<b>MS0</b> Sans hormone	10	0	0	0
<b>MS1</b> 1ml BAP+1ml NOA	10	0	0	60
<b>MS2</b> 1ml BAP+2ml NOA	10	10	60	0
<b>MS3</b> 2ml BAP+2ml NOA	10	0	10	60
<b>MS4</b> 2ml BAP+4ml NOA	10	0	60	90
<b>MS5</b> 1ml BAP+1ml ANA	10	0	0	0
<b>MS6</b> 1ml BAP+2ml ANA	10	0	0	70
<b>MS7</b> 2ml BAP+2ml ANA	10	40	0	90
<b>MS8</b> 2ml BAP+4ml ANA	10	0	0	90

Après l'exploitation des résultats présentés dans le **Tableau14**, on observe pour les demi-fleurs un taux moyen avoisinant les 40% sur le milieu MS7 additionné à la balance (2ml BAP+2ml ANA), un faible taux d'explants de 10% au milieu MS2 additionné de (1ml BAP+2ml NOA), pour les autres milieux testés (témoin, MS1, MS3, MS4, MS5 et MS6) la formation des cals est nulle.

Concernant la culture d'ovaire, nous avons enregistré un meilleur pourcentage d'explants ayant formés des cals de 60% sur les milieux MS2, MS4, additionnés respectivement de (1ml BAP+ 2ml NOA) et (2ml BAP+ 4ml NOA). Les autres milieux ont enregistré des taux nuls comme pour le témoin (milieu dépourvu d'hormone).

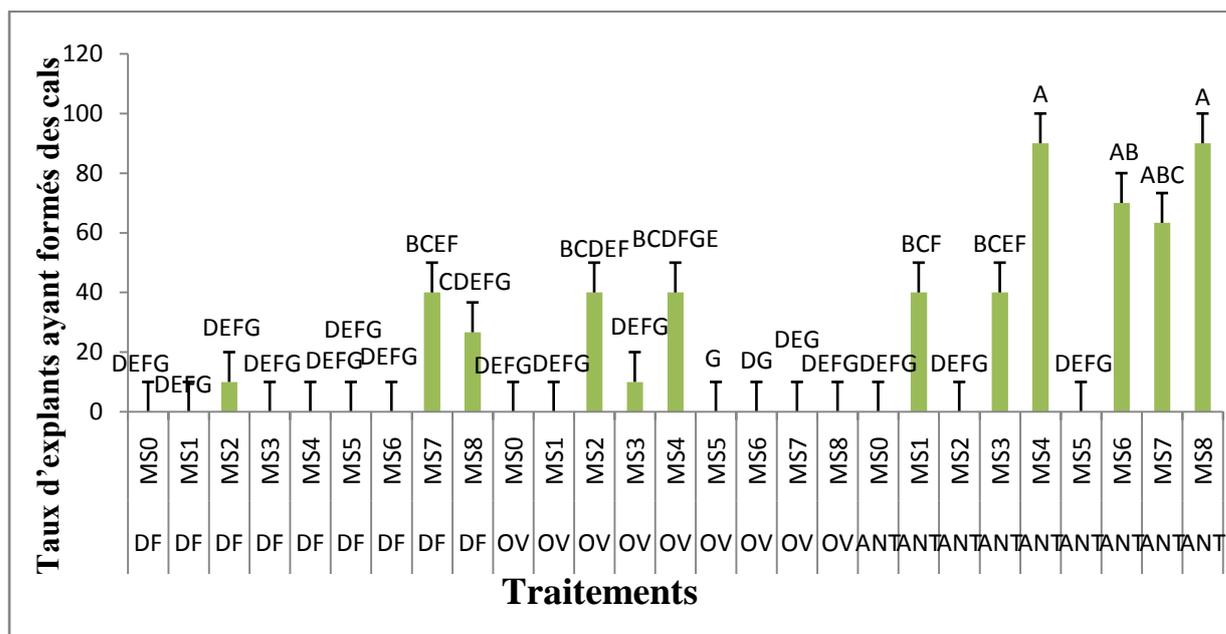
Nous observons pour la culture d'anthère, une meilleure réponse d'explants ayant formés des cals de 90% sur les milieux MS4, MS7 et MS8, suivi par MS6 avec 70%. Les milieux MS1, MS3 ont donné un pourcentage acceptable moyen de 60% avec les milieux MS2, MS5 et le témoin ou enregistre un pourcentage nul.

Une analyse statistique de l'ANOVA a révélé un effet hautement significative (**P=0,00\***, **Tableau15**) de l'effet de l'interaction type d'explants x milieux sur le % d'explants ayant formés des cals.

**Tableau15** : Test ANOVA des d'explants ayant formés des cals.

	SS	Degr. de	MS	F	p
	34844,44	1	34844,44	140,9720	0,000000
<b>Type d'explant</b>	21385,19	2	10692,59	43,2596	0,000000
<b>Milieu</b>	17844,44	8	2230,56	9,0243	0,000000
<b>Type d'explant*Milieu</b>	27992,59	16	1749,54	7,0782	0,000000
<b>Erreur</b>	13347,33	54	247,17		

Une analyse descriptive a été effectuée par le test de Newman et Keuls au seuil de risque de 5% en donnant les résultats illustrés dans la **Figure41**.



**Figure41** : Effet de l'interaction (explants x milieux)

Cépage Amellal.

En effet, le test de Newman et Keuls a permis de classer ces résultats en deux groupes homogènes distincts (A, G) et dix groupes chevauchants.

Le groupe (A) comporte les traitements (ANT x MS4) et (ANT x MS8), le deuxième groupe (G) comprend le traitement (OV x MS5). Le premier groupe chevauchant est CDEFG qui porte le traitement (DF x MS8).

Le deuxième groupe BCDEF qui est enregistré le traitement (OV x MS2) suivi par le groupe BCDFGE contient le traitement (OV x MS4), le groupe DEF qui porte le traitement (OV x MS7).

Le groupe DG qui enregistre le traitement (OV x MS6), le groupe BCF qui comprend le traitement (ANT x MS1), ensuite on a le groupe BCEF qui contient les deux traitements (DF x MS7) et (ANT x MS3).

le huitième groupe qui nommé AB aussi comprend le traitement (ANT x MS6), l'avant dernier groupe ABC qui porte le traitement (ANT x MS7) et le dernier groupe DEFG qui porte les traitements (DF x MS1), (DF x MS4), (OV x MS8) et les autres traitements restant.

## 5.2. Cépage Bouani

Après la mise en culture des explants de demi-fleur, ovaire et anthère dans les différentes balances hormonales utilisées, nous avons obtenu les résultats illustrés dans le **Tableau16**.

**Tableau16** : Taux d'explants ayant formés des cals en fonction des milieux testés (Demi-fleur ; Ovaire Anthère).

paramètre Milieu	Effectif	Taux d'explants ayant formés des cals		
		DF	OV	ANT
<b>MS0</b> Sans hormone	10	0	0	0
<b>MS1</b> 1ml BAP+1ml NOA	10	0	70	0
<b>MS2</b> 1ml BAP+2ml NOA	10	0	100	0
<b>MS3</b> 2ml BAP+2ml NOA	10	60	100	0
<b>MS4</b> 2ml BAP+4ml NOA	10	0	80	0
<b>MS5</b> 1ml BAP+1ml ANA	10	0	60	0
<b>MS6</b> 1ml BAP+2ml ANA	10	0	70	0
<b>MS7</b> 2ml BAP+2ml ANA	10	0	0	0
<b>MS8</b> 2ml BAP+4ml ANA	10	0	80	80

Nous observons à travers ce tableau un pourcentage plus ou moins élevé d'explants ayant formés des cals de (60%) sur le milieu MS3 additionnée de (2ml BAP et 2ml NOA). le taux est nul pour les autres milieux et le milieu témoin (MS0).

Concernant la culture d'ovaire, nous avons enregistré un forte pourcentage d'explants ayant formés des cals de 100% sur les milieux MS2, MS3, additionnés respectivement de (1ml BAP+ 2ml NOA) et (2ml BAP+ 2ml NOA).

Un taux de 80% sur le milieu MS8, et un pourcentage de 70% sur les milieux MS1, MS6 additionnés respectivement (1ml BAP+1ml NOA), (1ml BAP+2ml ANA).

Le milieu MS5 a enregistré un pourcentage d'explants ayant formés des cals de 60%. Les autres milieux (MS0, MS4, MS5) ont enregistré des taux nuls.

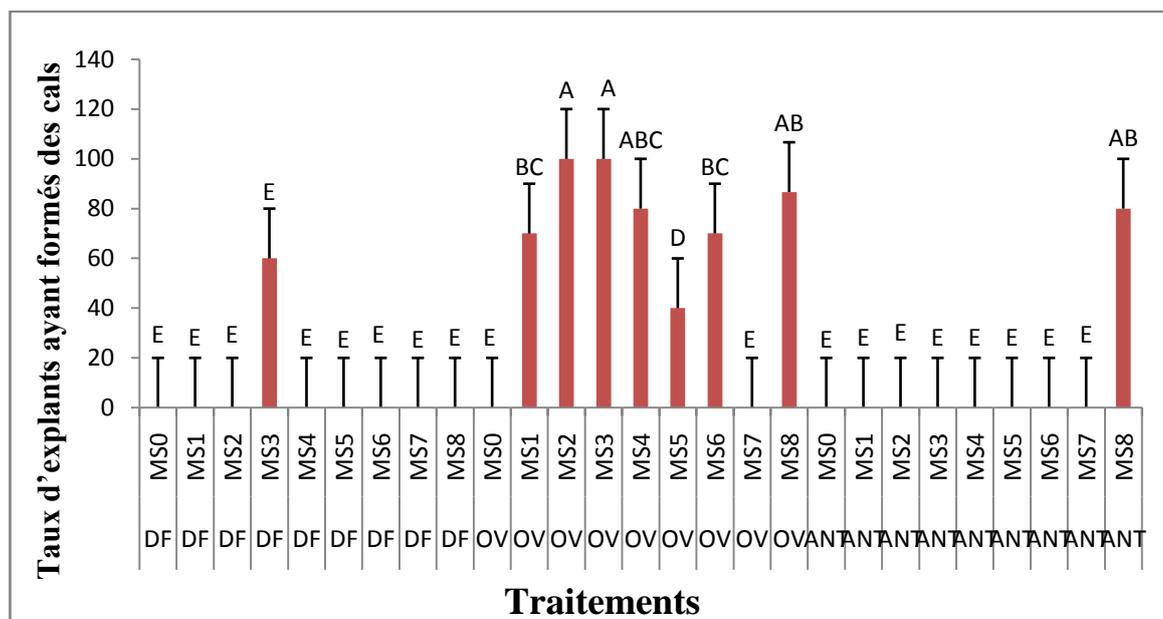
Nous observons pour la culture d'anthère, une meilleure réponse d'explants ayant formés des cals de 80% uniquement sur le milieu MS8 additionnée de (2ml BAP+4ml ANA). Les autres milieux présentent un taux nuls (0%) notamment les milieux MS1, MS2, MS3, MS4, MS5, MS6, MS7 et le témoin.

Une analyse statistique confirme ces résultats, en effet le test ANOVA a révélé un effet hautement significative ( $P=0,00^*$ , **Tableau17**) de l'effet de l'interaction (type d'explant x milieu) sur le % d'explants ayant formés des cals.

**Tableau17** : Test ANOVA des d'explants ayant formés des cals.

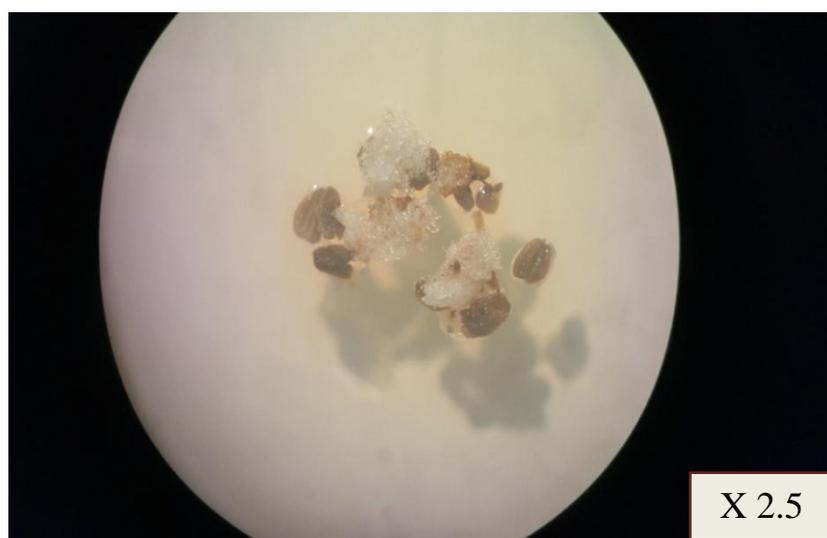
	SS	Degr. de	MS	F	P
	52390,12	1	52390,12	466,3297	0,000000
<b>type d'explants</b>	50558,02	2	25279,01	225,0110	0,000000
<b>milieu</b>	28787,65	8	3598,46	32,0302	0,000000
<b>type d'explants*milieu</b>	34197,53	16	2137,35	19,0247	0,000000
<b>Error</b>	6066,67	54	112,35		

Une analyse descriptive a été effectuée par le test de Newman et Keuls au seuil de risque de 5% en donnant les résultats illustrés dans la **Figure42** :



**Figure42** : Effet de l'interaction (explants x milieux) .

Le test de Newman et Keuls a classé ces résultats en trois groupes homogènes A, D et E, le premier groupe A qui comprend les traitements (OV x MS2), (OV x MS3), le deuxième groupe D qui porte le traitement (OV x MS5) et le troisième groupe E qui regroupe les traitements (DF x MS1), (OV x MS7) et les autres traitements restants. Trois groupes chevauchants, le groupe AB qui porte les traitements (OV x MS8), (ANT x MS8) suivi par le groupe ABC qui regroupe le traitement (OV x MS4).le troisième groupe BC qui comprend les deux traitements respectivement de (OV X MS1) et (OV x MS6).



**Figure43** : Cals produits par les anthères du cépage VBN, cultivés sur le milieu MS5.

### 5.3. Cépage Ahmar Bou Ameer (VHB)

Après la mise en culture des explants de demi-fleur, ovaire et anthère dans les différentes balances hormonales utilisées, nous avons obtenu les résultats illustrés dans le **Tableau18**.

**Tableau18** : Taux d'explants ayant formés des cals en fonction des milieux testés (Demi-fleur ; Ovaire Anthère).

paramètre Milieu	Effectif	Taux d'explants ayant formés des cals		
		DF	OV	ANT
<b>MS0</b> Sans hormone	10	0	0	0
<b>MS1</b> 1ml BAP+1ml NOA	10	0	50	0
<b>MS2</b> 1ml BAP+2ml NOA	10	0	0	0
<b>MS3</b> 2ml BAP+2ml NOA	10	0	40	30
<b>MS4</b> 2ml BAP+4ml NOA	10	0	80	0
<b>MS5</b> 1ml BAP+1ml ANA	10	0	70	0
<b>MS6</b> 1ml BAP+2ml ANA	10	0	60	60
<b>MS7</b> 2ml BAP+2ml ANA	10	0	10	40
<b>MS8</b> 2ml BAP+4ml ANA	10	80	0	80

Nous remarquons par rapport à la culture de demi-fleurs un meilleur pourcentage d'explants ayant formés des cals de 80% sur le milieu MS8. On observe un taux nul pour les autres milieux additionnés aux autres balances hormonales testés.

La culture des ovaires enregistre un taux très élevé de 80% sur le milieu (MS4) additionnée à (2ml BAP+4ml NOA).

Un pourcentage d'explants ayant formés des calcs plus ou moins élevé est observé sur les milieux MS5, MS6, MS1 et MS3 respectivement avec 70%, 60%, 50%, 40%. Un taux faible de 10% a été enregistré sur le milieu MS7 et nul pour les milieux MS2, MS8 et le témoin.

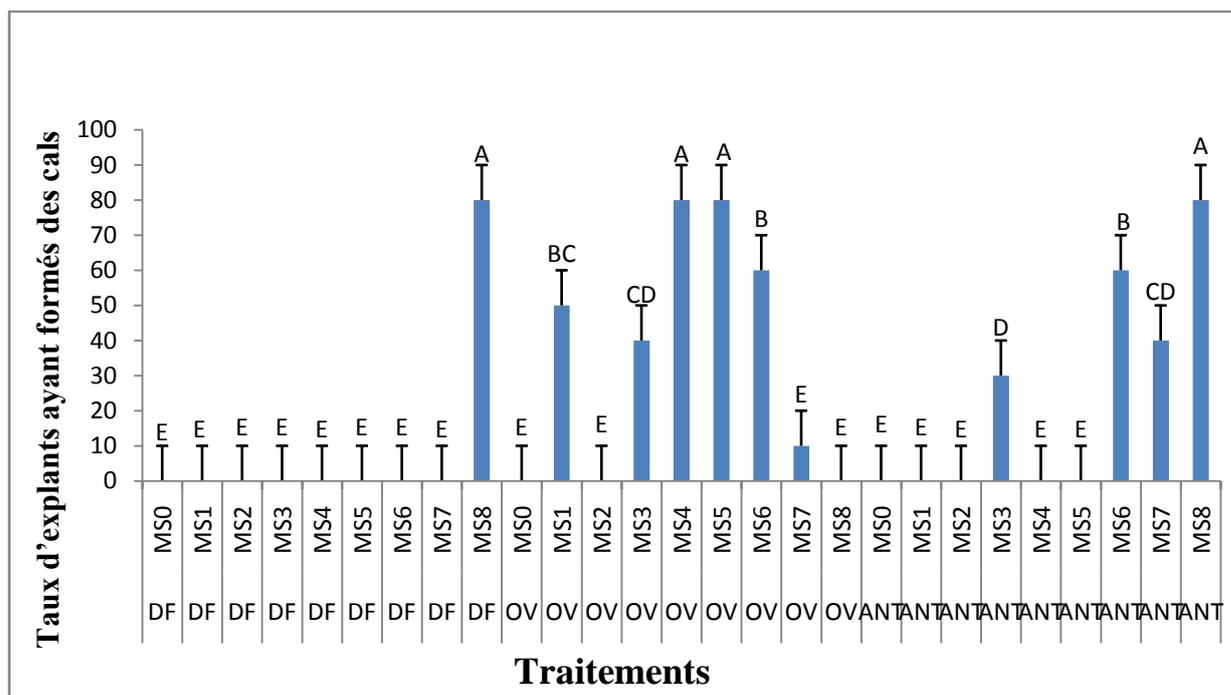
Concernant la culture des anthères, les résultats montrent un meilleur taux de 80% observé sur le milieu MS8 suivi par un pourcentage plus ou moins élevé de 60% localisé sur le milieu MS6. Un enregistre un taux de 40% sur le milieu MS7 additionné au balance (2ml BAP+2ml ANA). Un taux relativement faible de 30% sur le milieu MS3. Les autres milieux MS0, MS1, MS2, MS4 et MS5 présentent des taux nuls.

L'ANOVA a révélé une différence très hautement significative ( $P= 0,00*$ , **Tableau19**) de l'interaction (explants x milieux) sur ce paramètre.

**Tableau19** : Test ANOVA des d'explants ayant formés des calcs.

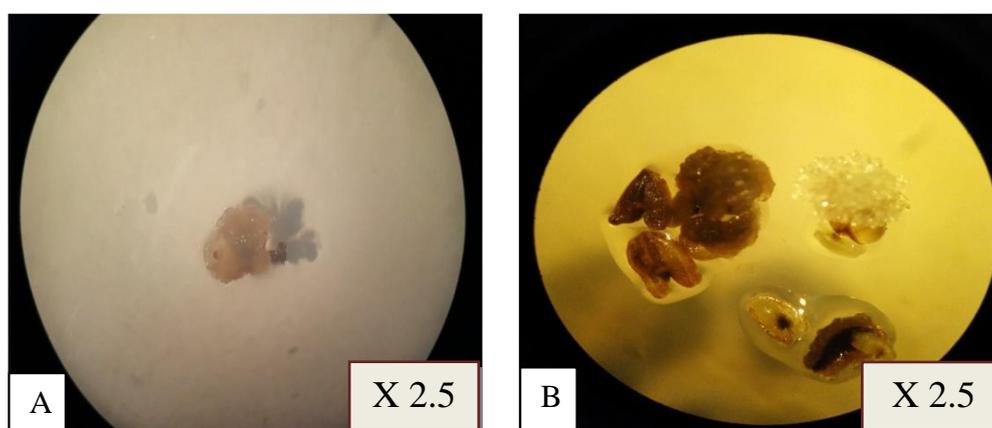
	SS	Degr. de	MS	F	P
	41344,44	1	41344,44	619,8223	0,000000
<b>type d'explant</b>	9622,22	2	4811,11	72,1266	0,000000
<b>milieu</b>	21355,56	8	2669,44	40,0194	0,000000
<b>type d'explant*milieu</b>	46177,78	16	2886,11	43,2676	0,000000
<b>Erreur</b>	3602,00	54	66,70		

Une analyse descriptive a été effectuée par le test de Newman et Keuls au seuil de risque de 5% en donnant les résultats illustrés dans la figure suivante :



**Figure44** : Effet de l'interaction (explants x milieux).

Le test de Newman et Keuls nous a permis de classer ces résultats en quatre groupes homogènes (A, B, D et E). Le groupe (A) comportant les traitements (DF x MS8), (OV x MS4), (OV x MS5) et (ANT x MS8). Le groupe (B) on comprend respectivement les deux traitements (OV x MS6) et (ANT x MS6) suivi par le groupe D qui contient un seul traitement (ANT x MS3). Le dernier groupe E qui porte les traitements (OV x MS7), (DF x MS5), (OV x MS2), (ANT x MS4) et les autres traitements restants. Deux groupes chevauchants, le premier BC qui enregistré le traitement (OV x MS1), le deuxième groupe CD qui comprend le traitement (OV x MS3) et le traitement (ANT x MS7).

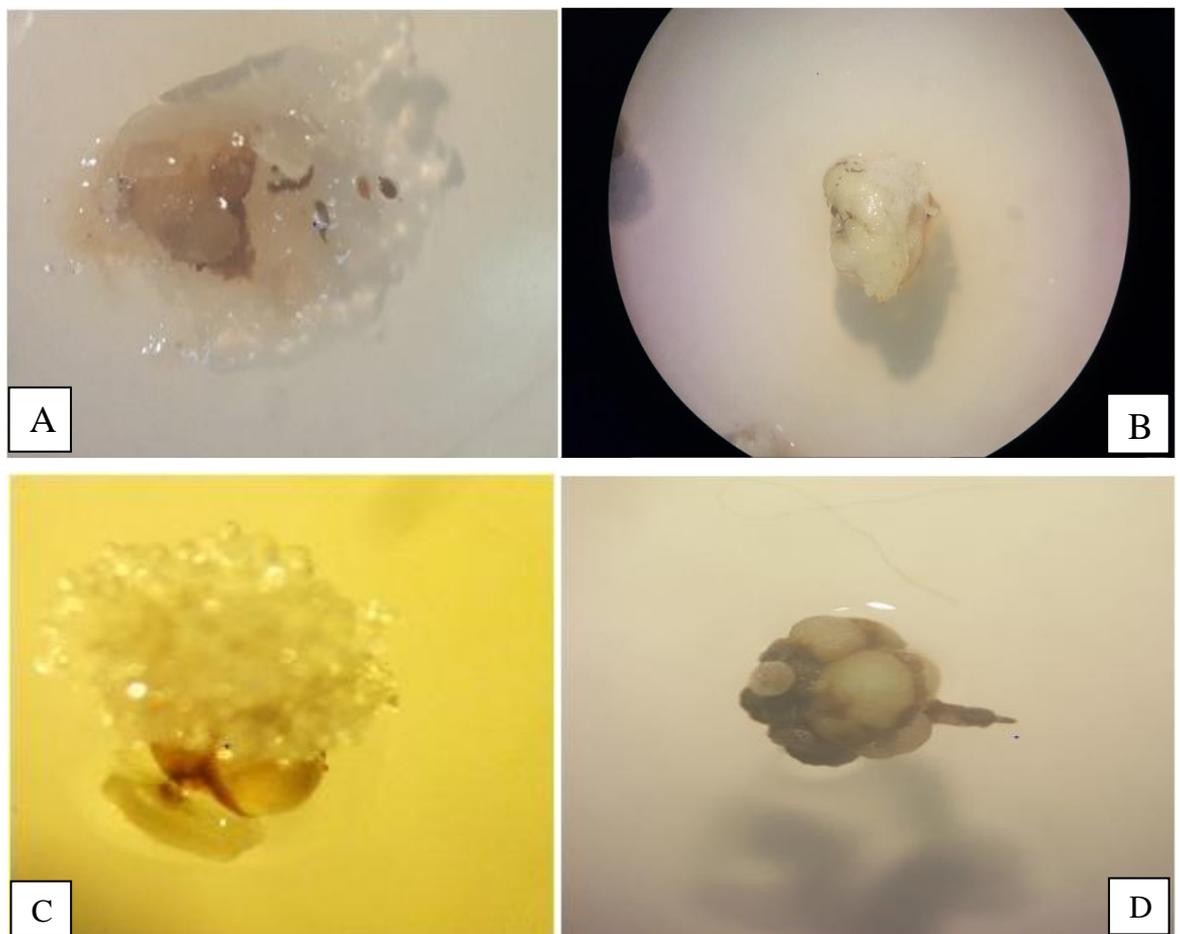


**Figure45** : Aspect de cals issues sur le milieu MS3 (VHB anthère **A**) et (VBN anthère **B**).

## 6. Couleur et aspect qualitatif des cals

Des cals de couleur et d'aspect variés ont été formés à partir de 3 mois. Après l'initiation de la culture, nous avons observé que les cals formées à partir de la culture d'anthères du cépage Ahmar Bou Ameer étaient blancs d'aspect translucide et friable comparant à ceux formées à partir des ovaires et des demi-fleurs qui sont légèrement verts et compacts (A et B).

Des amas callogènes ont été formés sur toute la partie végétale de l'explant (C). Alors que chez d'autres (Demi-fleurs, Ovaire) la formation des cals n'est produite que sur une partie de l'explant (D).



**Figure46:** Cals issues sur le milieu MS4 du cépage **VHB**. A, C : anthère, B, D : ovaire.

## 7. Discussion

Au cours de l'expérience nous avons remarqué l'absence de la contamination de milieu de culture grasse à l'utilisation d'antibiotique au cours de la préparation de milieu.

**RETAUDEAU (2006)**, montre que l'utilisation d'antibiotique au cours de la préparation de milieu peut éliminer la prolifération des germes fongique et les clones bactériennes.

D'après nos résultats obtenus, le stérilisant de l'hypochlorite de sodium, a donné un taux de contamination  $\pm$  faible pour les trois explants du cépage Bouani respectivement (17.72%, 5.06% et 0%) et moyenne pour le cépage Amellal (35,44%, 1.89% et 1.26%).

Selon **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 le dessèchement des tissus mise en culture *in vitro*.

Les résultats enregistrés au cours de notre expérimentation montrent un taux de dessèchement élevé des cultures de demi-fleurs de trois cépages testés AL, VBN et VHB respectivement avec (23.33%, 8.88% et 2.77%) comparés à la culture d'ovaires pour les mêmes cépages où les résultats sont plus probants avec respectivement (3.33%, 8.88% et 5.55%).

La culture des anthères des cépages Amellal et VHB présentent un faible taux de dessèchement avec respectivement de 9.44 et 14.44%. Le cépage VBN a enregistré un taux de dessèchement moyen de 35%.

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

La supériorité des anthères concernant la survie des explants, montre l'effet du type d'explant utilisé.

Ces résultats ne confirment pas ceux de **MARGARA (1989)**, montre que l'explant de l'anthère est plus réactif et acceptable à la formation des cals ou le phénomène de la calogénèse.

L'initiation à la callogénèse a été observée chez les deux cépages Amellal et Ahmar Bou **Ameur** après 3 semaines de la mise en culture des explants. La formation des cals a débuté d'abord au niveau des explants anthères suivie par les ovaires puis les demi-fleurs.

Contrairement au cépage Bouani, la néoformation des cals été observée après 5 semaines de la culture, ce qui nous permet de conclure que les espèces n'ont pas réagit de la même manière dans les mêmes milieux de culture nous pouvons déduire qu'il y'a un effet du génotype.

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 contrôlé (**GEORGE ET SHERRINGTON, 1984 ; BROWN, (1988) ; DODEMAN et al., 1997**).

Nos résultats confirment ceux de **MARTIN, (1980)** qui a signalé, qu'un milieu favorable à une espèce ne convient pas forcément à une autre même très voisine. Il peut avoir également des différences considérables de repos entre les cépages au sein d'une même espèce.

Le milieu témoin sans hormones (MS0) n'a pas favorisé la formation des cals chez les trois cépages testés, ces résultats confirment ceux de **CARIMI et al., 2005** qui soulignent que le milieu sans hormones n'entraîne pas la formation des cals .

Le nombre d'explants ayant formés des cals était plus important pour les anthères chez les trois cépages testés Amellal , Bouani et Ahmar Bou Ameer respectivement avec des taux de 57.8, 10 et 26.25%.

**LOPEZ-PERZ et al., 2005**, signalent que les anthères sont les explants les plus réactifs à l'induction calogène comparant aux autres explants (demi-fleur et ovaire).

Notons que les explants d'ovaires ont présenté un taux d'explants ayant formés des cals très élevé de 70% pour VBN, 38.75% pour VHB et 16.25% pour AL.

Les explants de demi-fleurs ont révélé le plus faible taux calogène pour les trois cépages de 10% pour VHB contre 7.5% pour VBN et 6.25% pour le cépage AL.

Nos résultats confirment ceux de **CARIMI (2005)** où il souligne que la capacité de callogène est liée directement à la qualité et la nature d'explants.

Généralement dans les cultures *in vitro*, les auteurs privilégient 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 [**DALVESCOT et GUERRAP, 2001 ; SAADI, 1991**].

Les aptitudes à la callogénèse varient en fonction de nombreux paramètres comme la nature et l'âge des explants, la composition hormonale des milieux de culture, la source carbonée et le génotype [ZRYD, 1988 ; MARGARA., 1989 ; HOPKINS, 2003].

Nous avons obtenu les meilleurs taux de calogénèse dans le milieu MS avec huit balances hormonales. La meilleure réponse (18.75%) a été enregistré par le milieu MS3 avec la balance (2ml BAP+2ml NOA) et ce pour les trois explants testés, suivie de MS8 (2ml BAP+2ml ANA) avec un taux de 14.58%. Le milieu MS6 additionné de (1ml BAP et 2ml ANA) a montré le taux le plus faible avec 10.83%.

DALVESCO *et al.*, (2001) montrent que le milieu MS est un milieu favorable à l'induction de l'embryogénèse somatique.

Les concentrations de la **BAP** utilisées dans cette étude sont comparables à celles utilisées dans des études antérieures chez d'autres génotypes de vigne, sans toutefois faire état de problèmes particuliers (MONETTE, 1986 ; MARTINEZ *et* TIZIO, 1989).

En outre, ces résultats ne sont pas similaires à ceux obtenus par GEORGE, (1996), ou il souligne que le dépérissement et la vitrification pourraient être attribués à la réaction du matériel végétal à des teneurs élevés de la **BAP** dans le milieu de culture.

Les hormones de croissance de part leur qualité et leur quantité influent fortement le processus de la callogenèse. Cette réalité est connue depuis longtemps [ZRYD, 1988 ; MARGARA, 1989].

El YACOUBI *et al.*, (2010), montrent que le rapport entre ces deux régulateurs de croissance change en fonction de plusieurs paramètres comme l'espèce végétale étudiée, la nature des explants employés et la composition des milieux de base.

Les résultats obtenus lors de cette étude corroborent avec ceux de DEL VESCO *et* GUERRA, (2001) qui ont mentionné que le milieu de Murashige et Skoog, (1962) est très favorable à l'induction de la callogénèse.

De même, ces mêmes auteurs signalent que ce milieu est caractérisé principalement par une très forte teneur en sels minéraux, en particulier en potassium et par une concentration également élevée en azote sous forme de nitrate et d'ammonium favorisant ainsi l'induction callogène.

**BRHADDA *et al* (2003)**, signale également que l'effet d'un milieu de culture résulte de l'ensemble des interactions des différents éléments qui le composent.

Certains d'entre eux stimulent les processus du développement *in vitro*, d'autres, par contre, ont peu d'influence sur la formation des cals [**THORPE, (1980) ; RUGINI, (1986) ; GRIGORIADOU *et al.*, (2002)**].

Le but de notre expérimentation est de rechercher la balance hormonale favorable pour la formation calogène de la vigne, ce recherche nos permet de mis en culture des déférentes types d'explants additionnée a des balances hormonales variée pour obtenu meilleur réponse au phénomène de calogènèse.

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

En culture *in vitro*, la maitrise de la technique, demande surtout la maitrise 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 meilleur 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 puis le rinçage avec l'eau distillée et aussi la désinfection a basse de chlorure de mercure (0.1g/l) donne des résultats moins efficace il faut le prendre en considération.

Le taux de contamination et dessèchement est un facteur limitent qui va contrôler et influencé le pourcentage d'explant survécus, ils réduite le taux d'explant survécus calé (les explants qui vent formé des cals) à cause de la contamination (bactérie, champignon) au la sécrétion de phénol au cours de la durée d'expérience. Aussi le génotype de cépage joue un rôle très important dans le phénomène de calogène, c'est lui qui va identifier la réponse du déférent type d'explant testé.

Après 3 semaines de la mise en culture de différents types d'explants (demi-fleurs, ovaires et anthère) dans le milieu MURASHIGE et SKOOG MS (1962) avec différentes balances hormonales, nous avons constaté que :

- Le cépage AL présente un faible pourcentage d'explants survécus de 3.12% après la mis en culture les demi-fleurs suivi par un pourcentage de 8.12% pour l'ovaire et un taux moyen de 28.75% pour la culture d'anthère.
- Le cépage VBN à présente un faible taux d'explant survécus de 1.87%, 5% dans les cultures respectivement (demi-fleur, anthère), un pourcentage moyenne de 35% dans la culture d'ovaire.

- Le cépage VHB montre un pourcentage de 19.37%, 13.12% respectivement à la culture (ovaire, anthère) et un faible taux d'explants survécus de 5% à la culture de demi-fleur.

Concernant L'induction de la calogénèse chez les trois cépages autochtones de *vitis venifera* L. nous avons enregistré les réponses suivant :

- La mis en culture des demi-fleurs du cépage AL à induit un meilleur taux d'explants survécus calogènes de 40% au milieu MS7 additionné au balance hormonale (2ml BAP + 2ml ANA), la culture d'ovaire présente une réponse de 40% au milieu MS4 additionné au balance (2ml BAP + 4ml NOA). Pour la culture des anthères enregistre un meilleur pourcentage calogène de 90% dans le milieu MS4 additionné au balance (2ml BAP + 4ml NOA) suivi par taux de 40% au milieu MS3 additionné respectivement de (2ml BAP + 2ml NOA).
- L'induction de la calogénèse chez le cépage Bouani donne une meilleur réponse de 60% au milieu MS3 additionné à la balance (2ml BAP + 2ml NOA) pour la culture de demi-fleur, un excellent pourcentage d'explants survécus calés de 100%, 80% dans les milieux MS2, MS3, MS4 additionnés au balances respectivement de (1ml BAP + 2ml NOA, 2ml BAP + 2ml NOA et 2ml BAP + 4ml NOA ), concernant la culture d'anthère en remarque une réponse efficace de 80% au milieu MS8 additionné au balance (2ml BAP +4 ml ANA).

Pour la mis en culture des trois type explants chez le cépage VHB en obtient les résultats suivants :

- Un meilleur taux d'explants survécus calés de 80% à été enregistré dans le milieu MS8 additionné au balance (2ml BAP +4 ml ANA) à la culture de demi-fleur, pour la culture d'ovaire en obtient un pourcentage très élevé de 80% aux milieux MS4, MS5 additionnés respectivement au balance (2ml BAP +4 ml NOA) et (1ml BAP +1ml ANA).
- Concernant la culture d'anthère on observe une meilleure induction calogène de 80% au milieu MS8 additionné au balance (2ml BAP +4 ml ANA).

L'explant le plus réactif ou qu'il à la capacité de l'induction de la calogènese est l'anthère, **LOEZ-PERZ AJ. et al., 2005**, signale que les anthères sont les explants les plus réactifs à l'induction calogène comparant aux d'autre explants.

Lorsque en faire une comparaison entre les cépages testés, on conclure que le cépage VBN est le plus réactif al l'induction calogènes par un pourcentage de 13.95% suivi par le deuxième cépage AL qui présente un taux de calogène de 13.33% puis le cépage VHB qui enregistré u pourcentage de 12.49% au phénomène du calogènese.

Notons par ailleurs, que les résultats négatifs enregistrés, lors de cette étude, ne peuvent pas être expliqué uniquement par l'effet milieu de culture ou de la nature des explants. Nous estimons qu'ils sont dans notre cas, dus beaucoup plus aux conditions de culture qui n'étaient pas favorables, surtout au niveau de la récolte de matériels végétales et la désinfections. En effet, le matériel ramoné de champ est plain de germe fongique et des clones bactériens, qui sont pratiquement déficèle a détruirez soit a la l'extérieure ou l'intérieure de l'explant.

**AGENIS-NEVERS M., 2006.** Impacts du changement climatique sur les activités agrumes. Transfert de technologie en agriculture N°109, pp 1-4.

**ALLEWELDT, G. and POSSINGHAM, J.V.(1988).** Progress in grapevine breeding Theoretical and Applied Genetics 75: 669-673.

**ANNONYME1 : TECHNIVIT Laboratoire.**2016., 6, rue des Vertus 18000 BOURGES (33) tlp : 248.65.02.99 **site:Plantessin vitro@Technivit.com**(25 mai 2017, 16 :35)

**ANNONYME2 : THE ANGIOSPERM PHYLOGENY GROUP. 2009.** An update of the angiosperm phylogeny group classification for the orders and families of flowering plants: Apg iii. *Botanical Journal of the Linnean Society* **161**(2): 105-121..

**ARNOLD, S. (VON) ; HAKMAN, I.** Regulation of somatic embryo development in *Picea abies* by abscisic acid (ABA). *Journal of plant physiology*, 1 988, Vol 132, N°2, p 164-169

**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

**Augé, R., Beauchesne, G., Boccon-Gibord, J., Decourtye, L., Digat, B., Jalouzot, R., Minier, R., Morand, J-CL., Reyoin, J.P., et Strullu, D.G. (1989).** la culture in vitro et ses application horticoles. 3ème édition revue, corrigée et augmentée. ED. Tee et Doc Lavoisier 225p.

**BAJAJ Y.S.P. ,1987.**Biotechnologie in agriculture and .forestry .in amélioration des espèces cultivées .A.Gallais et Bernneret ,1992.pp225.

**BARTELS A., 1998.** Guide des plantes de bassin méditerranéen. 354p.

**BLOUIN J., 2005.** Les parasites de la vigne. Stratégie de protection raisonnée.

**BOCCON-GIBOD J. , JALOUZOT R., 1989.** Les biotechnologies en horticulture, possibilités et perspectives. In La Culture *in Vitro* et ses applications horticoles. Augé R., Beauuchene G., Boccon-Gibod J., Decourtye L., Digat B., Jalouzot R., Minier R., Moran,d J CL., Reynoird JP., Strullu DG., Vidalie H., 1989. ed JB Baillièrè pp 91-131.

## Références bibliographiques

---

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

**BOURGKARD, F. ; FAVRE, J. M.** Somatic embryos from callus of *Sequoia sempervirens*. *Plant cell reports*, 1988, Vol 7, N° 6, p 445-448. PA BIO

**BOURSIQUOT JM, THIS P. 1996.** Les nouvelles techniques utilisées en ampélographie: Informatique et marquage. *J Int Sci Vigne Vin Special issue*: 12-23.

**BOWERS JE, BOURSIQUOT JM, THIS P, CHU K, JOHANSSON H, MEREDITH CP. 1999.** Historical genetics: The parentage of chardonnay, gamay, and other wine grapes of northeastern france. *Science* **285**: 1562-1565.

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

**BRETAUDEAU J., FAURE Y., 1990.** Atlas d'arboriculture fruitière. Vol 4. Edition.

**BRHADDA N, ABOUSALIM A , WALALI LOUDIYI D, BENALI D ., 2003.** Effet du milieu de culture sur le microbouturage de l'olivier (*Olea europeae L.*) cv. Picholine Marocaine *Biotechnol. Agron. Soc. Environ.* 7 (3R4), 177R182.

**BRICHE E., 2011.** Changement climatique dans le vignoble de Champagne : Modélisation Thermique à plusieurs échelles spatio-temporelles (1950-2100). Université Paris Diderot - Paris 7 École doctorale : E.E.S.C."Économie, Espaces, Sociétés, Civilisations. 263p.

**BRIGGS W B., 1964.** phototropis; in higher plants in physiology academic press: 1; 223-271.

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

**CALU G., 2004.** L'eau et les plantes. Mémoire Master I.19p.

**CAMEFORT H.,1977:** Morphologie des végétaux vasculaires .Ed DOIN,418p.

- CAREDDA S., DEVAUX P., SANGWAN R.S. ET CLÉMENT C. (1999).** Differential development of plastids during microspore embryogenesis in barley. *Protoplasma* 208: 248-256.
- CARIMI F., 2005.** Somatic embryogenesis protocol : citrus in : protocol for somatic embryogenesis in woody plants. Springer (eds), p115\_128.
- CARIMI F, BARIZZA E, GARDIMAN M, LO SCHIAVO F, 2005.** Somatic embryogenesis from stigmas and styles of grapevine. *In vitro Cell Dev Biol Plant* 41: 249-252.
- CARISSE O., BACON R., LASNIER J., MCFADDEN-SMITH W., 2006.** Guide D'identification des principales maladies de la vigne. Agriculture et agroalimentaire Canada, Publication. 32p.
- CHEMARTHAUD P., 1858.** aspects de l'influence édaphique sur l'enracinement de la vigne, conséquence sur la qualité du De la vigne et ses produits. Ed. Bordeaux Henri Muller , librairie.
- CHEVRE A.M.,1985.** Recherche sur la multiplication végétative *in-vitro* chez le châtaignier. Thèse de doctorat . Université de bordeaux II 100p.
- COLLET G.F et LE C.L .,1988.**Micro propagation de porte-greffes de pommier et de poirier .Enracinement in vitro de *Pyrus malus* L.(M25,26,27,MM106 ,M9 type jork ) et *Cydonia oblonga* Mill.(A) .Revue suisse Vitic .Arboric ,Hortic .Vol 20(2) :131-138.
- COUTIN R., 2002.** Acariens et insectes de la vigne. D'identification des principales maladies de la vigne *Insectes* n°126 (3) pp20-23
- CURE W.W et MOTT R.L, 1978.** A comparative anatomical study of Agriculture et agroalimentaire Canada.
- DALVESCOL.L et GUERRAP.M., 2001.** The effectiveness of nitrogen sources in feijoa somatic embryogenesis. *Plant cell tissue and organ culture* (64) :19-25.

**DANIEL G. (1993)** Anther culture in rye: improved plant regeneration using modified MS-media. *Plant Cell Reports* 13(5): 267-271.

**DEMARLY Y., 1985.** L'épigénétique. *Bull. Soc. Bot. Fr.*132. *Actual. Bot* (314),pp 79-94.

**DEMARLY Y., SIBI M., 1996.** Amélioration des plantes et biotechnologie. Edition J.L Eurotexte, pp 99-111.

**DEZA L.G., 1991.** Construction à la caractérisation de variants somaclonaux obtenus à partir d'explants de pomme de terre (*Solanum tuberosum* L ssp. *tuberosum* cv. Désirée) irradiés aux rayons Gamma. Faculté des Sciences Agronomiques de Gembloux, U.E.R. de phytopathologie, Belgique, 127p.

**DALVESCO LL and GUERRA PM, 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.

**DUNWELL JW (1986).** Pollen, ovule and embryo culture as tools in plant breeding. In: Withers LA, Alderson PG, eds. *Plant tissue culture and its agricultural application*. Butterworths London: 375-404.

**DUTRUC-ROSSET G., 2001.** Extrait du rapport sur la vitiviniculture mondiale, 26<sup>ème</sup> Congrès, n°3, 20 p Elles sont préparées de la manière suivante : Exemples de cépages présentant une sensibilité différente à la coulure.

**EL YACOUBI H., ZIDANE L., DOUIRA A., ROCHDI A. 2010.** Effets de deux phytohormones et de l'hydrolysate de caséine sur la callogenèse de trois portes greffes d'agrumes *bull. soc. Pharm. Bordeaux* vol. 149, p 7-16.

**FINNIE S., POWELL W. et DYER A. (1989)**The effect of carbohydrate composition and concentration on anther culture response in barley (*Hordeum Vulgatre L.*). *plant breeding* 103:110-118.

- FOROUGHI-WEHR B, FRIEDT W (1984).** Rapid production of recombinant barley yellow mosaic virus resistant *Hordeum vulgäre* lines by anther culture. *Theor Appl Genet* 67: 377-382.
- FREGONI, M. (1991).** Origines de la vigne et de la viticulture. Musumeci, Quart Italie.
- GAFFIOT F. 1934.** Dictionnaire latin français. *Hachette Livre*.
- GALET P., 2000.** Précis de viticulture. Ed. JF. 7ème édition. 597P
- GEORGE, E.F. & SHERRINGTON, P.D., 1984.** Plant propagation by Tissue Culture. Eastern Press. England.
- GEORGE, 1996.** Plant propagation by tissue culture, the technology. Exegetics Limited ED, 30-45 pp.
- GERRATH JM., 1993.** Developmental morphology and anatomy of grape flowers . Horticultural Review **13**, 315-337
- GREEN CE, PHILIPS RI., 1975** Plant regeneration from tissue cultures of maize. *Crop Sci* 15:417-421.
- GRIGORIADOU K, VASILAKAKIS M, ELEFThERIOU E.P. ,2002.** *In vitro* propagation of the Greek olive cultivar *Chondrolia Chalkidikis*. *Plant Cell, Tissue Org. Cult.* **71**(1) , p. 47-54.
- GUILPART N., 2014.** Relations entre services éco systémiques dans un agro écosystème à base de plantes pérennes : compromis entre rendement de la vigne et régulation de l'oïdium, L'INRA de Montpellier, **IFV** (institut français de la vigne de vin), p : 14.
- HAICOUR, R., 2002.** Biotechnologie végétale : technique de laboratoire. Ed Tee et Doc. Montréal AUF. 2002 (universités francophones ISBN2-7430-0560-2). 275p.
- HAKMAN, I. ; ARNOLD, S.(VON)** Somatic embryogenesis and plant regeneration from suspension cultures of *Picea-glauca* white spruce. *Physiologia plantarum*, 1988, Vol 72, N° 3, p 579-587.
- HIDALGO.L. (2005) :** Taille de la vigne édit. Mundi-prensa pp3-15-39.

**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 Lavoisier Tec & Doc. 2<sup>ème</sup> Ed. . 365p.

**HUGLIN.P. (1986) :** Biologie et écologie de la vigne édité. Payot Lausanne pp 22-25

**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 .19

**HOPKINS W G ., 2003.** Physiologie Végétale. Traduction de la 2<sup>e</sup> édition américaine par Serge Rambour, révision scientifique de Charles-Marie Evrard. Ed : De Boeck Université.514

**ISERIN P., 2001.** Plantes médicinales. Ed. Larousse-Bordas. 283p.

**JACQUARD C.** 2007 Embryogénèse pollinique chez l'orge (*Hordeum vulgare* L) : importance du prétraitement. thèse présentée à université de Reims Champagne-Ardenne science exactes et naturelles.

**JAY ALLEMEND, C., CAPELLI, P., et CORNU, D ; (1992).** Root development of in vitro hybrid walnut microcutting in vermiculite containing gelrite medium. Station d'amélioration d'arbres forestiers INRA, 45160. Ardou France. Scientia horticulura. 51(3-4) :335-342.

**JUDD W., CAMPBELL S., CHRISTOPHE S., KELLOGO-ELIZABETH A., STEVEN KARP A., NELSON R.S., THOMAS E., BRIGHT S.W.J., 1982.** Chromosome variation protoplast derived potato plants. Theor. Appl. Génét., 63,265-272.

**LABRECHE J.C., 2010.** Biologie végétale. Edition Dunod.3<sup>ème</sup> Ed. 295p.

**LAROUCHE I., 1998** Influence de la concentration des composantes du milieu au début de la phase d'induction in vitro d'anthères d'orge mémoire présenté à la faculté des études supérieures de l'université de Laval département de biologie Lavoisier Tec & Doc. 363p.

**LÊ C .L, 2001,** Identification of potato by AFLP. **In** Conservation des pomme de terre in vitro et caractérisation des variétés cultivées en suisse. LÊ C, L, Thomas, D,

## Références bibliographiques

---

**LÊ C, L, Thomas, D, Nowbuth, L ., 2002.** Conservation des pomme de terre in vitro et caractérisation des variétés cultivées en suisse .suisse Agric 34(3):133-136.

**LEBON G., 2005.** Importance des glucides lors de la floraison chez la vigne *Vitis vinifera* L.

**LELU, M. A. P. ; BORNMAN, C. H.** Induction of somatic embryogenesis in excised cotyledons of *Picea-glauca* and *Picea-mariana*. *Plant physiology and biochemistry (Paris)*, 1990, Vol 28, N° 6, p 785-792..

**LELU, M. A. P. ; BOULAY, M. P. ; BORNMAN, C. H.** Somatic embryogenesis in cotyledons of *Picea-abies* is enhanced by an adventitious bud-inducing treatment. *New jforest*, 1990, Vol 4, N° 2, p 125-136. PA BIO

**Levadoux L. 1956.** Les populations sauvages et cultivées de vitis vinifera l. *Ann Amélioration des*

**LEVADOUX L., 1956.** Les populations sauvages et cultivées de *Vitis vinifera* L. Station de

**LOPEZ-PEREZ A.J, CARRENO J, MARTINEZ-CUTILLAS A, DABAUZA M, 2005.** High embryogenic ability and plant regeneration of table grapevine cultivars (*Vitis vinifera* L.) induced by activated charcoal. *Vitis* 44, 79-85.

**LYNE R.L., et HUNTER C.P. (1986)** Embryoid haploid production by anther culture from cultured barley anthers in: LA. Winters and PG. Amderson (éds). *Plant tissue culture and its agriculture application*. London, Dordrecht scientific, Guildford 1 :67-93.

**MARASCHIN S., DE PRIESTER., SPAINK H. et WANG M. (2005)** Androgenic switch : an example of plant embryogenesis from the male gametophyte perspective. *Journal of Experimental Botany* 56(416): 1711-1726.

**MARGARA F., 1982:** La multiplication vegetative *in-vitro* .Aspects généraux B.T.I.374 L1 Agro 15:701-711.

**MARGARA J., 1984.** Base de la multiplication végétatives .Les méristèmes et l'organogenèse.

## Références bibliographiques

---

**MARGARA J., 1989.** Base de la multiplication végétatives .Les méristèmes et l'organogénèse. Institut National de la recherche Agronomique.93 .plant cell m tissue and organe culture .1993.34; 43-5

**MARGARA, F.(1989).** Bases de multiplication végétative : les méristèmes et l'organogénèse. Ed INRA , Paris. 262p

**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.

**MO, L. H., ARNOLD, S. (VON)** Origin and development of embryogenic cultures from seedlings of norway spruce *Picea-abies*. *Journal of plant physiology*, 1991, Vol 138, N° 2, p 223-230 .BIO

**MORLAT R, PUISSANT A, ASSELIN C, LEON H, REMOUE M., 2010.** Quelques aspects de l'influence édaphique sur l'enracinement de la vigne, conséquence sur la qualité du vin. Association Française pour l'étude du sol. pp 125-146

**MULLINS MG, BOUQUET A, WILLIAMS L.E., 1992.** Biology of the grapevine. Ed. Mullins University Press, Cambridge, UK . p239.

**NORSTOG K.J., 1961.**The growth and differentiation of cultured barley embryos.Amer. J. Bot. 48:876-884.

**NOVELLO C. et TAP J. 2005 .,** Introduction à la culture *in vitro* chez les végétaux. Maîtrise IUP SIAL.

**NOWBUTH et CL LE .AGROSCOPE RAC CHANGINES ., 2005.**Teneur non- conforme en ADN comme indicateur de variation soma clonale chez la pomme de terre .suisse agric .37 (6):257-266.

**NOZERAN R,BANCILHON L ., 1972 .**Les cultures in vitro en tant que technique pour l'approche de problèmes posés par l'amélioration des plantes .In Ann. Amélioration .Plantes 22(2),pp 167-185.

**OCHETTE C., 2005** growth, quality and biotechnology, WFP publisher .Finland.

**OLSEN F.L., (1987).** Induction of microspore embryogenesis in cultured anthers of *Hordeum Vulgare* L. The effects of ammonium nitrate, glutamine and asparagines as nitrogen source. Carlsberg Research communications organogenesis in cultured tissues of maize, wheat and oats, *Physiol. Plant.* 42:91-96.

**OULD RAMOUL A., 1997.** Etude des possibilités de production de semences de pomme de terre *Solanum tuberosum* L. variété Désirée à partir de minitubercules issus de cultures *in vitro*. Thèse de magistère INA, ALGER.

**PEROS JP, BERGER G, PORTEMONT A, BOURSIQUOT JM, LACOMBE T. 2010.** Genetic variation and biogeography of the disjunct vitis subg. *Vitis* (vitaceae). *Journal of Biogeography* 38(3): 471-486.

**PIATTI M.F., 1988.** Embryogénèse somatique et synchronisation du développement embryonnaire . Thèse de doctorat d'état en pharmacie . paris VI 130p *plantes* 6: 59-118.

**POUGET R. 1990.** Histoire de la lutte contre le phylloxéra de la vigne en france : 1868-1895. *Institut national de la recherche agronomique.*

**PRATIBHA M. et al., 2010.** Establishment of long-term proliferating shoot cultures of elite *Jatropha curcas* L.Publication. 32p.

**PURKAYASTHA J. et al., 2010.** Efficient *in vitro* plant regeneration from shoot apices and gene transfer by particle bombardment in *Jatropha curcas*. *Biol. Plant.*, 54(1), 13-20.

Pyrénées. Thèse de Doctorat. Institut national polytechnique de Toulouse. 185p.

**QUASHIE A. et Marie L ., KOKOU K., (2009).** culture *in vitro* et herbier *in vitro* culture and herbarium. Laboratoire de Physiologie et Biotechnologies Végétales., Ann. Univ. Lomé (Togo), série Sciences, Tome XVII : 49-58.

**RAINA A. PANDE H. ET BHOJWANI S. (2003)** Factors affecting androgenesis in indica Rice, Recherches Viticoles et d'Arboriculture Fruitière du Sud-Ouest, Pont-de-la-Maye (Gironde) pp59-115

**REINERT J., 1958.** Morphogenesis und ihre kontrolle an gewebeulturen auscaritten. Naturwiss.45:344-345.

**REYNIER A., 2007.** Manuel de viticulture. Edition TEC & DOC. Paris. 10éme Ed. 527p

**RIMBERIA F., SUNAGAWA H., URASAKI Y.ET ADANIYA S. (2005)** Embryo induction via anther culture in papaya and sex analyses of the derived plantlets. Scientia Horticulturae. 103(2): 199-208.

**ROSELL , CADMO H., et al., 1992.** fondements théoriques et pratiques de la culture des tissus végétaux., FAO, 00100 rome,Italie., p.p :61-63.

**ROUSSELLE P, ROBERT Y, GROSSUER J.C, ED ., 1996** .La pomme de terre production, Amélioration, Ennemis et Maladies. Utilisation édition R Doun P278.

**RUGINI E. ,1986.** Olive (*Olea europaea* L.). In Bajaj YPS. (ed.). *Biotechnology in agriculture and forestry. Vol 5. Trees I.* Berlin: Springer-Verlag, p. 253-267.

**SAADI A.,1991.** Régénération de plantes de pois *Pisum sativum* L par embryogenèse somatique . Thèse de doctorat . Paris Grignon 162p.

**SCHMID J. et KELLER E .,1981** : Nouvelles possibilités pour l'amélioration et la multiplication des plantes : les cultures de tissus et de cellules. Revue Suisse Agriculture 13(6): 265-272.

**SEMAL, J., LEPOIVRE, PH.** 1989. Plantes vivrières tropicales. Ed. Aupelf-Bref. John Libbey Eurotext .Paris. pp: 103-104.

**SHARIATPANAH M., BAL U., HERBERLE-BORS E. ET TOURAEV A.(2006)** Stresses applied for the re-programming of plant microspore towards in vitro embryogenesis. Physiologia plantarum 127(4):519-534.

**SHARP, W.R., SONDAHL, M., CALDAS, L.S., MARAFFA, S.B., 1980.** The physiology on *in vitro* asexual embryogenesis. Hortic., 2:268-310.

## Références bibliographiques

---

**SHEPARD J., 1982.** La régénération *in vitro* de plantes de pomme de terre. Pour la Science, Juillet. 34-47.

**SIBI M .,1981.** Hérité de variants épi géniques obtenus par culture des tissus *in vitro* chez les végétaux supérieurs .Thèse Doct ès Sci ; Univ Paris RSud, Orsay, 280 p.

**SIMON J-L., EGGENBERGER W., KOBLET W., MISCHLER M., SCHWARZENBACH J., 1992.** Viticulture. Ed. Payot, Lausanne.

**SMITH R.H, BHASKARAN S, MILLER F.R., 1985.** Screening for drought tolerance in Sorghum activity: localization using cell culture. In Vitro Cell .Dev. Biol .21 :541-545.

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

**STEWART F.E., 1958.** Growth and organized development of cultured cells,Amer. J. Bot. 45:709-713.

**TEOULE E .,1999.** Biotechnologie et Amélioration des plantes in Biotechnologie Seriban R. EdT TEC &DOC p 565-589.

**THIS P, LACOMBE T, THOMAS MR. 2006.** Historical origins and genetic diversity of wine grapes. *Trends in Genetics* 22(9): 511-519.

**THORPE T.A. ,1980.** Organogenesis *i n v i t r o*: structural physiological and biochemical aspects. In Vasil IK. (ed) *International review of cytology*. Suppl. II, p. 71-111.

**TISSERAT B ., ESANE B. et MURASHIGE T., 1979.** Somatic embryogenesis in Angiosperms . Hort. Rev.,1:1-78.

**WERNICKE., POTRYKUS., THOMAS., 1982.** Morphogenesis from cultured leaf tissue of *Sorghum bicolor*. The morphogenetic pathways, Protoplasma 111:53- 62.

**TOUSSAINT X., 1983.** Coulure et millérandage. *Vititech* 68, 14-15.

**TOUTE Y., 1998:** Genie génétique et biotechnologie, concepts et méthodes. Applications à l'agronomie et aux bio- industrie. Ed DUNOD 209p.

## Références bibliographiques

---

**TOUTE Y.,1998:** Genie génétique et biotechnologie , concepts et méthodes . Applications à l'agronomie et aux bio-industrie . Ed DUNOD 209p.

**VALLEAU WD. 1916.** Inheritance of sex in the grape. *The American Naturalist* A.2007. pp 138147.

**VARDI A., FRYDMAN-SHANI A.,GALUN E.,GONEM P. et BELICHMANS S.,1990:** Citrus cybrids transfer of microcitrus organelles into-citrus cultivars.1<sup>st</sup> International symposium *in-vitro*culture and horticultural breeding ,Acta Horticulturae 280: 234-239.

**WALALY LOUDYI D.EL., SKIREDJ A., HASSAN E., 2003.**Le bananier, la vigne et les vitivinicoles.

**Web 1:** <http://www.vulgarisation.net/bul109.htm>.

**WERNICKE., POTRYKUS., THOMAS., 1982.** Morphogenesis from cultured leaf

**WETHERELL D.F et HALPERIN W., 1963.** Embryo derived from callus tissue cultures of the wild carrot, *Nature* 200:1336-1337.

**WYSS E. HARING M., 2001.** Technique de sélection végétale : évaluation pour l'agriculture biologique., **IRAB/FIBL** ackerstrasse frick, Allemagne, 1<sup>ère</sup> édition ,page :10-21.

**YEUNG E.C. 1995.** - Structural and developmental patterns in somatic embryogenesisin Thorpe T.A. ed *in vitro* embryogenesis. TA. Ed. *In Vitro* embryogenesis in plants. Kluwer, Academic. Publishers , Dordrecht. 205-247.

**YVES C. ,1984** .La culture sans sol .in science et vie, horticole série (la nouvelle botanique) mars 1984, 146:68-75.

**ZRYD J.P., 1988:** Culture des cellules, tissus et organes végétaux .Ed .Press.Polytechniques Romandes Suisse 308p.

**ANNEXE1 : Caractéristiques des cépages**

**I. Cépage Amellal**

C'est un cépage autochtone de vigne, se trouve en kabyle, leur grappe est blanc.

Le cépage Amellal utilisé en général pour la production de raisin de table et le raisin sec plus la production de vin de consommation courante.



**Figure47 : Fruit de cépage Amellal (Anonyme 2017)**

**II. Cépage Bouani**

**Caractéristiques phénologiques :**

**Débourrement :** 3<sup>ème</sup> décade de mars

**Floraison :** 2<sup>ème</sup> décade de mai

**Véraison :** 2<sup>ème</sup> décade d' Août

**Maturité :** 1<sup>ère</sup> décade de septembre



**Figure48** : Fruits de cépage Bouani (Anonyme 2017).

### **La grappe**

**Langeur** : 32cm.

**Largeur** : 17cm.

**Forme** : Ailée.

**Poids** : 690gr.

### **Baies**

**Couleur** : Blanche

**Consistance** : Charnue.

**Forme** : Troncovoide présence de deux pépins.

**Volume de 100 baies** : 320ml.

**Poids de 100 baies** : 355gr.

### III. Cépage Ahmar Bou Ameer

Considéré comme cépage Autochtone originaire de la Kabylie Il est cultivé dans la plus part des régions montagneuses d'Algérie tel que Tlemcen, Mascara et Médéa, c'est dans cette dernière wilaya que se rencontrent les superficies les plus importantes.



**Figure49** : Fruit de cépage **Ahmar Bou Ameer** (ITAF, 2009).

La culture de ce cépage n'est pas à recommander en plaine ou il pourrit facilement et colore très mal.

#### **Caractéristiques culturales :**

- ✓ **Vigueur** : très vigoureux.
- ✓ **Sécheresse** : Moyennement sensible.
- ✓ **Vent** : Sensible au sirocco.
- ✓ **Maladies** : Sensible au mildiou, Oïdium et au Botrytis.
- ✓ **Mode conduite** : taille courte ou longue.
- ✓ **Rendement** : 70 à 80 Qx/ha.
- ✓ **Mode conservation** : se conserve bien sur souche si une bonne protection contre les maladies (Botrytis) est assurée.
- ✓ **Transport** : Moyennement résistant.
- ✓ **Commercialisation** : Très apprécié par les consommateurs.

ANNEXE 02 : Matériels utilisé en laboratoire

❖ Matériel du laboratoire utilisé

1. Appareillage et petit matériel



**Figure50** : Autoclave, pH mètre et Hotte à flux laminaire horizontal.

- ❖ Etuve,
- ❖ Balances de précisions,
- ❖ Plaques chauffantes avec agitateur,
- ❖ Bec benzène,
- ❖ Stérilisateur à billes
- ❖ Hotte chimique,
- ❖ Réfrigérateur,
- ❖ Distillateur.

- ❖ Pinces et scalpels métalliques en inox,
- ❖ Boîtes de stérilisation métalliques en inox,
- ❖ Lames à bistouri et à rasoir,
- ❖ Micropipettes de 250, 500 et 1000 µl,

### **2. Consommables et solvants**

- ❖ Boîtes de pétri en plastiques stériles de 60 mm et 90 mm de Ø, boîtes de pétri en verre,
- ❖ Bêchers d'100, 500 et 2000 ml,
- ❖ Flacons de 500 et 1000ml transparents et flacons d'1l fumés pour solutions mères,
- ❖ Eprouvettes 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 (NaO CL), chlorure de mercure (HgCL<sub>2</sub>), NaOH 0,1N, HCL 0,1N ;
- ❖ Solution d'antibiotique (pénicilline),
- ❖ Eau de javel de commerce,
- ❖ Isis et tween 20.

## Annexe

### ANNEXE 03 :

**Tableau20** : Test de Newman-Keuls ; variable % d'explants survécus Groupes Homogènes,  
alpha =,05000 pour le cépage AL

	Type d'explant	Milieu	% d'explants survécus	1	2	3	4
1	1	1	0,00000	****	****		
2	1	2	0,00000	****	****		
3	1	3	0,00000	****	****		
4	1	4	0,00000	****	****		
18	2	9	0,00000	****	****		
6	1	6	0,00000	****	****		
7	1	7	0,00000	****	****		
17	2	8	0,00000	****	****		
9	1	9	0,00000	****	****		
10	2	1	0,00000	****	****		
11	2	2	0,00000	****	****		
16	2	7	0,00000	****	****		
24	3	6	0,00000	****	****		
15	2	6	0,00000	****	****		
19	3	1	0,00000	****	****		
5	1	5	1,00000	****	****		
8	1	8	4,00000		****	****	
12	2	3	6,00000			****	****
14	2	5	6,00000			****	****
20	3	2	6,00000			****	****
21	3	3	6,00000			****	****
22	3	4	6,00000			****	****
25	3	7	7,00000			****	****
27	3	9	9,00000			****	****
26	3	8	9,00000			****	****
23	3	5	9,00000			****	****
13	2	4	10,00000				****

## Annexe

**Tableau21** : Test de Newman-Keuls ; variable % d'explants survécus Groupes Homogènes,  
alpha =,05000 pour le cépage VBN

	type d'explants	milieu	% d'explants survécus	1	2	3	4
1	1	1	0,00000	****			
2	1	2	0,00000	****			
3	1	3	0,00000	****			
22	3	4	0,00000	****			
5	1	5	0,00000	****			
6	1	6	0,00000	****			
7	1	7	0,00000	****			
8	1	8	0,00000	****			
9	1	9	0,00000	****			
10	2	1	0,00000	****			
21	3	3	0,00000	****			
26	3	8	0,00000	****			
25	3	7	0,00000	****			
20	3	2	0,00000	****			
19	3	1	0,00000	****			
24	3	6	0,00000	****			
17	2	8	0,00000	****			
23	3	5	0,00000	****			
4	1	4	5,00000		****		
15	2	6	5,33333		****		
11	2	2	7,00000		****	****	
16	2	7	7,00000		****	****	
14	2	5	8,00000			****	****
27	3	9	8,00000			****	****
18	2	9	8,33333			****	****
12	2	3	10,00000				****
13	2	4	10,00000				****

## Annexe

**Tableau22** : Test de Newman-Keuls ; variable % d'explants survécus Groupes Homogènes,  
alpha =,05000 pour le cépage VHB.

	type d'explant	milieu	% d'explant survecus	1	2	3	4	5
1	1	1	0,000000	****				
2	1	2	0,000000	****				
3	1	3	0,000000	****				
4	1	4	0,000000	****				
5	1	5	0,000000	****				
6	1	6	0,000000	****				
7	1	7	0,000000	****				
8	1	8	0,000000	****				
24	3	6	0,000000	****				
10	2	1	0,000000	****				
23	3	5	0,000000	****				
12	2	3	0,000000	****				
19	3	1	0,000000	****				
18	2	9	0,000000	****				
21	3	3	0,000000	****				
20	3	2	0,000000	****				
22	3	4	3,000000		****			
17	2	8	3,333333		****	****		
13	2	4	4,000000		****	****		
26	3	8	4,000000		****	****		
11	2	2	5,000000			****	****	
25	3	7	6,000000				****	
16	2	7	6,000000				****	
9	1	9	8,000000					****
14	2	5	8,000000					****
15	2	6	8,000000					****
27	3	9	8,000000					****

**Tableau23** : Evaluation du taux de contamination des trois explants

(Cépage Amellal)

<b>Temps</b>	<b>Demi-fleur</b>	<b>Ovaire</b>	<b>Anthère</b>
<b>1ère semaine</b>	56	2	3
<b>2ème semaine</b>	82	18	9
<b>3ème semaine</b>	82	18	9
<b>4ème semaine</b>	132	38	9

**Tableau24** : Evaluation du taux de contamination des trois explants

Chez le cépage VBN.

<b>Temps</b>	<b>Demi-fleur</b>	<b>Ovaire</b>	<b>Anthère</b>
<b>1ère semaine</b>	0	0	0
<b>2ème semaine</b>	58	17	3
<b>3ème semaine</b>	58	17	3
<b>4ème semaine</b>	81	41	26