

République Algérienne Démocratique et Populaire

Ministère de l'enseignement supérieur et de la recherche scientifique

Université de Blida (1)

Faculté des sciences de la nature et de la vie

Département biotechnologies

Mémoire de fin d'étude

En vue de l'obtention du diplôme de Master Académique

Spécialité : Biotechnologie Végétale

THEME

Introduction du Pistachier térébinthe (*Pistacia terebinthus*) à la culture *in vitro*

Présenté par :

SAHNOUNE SAMIA

DJIRA NAIMA

Devant le Jury :

Mme CHAOUIA C.	MCA	USDB (1)	présidente
Mme CHAOUCH F.Z.	MCA	USDB (1)	promotrice
Mme OUKARAF.Z.	Attachée de Recherche	INRF	examinatrice
Mme BRADEA M.S.	MCA	USDB (1)	examinatrice

Promotion :2014 /2015

Dédicace

Je dédie ce modeste travail

A mes très chers parents, qui m'a donné la vie qui sont sacrifiée pour mon bonheur et ma réussite, qui m'ont accordé leur aide, leur soutien et leur confiance .Papa Rachid, Maman Louiza merci pour tout

A mon très cher frère Yassine

A mes très chère Sœur, Souad , Hafidha .

A mes grands parents.

A mes oncles et mes tentes

A tous mes familles Rahile et Sahnoune et tous mes cousins et cousines

A tous (tes) mes amis (es) et spécialement ceux qui m'ont offert leur aide et leur soutien inoubliable : Aziza, Soumia L, Asma, Imene, Warda, Amina, Soumia S, Bessma, Chahinaze, Nabila, ainsi qu'a ceux que je n'ai pas cité leur nom et me sont très cher.

A tous mes professeurs qui ont contribué à ma formation du primaire jusqu'à l'université.

A tous mes camarades de l'université de Blida et spécialement de spécialité biotechnologie végétale.

Samia

Dédicace

Je dédie ce modeste travail

A mes très chers parents, qui m'ont donné la vie qui sont sacrifiée pour mon bonheur et ma réussite, qui m'ont accordé leur aide, leur soutien et leur confiance .Papa, Maman, merci pour tout

A mes très cher frère, Mostapha , Salem, Bilal,Abde Elrazak, Achraf.

A mon très chère sœur Donia.

A mes grand père, tous mes familles et tous mes cousins et cousines.

A tous (tes) mes amis (es) et spécialement ceux qui m'ont offert leur aide et leur soutien inoubliable : Fatiha, Bouchra, Aicha, fatima, zakia, ainsi qu'a ceux que je n'ai pas cité leur nom et me sont très cher.

A tous mes professeurs qui ont contribué à ma formation du primaire jusqu'à l'université.

A tous mes camarades de l'université de Blida et spécialement de spécialité biotechnologie végétale.

Naima

Résumé

Notre travail est réalisé sur *Pistacia térébinthus* pour ces intérêts, dont les plus importants sont médicaux, commerciaux, et agronomiques.

Nous avons choisi la culture *in vitro*, pour régénérer et évaluer le pourcentage de la réussite de cette technique sur cette espèce. On a appliqué cette dernière dû à la difficulté de sa multiplication par voie sexuée, cette technique a principalement pour objet de régénérer une plante entière à partir de cellules, de tissus végétaux ou d'organes (graine immature, embryon, ovule, pollen, bourgeon terminal, bourgeon axillaire, morceau de tige, morceau de feuille, de pétale de fleur, ...) et qui permet de mettre à la disposition des manipulateurs un matériel jeune, sain, en toute saison.

La culture *in vitro* est un ensemble de méthodes faisant intervenir d'une part l'asepsie (stérilisation du matériel, désinfection des explants) et d'autre part des conditions de culture parfaitement contrôlées (milieux de culture définis pour chaque type de plante, température, lumière, humidité). Donc les résultats obtenus, sont reliés aux différents facteurs de réussite de cette technique, selon la méthode de désinfection utilisée, le milieu de culture et la nature de l'explant ensemencé dans le milieu de culture MS, MS/2, G, et les hormones de croissance additionnées au milieu et l'acide ascorbique. Les résultats obtenus, ne font que confirmer la difficulté de l'espèce, vu qu'elle est riche en résine, ceci a constitué un obstacle pour la propagation *in vitro*. Ainsi, nous n'avons pas pu avoir de débourement des nœuds, ni la germination des graines.

Mots clés :

Pistacia térébinthus, « *in vitro* », milieu de culture, hormones.

Résumé

الملخص

اجري هذا العمل على البطم التريبتني لفوائده, أهمها الطبية, التجارية والفلاحية. و لهذا اخترنا الزراعة في المخبر, لتجديد وتقييم نسبة نجاح هذه التقنية على هذا النوع. أجرينا هذه الأخيرة نظرا لصعوبة تكاثرها بالطريقة الجنسية. هذه التقنية المستعملة لغرض تجديد نبتة كاملة عن طريق خلية, أنسجة نباتية, أو أعضاء (بذرة غير ناضجة, غشاء, بويضة, حيوب اللقاح, البرعم الطرفي, برعم إبطي, قطعة من الساق, قطعة من ورقة, بتلة زهرة) و التي تسمح بتوفير مادة فنية سليمة وموجودة في كل الفصول.

الزراعة في المخبر هي مجموعة من الأساليب التي تعتمد من جهة على التعقيم (معدات التعقيم, تطهير أجزاء النبتة) ومن جهة أخرى على شروط الزراعة محكمة المراقبة (الوسط الزراعي المحدد لكل نوع من النبات, درجة الحرارة, الضوء, والرطوبة). إذن النتائج المتحصل عليها مرتبطة بمختلف عوامل نجاح هذه التقنية, حسب طريقة التعقيم المستعملة, الوسط الزراعي وطبيعة الجزء المزروع في الوسط الزراعي وهرمونات النمو المضافة الى الوسط وحمض اسكوربيك. النتائج المتحصل عليها لا تؤكد صعوبة هذا النوع, نظرا لانه غني بالراتنج, هذا يشكل عائق من اجل النشر في المخبر. كذلك لم نستطع أن نتحصل على تفتح العقد ولا انتاش البذور.

كلمات المفتاح: البطم التريبتني, الزراعة في المخبر, الوسط الزراعي, هرمونات.

Summary

Summary

Our work is carried out on *Pistacia terebinthus* for these interests; the most important are medicinal, commercial and agricultural.

We chose in vitro culture to regenerate and evaluate the percentage of the success of this technique to this plant. We apply the latter has had difficulty multiply by sexual means, this technique is primarily intended to regenerate an entire plant from cells, plant tissue or organs (immature seed, embryo, egg, pollen, terminal bud axillary bud, stem piece, piece of leaf, flower petal,...) and that can make available material handlers a young, healthy, in any season.

In vitro culture is a set of methods involving one hand aseptic (equipment sterilization, disinfection of explants) and also perfectly controlled culture conditions (culture media defined for each type of plant, temperature, light, humidity). So the results are read over the different factors of success of this technique, according to the disinfection method used, the culture media and the nature of the explants inoculated in the culture media MS, MS / 2, G, and growth hormones added to the medium and the results obtained ascorbique.les acid, do not care to confirm the difficulty of the case, because it is rich in resin, this has been an obstacle to the spread In vitro, thus we do not have nodes bud or seed germination.

Keywords :

Pistacia terebinthus, "in vitro" culture medium, hormones.

Introduction

Ces dernières décennies, l'usage des plantes médicinales connaît un regain d'intérêt. Selon les estimations de l'OMS (2002), plus de 80 % de la population en Afrique utilisent encore la médecine traditionnelle pour répondre à leurs besoins de soins et de santé. Ceci est lié à la toxicité des produits chimiques, et au coût élevé des médicaments chimiques.

L'étude de la biodiversité intra et interpopulations devra être conduite en évaluant la variabilité des espèces locales traditionnelles et des sous-espèces spontanées en Algérie par l'étude des marqueurs morphologiques qualitatifs et quantitatifs. Les écotypes spontanés sont soumis à une érosion génétique causée par les incendies, déforestation, désertification, pollution, changement du climat, l'action du cheptel et enfin l'action de l'homme.

Depuis l'antiquité, plusieurs plantes sont utilisées pour leurs vertus, de nos jours l'être humain veut retourner à ses origines naturelles et explorer les bienfaits de la nature mais dans un cadre scientifique, parmi ces plantes on complète le pistachier (Helaine, 1997).

Les pistachiers sont des arbustes plastiques, indifférents à la nature du sol et tolèrent les vents forts et les longues périodes de sécheresse. Depuis l'étage bioclimatique humide à l'aride, les pistachiers constituent des espèces essentielles du maquis de la zone méditerranéenne (Boudy, 1950).

En Algérie, ces espèces communes de nos paysages en peuplements ou en arbustes éparses isolés, connaissent une très forte pression anthropologique, qui limite énormément leurs expansion et leurs développement. Donc Menacés de dégradation et de disparition, les pistachiers, nécessitent et en absence d'un inventaire national spécifique, une prise en charge effective et immédiate.

Le pistachier térébinthe (*Pistacia térébinthus*), bien que d'origine méditerranéenne a connu un développement extensif, le long de la vallée du Rhône, atteignant de lointaines contrées telles le Jura et la Savoie. Son bois dur est utilisé en marqueterie pour réaliser des ornements. Les pistachiers sont plus connus pour la production d'une oléorésine qui peut

Introduction

être utilisée comme antiseptique, vernis ou même en tant que produit alimentaire que pour la qualité gustative de leurs fruits (Reig-Arminana et *al.*,2004).

Le térébinthe se plaît sur les montagnes cependant en Provence, on ne voit pas beaucoup de ces arbres sur les lieux élevés, c'est particulièrement dans les coteaux, à l'exposition du midi, qu'on cultive le pistachier, et seulement jusqu'au tiers ou aux trois quarts de la pente des montagnes, mais il paraît qu'on peut élever cet arbre avantageusement partout où la vigne réussit dans les pays chauds. Le Térébinthe a l'avantage de croître dans les plus mauvais terrains, entre les rochers et les pierres, comme le Pin (Pline etGallimard, 2013).

Cet arbuste est une plante médicinale très riche en résines, le médecin grec Dioscoride, indique que la résine de térébinthe surpasse toutes les résines. Elle est bonne pour la toux et la tuberculose, sous forme de pastilles, soit seule soit avec du miel, C'est de ses graines comestibles (proches des vraies pistaches du *Pistacia vera*) que l'on extrait la véritable huile de térébinthe, qui sert, entre autres, aux frictions et aux inhalations(Pline etGallimard, 2013).

L'obtention de plants à partir de semis ou multiplication par voie sexuée est difficile pour *P. terebinthus*, car l'endocarpe est imperméable ,qu'il faut scarifier ,mécaniquement ou chimiquement ,pour faciliter le passage de l'eau . Pour la plupart des autres espèces du genre *Pistacia*, la germination est généralement aisée, bien qu'elle soit très liée à la provenance des semences (arbres producteurs) et à leur qualité : bonne fécondation et récolte de l'année [(Brghchi et Alderson,(1983-1985) ;Martinelli,(1988)].

La difficulté de multiplication de cette espèce constituée cependant, l'un des facteurs limitant de son extension, la production commerciale de plants de pistachier étant normalement faite par greffage. Afin de surmonter ces problèmes,et en conséquence produire des plants en masse , la multiplication in vitro a été explorée par plusieurs chercheurs [(Brghchi et Alderson,(1983-1985) ;Martinelli,(1988)]

Introduction

C'est pour faire face aux difficultés de multiplication végétative classique du *Pistacia térébintus*, que nous nous sommes tournées, vers la multiplication végétative in-vitro.

Le travail qui fait l'objet du présent mémoire porte sur le développement d'une méthode alternative basée sur l'utilisation des micro-boutures et la graine comme matériel de départ dans le but de régénérer le pistachier térébinthe.

Liste des figures

Liste des figures

Figure 01 : Arbre âge de pistachier térébinthe (Bab Ezzouar)	5
Figure 02 : Jeune arbre de pistachier térébinthe (blida)	5
Figure 03 : Feuille de pistachier térébinthe	8
Figure 04 : Fruit de <i>Pistacia térébinthus</i>	10
Figure 05 : Influence du pré-traitement à l'acide sulfurique concentré sur le pourcentage de germination de <i>P. terebinthus</i>	17
Figure 06 : Taux de contamination.....	33

Liste des tableaux

Liste des tableaux

Tableau 01 : Exigences Pédoclimatiques du <i>P.térébinthus</i>	11
Tableau 02 : Différentes désinfections du matériel végétal du 1 ^{er} essais	25
Tableau 03 : Différentes désinfections du matériel végétal du 2 ^{ème} essais	26
Tableau 04 : Désinfection des feuilles	27
Tableau 05 : Différents traitements anti-oxydants du matériel végétal	28
Tableau 06 : Différent traitement d'hormonaux utilisés.....	30
Tableau 07 : Taux de contamination des micro-boutures (1 ^{er} essais de désinfection)	34
Tableau 08 : Taux de contamination des micro-bouture (2 ^{ème} essai de désinfection)	35
Tableau 09 : Taux de contamination des graines (2 ^{ème} essai de désinfection)	37
Tableau 10 : Taux de contamination des graines scarifiées (2 ^{ème} essai de désinfection)	38
Tableau 11 : Taux de contamination des feuilles (1 ^{er} essais de désinfection)	39
Tableau 12 : Taux de contamination des feuilles (2 ^{ème} essai de désinfection)	40

Liste des abréviations

Liste des abréviations

BA : benzyladenine

G :gamborg

IRTA :Institut de Recerca i Tecnologia Agroalimentàries

ISF :Istituto Sperimentale perla Frutticoltura

MS :Muraschige et Skoog

OMS : organisation mondiale santé

ppm : partie pour million

I. Pistachier :

Le pistachier est un arbre ou arbuste dioïque et aromatique appartenant à la famille des Anacardiaceae. Comprend 11 espèces, réparties en 4 genres dont le genre *Pistacia* (Zohary, 1952). Le genre *Pistacia* regroupe, à l'exception de *P. vera* qui produit le fruit comestible, un important nombre d'espèces qui n'ont d'autre intérêt agronomique que leur possible utilisation comme porte-greffe. *P. atlantica*, *P. terebinthus* ou *P. integerrima* sont celles les plus fréquemment utilisées (Aletà et al., 1997). Le pistachier est riche en huiles (58,3-84,3%), en protéine (19,4-28,9%) mais relativement pauvre en sucres (6,10%-8,4%) (Bloch et Brekke, 1969).

En Algérie le pistachier est présent à l'état spontané sous diverses conditions pédoclimatiques. Nous en retrouvons trois espèces sauvages sur tout le littoral algérien, ainsi que dans les régions du sublittoral (Mouzaia), et jusque dans l'Atlas saharien (Djelfa) : *Pistacia lentiscus*, *Pistacia terebinthus*, *Pistacia palestina*, *Pistacia atlantica* Desf (Monjauze, 1968).

II. Pistachier térébinthe :

Pistacia terebinthus L ou Pistachier térébinthe, térébinthus en latin désigne la résine, c'est un arbuste à résine, pouvant atteindre cinq à six mètres de hauteur (Caizergues, 1997). à feuilles caduques de la famille des Anacardiaceae à très forte odeur résineuse. Le pistachier peut se trouver, sous la forme d'un petit arbre (Reig-Arminana et al., 2004). Il peut vivre plus de 100 ans (Rameau et al., 2008).

IL existe plusieurs sous-espèces de térébinthes, dont le térébinthe sauvage, le térébinthe à gros fruit, le térébinthe à petit fruit bleus (figure 01 et figure 02)



Figure 01 : Arbre âgé de pistachier térébinthe (Bab Ezzouar)



Figure 02 : Jeune arbre de pistachier térébinthe (Blida)

II.1. Taxonomie :

La classification admise actuellement est rapportée par Judd *et al.* (2002), Lieutaghi (2004) et Yaaqobi *et al.*, (2009).

-Règne: *Plantae*

-Classe: *Magnoliopsida*

-Ordre: *Sapindales*

-Famille: *Anacardiaceae*

-Genre: *Pistacia*

Une étude monographique du pistachier a été réalisée par Zohary (1954) in Khelil et Kellal (1980) montrant que le genre *Pistacia* comprend 11 espèces à savoir:

Pistacia atlantica Desf. ou pistachier de l'Atlas.

Pistacia lentiscus L. ou lentisque : fruits non comestibles

Pistacia terebinthus L. ou thérébinthe: fruits aigrelets comestibles

Pistacia vera ou pistachier cultivé.

Pistacia afghanistania, *P. chinensis*, *P. khinjuk*, *P. mexicana*,

P. palestina, *P. wienmannifolia*, *P. intergerrima*.

II.2. Origine et répartition :

II. 2.1. Origine

Le pistachier térébinthe est originaire des régions méditerranéennes de l'Europe, de l'Asie, et de l'Afrique (Rameau *et al.*, 2008)

II.2.2.Répartition :

II.2.2.1. En l'Algérie

L'étude de la biodiversité intra et interpopulations devra être conduite en évaluant la variabilité des espèces locales traditionnelles et des sous-espèces spontanées en Algérie par l'étude des marqueurs morphologiques qualitatifs et quantitatifs. Les écotypes spontanés sont soumis à une érosion génétique causée par les incendies, la déforestation, la désertification, la pollution, le changement du climat, l'action du cheptel et enfin l'action de l'homme. Une enquête préliminaire a montré que l'espèce endémique se trouvent réparties comme suit sur le territoire :

Pistacia terebinthus, dans le bassin de la Soumam, au niveau du versant Nord du Djurdjura et dans le bassin d'El Kseur, en association avec le pin d'Alep et le chêne vert. (Belhadj, 2003 et Choaki, 2006).

II.2.2.2.Répartition dans le monde

Le pistachier térébinthe est originaire de l'Afrique du Nord (Maroc, Algérie, Tunisie, Libye), d'Asie de l'Ouest (Arabie saoudite, Palestine occupée, Jordanie, Liban, Syrie, Turquie) et de l'Europe méditerranéenne (midi de la France, Espagne, Albanie, ancienne Yougoslavie, Bulgarie, Grèce, Italie) et du Portugal. C'est donc une espèce présente sur tout le pourtour méditerranéen. À l'origine elle était présente dans le midi de la France, son aire s'est étendue jusque dans le Jura, les Hautes-Pyrénées, le Quercy, la Savoie et le Périgord, mais toujours dans les zones dégradées associées aux chênes vert, pubescent et à une altitude maximale de 500 m, il est absent en Corse (Rameau et al., 2008)

II.3.Descriptions morphologiques :

Le pistachier térébinthe est un arbuste, méditerranéen de trois à cinq mètres présentant de grosses grappes de fleurs pourpres et des feuilles composées imparipennées devenant jaunes ou rouge flamboyant à l'automne. L'essence de térébenthine était à l'origine fabriquée avec la sève de cet arbre. Son écorce est gris pâle, sa croissance est lente (Reig-aminana et al., 2004).

II.3.1. Feuilles :

Les feuilles sont caduques. Elles sont vertes au printemps (Figure 03). Jaunes ou rouge flamboyant à l'automne. (Rameau et *al.*, 2008).



Figure 03 : Feuille de pistachier térébinthe

II.3.1.1. Foliolle :

La feuille est composée de plusieurs folioles de différentes dimensions, au nombre de cinq, de sept ou neuf, et quelque fois jusqu'à treize, qui sont attachées par couples sur un filet commun, terminé par une seule foliole : elles sont d'un vert brillant et foncé en-dessus, mais blanchâtre et mate en-dessous (Ubarrechena et *al.*, 2013)

II.3.1.2. Pétiole :

Le pétiole désigne la pièce foliaire et relie le limbe à la tige. Il est glabre, non ailé, et sans poils (Ubarrechena et *al.*, 2013)

II.3.1.3. Rachis :

Le rachis est terminé par une unique foliole, sans aile (Ubarrechena et *al.*, 2013)

II.3.1.4.L'inflorescence :

L'inflorescence femelle est pyramidale dense, elle mesure de 15-20 cm, de couleur rouge vif, à l'extrémité des rameaux de 1 an. Elle apparait d'Avril à Juin.

Le panicule mâle est brunâtres, mesure jusqu'à 10 cm, (Ubarrechena et *al.*, 2013)

II.3.2. les fleurs :

les fleurs sont en grappes composées, latérales, naissant sur les jeunes rameaux de l'année précédente, [(Fritsch ,1983) ;(Laurent L.,1938) ;(Lequay , 2006)].

Selon Ubarrechena et *al.*(2013), tous les pistachiers sont dioïques ce qui signifie qu'il faut des pied mâles à proximité pour obtenir des fruits sur le pied femelle. La floraison a lieu du printemps (Mai à Juin), la pollinisation est anémogame.

II.3.2.1.Les fleurs mâles :

Les fleurs mâles sont, constituées de 5 sépales réguliers, comportant 1 ou 2 rangs de 5 étamines (Ubarrechena et *al.*, 2013)

II.3.2.2.Les fleurs femelles :

Les fleurs femelles ont un ovaire supère muni de 5 carpelles soudés (Ubarrechena et *al.*, 2013)

II.3.3.fruit :

Le fruit est ovoïde, apicule , et assez petit, il est subglobuleux (Raphael et Jadwiga ,2010) ,Fruits charnus de 5 à 7 mm, en grappes serrées roses,(Figure 04)



Figure 04 :Fruit de *Pistacia térébinthus*

rouges puis brunes, à forte odeur de résine ,Ce fruit sont des drupes généralement comestibles contenant des noyaux riches en lipides (Ubarrechena et *al.*, 2013)

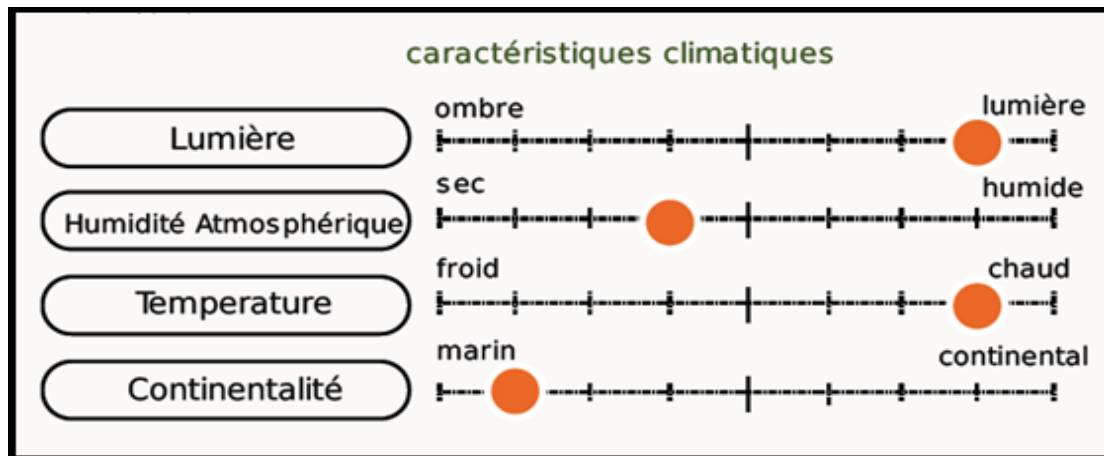
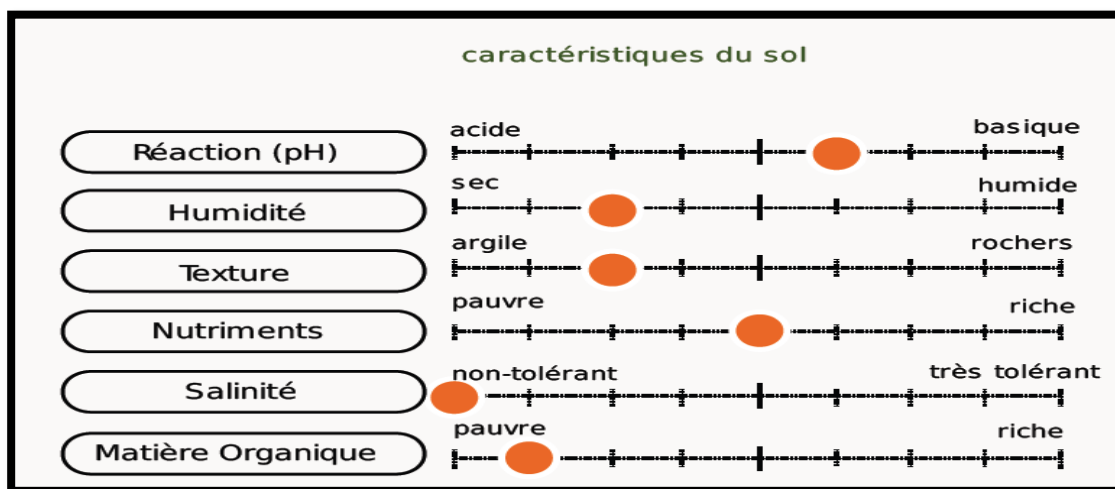
II.4.Caractéristiques écologiques et climatique de *Pistacia térébinthus* :

Le *P.térébinthus* tolère la plupart des sols à condition qu'ils soient bien drainés.Il supporte également un peu de calcaire.Il est surtout présent dans le Midi,jusqu'à500 mètres d'altitude .Il se trouve dans les maquis et garrigues,en général sur sol secs et calcaires. Il reste à l'état sauvage en France.dans la zone méditerranéenne.Il est moins résistant à la sécheresse.Il est caractérisé par sa haute teneur en tanins et résines (Reig-arminana et *al.*,2004).

II.4.1.Exigence pedo-climatique :

Le *P.terebinthus* aime le sol à [pH] basique, l'humidité doit être moyenne, il préfère le sol à texture argileuse, riche en nutriments, et pauvre en matière organique, il est très sensible à la salinité. Quant aux caractéristiques climatiques, il est plus exigeant en lumière, un peu d'humidité atmosphérique, et une forte température, son continentalité est marin (Tableau 01)

Tableau 01 : Exigences Pédoclimatiques du *P.terebinthus*. (Julve, 2014)



II.5.Utilisation et intérêt :

Le *P. terebinthus* est caractérisé par sa haute teneur en tanins et résines, particulièrement en monoterpènes, sesquiterpènes et mono- terpénols. Sa richesse en terpènes, fait qu'il est utilisé dans la production d'essence de térébenthine (Garcia ,2008).

La graine du Pistachier térébinthe fournit l'huile de térébenthine qui est comestible, et utilisée en friction ou inhalation voire en cuisine qui sert de condiment dans le sud du maghreb.Ses feuilles soignent les brûlures, sa résine est un antiseptique. En médecine, elles sont utilisée dans les cas de bronchites, car elles réduisent les problèmes d'asthme ou d'infection urinaire (Ubarrechena et *al.*, 2013).La résine soigne aussi l' ulcère d'estomac , ainsi que certaines formes de cancer(Andrikopoulos ,2003). Elle sert aussi à la fabrication de vernis et de friandises (Gattefosse ,1921).

De mêmes plusieurs études sur les activités médicinales du pistachier térébinthe ont montré que les huiles essentielle (Duru et al 2003 ;Belloni ,2005) les extraits aqueux (Kordali et *al.*,2005) et quelques triterpènes(Kivçak et Akay,2005), présentent des activités anti-inflammatoire,antifongique,anti-hypertensive,antirhumatisme et anticancérogène [(Belloni,2005) ;(Kordali et *al.*,2003) ;(Kivçak et Akay,2005)et (Giner-larza ,2001)]. Mélangées à d'autres plantes aromatiques, les parties aériennes du pistachier térébinthe, servent à la préparation de tisanes médicinales « zaatar » (Flamini et *al.*,2004).

Son bois dur est utilisé en ébénisterie et en marqueterie pour réaliser des ornements. Il est d'un blanc jaunâtre, parfois mêlé de teintes verdâtres ou rougeâtres. Âgé, il brunit. (Rameau et *al.*,2008).

En France, pour utiliser le *Pistacia terebinthus* comme porte-greffe il faut patienter 2-3 ans après son semis pour le greffer.

Introduit aux États-Unis en 1854, il est utilisé comme porte-greffe pour le pistachier vrai, car il résiste mieux au phytophthora (Amigues,2010).

Le térébinthe produit une oléorésine par les fissures de son écorce. Cette résine se solidifie à l'air (Amigues,2010).

Dans l'Antiquité, on disait d'elle « La meilleure [résine] est celle du térébinthe, consistante, d'un parfum on ne peut trouver plus agréable et subtil, mais d'un rendement faible » (Amigues , 2010).

L'écorce est brûlée comme Ombre (Gattefosse ,1921).

On extrait des galles une substance rouge utilisée pour teindre les laines (Rameau et *al.*,2008).

Sa gomme a été autrefois distillée pour produire de l'essence de térébenthine, très bon solvant des graisses, des huiles et des cires, (Vallorani et *al.*, 2012).

Des étude archéologiques menées en Turquie ont montré que les fruits du *Pistacia térébinthus* étaient utilisés comme aliments il y a 9000 ans.Des autochtones continuaient, il n'y pas si longtemps,à les consommer en tant que stimulant de l'appétit[(Ozcan,2004 ;Aydin et Ozcan,2002)]

II.6.Caractérisation des huiles essentielles du *Pistacia térébinthus*.

Fernandez et *al.*,(1998), ont extrait par hydrodistillation l'huile essentielle des parties aériennes récoltées dans la province de Jaén, en Espagne. Ils ont obtenu un rendement de 0.38 %. Cette huile essentielle est caractérisée par la prédominance du (E)- β -ocimène (15.0%),L' α -pinène (7.9%) et un sesquiterpène non identifié 17.7%.

Usai et *al.*,(2006) ont étudié les huiles essentielles des feuilles, des rameaux et des fruits récoltés en Sardaigne (Italie). Les rendements varient de 0.01 % pour les feuilles à 1.5 % pour les fruits. Les composés majoritaires décrits dans huiles essentielles des feuilles sont l' α -pinène (16.4%), le β -pinène (13.5%), l' α -terpinéol 8%.L'essence des rameaux est dominée par l' α -pinène(66.0%) et α -terpinéol (9%),l'huile essentielle des fruits se caractérise par la prédominance de l' α - et β -pinène avec respectivement (54.8%)

Les feuilles et les fruits sont hydrodistillés dans un appareil de type clewenger pendant 3 heures. Les rendements obtenus sont de 0.09 % en moyenne, pour les feuilles, et de 0.25 et 0.40 % pour les fruits. Le fruit donne environ deux fois plus d'huile que les feuilles, ce résultat confirme les données de la littérature, Usai et *al.* ;(2006). ont obtenu 0.01 % pour les feuilles et 1.5% pour les fruits.

II.7. Les maladies :

La galle du pistachier térébinthe est provoquée par les pucerons qui amènent la feuille à subir une déformation pour contenir les œufs de son parasite. Les galles les plus courantes sur cette espèce sont causées par les pucerons *Forda marginata*, *Forda formicaria* et *Baizongia pistaciae* (Dauphin et Aniotbéhère, 1997).

Chapitre II : Multiplication de *Pistacia terebinthus*

Le pistachier se multiplie par semis, par bouturage et par greffage (Cornu et Boulay,1986).

I-Multiplication par voie sexuée :

L'obtention de plants à partir de semis est difficile pour *P. terebinthus*, car l'endocarpe est imperméable. Il faut le scarifier, mécaniquement ou chimiquement, pour faciliter la germination. Pour la plupart des autres espèces du genre *Pistacia*, la germination est généralement aisée, bien qu'elle soit très liée à la provenance des semences (arbres producteurs) et de la qualité : bonne fécondation et récolte de l'année [(Vargas, 1985 ; Sainz de Omeñaca *et al.*, 1990)].

Le pistachier térébinthe se sème au printemps. Avant le semis, il faut

- Eliminer le mésocarpe des fruits (partie charnue) puis sécher les coques.
- Stratifier ces graines pendant 1 ou 2 mois à 4 °C.
- Scarifier les graines, avant de les enterrer, recouvrir de 10 cm de sable dans une terrine de 25 cm de profondeur, qu'on place à 20-25 °C, jusqu'à la levée. Le taux de germination est de 20 %.
- Repiquez rapidement en pleine terre ou en pot profond avant d'effectuer un greffage.

I-1-Germination :

Le taux de germination sont différents selon les espèces du genre *Pistacia*. Ainsi *P. terebinthus* germe, difficilement. Le pourcentage de germination varie selon le pied-mère ayant produit ces semences, ce qui permet de faire une sélection très efficace au sein des populations de *P. terebinthus*. Par contre, les semences de *P. vera* et *P. atlantica* germent, en général très bien, après une stratification au froid humide (2-4°C) pendant 2 mois, et si elles sont ultérieurement placées à des températures supérieures à 20°C [(Frutos et Barone, 1988); (Vargas *et al.*, 1989)].

I-1-1-Essais de germination

Toutes les semences utilisées pour ces essais étaient bien fécondées, de la récolte de l'année et sans défauts apparents. Le mésocarpe était éliminé car il est, en effet, considéré comme un inhibiteur de la germination [(Withhouse, 1957) ; (Ayfer et Serr, 1961) ; (Sainz de Omeñaca *et al.*, 1990)]. Les semences ont subi une scarification, habituellement mécanique mais qui peut être aussi chimique, à l'aide de l'acide sulfurique ou de la soude caustique [(Crane et Forde, 1974) ; (Romero *et al.*, 1988) ; (Caruso et de michele, 1987) ; (Avanzato et Cherubini, 1922) ; (Rouskas, 1996)].

La température après stratification humide a été maintenue supérieure à 20 °C, afin de permettre une germination rapide (Joley et Opitz, 1971). Il faut noter que la stratification, en Grèce, des semences de tsikoudia, se fait autour des 4°C pendant 40 jours, ce qui permet d'éliminer la dormance des embryons. Le traitement étant suivi par une mise en germination à 22°C (Rouskas, 1996).

I-2-Amélioration de la germination :

La germination des semences de *P. terebinthus* est améliorée par un pré-traitement de scarification chimique avec de l'acide sulfurique concentré [(Crane et Forde, 1974 ; Aletà et Ninot, 1996)]. L'influence de la provenance des semences, surtout pour cette espèce si peu sélectionnée, est l'effet le plus net enregistré sur le pourcentage de germination. Le trempage dans l'acide sulfurique permet une amélioration de la germination, qui atteint son maximum à une durée de trempage de 10 minutes, (Figure 05) d'après les résultats de l'ISF, et de 2 heures d'après ceux de l'IRTA. mais Il faut cependant être prudent avec la scarification chimique, qui peut conduire à un éclatement artificiel des semences lesquelles, après traitement, ne seront pas capables de germer.

Ce phénomène, déjà remarqué par Crane et Forde (1974), se produit clairement après 1 heure de trempage dans l'acide sulfurique concentré. La scarification chimique facilite la

pénétration de l'eau au travers l'endocarpe ligneux, mais elle n'élimine pas la dormance des embryons, d'autre part, la présence de cet agent acidifiant, dans le milieu humide de germination, favorise l'apparition à 20°C de champignons qui endommagent les semis (Aletà et Ninot, 1996).

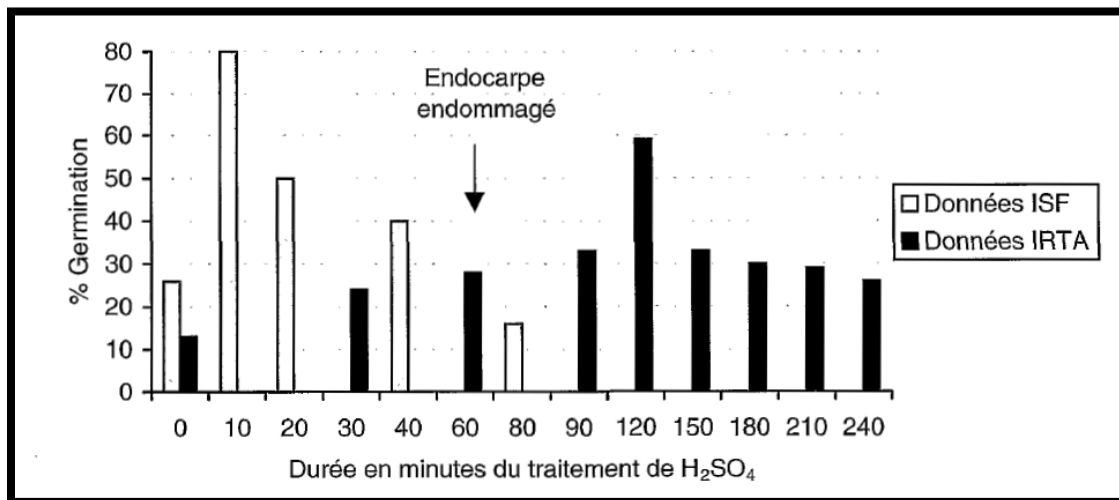


Figure 05 : Influence du pré-traitement à l'acide sulfurique concentré sur le pourcentage de germination de *P. terebinthus* (Aletà et al., 1997)

II-Multiplication par voie asexuée :

La multiplication végétative est la technique de production de nouvelles plantes à partir des parties végétatives. Dans 100% des cas, la nouvelle plante est identique à la plante-mère, à partir d'un organe (tige, racine, feuille . . .), d'un tissu ou d'une cellule. Elle est, depuis des siècles, largement utilisée pour reproduire de nombreuses espèces en horticulture, et en arboriculture (Cornu et Boulay, 1986).

Il existe différentes méthodes de multiplication végétative: le bouturage, le marcottage

et le greffage (Tchoundjeu, et al., 2008).

II-1-bouturage :

Technique traditionnelle en horticulture, elle est utilisée dans les programmes d'amélioration et de multiplication de nombreuses espèces forestières (Cornu et Boulay,1986)

Le bouturage est une forme de multiplication végétative de certaines plantes consistant selon Tchoundjeu et *al.*, (2008) à donner naissance à un nouvel individu à partir d'un organe ou d'un fragment d'organe isolé. c'est un clonage : la bouture est génétiquement identique à la plante-mère. Elle se fait par dédifférenciation cellulaire au niveau du méristème et peut être naturel ou artificiellement provoquée (Levichev et Martin Schnittler., 2012).

Le bouturage du *P.térébinthus*, est pratique en juillet, à l'aide de bouture herbacé.

II-2-Micro-propagation :

La multiplication végétative par culture *in-vitro* ou micropropagation présente plusieurs avantages sur les méthodes classiques dites " conventionnelles "de propagation. Cette technique a rendu possible la multiplication d'espèces chez lesquelles les semences sont rares, ou présentant des difficultés de germination et/ou dont les techniques de bouturage ou de greffage sont inapplicables, ce qui a conduit à une plus grande diversité des plantes commercialisées [(Ferry et *al.*,1998; Semal,1998).].

De même plusieurs autres techniques, toutes dérivées de la culture *in-vitro* ,ont un rôle important à jouer dans l'amélioration des performances agronomiques ou horticoles des plantes cultivées. La micropropagation est utilisée dans un but de multiplication en masse , puisqu'elle permet , en partant d'un seul individu (plant), l'obtention d'un nombre considérable de plantes génétiquement identiques à la plante mère [(Ferry et *al.*,1998; Semal,1998).] les plants reproduits ne sont pas seulement conformes mais présentent aussi une grande uniformité.

Par ailleurs, l'usage de cette technique nécessite peu d'espace et peu être programmé indépendamment des saisons. La technique représente donc sans contexte un outil puissant aux perspectives industrielles et économiques importantes [(Margara,1982); (Boxus,1995); (Semal,1998); (Skirvin et *al.*, 2000)].

Les techniques de micropropagation empruntent essentiellement deux voies,

-L'une qui utilise des tissus méristématiques (méristème ou apex de tige, bourgeons axillaires) potentiellement capable de donner suite, au développement normal, d'un individu, appelée microbouturage (Saadi,1991). Cette technique est souvent appelée "multiplication conforme" car elle part de méristème préexistant dans lesquels , les cellules sont génétiquement très stables ,l'individu est généralement obtenu en deux étapes successives, d'abord la production de tige ,puis son enracinement (Amato,1977 in Boxus,1995).

-L'autre voie, utilise toute sorte de tissus différenciés (fragments de tige, de racines, de pétiole, de feuilles, d'embryons matures et immatures, d'hypocotyles, cotylédons...etc) pour aboutir à la néoformation soit de bourgeons ou de racines, (c'est l'organogenèse), soit de structures ressemblant aux embryons zygotiques, c'est l'embryogenèse somatique (Zryd,1988 et Margara,1989).

II-2-1- Organogenèse :

L'organogenèse est la base fondamentale de la multiplication végétative, laquelle s'appuie toujours sur la formation de méristèmes nouveaux (Margara,1989). En partant d'un explant, elle aboutit à la formation d'un nouvel individu par l'élaboration de bourgeons (caulogenèse) et de racine (rhizogenèse).

II-2-2-Caulogenèse :

La caulogenèse désigne à la fois l'initiation et le développement des bourgeons terminaux, axillaires, adventifs ou néoformés sur une cal.

Les bourgeons terminaux dérivent de la gemmule de l'embryon.

Les bourgeons axillaires sont produits généralement par les deux ou trois assises cellulaires superficielles de la tige.

Les bourgeons adventifs sont formés en des endroits inhabituels. Ils sont formés à partir d'organes différenciés de la plante (entre-noueds, tubercules, racines).Ils peuvent avoir pour

origine des massifs cellulaires restés méristématiques ou bien provenir d'une différenciation de certaines cellules (Camefort, 1977).

Les bourgeons néoformés *in-vitro* peuvent apparaître sur l'explant initial ou sur une cal, ils peuvent être considérés comme un cas particulier de bourgeons adventifs (Boxus, 1995). Ils sont induits sur n'importe quel type d'organe ou de tissu y compris sur ceux qui ne les produisent pas dans les conditions naturelles [(Camefort, 1977); (Zryd, 1988); (Margara, 1989)].

II-2-3-Rhizogenèse :

La rhizogenèse désigne la néoformation et la croissance de la racine. Les méristèmes de racine se répartissent en plusieurs catégories selon leurs origines (Camefort, 1977).

Les racines latérales se forment de manière spontanée sur la racine principale dans les conditions naturelles.

Les racines adventives sont produites par des organes divers, soit spontanément, soit accidentellement à la suite d'une blessure ou d'une manière provoquée, dans les conditions du bouturage et du marcottage(Boxus, 1995).

Les racines néoformées, au sein d'une cal, en culture « *in-vitro* », peuvent être considérées comme un cas particulier de méristèmes adventifs (rhizogenèse indirecte) ou l'émission de racines sur un explant dans des endroits inhabituelles (rhizogenèse directe) (Camefort, 1977).

III-Milieu de cultures

Un milieu de culture s'élabore au moyen d'éléments minéraux majeurs (macro-élément) et d'éléments mineurs (micro-éléments),toutefois, d'autres substances doivent donc venir en complément de la solution minérale ; il s'agit des vitamines, de la source de carbone et des régulateurs de croissance, indispensables à l'entrée en croissance ou à la différenciation d'organes mis en culture(Auge et al ; 1989).

IV- Les régulateurs de croissances :

Les régulateurs naturels de croissances des végétaux, appelés souvent hormones de croissance, se répartissent actuellement en cinq groupes : auxines, cytokinines gibbérellines, acides abscissiques, éthylènes selon Margara,(1989). Les facteurs de croissance dont 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'a partir de 1939, après la découverte des facteurs de croissance et notamment des auxines ces dernières participent à la croissances en augmentant le nombre de cellules et provoquent l'élongation cellulaire. Les cytokinines y sont impliquées en augmentant le nombre de cellules ; ceci ce fait en fonction de l'équilibre auxines /cytokinines qui détermine l'organogenèse (Tourte et *al.*,2005).

V-Intérêt de la culture *in vitro* :

La technique *in vitro* est un mode de multiplication végétative artificielle des plantes. Il s'agit d'un ensemble de méthodes faisant intervenir d'une part l'asepsie (stérilisation du matériel, désinfection des explants) : et d'autre part des conditions de culture parfaitement contrôlées (milieux de culture définis pour chaque type de plante, température, lumière, humidité,...). Ces méthodes s'appliquent à des organes ou à des fragments d'organes : les explants (Sibi, 1981).

L'explant doit trouver dans le milieu de culture tout ce dont il a besoin pour survivre, se multiplier et éventuellement régénérer un nouvel individu, en fait, tout ce que la plante mère peut fournir :

- a) par les racines : les éléments minéraux, l'eau ;
- b) par les feuilles et grâce à la photosynthèse : des sucres, des vitamines et des acides aminés ;
- c) les hormones, pour orienter la formation des organes (Lê et *al.*, 2002).

La culture *in vitro* permet :

- l'obtention de clones sélectionnés pour leur vigueur, leur caractères intéressants,leur rareté .

- L'amélioration des conditions sanitaires par les techniques de cultures in vitro souvent associées à l'éradication des viroses l'assainissement des végétaux (Sibi,1981)

- la production rapide et en masse, à n'importe quel moment de l'année ,et l'augmentation de diffusion cellulaire par ces techniques [(Smith *et al.*,1985) ; (Collet et LÊ, 1988)].

- le raccourcissement des cycles de développement ;

- la diminution des coûts de production (peu de personnel) et des dépenses énergétiques (réduction des surfaces de culture et éclairage réduit) ;

- la facilité de stockage et conservation (au froid) de millions de plantes sur de très petites surfaces, à l'état sain et à l'abri des contaminations et faire une banque de génotypes et réaliser ainsi des plantations hors la période de croissance (Lê et *al.*, 2002).

- le rajeunissement d'un végétal.

- la facilité de leur transport d'une région à l'autre ou d'un pays à l'autre;

- la production de substances biochimiques intéressantes pour l'industrie, les secteurs alimentaires et pharmaceutiques

- La propagation végétative, des espèces qui ne présentent pas ces capacités en conditions classiques (Sibi, 1981).

VI. Intérêt de l'introduction "in-vitro" de pistachier térébinthe:

Le pistachier térébinthe est une plante médicinale intéressante, on l'utilise pour extraire l'huile essentielle de térébinthe, et la résine la plus utilisée en médecine (comme qu'antiseptique et contre les maladies respiratoires comme la bronchite). Pour extraire une bonne quantité d'huile, on a besoin d'une grande quantité de térébinthe. Les surfaces de la culture restent limitées en Algérie, et sa multiplication sexuée est plus difficile vu la dormance des graines. Pour mettre à la disposition des utilisateurs de l'huile et de la résine, il faut de grande quantité du végétale. Le prélèvement sur terrain pourrait porter atteinte à l'espèce, ceci menacerait, même son existence. C'est pour éviter que l'espèce ne soit menacée et même

exterminée, nous nous sommes proposées, de l'introduire en culture in-vitro, a fin de produire des masses importante de végétale, qui serviraient à l'extraction des ces huiles et du résine, sans porter atteinte à la nature.

VI. Les travaux sur pistachier térébinthe :

Des essais de germination ont été réalisés sur plusieurs espèces susceptibles d'être utilisées comme porte-greffes : *P. atlantica*, *P. integerrima*, *P. palestina*, *P. terebinthus* et *P. vera*. Les partenaires engagés dans ce type de travaux ont été Mas Bové (Espagne), le NAGREF de Lamia (Grèce), l'ISF de Rome (Italie) et l'EAN d'Oeiras (Portugal).

Dans la multiplication végétative par bouture herbacée, les espèces utilisées ont été *P. atlantica*, *P. integerrima* et *P. terebinthus*. Les pied-mères ont été étiolés avant prélèvement des boutures. Les boutures semi-ligneuses ont été trempées dans une solution d'acide indolbutyrique (AIB) ,et enracinées sous brouillard. Ces travaux ont été réalisés à l'ISF de Rome, (Aletà et *al.*, 1997)

I-lieu de l'expérimentation :

L'expérimentation a été réalisée au Laboratoire d'Amélioration des Plantes au Département de Biotechnologies de l'Université de Blida 1.

II-Matériel végétal :

Nous avons utilisé des feuilles, des nœuds, des apex, et des graines du pistachier térébinthe récoltés sur un pied (sur un arbre), se trouvant à l'intérieur du Département de Biotechnologies de Blida 1.

La germination des semences de pistachier térébinthe a subi un prétraitement de scarification chimique avec de l'acide sulfurique concentré.

Nous avons trempé les graines dans l'acide sulfurique concentré pendant 30 minutes, puis nous avons rincé avec l'eau distillée, ces graines sont immergées dans l'eau distillée pendant 24 heures, pour éliminer l'épicarpe (inhibition tégumentaire).

Le non développement de la plantule de la graine entière est dû à la présence du tégument. En effet, il induit la dormance des graines par la présence de polyphénol ce qui empêche la germination. En revanche, l'association entre l'embryon et les cotylédons a permis le développement de la plantule d'une part en raison de l'absence d'induction de dormance et d'autre part la présence des cotylédons qui sont une source d'énergie.

Le prélèvement des nœuds, des feuilles, et des apex, est fait à l'extrémité supérieure de l'arbre, afin de prendre les parties juvéniles uniquement. Le prélèvement a eu lieu de mois de décembre 2014 au mois de mai 2015.

II-1 Désinfection du matériel végétal :

Selon Zryd et *al.*, (1988), il est impératif de trouver un compromis entre les exigences d'une bonne stérilisation complète et le souci de préserver l'intégrité du tissu végétal.

Nous avons utilisé comme substance désinfectante ; l'hypochlorite de calcium car il ne pénètre pratiquement pas dans les tissus, donc il préserve leur intégrité en plus c'est un produit peu stable en solution aqueuse (Auge et *al.*, 1989)

Avant d'être désinfectées, on à rincé le matériel végétal à l'eau de robinet puis avec l'eau distillée stérile pour éliminer les poussières et les micro-organismes.

La désinfection des explants est réalisée selon deux protocoles:

II.1.1. 1^{er} essai de désinfection :

La désinfection des nœuds, des feuilles, des apex, et des graines a commencé par un trempage du matériel végétal dans de l'éthanol (70%) pendant 20 secondes, puis rinçage une fois avec de l'eau distillée stérile, puis un trempage dans une solution d'hypochlorite de calcium à différentes concentrations pendant différents temps de trempage ,sous agitation continue. Enfin, un rinçage dans l'eau distillée stérile est effectué pour éliminer tous les traces des produits utilisés.(Tableau 02)

Tableau 02 : Différentes désinfections du matériel végétal du 1^{er}essais:

Désinfectant utilisé	Concentration ou pourcentage	Durée de trempage	Rinçage à l'eau distillée stérilisée
Ethanol	70%	20 secondes	Une fois
Hypochlorite de calcium Ca(ClO) ₂	8%	15 min	Une fois
		20 min	Une fois
		25 min	Une fois
	10%	15 min	Une fois
		20 min	Une fois
		25 min	Une fois

II.1.2. 2^{ème} essai de désinfection :

La désinfection des nœuds, des feuilles, apex, et les graines est réalisée sous hotte à flux laminaire. Le protocole de désinfection a commencé par un trempage du matériel végétal dans une fongicide (Metomyl), puis trempé dans l'acide ascorbique, et suivi par l'éthanol à 95%.l'immersion, pendant différents temps, dans une solution d'hypochlorite de calcium à différentes concentrations, sous agitation continue. Enfin,un rinçage avec l'eau distillée stérile est effectués pour éliminer tous les produits utilisés,(Tableau 03).

Tableau 03 : Différentes désinfections du matériel végétal du 2^{ème} essai:

désinfectant utilisé	Concentration ou pourcentage	Durée de trempage	Rinçage à l'eau distillée stérilisée
Fongicide (Metomyl)	0.5g /l	15 minutes	
	5g /l		
Acide ascorbique	0.2g/l	1heurs	
	1g/l		
Éthanol	(95%)	20 secondes	
		25 secondes	
hypochlorite de calcium Ca(ClO) ₂	8%	15, 20,25 min	Une fois
	10%	15, 20,,25 min	
	15%	15, 20,25 min	

Pour les feuilles, en plus de deuxième essai, nous avons utilisé la désinfection par l'hypochlorite de calcium à des concentrations différentes moins élevées que les micro-boutures et les graines, (Tableau 04) avec un seul rinçage à l'eau distillée stérilisée.

Tableau 04 : Désinfection des feuilles

	Concentration	Temps de trempage (mn)
L'hypochlorite de calcium	1%	4, 6, 8
	2%	4, 8, 6
	3%	4, 6, 8

II.2.Traitement antioxydant :

Les ligneux en général et notamment le pistachier térébinthe, sont caractérisés par la sécrétion des phénols dans le milieu de culture. Au cours des premiers essais de propagation *in vitro* du pistachier de l'Atlas réalisés par Maroc (2000), beaucoup de difficultés ont été rencontrées dans la mise en culture des micro-boutures à cause de l'abondante sécrétion phénolique.

Dans le but d'éliminer ces phénols, Mestouri(2001), a testé plusieurs doses d'acide ascorbique et avec différents temps de trempage. Ces essais ont été réalisés sur des micro-boutures ligneuses, semi-ligneuses et herbacées.

Le meilleur résultat a été obtenu avec les micro-boutures herbacées, et le trempage dans différents concentrations d'acide ascorbique pendant 1heures, avant la désinfection et dans le même but aussi il a additionné 0.1g/l et 0,2g/l d'acide ascorbique dans le milieu de culture. Selon la concentration et le mode d'emploi utilisé, on dénombre quatre types de traitements (Tableau 05).

Tableau 05 : Différents traitements anti –oxydants utilisé.

Traitements anti - oxydants	T ₀	T ₁	T ₂	T ₃	T ₄
Trempage dans la solution d'acide ascorbique à :	0	0.2 g.l ⁻¹	1 g.l ⁻¹	5 g.l ⁻¹	3 g.l ⁻¹
Durée de trempage	0	60 mn	60 mn	60 mn	60 mn
Acide ascorbique contenu dans le milieu de culture	0	0.1 g.l ⁻¹	0.1 g.l ⁻¹	0.2 g.l ⁻¹	0.2 g.l ⁻¹

III-Milieus de cultures utilisées

Trois milieux de culture de base ont été testés pour une meilleure croissance du matériel végétal (âgé , vitro semis).il s'agit du milieu Murachige et Skoog (1962) noté (MS) et le milieu de Murachige et Skoog (1962) dilué au demi,noté (MS/2) et le milieu de Gomborg .

L'ajustement du pH aux valeurs situées entre 5.6 et 5.8 se fait à l'aide d'une solution de NaOH ou à l'aide d'une solution de Hcl.

Les milieux de culture sont distribués dans des tubes en verre à raison de 20 ml par tube.

Tous les milieux de cultures sont stérilisés à l'autoclave à une température de 120°C et à une pression de 1 bar pendant 20 mn.

- Milieu de culture de Murachige et Skoog (1962) noté MS .
- Macroéléments de MS, (annexe 1)

- Microéléments de MS, (annexe 2)
 - Na₂EDTA 37,25mg/l.
 - FeSO₄ 7H₂O 27,85mg/l.
 - Saccharose 30 g/l.
 - Gélose (Agar-agar) 8 g/l.
 - Acide ascorbique 0.1 g/l.
- Milieu de culture de Gomborg noté G (annexe 2)
 - ✓ Macroéléments de G, (annexe 3)
 - ✓ Microéléments de G, (annexe 4)
 - ✓ Na₂EDTA 37,25mg/l.
 - ✓ FeSO₄ 7H₂O 27,85mg/l.
 - ✓ Saccharose 30 g/l.
 - ✓ Gélose (Agar-agar) 8 g/l.
 - ✓ Acide ascorbique 0.1 g/l.
 - Milieu de culture de Murachige et Skoog dilué au demi,noté MS/2 .
 - Macroéléments de MS/2, (annexe 1)
 - Microéléments de MS, (annexe 2)
 - Na₂EDTA 37,25mg/l.
 - FeSO₄ 7H₂O 27,85mg/l.
 - Saccharose 30 g/l.
 - Gélose (Agar-agar) 8 g/l.
 - Acide ascorbique 0.1 g/l.
 - Pour le milieu de MS/2, ce sont les macro-éléments qui sont divisé par deux.

La nature, des sucres employés dans le milieu, apporte, elle aussi, sa part d'influence sur la caulogénèse. Le saccharose s'est montré lui aussi favorable à la caulogénèse. De nombreux auteurs rapportent l'action positive du saccharose sur la caulogénèse (Samyn,1995) ;(Simpson et Marks,1995) ;(Gribaudo et Restagno,1995).

IV. Traitement hormonaux :

Les principaux régulateurs de croissance utilisés sont :

*pour les cytokinines.

- benzyladenine (BA)

*pour les auxines.

-l'acide indol acétique (AIA)

-l'acide indol butyrique (AIB)

L'effet de la composition hormonale intervient à la fois dans l'obtention des bourgeons néoformés et aussi dans l'enracinement des tiges régénérées [(Walker et al.,1979) ;(Margara,1989)].

Ils sont utilisés combinés et ceci afin de tester les réponses morphologique du matériel végétal mis en culture, (Tableau 06).

Tableau 06: Différente traitement d'hormonaux utilisés.

Traitement hormonaux	AIA	BA	AIB
T0	0 mg/l	0 mg/l	
T1	0.2 mg/l	0.4 mg/l	
T2	0.2 mg/l	0.6 mg/l	
T3	0.4 mg/l	0.8 mg/l	
T4		0.4 mg/l	0.2 mg/l
T5		0.6 mg/l	0.4 mg/l
T6		0.8 mg/l	0.6 mg/l

V-Mise en culture :

En première étape : après la désinfection des nœuds, des feuilles, et des apex, la mise en culture se fait au niveau de la hotte à flux laminaire et devant un bec bunsen. Avant cette étape, on a fragmenté les boutures en micro-bouture de 1 à 2 cm environ d'hauteur comprenant un ou deux bourgeons axillaires. Selon la longueur des nœuds, le matériel végétal est placé dans un tube à essais, contenant 20 ml de milieu de culture.

Les micro-boutures, et les feuilles sont transférées sur des milieux de culture solides.

En deuxième étape : avant de désinfecter les graines, on a retiré quelques embryons de la graine. On a placé les grains et les embryons dans les tubes à essais, contenant 20ml de milieu de culture.

VI-Condition de culture :

Les vitro-semis ainsi que les micro-boutures sont maintenus dans un phytotron avec des conditions contrôlables et bien précises de lumière et de température :

-Une photopériode de 16 heures de lumière et 8 heures de d'obscurité, est utilisée pour éviter la libération des phénols, nous avons utilisé l'obscurité, pendant notre essai.

-Une température de 24 ± 1 , pendant toute la période de notre essai est gardée.

I. Contamination :

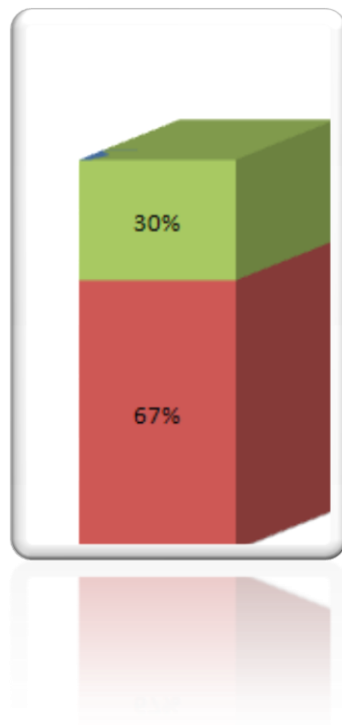
Malgré la désinfection du matériel végétal avec l'Ethanol, hypochlorite, fongicide, acide ascorbique et l'eau stérile le taux de contamination était très élevé.

Durant notre travail, nous nous sommes trouvées face à deux sortes de contamination : bactérienne et cryptogamique. C'est à partir des observations qu'on peut détecter le type de contamination. Lors de la contamination du milieu par un micro-organisme, comme par exemple un champignon, on observe alors une compétition entre le champignon et la plante avec un envahissement plus important des champignons qui possèdent un cycle cellulaire plus court.

Dans certains tubes, nous avons observé le développement d'un mycélium qui a une texture feutrée de couleur grisâtre ou blanchâtre, il s'agit de contaminations cryptogamiques.

Dans d'autres tubes, nous avons observé le développement d'un voile d'aspect laiteux à l'intérieur et à la surface du milieu de culture. Ce voile est quelques fois coloré en jaune ou en rose, dans ce cas, il s'agit de contaminations bactériennes.

Au début de notre travail (désinfection sans fongicide et vitamine C), on a constaté que le taux de contamination pour les champignons est arrivé à 67 % et pour les bactéries à 30% (Figure 06)



Taux de contamination par bactérie



Taux de contamination par champignon



Figure 6 : Taux de contamination par champignon et par bactérie.

II. Désinfection des micro-boutures :

Durant le premier essai de désinfection, on a remarqué que les micro-boutures ne déboussaient pas, car les contaminations, bactériennes et fongiques étaient importantes. Le taux de contamination par les champignons était très important.

Pour ces essais, nous n'avons pas utilisé le fongicide et l'acide ascorbique, nous pensons que l'absence du fongicide a favorisé le développement des champignons (Tableau 07)

Tableau n°7 : Taux de contamination des micro-boutures (1^{er} essais de désinfection)-1^{ere} étude expérimental :

Essais	désinfection utilisées	Taux de contamination
Essai n°1	Éthanol 70% (20min) Hypochlorites 8%(15min)	55.46%
Essai n°2	Éthanol 70% (20min) Hypochlorites 8%(20min)	30.49%
Essai n°3	Éthanol 70% (20min) Hypochlorites 8%(25min)	10.45%

-2^{eme} étude expérimental :

Essais	désinfection utilisées	Taux de contamination
Essai n°4	Éthanol 70% (20min) Hypochlorites 10%(15min)	43.96%
Essai n°5	Éthanol 70% (20min) Hypochlorites 10%(20min)	22.39%
Essai n°6	Éthanol 70% (20min) Hypochlorites 10%(25min)	20.45%

La comparaison entre les deux différentes désinfections utilisées dans le premier essai montre que le meilleur résultat est obtenu après l'augmentation de la concentration de l'hypochlorite de calcium à 10%. Le bon résultat est obtenu dans l'essai n°6.

Pour améliorer nos résultats, on a suivi un deuxième essai de désinfection, qui consiste à additionner un fongicide le Metomyl et de l'acide ascorbique pour éliminer la sécrétion des phénols. Les résultats obtenus sont supérieurs que le premier cas, car le taux de contamination a diminué.

Après plusieurs essais de désinfections, on a remarqué que le taux de contamination a diminué jusqu'à 0% (Tableau n°8). La sécrétion des phénols a diminué aussi.

Tableau n°8 : Taux de contamination des micro-boutures (2^{ème} essai de désinfection)

-1^{ère} étude expérimental :

Essais	désinfection utilisées	Taux de contamination
Essai n°1	Éthanol 70% (20min) , fongicide (15min), l'acide ascorbique(60min) , hypochlorites 8%(15min)	21.54%
Essai n°2	Éthanol 70% (20min) fongicide (15min), l'acide ascorbique(60min), hypochlorites 8%(20min)	18.25%
Essai n°3	Éthanol 70% (20min) fongicide (15min), l'acide ascorbique(60min), hypochlorites 8%(25min)	10.45%

-2^{ème} étude expérimental :

Essais	désinfection utilisées	Taux de contamination
Essai n°4	Éthanol 70% (20min) , fongicide (15min), l'acide ascorbique(60min) , hypochlorites 10%(15min)	8.13%
Essai n°5	Éthanol 70% (20min) fongicide (15min), l'acide ascorbique(60min), hypochlorites 10%(20min)	7.23%
Essai n°6	Éthanol 70% (20min) fongicide (15min), l'acide ascorbique(60min), hypochlorites 10%(25min)	6.96%

-3^{eme} étude expérimental :

Essais	désinfection utilisées	Taux de contamination
Essai n°7	Éthanol 70% (20min) , fongicide (15min),l'acide ascorbique(60min) , hypochlorites 15%(15min)	4.98%
Essai n°8	Éthanol 70% (20min) fongicide (15min), l'acide ascorbique (60min), hypochlorites 15%(20min)	2.15%
Essai n°9	Éthanol 70% (20min) fongicide (15min),l'acide ascorbique(60min), hypochlorites 15%(25min)	0%

La comparaison entre les deux différentes désinfections utilisées dans le premier essai montre que le meilleur résultat est obtenu après l'augmentation de la concentration de l'hypochlorite de calcium à 15%, et l'additionnement d'un fongicide. Le meilleur résultat est obtenu dans l'essai n°9 avec un taux de contamination nulle.

III. Désinfection des graines :

Pour les graines, on a utilisé un seule mode de désinfection, qui est le deuxième essai, dans ce cas, on a observée que les graines ne germent pas, et il ya un peu de contamination cryptogamiques (Tableau 09)

On a remarquée aussi l'absence des bactéries, et l'absence de sécrétions phénoliques, présenté dans la (figure 09).

Le nombre de graine étant limité, nous avons arrêté les essais sur l'utilisation de la semence.

Tableau n°9 : Taux de contamination des graines (2^{ème} essai de désinfection)-1^{ère} étude expérimental :

Essais	désinfection utilisées	Taux de contamination
Essai n°1	Éthanol 70% (20min) , fongicide (15min),l'acide ascorbique(60min) , hypochlorites 8%(15min)	30.48%
Essai n°2	Éthanol 70% (20min) fongicide (15min), l'acide ascorbique(60min), hypochlorites 8%(20min)	22.35%
Essai n°3	Éthanol 70% (20min) fongicide (15min),l'acide ascorbique(60min), hypochlorites 8%(25min)	19.23%

-2^{ème} étude expérimental :

Essais	désinfection utilisées	Taux de contamination
Essai n°4	Éthanol 70% (20min) , fongicide (15min),l'acide ascorbique(60min) , hypochlorites 10%(15min)	17.15%
Essai n°5	Éthanol 70% (20min) fongicide (15min), l'acide ascorbique(60min), hypochlorites 10%(20min)	15.68.56%
Essai n°6	Éthanol 70% (20min) fongicide (15min),l'acide ascorbique(60min), hypochlorites 10%(25min)	9.96 %

-3^{ème} étude expérimental :

Essais	désinfection utilisées	Taux de contamination
Essai n°7	Éthanol 70% (20min) , fongicide (15min),l'acide ascorbique(60min) , hypochlorites 15%(15min)	3.83%
Essai n°8	Éthanol 70% (20min) fongicide (15min), l'acide ascorbique (60min), hypochlorites 15%(20min)	2.45%
Essai n°9	Éthanol 70% (20min) fongicide (15min),l'acide ascorbique(60min), hypochlorites 15%(25min)	0%

Pour les graines la comparaison entre les résultats obtenus montre que la contamination est réduite avec l'augmentation de l'hypochlorite de calcium et après l'utilisation d'un fongicide.

IV. Scarification des graines :

L'explication que porte cette différence de germination des graines scarifiées et les graines entières, est justifiée par la dormance tégumentaire; c'est-à-dire l'écorce externe qui protège l'embryon. Cette dormance tégumentaire peut être éliminée par une scarification mécanique, sans risque de touché ou blessé l'embryon ou chimiquement par l'acide sulfurique concentré. Cette opération permet la pénétration de l'eau et le déclenchement du processus physiologique de germination, [(Berrie, 1985) ; (Hartmann et al, 1990) ; (Bani ameur, 1998)].

Pour les graines, on a utilisé un seule mode de désinfection, qui est le deuxième essai, dans ce cas, on a observée que les graines ne germent pas, et il ya un peu de contamination cryptogamiques, avec un taux de 9 % (Tableau 10)

Après l'application des déférentes concentrations de hypochlorite de calcium on a remarqué que le taux de contamination a diminué jusqu' à 0% (Tableau 10)

Tableau 10 : Taux de contamination des graines scarifiant (2^{eme} essai de désinfection)

	Concentration	Temps de trempage (mn)	% de contamination
L'hypochlorite de calcium	8%	20	9%
	15%	20	0%

Le nombre de graine étant limité, nous avons arrêté les essais sur l'utilisation de la semence.

Durant notre travail, nous avons remarqué que la scarification chimique, n'influe pas sur la germination des grains dans *in vitro*.

IV. Désinfection des feuilles :

Dans la première étape de désinfection, on a remarqué que les feuilles ne manifestaient aucune réaction.

Le taux de contamination aux champignons a atteint 10 %

Tableau n°11 : Taux de contamination des feuilles (1^{er} essais de désinfection)

-1^{ère} étude expérimental :

Essais	désinfection utilisées	Taux de contamination
Essai n°1	Éthanol 70% (20min) Hypochlorites 8%(15min)	45.1 6%
Essai n°2	Éthanol 70% (20min) Hypochlorites 8%(20min)	32.46%
Essai n°3	Éthanol 70% (20min) Hypochlorites 8%(25min)	20.95%

-2^{ème} étude expérimental :

Essais	désinfection utilisées	Taux de contamination
Essai n°4	Éthanol 70% (20min) Hypochlorites 10%(15min)	13.96%
Essai n°5	Éthanol 70% (20min) Hypochlorites 10%(20min)	10.39%
Essai n°6	Éthanol 70% (20min) Hypochlorites 10%(25min)	9.25%

Pour diminuer le taux de contamination, on a suivi le deuxième essai de désinfection, qui consiste à additionner un fongicide, le Metomyl et l'acide ascorbique, pour éliminer la

sécrétion de phénol. Les résultats obtenus sont meilleurs, ainsi le taux de contamination a baisse à 3.45%.

On a remarqué aussi, quelque, fois que les feuilles changeaient de couleur, et elles se nécroisaient.

Après plusieurs essais nous n'avons pas pu améliorer nos résultats, nous avons donc proposé de diminuer la concentration de l'hypochlorite de calcium.

Les contaminations ont atteint 0%, les feuilles vertes sont restées vertes, mais aucune réaction callogène n'a eu lieu (Tableau n°11)

Tableau n°12 : Taux de contamination des feuilles (2^{ème} essai de désinfection).

-1^{ère} étude expérimental :

Essais	désinfection utilisées	Taux de contamination
Essai n°1	Éthanol 70% (20min) , fongicide (15min),l'acide ascorbique(60min) , hypochlorites 1%(4min)	23.46%
Essai n°2	Éthanol 70% (20min) fongicide (15min), l'acide ascorbique(60min), hypochlorites 1%(6min)	13.49%
Essai n°3	Éthanol 70% (20min) fongicide (15min), l'acide ascorbique(60min), hypochlorites 1%(8min)	9.65%

-2^{ème} étude expérimental :

Essais	désinfection utilisées	Taux de contamination
Essai n°1	Éthanol 70% (20min) , fongicide (15min),l'acide ascorbique(60min) , hypochlorites 2%(4min)	7.56%
Essai n°2	Éthanol 70% (20min) fongicide (15min), l'acide ascorbique(60min), hypochlorites 2%(6min)	5.29%
Essai n°3	Éthanol 70% (20min) fongicide (15min),l'acide ascorbique(60min), hypochlorites 2%(8min)	3.45%

-3^{ème} étude expérimental :

Essais	désinfection utilisées	Taux de contamination
Essai n°1	Éthanol 70% (20min) , fongicide (15min),l'acide ascorbique(60min) , hypochlorites 3%(4min)	0%
Essai n°2	Éthanol 70% (20min) fongicide (15min), l'acide ascorbique(60min), hypochlorites 3%(6 min)	0%
Essai n°3	Éthanol 70% (20min) fongicide (15min),l'acide ascorbique(60min), hypochlorites 3%(8min)	0%

Après les résultats obtenus on a constate que le taux de contamination est élimine par l'utilisation de l'hypochlorite de calcium à 3% (essai n°3-3^{ème} étude).

VI. Discussion générale.

L'objectif essentiel visé par ce travail consiste à essayer de régénérer *in -vitro* des plantes entières de *Pistacia térébinthus* via l'organogenèse. Pour parvenir à cela, nous avons testé deux principaux facteurs susceptibles d'influencer la régénération, et qui sont le milieu de culture, et la nature de l'explant.

Dans des essais que nous avons qualifié de préliminaires, nous avons choisi un certains nombre de facteurs liés aux conditions d'expérimentation ; tel que la lumière qui semble être nécessaire à l'organogenèse chez le *Pistacia térébinthus* ainsi que l'obscurité.

Tous les efforts que nous avons fournis, s'orientent vers l'élimination des contaminations dues aux bactéries et aux champignons.

Pour ce qui est des micro-boutures, l'utilisation de la désinfection par l'hypochlorite de calcium à 15% pendant 25 min, et un fongicide ont donné le meilleur résultat. Le taux de contamination est atteint (0%).

Pour ce qui est des graines, l'utilisation de la de la désinfection par l'hypochlorite de calcium à 15% pendant 25 min, et un fongicide ont donné le meilleur résultat. Le taux de contamination est atteint (0%).

Relativement aux explants de feuilles, c'est aussi la concentration de la désinfection par l'hypochlorite de calcium à 3%, et un fongicide ont donné le meilleur résultat. Le taux de contamination est atteint (0%).

Les travaux menés par Auge et *al.*, (1989), sur la stérilisation du matériel végétal, ont montré que l'hypochlorite de calcium est un produit stérilisant très efficace pour la destruction des micro-organismes, car il ne pénètre pratiquement pas dans les tissus. Par contre, l'hypochlorite de sodium a la possibilité de pénétrer dans les tissus et de provoquer leur détérioration, qui se manifeste par une nécrose et l'arrêt ultérieur de la croissance.

Conclusion

Conclusion :

Le premier but de notre expérimentation est l'essai de régénérer le pistachier térébinthe à partir de différents explants dont les nœuds, les feuilles et les apex

Au début des essais le taux de contamination est élevée (champignons et bactéries), mais après plusieurs essais de désinfections avec l'additionne de fongicide, l'acide ascorbique, et l'hypochlorite de calcium à différentes concentration, on a pu baisser le taux de contamination.

La sécrétion phénolique a inhibé la croissance. Pour cette raison on a utilisé l'anti oxydant, acide ascorbique avec des différentes concentrations.

Deuxième but de notre expérimentation a concerné le taux de germination des graines de *Piastacia térébinthus*. Le taux de germination est nul dans notre cas.

Ce ci pourrait être dû a une inhibition, soit tégumentaire soit embryonnaire. Il faudra procéder à d'autres essais, afin de lever ces inhibitions, par l'utilisation du froid au bien par la scarification mécanique des graines ou chimique à l'aide de l'acide sulfurique concentré.

Pour ce qui est des nœuds, on remarque l'absence du débourrement. En effet les ligneux sont connu pour leur difficulté à se micropropager, ceci est due à leur teneur en phénol, qui une fois à la lumière, s'oxydent et inhibent toute croissance des explants.

Recommandation :

Ce qui serait souhaitable de faire pour continuer ce travail :

- Utiliser des explants plus jeunes, les traiter à l'obscurité, avant leur mise en culture.
- Tester plusieurs balances hormonales pour provoquer le débourrement.

Conclusion

- et aussi pour s'assurer de l'état sanitaire du matériel végétal. Il est préférable de traiter la plante mère sur terrain avec une fongicide systémique au moins un mois avant la récolte.

Table des matières

Résumé

Liste des Figures

Liste des Tableaux

Liste des abréviations

Introduction 1

Chapitre 1 : Généralité Sur l'espèce

I.Pistachier 4

II.Pistachier térébinthe 4

II.1. Taxonomie 6

II.2. Origine et Répartition..... 6

II. 2.1.Origine 6

II.2.2.Répartition 7

II.2.2.1. En l'Algérie 7

II.2.2.2.Répartition dans le monde..... 7

II.3.Descriptions morphologiques..... 7

II.3.1.Feuilles 8

II.3.1.1.Foliole 8

II.3.1.2.Pétiole..... 8

II.3.1.3.Rachis..... 8

II.3.1.4.. L'inflorescence..... 9

II.3.2. les fleurs 9

II.3.3.fruit 9

II.4.Caractéristiques écologiques et climatique de *Pistacia térébinthus* 10

Table des matières

II.4.1.Exigence pidoclimatique	11
II.5.Utilisation et intérêt	12
II.6.Caractérisation des huiles essentielles du <i>Pistacia térébinthus</i>	13
II.7.Les maladies	14

Chapitre II : Multiplication de *Pistacia térébinthus*

I-Multiplication par voie sexuée	15
I-1-Germination	15
I-1-1- Essais de germination	16
I-2-Amélioration de la germination	16
II-Multiplication par voie asexuée	17
II-1- Bouturage	18
II-2-Micro-propagation	18
II-2-1- Organogenèse	19
II-2-2-Caulogenèse	19
II-2-3-Rhizogenèse	20
III-Milieus de cultures	20
IV- Les régulateurs de croissances	21
V-Intérêt de la culture in vitro	21
V. Intérêt de l'introduction "in-vitro" de pistachier térébinthe	22
VI. Les travaux sur pistachier térébinthe	23

Table des matières

Chapitre III : Matériel et méthode

I-Lieu de l'expérimentation	24
II-Matériel végétale	24
II-1 Désinfection des matériels végétaux	24
II.1.1. 1 ^{er} étape de désinfection	25
II.1.2. 2 ^{eme} étape de désinfection	26
II-2 Traitement antioxydant	27
III-Milieus de culture utilisés	28
IV. Traitement hormonaux.....	30
V-Mise en culture	31
VI-Condition de culture	31

Chapitre IV: Résultat et discussion

I. Contamination	32
II. Désinfection des micro-bouteurs	33
III. Désinfection des graines	36
IV. Scarification des graines	38
V. La Désinfection des feuilles.....	39
VI. Discussion Générale	41
Conclusion	43

Référence Bibliographique

Annexes