

UNIVERSITE BLIDA 1

Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie

Département de Biologie et Physiologie Cellulaire

THESE DE DOCTORAT

En Biologie

Spécialité : Biotechnologie Végétale

MICROPROPAGATION DE L'ARGANIER

(Argania spinosa L. SKEELS).

Par

Nassima AIZER

Devant le jury composé de :

Mme. TOUAIBIA Meriem	MCA	Univ Blida1	Présidente
Mme. CHAOUIA Chérifa	Professeur	Univ Blida1	Directrice de thèse
Mme. SMAIL SAADOUN Nouria	Professeur	Univ Tizi-Ouzou	Examinatrice
Mr. LAZALI Mohamed	Professeur	Univ Kh Miliana	Examineur

Blida, Juin. 2021

ملخص

شجرة الأركان (*Argania spinosa L. Skeels*) هي النوع الوحيد الذي يمثل عائلة Sapotaceae، وهي تنتمي إلى رتبة Ebénales، وهي شجرة مستوطنة في جنوب غرب الجزائر (منطقة تندوف بالتحديد حمادة الدراع في واد الماء) تلعب دورًا بيئيًا واجتماعيًا واقتصاديًا كبيرًا. تواجه هذه الأنواع الغابية مشاكل التدهور وصعوبة التجديد بالتقنيات الطبيعية. لذلك، يمكن أن يكون استخدام تقنيات الاستزراع في المختبر حلاً من أجل تجديد هذه الأنواع المهددة بالانقراض بسرعة.

بالنسبة للإنبات في المختبر، تتم معالجة البذور الصلبة كيميائيًا (تنقع في بيروكسيد الهيدروجين (H₂O₂) (حجم 10) عند درجة حرارة 25 ± 2 درجة مئوية لمدة يومين وأربعة أيام وأسبوع واحد) فكانت النتيجة سلبية لم تنتش على وسط عيش مكون من مياه معدنية مضاف إليها EG-agar. فيما يتعلق بالبذور (المنزوعة القوقعة ميكانيكياً) التي تم تطهيرها مسبقاً لمدة 5 دقائق في NaClO تركيز 8 درجة (T1) وضبطها على الإنبات في وسط عيش مكون من مياه معدنية مضاف إليها EG-agar اعطت نتائج أفضل مع معدل إنبات 100٪.

تم تطوير بروتوكول محسن للتكاثر الدقيق بواسطة تقنية التقطيع الدقيق بنجاح باستخدام وسط زرع MS مع الهرمونات النباتية التالية (1.5 ملغ / لتر Kin؛ 0.5 ملغ / لتر AIA)، (1 ملغ / لتر Kin؛ 0.5 ملغ / لتر AIA) التي تعتبر المفضلة في تبرعم البراعم الجانبية بنسبة 100 ٪ لارغان تندوف وبراقي على التوالي، قدم هذا المزيج الهرموني نباتات مخبرية ذات نوعية جيدة تتميز بـ 2.44، 1.96 سم في الارتفاع، مع متوسط عدد البراعم المشكلة حديثاً 5 و 8 ومتوسط عدد الوريقات من 11 و 16 وريقة لمصدري نبات الارغان المستعمل على التوالي. تسمح إضافة 1.5 ملغ / لتر من هرمون GA3 إلى وسط الاستنبات (MS) بتمديد السيقان إلى 4.7 سم و 5 سم لمصدري نبات الارغان المستعمل على التوالي. التجذير ناجح على وسط 2 / MS الذي يحتوي على 0.5 غ من الكربون المنشط و (1 ملغ / لتر AIB، 1 ملغ / لتر ANA) بمعدل 36٪ و 50٪ على التوالي ومتوسط طول الجذور 7.5 و 5 سم بعد إضافة حمض الاسكوربيك.

الشتلات المتأقلمة لديها معدل بقاء عالٍ جدًا 90٪. كما تظهر دراسة الأنسجة أن الشتلات المتحصل عليها مخبرياً تحتوي على أنسجة مشابهة لتلك الموجودة في النباتات الطبيعية. الدراسة النسيجية للنباتات المتحصل عليها تبين انها تحتوي على نفس انسجة النباتات الموجودة في الطبيعة (تندوف).

كلمات المفتاح: الأركان، إنتاش البذور، التكاثر الدقيق، الإنبات المخبري، الدراسة النسيجية، التأقلم.

RESUME

L'Arganier (*Argania spinosa* L. Skeels) est la seule espèce représentant la famille des Sapotaceae appartenant à l'ordre des Ebénales. En Algérie, c'est un arbre endémique du sud-ouest de la région de Tindouf (localité Hamada de Drâa Oued-El-Ma). Il joue un rôle écologique et socio-économique majeur. Cette essence forestière est confrontée aux problèmes de dégradation et de difficulté de régénération par les techniques naturelles et classiques. Le recours à la multiplication par les techniques de cultures *in vitro* pourrait être une solution afin de régénérer, rapidement, cette espèce en voie de disparition.

Pour la germination *in vitro*, des noix d'arganier scarifiées chimiquement (trempage dans l'eau oxygénée (H₂O₂) (10 volumes) à une température de 25 ± 2°C pendant deux (2), quatre (4) et sept (7) jours désinfectées et mises en culture sur milieu eau-gélosée (EG). Cette technique a été abandonnée car les essais de scarification chimique des noix n'ont pas donné de résultats attendus. Concernant les amandes (scarification mécanique) préalablement désinfectées pendant 5 mn dans l'hypochlorite de sodium (NaClO) à 8° (T1) et mis à germer sur milieu eau-gélosée (EG) donnent de meilleurs résultats avec un taux de germination de 100%.

Un protocole optimisé de micropropagation par microbouturage a été mis au point avec succès en utilisant le milieu MS avec la combinaison (1.5mg/l Kin /0,5mgAIA), (1mg/l Kin/0,5mg/l AIA) qui est favorable au débourrement des bourgeons axillaires d'*Argania spinosa* L. avec un taux de 100% pour les deux provenances Tindouf (Hamada) et station de Baraki. Cette combinaison hormonale a fourni des vitro-plants vigoureux atteignant de 2.44 et 1.96 cm de hauteur, avec un nombre moyen des bourgeons néoformés de 5 et 8 et un nombre moyen de folioles d'ordre de 11 et 16 folioles respectivement pour les deux provenances. L'adjonction de 1,5 mg /l de GA3 au milieu de culture (MS) permet un allongement caulinaire de 4.7 et 5 cm des vitro-plants d'arganier de deux types de végétal utilisé. L'enracinement montre sur milieu MS/2 contenant 0,5 g de charbon actif et (1mg/l AIB et ANA) avec un taux de 36 et 50% respectivement et une longueur moyenne des racines de 7,5 et 5 cm après l'ajout de 100mg/l d'acide ascorbique.

Les plantules acclimatées présentent un taux de survie très important de 90%. L'étude histologique de végétal obtenu *in-vitro* montre que ces plantules comportent des tissus similaires à ceux du végétal adulte (Tindouf).

Mots clés : *Argania spinosa* (L.), germination, micropropagation, microbouturage, histologie, acclimatation.

ABSTRACT

The Argan tree (*Argania spinosa* L. Skeels) is the only species representing the Sapotaceae family belonging to the order of Ebenales. In Algeria, it is an endemic tree in the southwest of the Tindouf region (Hamada locality of Drâa Oued-El-Ma). It plays a major ecological and socio-economic role. This forest species is confronted with the problems of degradation and difficulty of regeneration by natural techniques. Therefore, the use of *in vitro* culture techniques could be a solution to quickly regenerate this endangered species.

For *in vitro* germination, chemically scarified argan nuts (soaked in hydrogen peroxide water (H₂O₂) (10 volumes) at a temperature of 25 ± 2 ° C for two days, four days and one week) disinfected and cultured on agar water medium (EG). This technique was abandoned because the chemical scarification tests of the nuts did not give expected results.

Concerning the almonds (mechanical scarification) previously disinfected for 5 min in NaClO at 8 ° (T1) and germinated on water-agar medium EG gives better results with a germination rate of 100%.

An optimized micro propagation protocol by micro-cutting has been successfully developed using the MS medium with the combination (1.5mg/l Kin/0.5mg/l AIA), (1mg / l Kin; 0.5mg / l AIA) which is favorable at the opening of the axillary buds of *A spinosa* with a rate of 100% for the plant coming from Tindouf and Braki respectively, this hormonal combination produced vigorous *in vitro*-plants reaching 2.44, 1.96 cm in height, with an average number of neoformed buds of 5 and 8 and an average number of leaflets of order of 11 and 16 leaflets respectively for the two sources of plant material. The addition of 1.5 mg / l of GA₃ to the culture medium (MS) allows a stem extension of 4.7 cm and 5 cm of the argan plants of two types of plant used. Rooting is successful on MS/2 medium containing 0.5 g of activated carbon and (1 mg / l AIB, 1 mg / l ANA) with a rate of 36 and 50% respectively and an average root length of 7.5 and 5 cm after adding 100 mg/l of ascorbic acid.

Acclimatized seedlings have a very high survival rate of 90%. The histological study of the plant obtained *in vitro* shows that these plants contain tissues similar to those of the adult plant (Tindouf).

Key words: *Argania spinosa* (L.), germination, microcutting, micropropagation, histology, acclimatization.

REMERCIEMENTS

Je tiens vivement à exprimer ma profonde reconnaissance et gratitude à :

Mme CHAOUIA C. Professeur à l'université Blida 1, pour avoir accepté d'encadrer ce travail et pour ses précieux conseils.

Mes remerciements vont particulièrement à **Mme SAIDI F.** Professeur à l'université Blida1, pour son aide à identifier les coupes histologiques.

Je tiens à remercier **Mme TOUAIBIA M.** pour avoir accepté de présider le jury.

Mes vifs remerciements vont aussi aux membres de jury qui ont accepté d'expertiser ce travail de doctorat.

Je tiens à exprimer mes sincères gratitudes à toutes les personnes du laboratoire de culture *in vitro* à l'EHEV : **Mme ANOU W., Mme Lila., Mr Kamel.**

J'associe à mes remerciements tous les membres d'INRF (Institut National de Recherche Forestière, station de Baraki Alger), particulièrement **Mr. OUAICH** responsable d'INRF pour son aide.

Je tiens à remercier toutes les personnes qui ont contribué à la réalisation de ce travail de thèse de doctorat, qui est loin d'être un travail individuel.

DEDICACES

*Je dédie cette thèse réalisée grâce à DIEU tout puissant
Aux êtres les plus chères : Mes parents*

A *ma chère mère qui aurait été comblée de bonheur, si elle était de ce monde.*

A *mon très cher père que DIEU lui donne la force pour qu'il continue à couronner ma vie.*

A *mon mari Abdelkrim, auquel je témoigne toute ma reconnaissance pour ses sacrifices et ses encouragements tout au long de ce travail.*

A *ma petite princesse Nouha.*

A *mon petit prince Rayane.*

A *toutes mes amies, particulièrement Nabila ABDELLATIF pour son aide morale, ces précieux conseils et pour sa patience remarquable.*

A *mes adorables sœurs et leur chers époux.*

A *mes très chers neveux et nièces.*

A *tous ceux qui me sont chers.*

TABLE DES MATIERES

ملخص

RESUME

ABSTRACT

REMERCIEMENTS

DEDICACES

TABLE DES MATIERES

LISTE DES FIGURES ET TABLEAUX

LISTE DES ABREVIATIONS ET SYMBOLES UTILISES

INTRODUCTION	6
CHAPITRE 1 : SYNTHÈSE BIBLIOGRAPHIQUE	9
1.1. Généralités sur l'arganier	9
1.1.1. Aspect historique	9
1.1.2. Aire géographique de l'arganier	9
1.1.2.1. En Algérie	10
1.1.2.2. Au Maroc	11
1.1.3. Origine de l'arganier en Algérie	12
1.1.4. Systématique de l'arganier	12
1.1.5. Caractéristique botanique de l'arganier	13
1.1.5.1. Système souterrain	13
1.1.5.2. Système aérien	15
1.1.5.2.1. Tronc	15
1.1.5.2.2. Rameaux	15
1.1.5.2.3. Feuilles	16
1.1.5.2.4. Fleurs	17
1.1.5.2.5. Fruit	18
1.1.5.2.6. Bois	20
1.1.6. Ecologie de l'arganier	20
1.1.6.1. Facteur édaphique	20
1.1.6.2. Température	20
1.1.6.3. Humidité	21
1.1.7. Importances de l'arganier	21
1.1.7.1. Ecologique	21
1.1.7.2. Socio-économique	21
1.1.7.3. Biodiversité	22
1.1.8. Etat d'arganeraies de Tindouf	22
1.2. Multiplication de l'arganier	23
1.2.1. Multiplication par semis	23
1.2.1.1. Germination spontanée	23
1.2.1.2. Germination provoquée	24

1.2.1.2.1. Scarification chimique	24
1.2.1.2.2. Scarification mécanique	24
1.2.2. Rejets de souches	25
1.2.3. Multiplication végétative	25
1.2.3.1. Multiplication par bouturage	25
1.2.3.2. Multiplication par greffage	26
1.2.4. Culture <i>in vitro</i>	26
1.2.4.1. Totipotence	27
1.2.4.2. Balance hormonale	27
1.2.4.3. Voies de multiplication <i>in vitro</i>	28
1.2.4.3.1. Multiplication par bourgeonnement axillaire	28
1.2.4.3.2. Multiplication par bourgeonnement adventif	29
1.2.4.3.3. Embryogenèse somatique	30
1.2.4.4. <u>Etapes de micropropagation d'arganier</u>	31
1.2.4.5. Avantages et inconvénients de micropropagation	33
CHAPITRE 2 : MATERIEL ET METHODES	34
2.1. Site expérimental	34
2.2. Matériel végétal utilisé	34
2.2.1. Provenance et préparation du matériel végétal	34
2.2.1.1. Matériel végétal juvénile	34
2.2.1.2. Matériel végétal adulte	35
2.2.2. Description botanique de l'arganier	36
PREMIERE PARTIE : GERMINATION <i>IN VITRO</i> DES GRAINES	41
2.1. Germination des graines	41
2.1. 1. Noix	41
2.1.2. Amandes	42
2.2. Désinfection des graines	42
2.3. Milieux de germination	42
2.4. Mise en germination	43
2.5 Paramètres mesurés	43
2.5.1. Taux de contamination	43
2.5.2. Taux de germination	43
2.5.3. Croissance des vitro-semis	43
2.5.4. Nombre de jeunes feuilles par vitro-semis	43
DEUXIEME PARTIE : MICROPROPAGATION PAR MICROBOUTURAGE	44
2.1. Désinfection du matériel végétal	

2.2.	Milieux de culture de base	44
2.3.	Régulateurs de croissance	48
2.4.	Néoformation des bourgeons	49
2.5.	Elongation	50
2.6.	Enracinement	50
2.7.	Mise en culture	52
2.8.	Paramètres mesurés	52
2.9.	Acclimatation	53
2.10.	Etude histologique	53
2.11.	Analyses statistiques	54

CHAPITRE 3 : RESULTATS 55

REMIERE PARTIE : GERMINATION DES GRAINES D'ARGANIER 55

3.1.	Contamination des graines	55
3.1.1.	Taux de contamination des noix	56
3.1.2.	Taux de contamination des amandes	56
3.2.	Germination des noix	57
3.3.	Germination des amandes	58
3.3.1.	Taux de germination des amandes	58
3.3.2.	Effet de la désinfection sur le nombre de feuilles	59
3.3.3.	Effet de la désinfection sur la hauteur des vitro-semis	59
3.3.4.	Etapas chronologiques de germination	60
3.3.4.1.	Imbibition de l'amande	60
3.3.4.2.	Germination <i>sensu-stricto</i>	61
3.3.4.3.	Croissance de la plantule	62

DEUXIEME PARTIE : MICROPROPAGATION PAR MICROBOUTURAGE 65

3.1.	Effet de milieu de culture sur le débourrement	65
3.2.	Microbouturage des rameaux provenant de Tindouf	66
3.2.1.	Néoformation de bourgeons (débourrement)	66
3.2.1.1.	Taux de contamination	66
3.2.1.2.	Taux de débourrement	67
3.2.1.3.	Développement des microboutures	68
3.2.1.3.1.	Effet du milieu sur la longueur des microboutures	68
3.2.1.3.2.	Effet du milieu sur le nombre de bourgeons	70
3.2.1.3.3.	Effet du milieu sur le nombre de feuilles	71
3.2.2.	Elongation des microboutures	75
3.2.3.	Enracinement	77
3.2.3.1.	Induction des racines	77
3.2.3.1.1.	Sans charbon actif	77
3.2.3.1.2.	Avec charbon actif	78
3.2.3.2.	Elongation racinaire	79

3.3. Microbouturage à partir des vitro-semis de Baraki	81
3.3.1. Néof ormation des bourgeons	81
3.3.1.1. Taux de débourrement	81
3.3.1.2. Développement des microboutures	81
3.3.1.2.1. Effet de milieu sur la hauteur	81
3.3.1.2.2. Effet du milieu sur le nombre de bourgeons	83
3.3.1.2.3. Effet du milieu sur le nombre de feuilles	84
3.3.2. Elongation	86
3.3.3. Rhizogénèse	87
3.3.3.1. Induction des primordiums racinaires	87
3.3.3.1.1. Sans charbon actif	87
3.3.3.1.2. Avec charbon actif	90
3.3.3.2. Elongation racinaire	90
3.4. Effet d'écotype sur les caractéristiques morphologique des microboutures	92
3.5. Acclimatation	93
3.6. Etude histologique	94
3.6.1. Entre-nœuds	94
3.6.2. Feuilles	98
3.6.3. Racines	100
CHAPITRE 4 : DISCUSSION	103
4.1. Germination	103
4.2. Etapes de microbouturage	105
CONCLUSION	109
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	111
ANNEXES	125

LISTE DES FIGURES ET TABLEAUX

Figure 1.1	Situation cartographique de l'arganier de Tindouf	10
Figure 1.2	Aire de répartition de l'arganier au Maroc	11
Figure 1.3	Aspect général de l'arganier <i>dans la</i> zone de Oued El Ma (Hamada du Drâa)	13
Figure 1.4	Profil racinaire d'arganier	14
Figure 1.5	Tronc entrelacé d'arganier de Tindouf	15
Figure 1.6	Différenciation morphologique des rameaux de l'année	16
Figure 1.7	Aspect d'un rameau feuillé d'arganier	17
Figure 1.8	Composition florale et boutons floraux avec styles apparents	18
Figure 1.9	Rameau avec des fruits matures	19
Figure 1.10	Fruits immatures, graines et amandes d'arganier	19
Figure 1.11	Action anthropique	23
Figure 1.12	Equilibre entre auxines et cytokinines déterminant L'orientation de l'organogenèse en culture <i>in vitro</i>	27
Figure 1.13	Etapas de culture <i>in vitro</i> de l' <i>Argania spinosa</i> L.	32
Figure 2.1	Carte de localisation de site de prélèvement des fruits d'INRF de Baraki	35
Figure 2.2	Aspect et site de prélèvement du matériel végétal adulte	36
Figure 2.3	Aspect morphologique d' <i>Argania spinosa</i> L. de Baraki.	37
Figure 2.4	Rameau lignifié feuillé d'arganier avec des épines	38
Figure 2.5	Feuille d' <i>A. spinosa</i> sous loupe binoculaire (G×16)	38
Figure 2.6	Aspect des rameaux d'arganier avec des fruits	39
Figure 2.7	Fruits secs d' <i>Argania spinosa</i> L.	39
Figure 2.8	Lot de noix d' <i>Argania spinosa</i> L.	40
Figure 2.9	Détails de noix d' <i>Argania spinosa</i> L.	40
Figure 2.10	Organigramme des différents prétraitements appliqués sur les noix.	41
Figure 3.1	Développement des contaminations des noix et des amandes.	55
Figure 3.2	Taux de contamination des noix prétraitées	56
Figure 3.3	Taux de contamination des amandes	57
Figure 3.4	Noix éclatée après 20 jours de mis en germination	57
Figure 3.5	Taux de germination des amandes d'arganier	58
Figure 3.6	Effet du traitement de désinfection sur l'apparition des	

	feuilles	59
Figure 3.7	Effet du traitement de désinfection sur la hauteur des vitro-semis	60
Figure 3.8	Gonflement d'amande d'arganier (imbibition) après une semaine	61
Figure 3.9	Eclatement de l'amande et apparition de radicule et tigelle	62
Figure 3.10	Apparition des feuilles cotylédonaire et feuilles après un mois	63
Figure 3.11	Aspect de vitro-semis d'arganier âgé de deux mois	63
Figure 3.12	Cas de polyembryonies d'une amande d'arganier (provenance : Baraki).	64
Figure 3.13	Effet de milieux de base sur le débourrement	65
Figure 3.14	Explants contaminés après dix jours de mise en culture	66
Figure 3.15	Taux de contamination des explants sur milieux de débourrement. (Provenance de Tindouf)	67
Figure 3.16	Taux de débourrement des bourgeons chez <i>Argania spinosa</i>	68
Figure 3.17	Effet de milieux de débourrement sur la longueur des microboutures	69
Figure 3.18	Effet du milieu de débourrement sur le nombre de bourgeons néoformés	70
Figure 3.19	Effet du milieu de culture sur le nombre de feuilles néoformées	72
Figure 3.20	Aspect des vitro-plants sur milieux de débourrement (1 ^{ère} subculture).	73
Figure 3.21	Aspect des vitro-plants à 2 ^{ème} et 3 ^{ème} subculture	74
Figure 3.22	Aspect des vitro-plants sur milieu Mi6 à la 4 ^{ème} subculture (Provenance de Tindouf).	75
Figure 3.23	Effet de GA3 sur l'élongation caulinaire	76
Figure 3.24	Aspect des vitro-plants d' <i>Argania spinosa</i> L. sur milieu d'élongation	77
Figure 3.25	Aspect morphologique des microboutures avec formation de cals sur milieu d'enracinement (sans charbon actif).	78
Figure 3.26	Effet de la balance hormonale sur l'enracinement des microboutures	78
Figure 3.27	Aspect morphologique des vitro-plants enracinés	79
Figure 3.28	Aspect des racines nécrosées (phase d'élongation racinaire)	80
Figure 3.29	Longueur moyenne des racines après l'ajout d'acide ascorbique	80
Figure 3.30	Taux de débourrement des bourgeons chez <i>Argania spinosa</i>	81

Figure 3.31	Effet de l'équilibre hormonal sur la longueur des microboutures	82
Figure 3.32	Effet de l'équilibre hormonal sur le nombre de bourgeon/microbouture	83
Figure 3.33	Effet de l'équilibre hormonal sur le nombre des feuilles néoformées	84
Figure 3.34	Aspect des vitro-plants sur milieu Mi6 à la 4 ^{ème} subculture (Provenance station de Baraki).	85
Figure 3.35	Effet de GA3 sur l'allongement caulinaire des microboutures	86
Figure 3.36	Aspect des microboutures sur milieu l'élongation Ma3	87
Figure 3.37	Effet de l'équilibre hormonal sur l'enracinement des microboutures (Sans charbon actif)	88
Figure 3.38	Aspect des vitro-plants enracinés (sans charbon actif)	89
Figure 3.39	Effet d'équilibre hormonal sur l'enracinement des microboutures (Avec charbon actif).	90
Figure 3.40	Effet de l'équilibre hormonal sur la longueur moyenne des racines	91
Figure 3.41	Aspect des vitroplants enracinés sur milieu Mr3 avec charbon actif.	91
Figure 3.42	Aspect des plantules d'arganier en acclimatation	93
Figure 3.43	Suivi de plantules acclimatées	94
Figure 3.44	Coupes transversales d'entre-nœuds <i>in vitro</i> (G×100)	95
Figure 3.45	Détail d'un faisceau conducteur d'entre-nœud de vitro-plants	96
Figure 3.46	Coupes au niveau d'entre-nœuds du rameau provenant de Tindouf	97
Figure 3.47	Coupes transversales au niveau de feuilles <i>in vitro</i> d'arganier	98
Figure 3.48	Coupe transversale au niveau de feuille d'arganier de Tindouf	99
Figure 3.49	Coupes transversales au niveau d'une racine néoformée <i>in vitro</i> .	101
Figure 3.50	Coupe transversale au niveau d'une racine d'arganier de Tindouf (G×400).	102
Tableau 2.1	Conditions de désinfection des graines à NaClO	42
Tableau 2.2	Constituants du milieu MS	45
Tableau 2.3	Constituants du milieu de Gamborg	46
Tableau 2.4	Composition du Woody Plant medium (WPM)	47
Tableau 2.5	Type de régulateurs de croissance et leur solubilité	48
Tableau 2.6	Concentrations des phytohormones de néoformation des	49

Tableau 2.7	bourgeons (végétal adulte de Tindouf) Concentrations des phytohormones de néoformation des bourgeons (végétal juvénile de la station de Baraki)	49
Tableau 2.8	Concentrations de GA3 testées pour le milieu d'allongement	50
Tableau 2.9	Concentrations hormonales testées pour le milieu rhizogène (végétal adulte de Tindouf)	51
Tableau 2.10	Concentrations hormonales testées pour le milieu rhizogène (végétal juvénile de la station de Baraki)	51
Tableau 2.11	Technique de double coloration des coupes	55
Tableau 3.1	Effet du milieu sur la longueur des microboutures (Test Newman-Keuls).	70
Tableau 3.2	Effet du milieu sur le nombre des bourgeons (Test Newman-Keuls).	71
Tableau 3.3	Effet du milieu sur le nombre de feuilles néoformées (Test Newman-Keuls).	72
Tableau 3.4	Effet de milieu d'allongement (Test post hoc)	76
Tableau 3.5	Effet du milieu sur la longueur des microboutures (Test Newman-Keuls)	82
Tableau 3.6	Effet du milieu sur le nombre des bourgeons (Test Newman-Keuls)	84
Tableau 3.7	Effet du milieu sur le nombre de feuilles (Test Newman-Keuls)	85
Tableau 3.8	Effet du milieu sur la longueur des microboutures (Test Newman-Keuls)	86
Tableau 3.9	Effet d'écotype sur le développement morphologique des microboutures	92

LISTE DES SYMBOLES ET DES ABREVIATIONS

UNESCO	: United Nations Educational, Scientific and Cultural Organization
INRF	: Institut National de Recherche Forestière
EHEV	: Entreprise Horticole et Espaces Verts
UPEV	: Unité Paysagisme et Espaces Verts
AIA	: Acide Indole-3-Acétique
AIB	: Acide indole-butyrique
ANA	: Acide α -Naphtalo-Acétique
2,4-D	: 2,4 Dichlorophénoxyacétique
2 iP	: isopentényladénine
BAP	: Benzyl-Amino-Purine
Kin	: Kinétine
GA3	: Acide Gibbérellique A3
MS	: Murashige et Skoog
B5	: Gamborg
ANOVA	: ANalysis Of VAriance

INTRODUCTION

L'arganier (*Argania spinosa* L., Skeels.), est une espèce unique de la famille des Sapotaceae. C'est un arbre endémique de l'Algérie et du Maroc, il se trouve dispersé dans le sud-ouest de l'Algérie, notamment dans la région de Tindouf [1] où il s'étend sur une superficie de 50670 hectares [2].

L'arganier joue un rôle écologique très important pour la lutte contre la désertification dans l'écosystème des zones arides et semi arides par la fertilité et la restauration des sols d'apports, il abrite une strate herbacée, contribue à la stabilisation des cours d'eau dans les bordures des Oueds et assure un habitat pour la faune sauvage [3]. Il constitue un arbre oléagineux, à multi-usages dont chaque partie ou production de l'arbre (bois, feuilles, fruits et huile) est utilisable et constitue aussi une source de revenus ou de nourriture pour l'utilisateur [3]. Son principal intérêt réside dans son fruit qui donne une huile très précieuse à usage cosmétique et alimentaire [4].

Or, malgré tous ces intérêts, cette essence a connu au fil des temps, d'importantes perturbations liées essentiellement au climat et à l'action anthropozoogène qui se traduit par des coupes massives et l'utilisation sauvage du bois d'arganier pour la production de charbon. D'autres pratiques d'exploitation favorisent également le surpâturage qui a transformé profondément la physionomie de ce fragile écosystème, induisant ainsi une modification profonde dans la répartition spatiale de cette essence [5].

Face à ce sérieux problème de régression alarmante, Il est donc devenu urgent, non seulement de préserver les arbres d'arganier restants, mais également de réhabiliter les zones dégradées [4]. La préservation de l'arganier et son écosystème sont devenus aujourd'hui une priorité nationale. L'élaboration d'une stratégie pour la conservation et la lutte contre la disparition de l'espèce en question s'avère donc indispensable. Elle doit reposer sur la protection et l'intensification du reboisement. Actuellement, beaucoup d'études sur la régénération sont réalisées mais uniquement dans les laboratoires et quelques

expérimentations au niveau des pépinières universitaires et stations de recherches.

Cependant la régénération de cette espèce naturellement est actuellement très faible voire absente [6]. En raison des revenus importants tirés de l'huile, toutes les noix d'argan sont précieusement ramassées. Les quelques graines qui auraient échappées à la récolte et qui auraient germées ne dépassent pas le stade de plantules, qui sont leurs tour broutées par les [7].

De plus la multiplication végétative traditionnelle (greffage bouturage et marcottage) pose d'importants problèmes, notamment de reprise et ne répond pas aux besoins d'intensification souhaitée.

En conséquence, les solutions les plus appropriées pour la régénération rapide de cette espèce doivent être orientées vers les méthodes de biotechnologie végétale pour préserver cette espèce en voie de disparition. Dans ce contexte s'inscrit notre travail et vise la maîtrise de régénération d'arganier par micropropagation. Ce travail a été réalisé au niveau de laboratoire de culture *in vitro* à l'entreprise horticole et espace vert à Bab Ezzouar (Alger) et laboratoire de Biotechnologie, Environnement et Santé du département des Biotechnologies de la Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie, Université Blida1.

Afin de répondre à cette problématique, notre étude sera conduite en quatre volets :

- Le premier consiste à déterminer les conditions optimales de germination *in vitro* des graines d'*Argania spinosa* L. Cette étape permet d'obtenir des vitro-semis qui seront utilisés pour initier la micropropagation par microbouturage.
- Le deuxième volet consiste à optimiser les conditions d'initiation, d'élongation caulinaire et de rhizogenèse des explants d'*Argania spinosa* L. provenant de rameaux d'arbres adultes de la localité

Hamada de Draâ à Oued El-Ma (Tindouf) et de vitro-semis obtenus après germination *in vitro* des graines récoltées à la station de Baraki de l'INRF.

- Le troisième est axé sur l'acclimatation de plantules obtenues *in vitro*.
- Le quatrième s'articule autour d'une étude histologique de différentes parties des plantules obtenues afin d'identifier et de comparer les tissus de plantules juvéniles obtenues *in vitro* avec ceux du végétal adulte provenant de Hamada de Draâ à Oued El-Ma (Tindouf).

CHAPITRE 1

SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE

1.1. Généralités sur l'arganier

1.1.1. Aspect historique

L'arganier est très anciennement connu et utilisé par l'homme puisque les phéniciens, au Xe siècle, auraient utilisé l'huile qu'ils produisent dans leur comptoir installé le long de la côte atlantique [8]. Les premiers écrits sur l'arganier sont ceux de géographes et médecins arabes qui ont étudié la région de Maghreb [9].

Ibn-Al-Beïtar en 1219 in **Riedacker et al.**, [10], a décrit l'arbre et la technique d'extraction de l'huile dans son "Traité des Simples" (traduit par Lerlec, 1877).

En 1515 Jean-Léon l'Africain en parle également et décrit l'huile comme étant de très mauvaise odeur et servant pour l'alimentation et l'éclairage (traduction d'Epaulaire 1956) [10]. Ce n'est qu'en 1737 que la première description fut donnée par Linné à partir seulement de rameaux séchés et sans fleurs. Linné (1737), donne la description spécifique dans son "*Hortus cliffortianus*" sous le nom de *Sideroxylon spinium* L. qui veut dire bois de [10]. **Gentil, (1906)** in [7] a précisé l'aire géographique de l'arganier et en 1998, l'arganeraie a été classée en « Réserve de biosphère » par l'UNESCO [10].

Nouaim, (2005) [9] a décrit l'arbre et ses caractéristiques ainsi que ses exigences climatiques. En effet, il souligne que loin d'être un arbre du passé, l'arganier est à l'image de l'éternité, cette espèce était présente avant l'arrivée de l'homme.

1.1.2. Aire géographique de l'arganier

L'Arganier est un arbre endémique de l'Algérie [11] [12] et du Maroc [13] [14] [15].

1.1.2.1. En Algérie

En Algérie, son aire de répartition géographique couvre un territoire relativement important dans le Nord-Ouest de la wilaya de Tindouf où cette espèce constitue la deuxième essence forestière après l'*Acacia radianna* [5].

Il forme dans ce territoire (Hamada de Drâa), des populations dispersées, regroupées selon un mode contracté, le long des berges des oueds où il trouve les compensations hydriques nécessaires.

Il y'a peu de temps, on croyait que l'aire naturelle de l'arganier se limite à la zone de Touaref Bou-âam particulièrement à Oued El-Ma, alors qu'il existe d'autres populations (Merkala, Targant) avec une richesse spécifique conformément à l'étendue de l'arganeraie. L'aire de l'arganier de Tindouf s'étend sur une superficie de 50670 hectares (**Figure 1.1**) [16].

De même il existe quelques sujets d'arganier plantés au nombre de 7 dans la région de Stidia sur le plateau de Mostaganem [17].

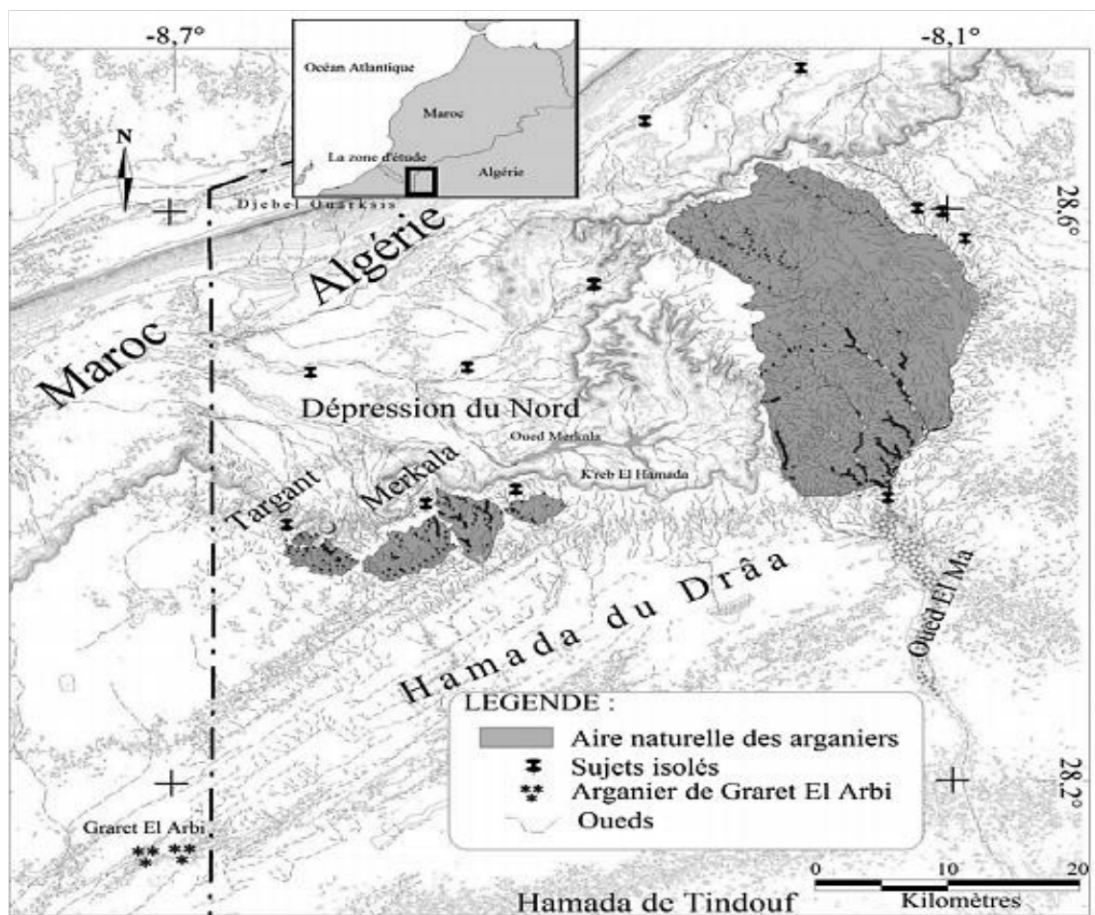


Figure 1.1 : Situation cartographique de l'arganier de Tindouf [17]

1.1.2.2. Au Maroc

Au Maroc, Il s'étend sur 828.000 ha [18], C'est la deuxième essence forestière marocaine de point de vue superficie après le chêne vert. Il est localisé principalement dans le Sud-ouest marocain [9]. Les peuplements les plus importants s'étendent principalement depuis le nord-est d'Essaouira jusqu'à la vallée du Souss (**Figure 1.2**) [19].

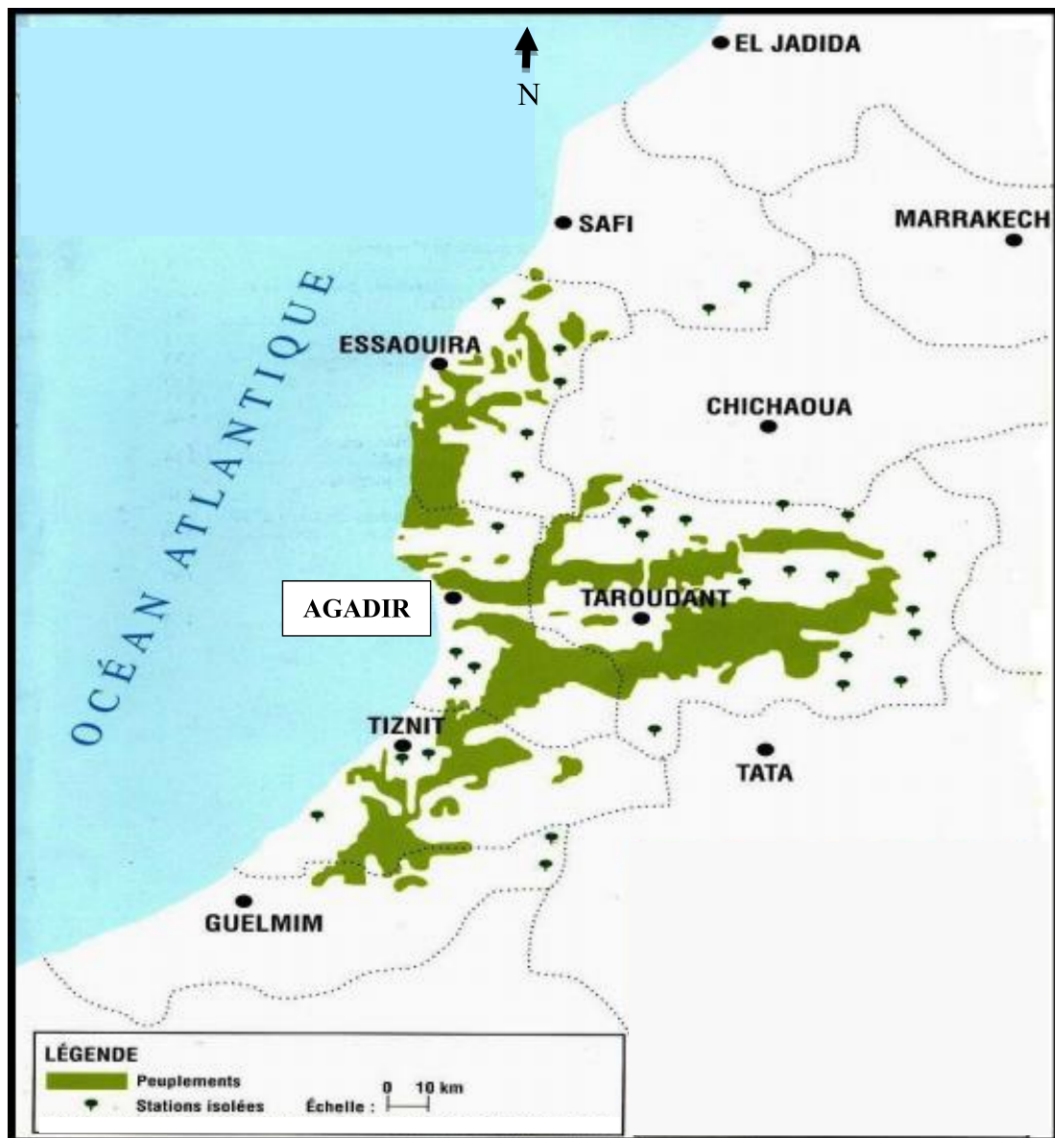


Figure 1.2 : Aire de répartition de l'arganier au Maroc [19].

1.1.3. Origine de l'arganier en Algérie

L'arganeraie de Tindouf formait, probablement, à l'origine une même unité écologique avec celle du Maroc qui couvrait de vastes territoires. A l'avènement des périodes glaciaires, un déplacement de la totalité de l'aire à arganier qui couvrait le territoire marocain s'est opéré vers le sud marocain. Seules quelques populations isolées subsistent encore dans le Nord (Oued Grou au sud-est de Rabat et Beni Snassen près de Oujda).

La dynamique glaciaire, particulièrement celle du Würm (dernière glaciation) avait réduit considérablement son aire de répartition et « l'écrasement » vers le sud a provoqué un débordement sur l'actuelle Hamada de Tindouf, d'où l'existence d'une véritable relique actuellement en Algérie [5].

Située à la limite orientale de son aire de répartition, en condition d'extrême xéricité et dans un contexte éco-climatique hyper-aride, l'arganeraie de Tindouf, en l'absence de l'ambiance atlantique dont jouit celle du Maroc et sous l'effet conjugué des pâturages et des coupes excessives, a vu son aire de répartition rétrécir de manière inexorable, jusqu'à ne former que des peuplements reliques ayant différentes typologies [5].

Vu l'intérêt qu'il présente sur le plan écologique, certains pays l'ont introduit pour enrichir leur patrimoine forestier. Parmi ces pays, nous avons la Hollande (1697), l'Angleterre (1711), la France (1852), les Etats Unis (1927), la Tunisie, la Libye et la Palestine occupée [20].

1.1.4. Systématique de l'arganier

L'arganier (*Argania spinosa* L. Skeels) appartient à la famille des Sapotaceae regroupant environ 600 espèces dont *Argania spinosa*, est le seul représentant de son genre [9]. Le nom de cette famille à laquelle n'appartiennent que des plantes tropicales, l'arganier, c'est l'unique membre de la famille des Sapotacées à vivre encore naturellement au nord du Tropique du Cancer [21].

La classification de l'arganier est la suivante [22] :

Classe : Magnoliopsida
 Famille : Sapotaceae
 Genre : *Argania*
 Espèce : *Argania spinosa*

1.1.5. Caractéristiques botaniques de l'arganier

L'arganier, *Argania spinosa* (L.) Skeels, est un arbre très résistant qui peut vivre de 150 à 200 ans. C'est un arbre aux rameaux épineux, d'où la dénomination de « spinosa » [5]. Il peut atteindre 8 à 10 mètres de hauteur. Sa couronne est largement déployée, dense et arrondie. Le port, variable, peut être dressé ou pleureur. Le tronc est court (2 à 3 mètres), il est sinueux et souvent formé par plusieurs tiges entrelacées (**Figure1.3**).

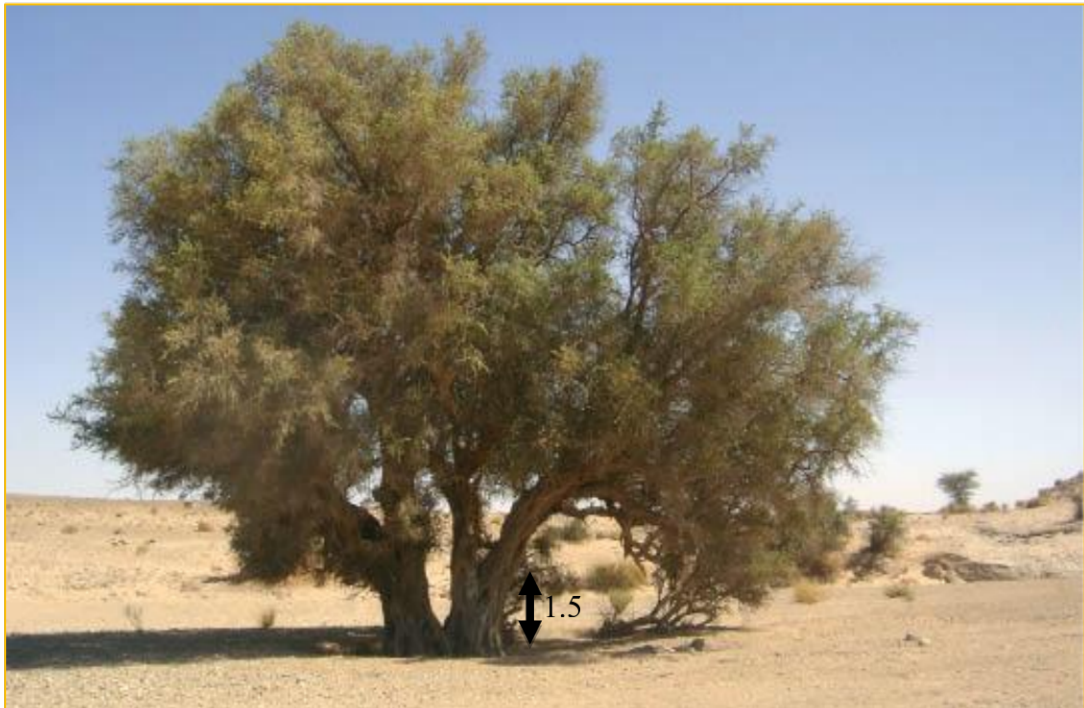


Figure1.3 : Aspect général de l'arganier dans la zone de Oued El Ma (Hamada du Drâa Tindouf) [5].

1.1.5.1. Systeme souterrain

➤ Racines

L'arganier est caractérisé par un système racinaire, particulièrement profond (de 30 ou 40 mètres de profondeur et il est dépourvu de poils absorbants (racines « magniloïdes ») (**Figure1.4**) [23].



Figure 1.4 : Profil racinaire d'arganier [24]

En effet, le système racinaire de l'arganier est le siège d'une association à bénéfices réciproques (une symbiose) avec des champignons du sol pour former des endomycorhizes, ces derniers formant des filaments (les hyphes) des champignons qui pénètrent dans les cellules des racines [5].

La symbiose mycorhizienne améliore l'efficacité de la nutrition minérale, la plante fournit au champignon de l'énergie sous forme de sucres issus de la photosynthèse et en échange, le champignon offre à la plante son réseau étendu d'hyphes qui explore tout le sol et récupère les minéraux présents en faible quantité. La dépendance de l'arganier est accrue par la nature de ses racines de type primitif, dit « magniloïde » sont dépourvues de poils absorbants, rendant indispensables ces derniers de leurs partenaires mycorhiziens qui augmentent la surface de contact avec le sol pour en récupérer l'eau et les éléments minéraux [25].

Nouaim et al., [7] signalent que des plants d'arganier produits *in vitro* et inoculés par une souche sélectionnée montrent une croissance 3 à 4 fois plus importante par rapport aux plants non mycorhizés. Selon **Bousselmane et al., [26]** la technique de mycorhization améliore la croissance des plants, particulièrement en matière de leur enracinement, d'une part, et permet ainsi de pallier au manque de reprise des plants après leur transfert en plein champ, d'autre part.

1.1.5.2. Systeme aerien

1.1.5.2.1. Tronc

L'arganier présente un tronc très vigoureux et court, tourmenté et puissant, il est formé assez souvent par plusieurs tiges entrelacées provenant de la soudure de rejets très voisins (**Figure 1.5**) [26] [27].



Figure 1.5 : Tronc entrelacé d'arganier de Tindouf [16]

1.1.5.2.2. Rameaux

Les rameaux sont épineux, d'où le nom d'espèce "*spinosa*"; les épines assurent une certaine défense de l'arbre. Certaines d'entre elles peuvent évoluer vers un nouveau rameau (**Figure 1.6**), d'autres rameaux étant d'architecture plus classique, avec un bourgeon apical. L'ablation de l'apex stimule la ramification, ce qui donne à l'arbre un port très dense lorsqu'il est brouté par les chèvres. L'arganier possède une grande capacité de rebourgeonnement et de rejet de souche. Un arbre coupé forme un buisson très épineux, impénétrable, qui croît ainsi pendant plusieurs années jusqu'à ce que les pousses centrales soient hors de portée des animaux notamment les chèvres [28].

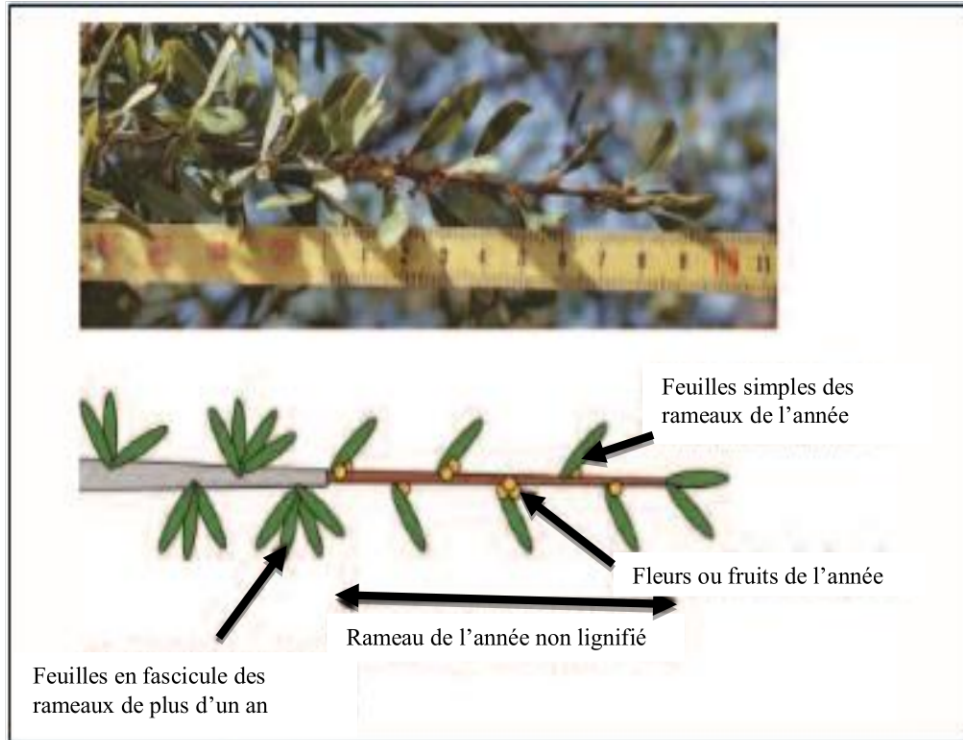


Figure 1.6 : Différenciation morphologique des rameaux de l'année [29].

1.1.5.2.3. Feuilles

Les feuilles d'*Argania spinosa* sont alternées, en forme de spatule ou lancéolées, longues de 2 à 3 cm. Elles sont de couleur vert sombre à la face supérieure, plus claire en dessous (**Figure1.7**). En période de forte sécheresse, l'arbre perd complètement son feuillage ; cet état peut durer quelques années, les feuilles sub-persistantes réapparaissent peu après le retour des pluies [10].



Figure1.7 : Aspect d'un rameau feuillé d'arganier
(Photo originale)

1.1.5.2.4. Fleurs

La fleur de l'arganier est minuscule (2 à 4 mm) [30] [31], pentamère, constituée en glomérules localisés au niveau des entre-nœuds et à l'aisselle des feuilles et pouvant être composé de 15 fleurs et plus (**Figure1.8**) l'arganier est monoïque [30] [32] [33].

Chez l'arganier, deux types de floraison sont observés : une floraison pauciflore, peu abondante, sur les rameaux âgés lignifiés ; elle est la première à être observée et une floraison très importante et plus tardive sur les nouvelles pousses [32] [33] [34] [35] [36].

Le débourrement démarre en octobre juste après les premières pluies. De petits fruits préexistants commencent à grossir, des feuilles se développent en rosette sur les rameaux ligneux et quelques fleurs apparaissent sur les rameaux du printemps précédent. En janvier et février, les rameaux continuent à croître et des fleurs apparaissent de plus en plus nombreuses sur les rameaux de l'année précédente et ceux en croissance, tandis que les fruits grossissent très vite. Cette croissance continue jusqu'en juin avec une floraison maximale de mars à la fin mai. Il y a arrêt de croissance des rameaux juste après la fécondation et la

formation du fruit (nouaison), ce dernier continu à grossir pour atteindre sa maturité en juillet, il est de couleur jaune marron.

La défoliation commence généralement à la fin du cycle végétatif et reproducteur durant la période estivale (Août) [19].

Après chaque pluie, de nouvelles fleurs apparaissent ce qui se traduit par des fruits de tailles différentes sur le même arbre [37].



Figure1.8 : Composition florale et boutons floraux avec styles apparents [16].

1.1.5.2.5. Fruit

Le fruit mûr a la grosseur d'une noix, il est jaune parfois veiné de rouge. Il est de forme ovale, ronde ou en fuseau. Il est formé d'un péricarpe charnu ou pulpe qui représente 50 à 75% du poids du fruit frais. La pulpe recouvre un noyau, appelé noix d'argane, à téguments lignifiés très épais contenant l'albumen et la plantule (**Figure1.9**) [10] [38]. Cette noix représente environ 25 à 50% du poids du fruit frais [9].



Figure1.9 : Rameau avec des fruits matures [29].

La noix contient une à trois amandes albuminées, huileuses, et renferme 50 à 60% de l'huile [9]. Le poids des amandes contenues dans les noix, représente environ 3% du poids du fruit et varie de façon importante sur un même pied (Figure 1.10) [9].

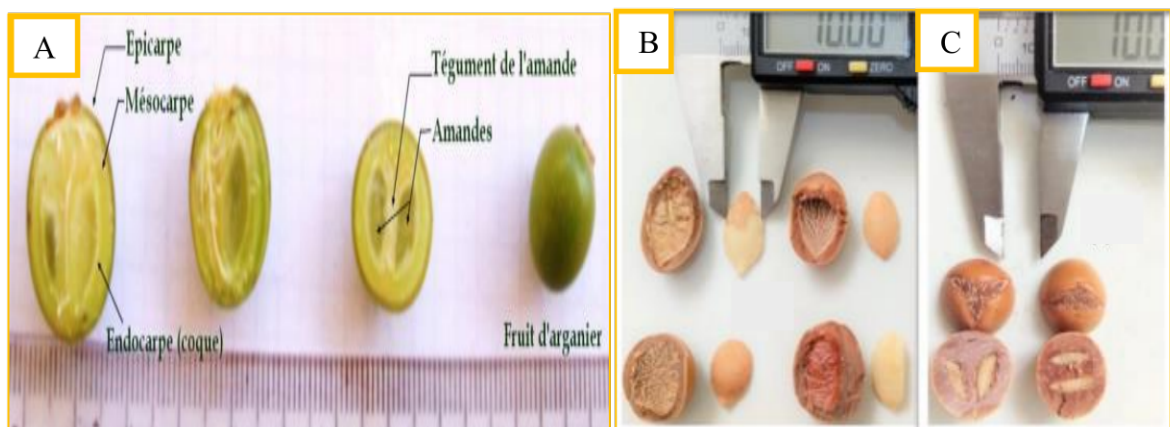


Figure1.10 : Fruits immatures, graines et amandes d'arganier [16].

A : Coupes transversales et longitudinales de fruit immature.

B : Coupes longitudinales de noix montrant l'amande.

C : Coupes transversales de noix.

1.1.5.2.6. Bois

Le bois de l'arganier, est très dur, compact, dense (de densité 0,9 à 1), appelé « bois de fer », il a fait le bonheur des charbonniers où ils ont saccagé la forêt [39].

L'âge de l'arganier ne peut être estimé qu'approximativement, en raison de la croissance irrégulière du bois pendant les premiers 30 ans. Les cernes, peu visibles, correspondent à des périodes de végétation et non à des années [40] [41]. La croissance est tributaire de l'eau et non pas du temps. En période sèche, l'arganier cesse de se développer, même si celle-ci dure plusieurs années [9].

Le bois a également des caractéristiques chimiques particulières, il est riche en saponines qui sont utilisés pour la fabrication des produits pharmaceutiques [42].

1.1.6. Ecologie de l'arganier

1.1.6.1. Facteur édaphique

L'arganier n'a aucune exigence par rapport au type de sol. Il a une grande faculté d'adaptation, il pousse aussi bien sur des schistes, des quartzites, des roches calcaires ou sur des alluvions. Il se développe aussi sur des sols salés **Gentil, (1906) in Nouaim et al., [7]**. En revanche, il ne peut s'installer sur des sables mobiles profonds, probablement à cause de décapage éolien, susceptible de mettre à nu ses racines [7].

1.1.6.2. Température

L'arganier est une espèce thermo-xérorophile [43]. Il peut supporter une température maximale de 50°C et une température minimale de 0°C [44]. Il réagit aux périodes de sécheresse prolongée en perdant tout ou une partie de son feuillage [9].

1.1.6.3. Humidité

L'arganier a besoin d'un certain degré hygrométrique de l'air. Selon **Nouaim et Chaussod, (1992) [45]** l'arganier ne s'installe que faiblement vers l'intérieur, au-delà de 150 kilomètres de l'océan atlantique, justifiant ainsi que l'humidité atmosphérique semble être un paramètre clé de l'écologie de cette espèce.

1.1.7. Importance de l'arganier

Le rôle écologique et socio-économique de l'arganier est remarquable dans les milieux sub-désertiques. Son importance peut être appréciée sur les plans suivants **[5]**:

1.1.7.1. Ecologique

L'arganier assure l'équilibre écologique, grâce à son système racinaire puissant et profond, permettant la protection et la conservation des sols contre les processus d'érosion hydrique et éolienne, particulièrement dans la région de Tindouf **[5]**.

1.1.7.2. Socio-économique

L'arganier constitue un modèle de rentabilité à condition que son exploitation soit rationnelle, toutes les parties de l'arganier sont utilisées par les populations locales **[29]**.

En effet, le bois est expressément recherché pour sa solidité aussi bien comme bois d'œuvre que comme source d'énergie. Les feuilles et les fruits sont broutés par les chèvres qui, du fait de la morphologie de l'arbre, arrivent à grimper au niveau des branches supérieures.

La graine est oléagineuse dont l'huile occupe une place soit dans l'alimentation humaine, soit pour les soins en phytothérapie ou encore comme une ressource complémentaire à l'économie des populations locales notamment les nomades qui s'installent autour des arganeraies **[5]**.

1.1.7.3. Biodiversité

L'arganier de Tindouf développe une typologie caractéristique qui semble convenir à un bon nombre d'espèces de la faune saharienne. La typologie des habitats, leur diversité ainsi que leur agencement spatial, a permis à certaines espèces des zones arides de créer leur refuge [5].

Il permet la conservation de la biodiversité faunistique non seulement en espèces endémiques algériennes, mais aussi en espèces provenant du Sahara occidental et du Maroc [46].

1.1.8. Etat d'arganeraies de Tindouf

Les actions anthropiques qui s'exercent partout à travers l'arganeraie (défrichage, coupe de bois, surpâturage) modifient considérablement la structure des peuplements, la consistance et les conditions de croissance et de développement de l'espèce. L'arganier est menacé de disparition, il subit diverses agressions. En effet, l'aire de l'arganier se dégrade d'année en année sous l'effet conjugué de l'accroissement de la population qui s'y installe et de celle des besoins en énergie (utilisation du bois d'arganier pour produire du charbon).

Les effets de la déprédation restent visibles sur de grandes étendues, à travers les souches et les rejets irréversiblement détruits suite à la persistance de l'action anthropique. La zone dite de «laminage» à l'ouest de Oued El Ma, est incontestablement celle qui a subi un maximum de pression, montrant ainsi des signes d'irréversibilité à travers la nécrose de nombreuses souches (Figure : 1.11) [5].

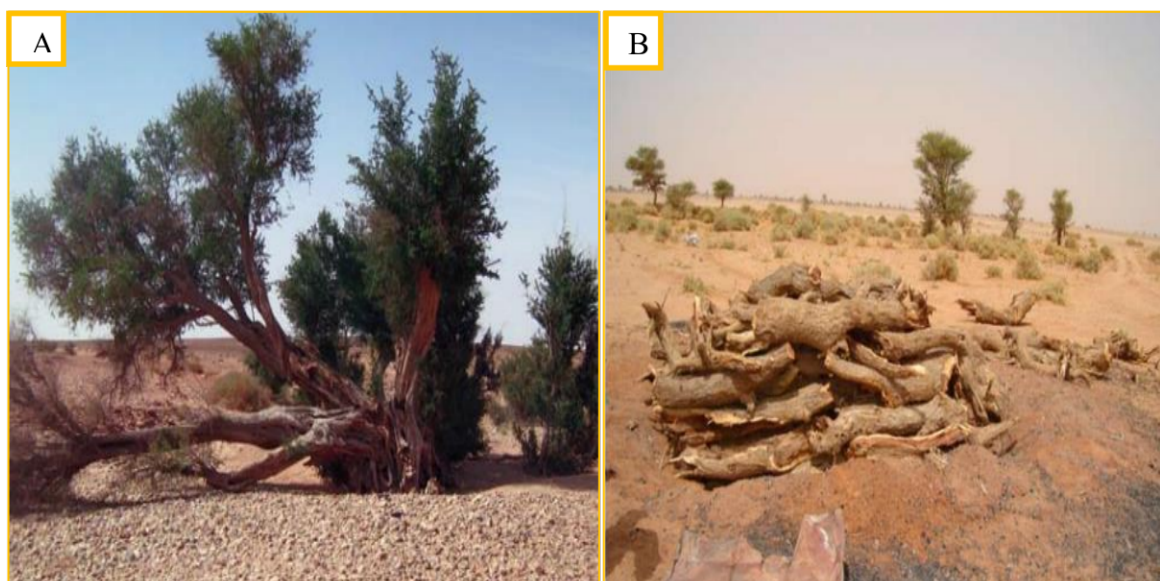


Figure : 1.11 : Action anthropique [5].

A : Coupes, B : Charbonnières.

L'arganier a résisté jusqu'à maintenant, grâce à sa grande diversité génétique [47] [48] [49]. En effet, Une approche de restauration écologique, est à suggérer à ce stade de dégradation.

1.2. Multiplication de l'arganier

L'arganier peut se régénérer naturellement par graines (germination) ou par rejets de souche. Le reboisement à savoir la régénération artificielle (bouturage ou greffage) et même les techniques modernes de la biotechnologie végétale sont utilisés pour pallier à une absence, lenteur ou déficience de la germination naturelle [9].

1.2.1. Multiplication par semis

1.2.1.1. Germination spontanée

La régénération par germination naturelle se fait par le biais des graines qui tombent sur le sol. Cette régénération nécessite, bien entendu, des conditions écologiques (climat et sol) appropriées pour la germination des graines. Au niveau de son aire de répartition, l'arganier semble souffrir d'une absence quasi-totale de régénération naturelle sauf dans de très rares endroits localisés en bordure de cours d'eau, semblant profiter d'un maximum d'humidité [5]. Cette absence de

régénération naturelle est dûe à la surpopulation et des revenus importants tirés de l'huile où toutes les noix d'argan sont précieusement ramassées. Les quelques graines qui auraient échappé à la récolte et qui auraient germé ne dépassent pas le stade de plantule car elles sont systématiquement broutées par les animaux (les chèvres en particulier). La surpopulation et le surpâturage sont également à l'origine de la quasi-disparition des touffes d'épineux qui autrefois favorisaient les germinations et formaient pour les jeunes plantules une défense naturelle contre les animaux [9].

1.2.1.2. Germination provoquée

La coque des graines de plusieurs espèces forestières semble constituer un obstacle, ce qui a poussé certains auteurs à expérimenter d'autres techniques notamment.

1.2.1.2.1. Scarification chimique

Pour favoriser la germination, les noix d'argan avant semis, elles sont trempées dans une solution acide [50]. Pour d'autres auteurs, la germination des noix d'argan ne nécessite pas de traitements chimiques préalables. Selon **Nouaim, (1994) [51]**. Un simple pré-trempeage dans l'eau, technique utilisée actuellement par les pépiniéristes, est suffisant.

1.2.1.2.2. Scarification mécanique

Le concassage du tégument osseux favorise un contact rapide des amandes avec l'eau. L'utilisation des amandes au lieu des noix pour la production de plantules d'arganier, réduit le temps de latence de deux ou trois semaines, à trois jours seulement. L'intervalle de germination est réduit de quarante à douze jours. Ainsi, la scarification mécanique améliore la capacité de germination, qui peut atteindre 100% [52].

1.2.2. Rejets de souches

De nombreux cas de rejets de souche sont observés sur le terrain. En effet, un arbre coupé forme une couronne de rejets qui se développent vigoureusement.

Cependant, une protection doit être assurée à ces rejets durant une longue période (mise en défens de 6 à 8 ans) contre le surpâturage [5].

1.2.3. Multiplication végétative

Il est tout à fait possible de multiplier des arganiers par des méthodes végétatives utilisant des techniques de (greffage, bouturage) [9].

1.2.3.1. Multiplication par bouturage

Le bouturage est une technique qui consiste à prélever une partie de plante (tige, feuille, racine) et de la mettre dans des conditions particulières pour qu'elle produit des racines et reconstituer ensuite un plant en conformité génétique avec le pied- mère. Toutefois, l'aptitude à l'enracinement diffère d'une plante à une autre. Certaines plantes s'enracinent facilement alors que d'autres n'arrivent pas à émettre de racines. Le potentiel d'enracinement des boutures dépend tout d'abord du potentiel génétique de l'espèce et/ou de la variété. En plus des facteurs génétiques, le bouturage dépend de l'âge des plantes [53].

En ce qui concerne la multiplication de l'arganier par bouturage, les premiers travaux ont été menés sur des boutures herbacées issues d'arbres adultes. Ces dernières ont été conduites sous serre de nébulisation. Les résultats obtenus étaient faibles (17% d'enracinement) encore peu maîtrisé à l'époque [53]. D'autres travaux ont été entrepris sur la multiplication par bouturage des rameaux d'arbres adultes, [54] [55] [56] montrent que les meilleurs rendements sont obtenus sous serre contrôlée (chauffage de fond des tablettes de multiplication, système de réfrigération par évaporation d'eau, système de nébulisation automatique) et un traitement à l'acide β -indole butyrique (AIB) par trempage de la partie basale dans la solution hormonale. Sous ces conditions, les taux de réussite ont été améliorés. Ces travaux ont mis en évidence un effet significatif du génotype sur les taux d'enracinement, il a été constaté des nécroses au niveau de la partie basale des explants qui impacte le niveau du rendement de l'enracinement [57].

1.2.3.2. Multiplication par greffage

Le greffage est un processus qui consiste à rassembler les performances de deux sujets, le greffon et le porte greffe. L'opération doit aboutir à la connexion des systèmes vasculaires (xylème et phloème) des deux symbiotes (porte greffe et greffon) [53].

Le greffage est beaucoup mieux adapté à l'arganier que le bouturage car, en plus de sa faisabilité pour conserver les performances des greffons (clones sélectionnés), il permet de garder les avantages du porte-greffe, notamment sa vigueur et en général des racines longues adaptées permettant à l'arganier de puiser l'eau en profondeur [53].

Jusqu'à maintenant, le greffage donne les meilleurs rendements [57]. La méthode de greffage en fente simple est la plus adaptée à la multiplication de l'arganier. Toutefois, l'effet interaction greffon/ porte-greffe constitue encore une limitation à la technique [53] [58] [59].

Chez l'arganier, en raison de la limitation et de la lenteur des méthodes classiques de multiplication végétative (bouturage et greffage), l'application de la culture *in vitro* présente une bonne alternative pour la production en masse de plants.

1.2.4. Culture *in vitro*

On appelle techniques *in vitro* un corpus de méthodes faisant intervenir d'une part des éléments d'aseptie et d'autre part impliquant la mise en place d'un environnement parfaitement contrôlé. Ces méthodes s'appliquent tout autant à des fragments de plante (tissus ou organes) et à des cellules plus ou moins isolées [60].

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 [61].

Il est bien évident que le passage d'un état différencié à l'état de cellule méristématique proliférante, ne se fait pas sans que des modifications profondes n'apparaissent dans la structure de la cellule. Ces dernières ramènent la cellule adulte à l'état juvénile, capable de s'orienter vers la formation des organes, cela manifeste la totipotence de la cellule végétale [61].

1.2.4.1. Totipotence

La totipotence est la faculté de la cellule végétale spécialisée à perdre cette spécialisation et de se multiplier sous forme d'un tissu indifférencié. Puis, elle retrouve sa spécialisation par une autre différenciation [62]. [63].

1.2.4.2. Balance hormonal

Selon SKOOG et MILLER (1957) in **Zryd, (1988) [60]**, le comportement physiologique d'un explant mis en culture en présence des deux principales hormones de croissance (auxine et cytokinine) (**Figure 1.12**):

- Si le rapport auxine / cytokinine est élevé, on obtient un fonctionnement de type rhizogène ;
- Si le rapport auxine / cytokinine est faible, l'explant évoluera vers un fonctionnement de type caulogène ;
- Enfin, si le rapport est voisin de l'unité, on aura un comportement de type callogène et/ou embryogène [60].

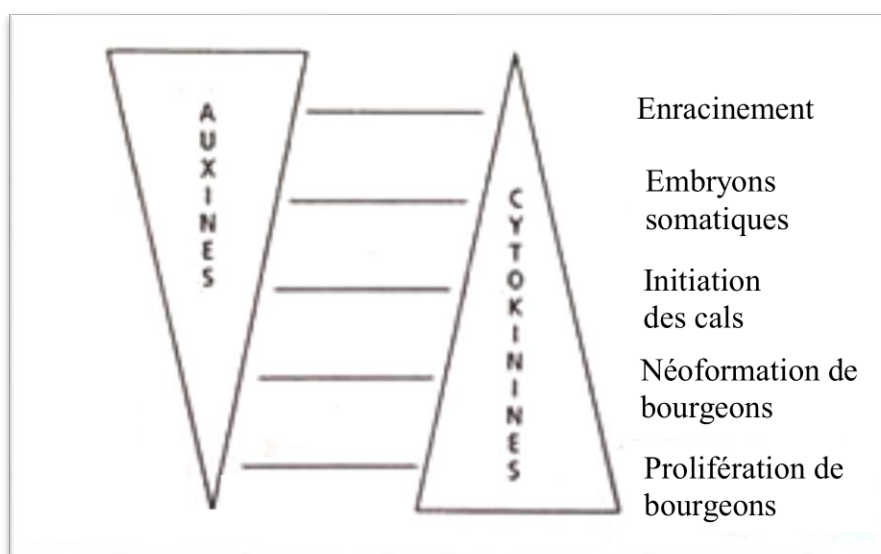


Figure 1.12: Equilibre entre auxines et cytokinines déterminant l'orientation de l'organogenèse en culture *in vitro* [64].

1.2.4.3. Voies de multiplication *in vitro*

La propagation des végétaux *in vitro* peut suivre des voies très différentes :

- Soit en provoquant et en accélérant le débourrement axillaire normal des explants,
- Soit en provoquant l'apparition de bourgeons (adventifs) en des endroits inhabituels,
- Soit en favorisant la différenciation d'embryons (embryons somatiques) **[60]**.

1.2.4.3.1. Multiplication par bourgeonnement axillaire

Un bourgeon ou portion terminale de tige mis en culture ne développe en principe qu'un seul axe par la croissance du méristème caulinaire principal. Mais la composition du milieu peut être contrôlée de telle manière que tous les bourgeons axillaires potentiellement présents puissent se développer en autant de petites tiges feuillées et celles-ci, à leur tour, peuvent développer des rameaux latéraux. Le même développement végétatif peut être provoqué à partir de fragments de tiges ou d'inflorescences pourvu qu'ils comportent des nœuds et par conséquent des bourgeons axillaires **[60]**.

Les différentes étapes de la multiplication par débourrement axillaires **[60]**:

- L'explant initial peut être soit un méristème isolé, un bourgeon terminal ou axillaire, une extrémité de tige, soit un fragment de tige comportant au moins un bourgeon axillaire.
- Sur un milieu approprié comportant peu de cytokinines, le méristème croît où le bourgeon débourre et se développe en une tige feuillée. Celle-ci peut être découpée en fragments (nœuds et segments de tige) qui, remis sur le même milieu, vont redonner autant de tiges feuillées.
- Si l'explant initial est déposé sur un milieu plus riche en cytokinines, le bourgeon débourre et donne une tige feuillée qui se ramifie elle-même et donne des rameaux secondaires et parfois de 3^{ème} ou 4^{ème} ordre.
- Les touffes des bourgeons sont fragmentées et la multiplication se réalise à ce stade.
- Lorsque le bourgeonnement axillaire est intense, une phase d'élongation, qui permet de le freiner, est nécessaire avant l'enracinement.

- Les tiges peuvent alors être transférées sur un milieu neutre ou enrichi en auxines, qui permet leur enracinement. Les plantules complètes sont alors acclimatées en terre où elles reconstituent de nouvelles plantes.

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

- **La culture de méristème**, *sensu stricto*, n'est qu'un cas particulier utilisant le seul territoire méristématique du bourgeon et ne régénérant, en principe, qu'une seule plante assainie à partir de laquelle on pourra développer le clone [60].

1.2.4.3.2. Multiplication par bourgeonnement adventif

L'initiation des bourgeons peut être en principe induite sur n'importe quel type d'organe ou de tissu y compris sur ceux qui ne les produisent pas dans les conditions naturelles [65].

Les voies suivies de multiplication par bourgeonnement adventif sont [60]:

- L'explant est constitué d'un fragment d'organe, d'une portion de tissu(s), ou même de cellules isolées (grains de pollen, protoplastes).
- Les bourgeons sont néoformés directement à partir des cellules de l'explant initial.
- Ces bourgeons se développent en tige, généralement sur le même milieu sinon, sur un milieu d'allongement.
- Les cellules de l'explant initial se divisent rapidement et forment de manière désorganisée, un cal primaire rattaché à l'explant de départ.
- Le cal primaire peut être subcultivé sur un milieu solide d'accroissement du cal.
- Le cal forme des bourgeons sur un milieu d'induction approprié.
- Toutes les tiges obtenues sont transférées sur un milieu neutre ou enrichi en auxines qui va provoquer leurs enracinements.

La conformité des plantes issues de cals n'est jamais garantie [66]. Dans la pratique industrielle, la variabilité parmi les plantes issues par micropropagation

semble pouvoir être minimisée par l'écartement systématique des plantules peu vigoureuses et chétives [60].

1.2.4.3.3. Embryogenèse somatique

Lorsqu'on place dans un milieu de culture contenant une auxine (2,4-D), un fragment de tissu de carotte (*Daucus carota*), celui-ci produit un cal qui, après transfert sur un milieu sans auxine, donne naissance à de nombreux embryons. Ce dernier, provient d'un tissu non constitué de cellules zygotiques sont appelés « embryons somatiques » [60].

- L'explant de départ est un fragment d'organe, de tissu ou de cellules isolées
- Un cal primaire est formé qui peut être dissocié et être multiplié sous forme de suspension cellulaire.
- La suspension cellulaire remise sur un milieu solide pour donner des embryoïdes (embryons somatiques).
- Les embryoïdes se développent, comme des embryons zygotiques, directement en plantules enracinées comme des plantules de semis traditionnel [60].

La culture des suspensions cellulaires est une technique moderne et rapide pour la propagation en masse de plantes à progresser [67]. Ainsi, la culture industrielle de cellules végétales est réalisée à grande échelle dans des bioréacteurs atteignant un volume de 75 000 litres [68]. [69].

Les espèces végétales expérimentées sont nombreuses, il s'agit des espèces ligneuses vivaces et herbacées annuelles [70] [71].

1.2.4.4. Etapas de micropropagation d'arganier

La micropropagation de l'arganier a débuté en 1987 [72] avec des milieux de culture et régulateurs de croissance où plusieurs essais ont été effectués et ils ont produits des cals. En 1994, les études de micro-bouturage d'une autre équipe [51] avait obtenu quatre explants sur 28 testés. Plusieurs essais ont à nouveau eu lieu à Agadir de 1994 à 2004, avec un protocole décrit par **Kenny, (2007) [72]**. Ce dernier constate que la formation de racines est difficile à obtenir et que de

nombreux problèmes restent à régler notamment la nécrose apicale, la formation des cals, l'absence de racines secondaires, divers contaminations, blocage de l'allongement racinaire et difficultés à acclimater les vitro-plants.

Des essais ont porté sur du matériel végétal provenant de pieds-mères âgés d'un an à trois ans, qui ont été élevés sous serre. Le protocole de production de micro-boutures [51] [4] [9] préconisent d'employer le milieu de Murashige et Skoog (MS) qui induit au bon développement de pousses de plus de 5 cm chez certains clones [4]. D'autres clones ont montré des taux de multiplication faibles et ont des apex nécrosés sur divers milieux testés.

Les explants sont recueillis et récupérés à partir des plantes mères sélectionnées. Après désinfection ces derniers sont soumis aux différentes phases de développement à savoir :

- ✓ Initiation de bourgeons,
- ✓ Multiplication,
- ✓ Elongation,
- ✓ Enracinement.

Les cultures sont ensuite incubées sous une photopériode de 16h/8h et une température de $25 \pm 1^\circ\text{C}$. Les repiquages sur les milieux frais sont effectués à partir de la quatrième semaine de culture. Au cours des repiquages, les jeunes pousses feuillées sont séparées et repiquées en vue de leur multiplication et élongation [73].

En effet, la multiplication par microbouturage est basée sur le développement des milieux de culture qui favorisent l'initiation, la multiplication de bourgeons ainsi que l'enracinement de vitro-plants obtenus à partir des explants [73].

Les étapes de culture *in vitro* de l'*Argania spinosa* L. sont résumées dans la (Figure 1.13) [73].

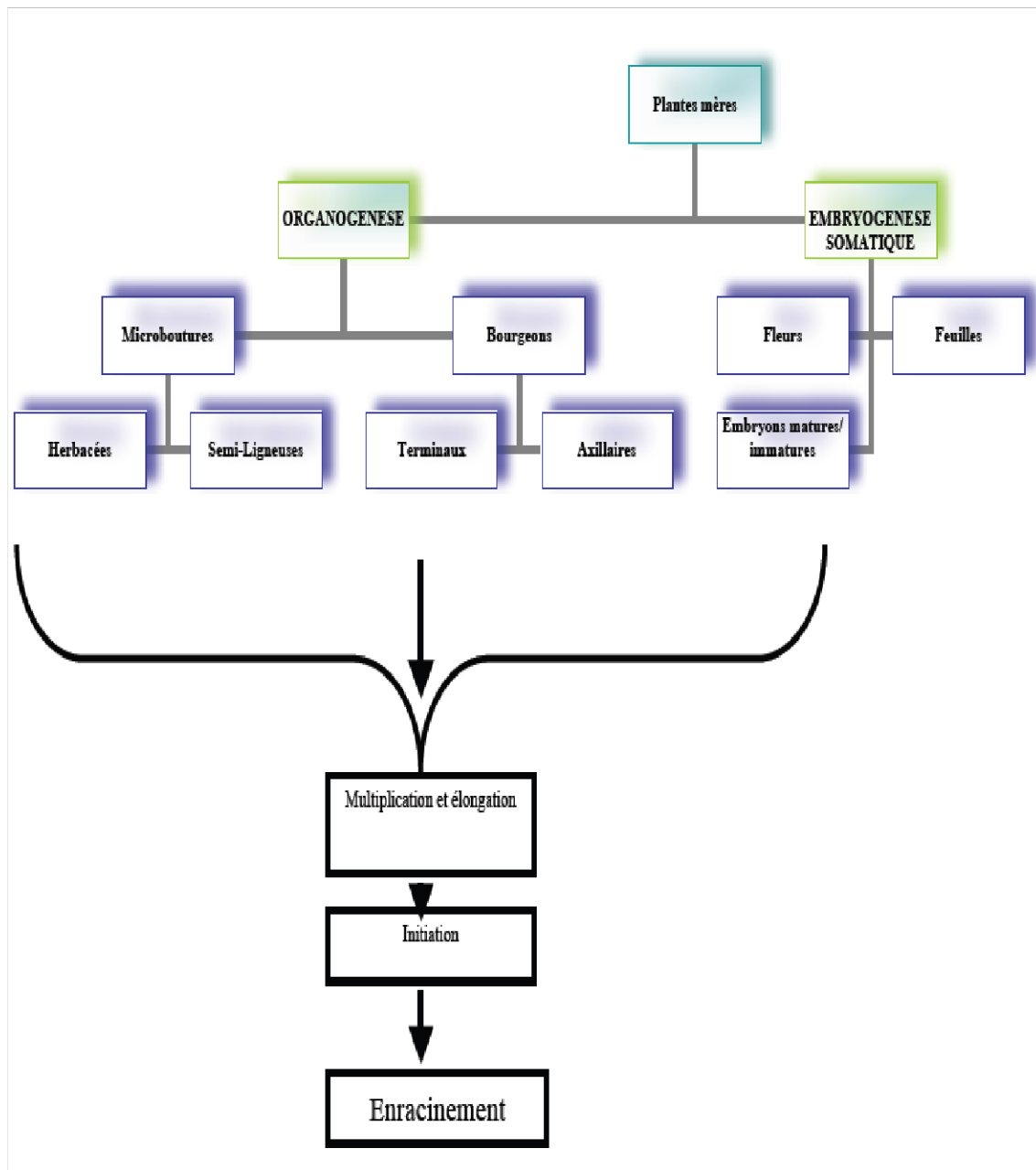


Figure 1.13 : Etapes de culture *in vitro* de l'*Argania spinosa* L. [73].

✓ Acclimatation en sol

Bien que peu de recherches systématiques aient été effectuées sur cette importante étape de transition, on conçoit que les deux facteurs les plus importants sont le substrat et l'environnement.

Les plantules doivent être soigneusement lavées pour éviter la prolifération des micro-organismes surtout les champignons, l'application d'un fongicide en

pulvérisation, dès l'acclimatation pour éviter l'attaque des jeunes plantules par différentes maladies [60].

1.2.4.5. Avantages et inconvénients de micropropagation

La micropropagation *in vitro* d'arbres ligneux a de nombreux avantages par rapport aux méthodes de propagation classiques [74].

Elle fournit une bonne alternative pour la conservation et la multiplication rapide, dans un espace limité, de nombreux arbres précieux, rares, ou menacés de disparition. Cette technique a été aussi utilisée pour l'arganier afin de produire des plants génétiquement homogènes [75].

Elle est également utile pour la production en masse d'arbres génétiquement identiques, physiologiquement uniformes, et exempts d'agents pathogènes, afin de répondre plus rapidement aux exigences de production et de restauration du système agro-forestier [76] [77].

Les techniques *in vitro* permettent la multiplication d'arbres sélectionnés indépendamment de la saison et du stade de floraison ou de production de graines ce qui nous aide à contourner les cycles de vie longs (végétatif et reproducteur) spécifiques aux arbres ligneux [74].

Cependant, la récalcitrance, la contamination, la croissance lente, et les exsudations des composés phénoliques constituent d'importants obstacles de la multiplication des arbres ligneux [78].

Chez l'arganier la variabilité génétique constitue une difficulté majeure de micro-propagation. Il s'avère impossible de mettre au point un milieu unique permettant la multiplication et l'enracinement de tous les clones [79] [4]. Ce phénomène est fréquent chez les ligneux pour lesquels il faut adapter les milieux en fonction des exigences des différentes variétés ou clones étudiés.

MATERIEL ET METHODES

2.1. Site expérimental

L'expérimentation s'est déroulée au niveau des laboratoires de :

- Culture *in vitro* de l'unité UPEV à l'entreprise EHEV de Bab Ezzouar, (Alger) ;
- Biotechnologies, Environnement et Santé du département de Biologie et Physiologie Cellulaire et d'amélioration des plantes du département des Biotechnologies de la Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie, Université Blida 1, Algérie.

2.2. Matériel végétal utilisé

Le matériel végétal utilisé lors des essais effectués, provient de l'espèce d'*Argania spinosa* L. Skeels, se trouvant dans une arganeraie à Tindouf localité de Hamada de Draâ, zone de Touaref Bou-âam à Oued El-Ma et dans un arboretum de la station de recherche de Baraki (INRF).

2.2.1. Provenance et préparation du matériel végétal

Durant notre expérimentation, nous avons réalisé deux essais sur deux types de matériel végétal :

- Juvénile ;
- Adulte.

2.2.1.1. Matériel végétal juvénile

Nous avons obtenu ce matériel végétal (vitro-semis) après germination *in vitro* des graines matures, récoltées en Juillet 2016, durant la phase de maturation des fruits sur des arbres adultes de plus de 20 ans, situés à la station de recherche forestière (INRF) de Baraki (**Figure 2.1**).

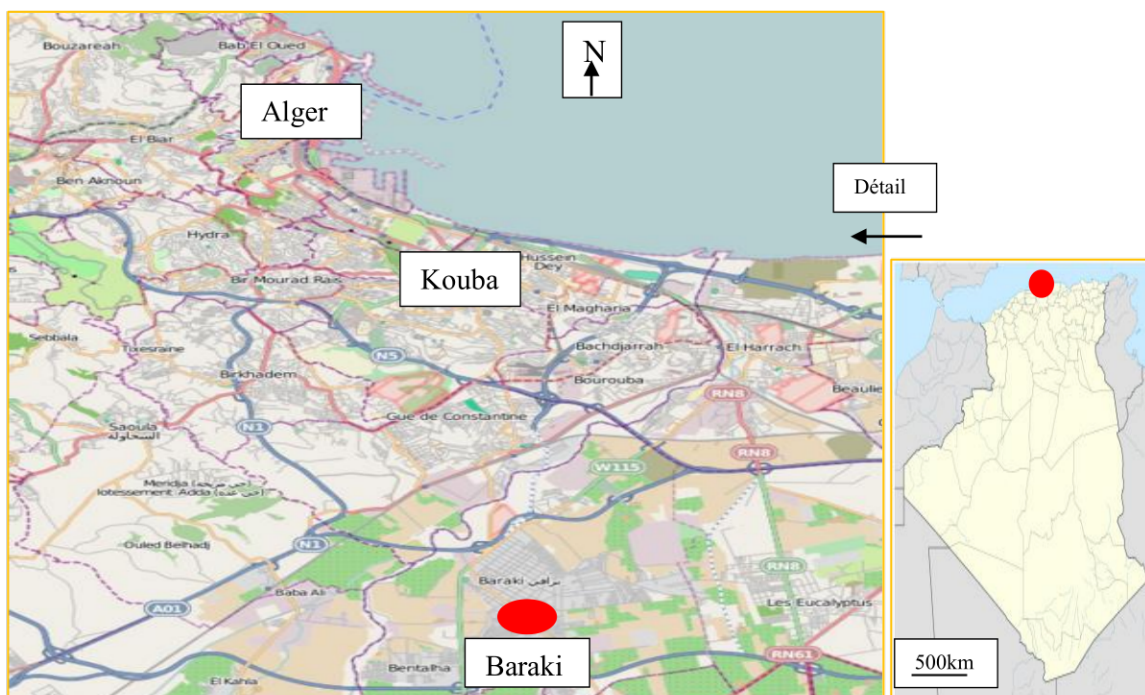


Figure 2.1 : Carte de localisation de site de prélèvement des fruits d'INRF de Baraki (Coordonnées 36° 47' 43" N, 2° 57' 50" E).

Les fruits sont débarrassés de leurs péricarpes (pulpes) pour avoir des noix qui sont placées dans des sachets en plastiques puis conservées à une température ambiante de laboratoire à $25 \pm 2^{\circ}\text{C}$. Lors de leur utilisation, certaines ont été débarrassées de leur endocarpe lignifié afin d'obtenir des amandes qui seront utilisées dans nos expérimentations.

2.2.1.2. Matériel végétal adulte

Nous avons taillé des rameaux semi-ligneux à partir d'arbres adultes (plus de 100 ans) provenant de Oued El-Ma (Tindouf) (**Figure 2.2**), que nous avons transporté dans des sacs en jutes, humidifiés et placés dans des glacières pour éviter leurs dessèchement.

Au laboratoire, les rameaux ont été segmentés en boutures de 7 cm afin de les désinfecter.

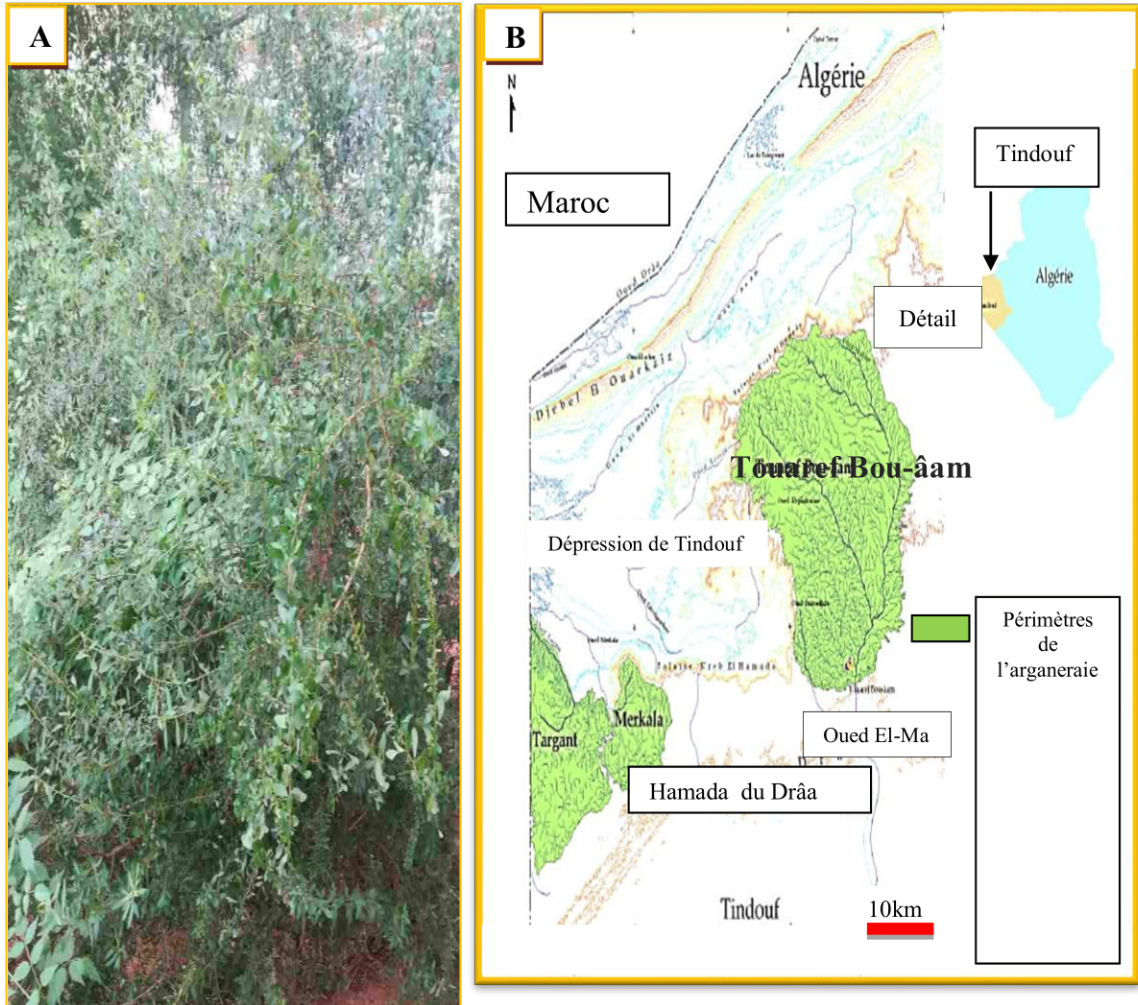


Figure 2.2 : Aspect et site de prélèvement du matériel végétal adulte

A : Etendue d'arbres de Oued El-Ma (Tindouf).28°30'42"N8°18'54"W.

B : Carte de localisation de site de prélèvement.

2.2.2. Description botanique de l'arganier

L'arganier (*Argania spinosa* L.) est un arbre pouvant atteindre 8 à 10 mètres de haut, présentant des rameaux épineux dressés ou pleureurs (**Figure 2.3**).



Figure 2.3 : Aspect morphologique d'*Argania spinosa* L. de Baraki (Photo originale).

La grande variabilité entre les arbres est accentuée par la variabilité de la taille et de la forme des feuilles et des fruits.

Les feuilles sont alternées lancéolées généralement longues d'environ 2 à 3 cm (**Figure 2.4**), elles sont de couleur vert sombre à la face supérieure (**Figure 2.5.B**), plus claire en dessous (**Figure 2.5.A**), elles sont simples (**Figure 2.4**) ou groupées en rosette (**Figure 2.6**).

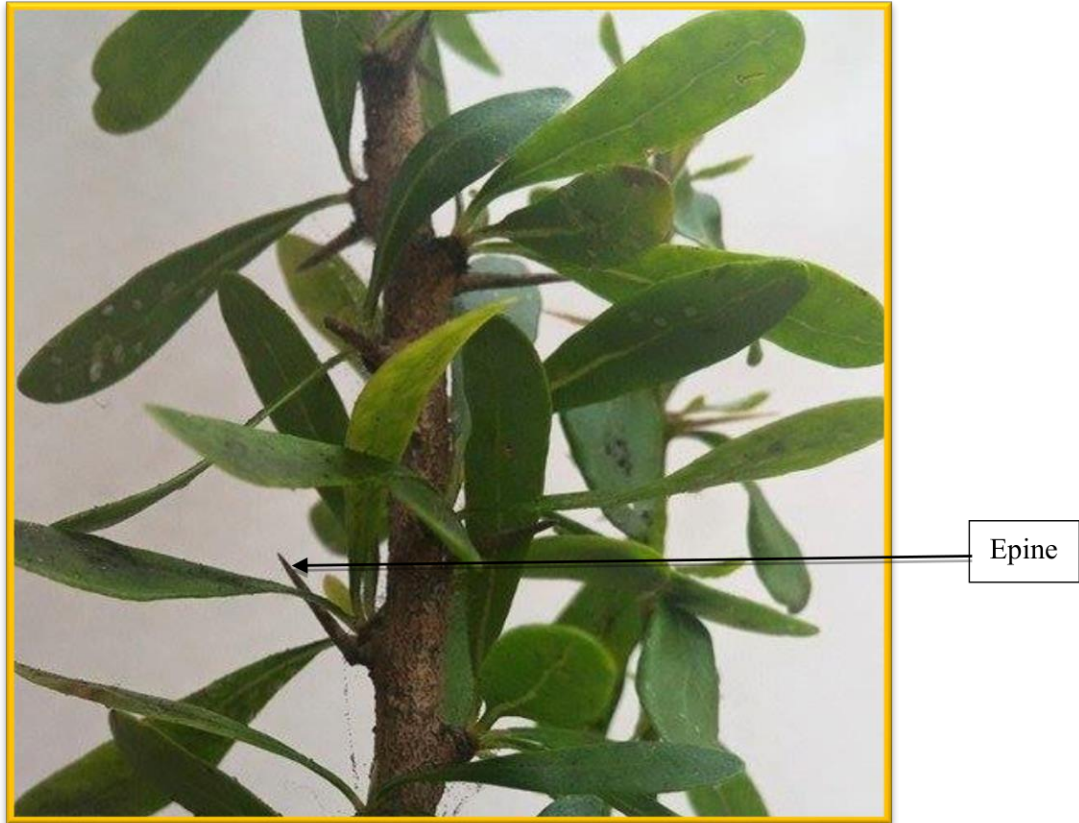


Figure 2.4 : Rameau lignifié feuillé d'arganier avec des épines
(Photo originale).

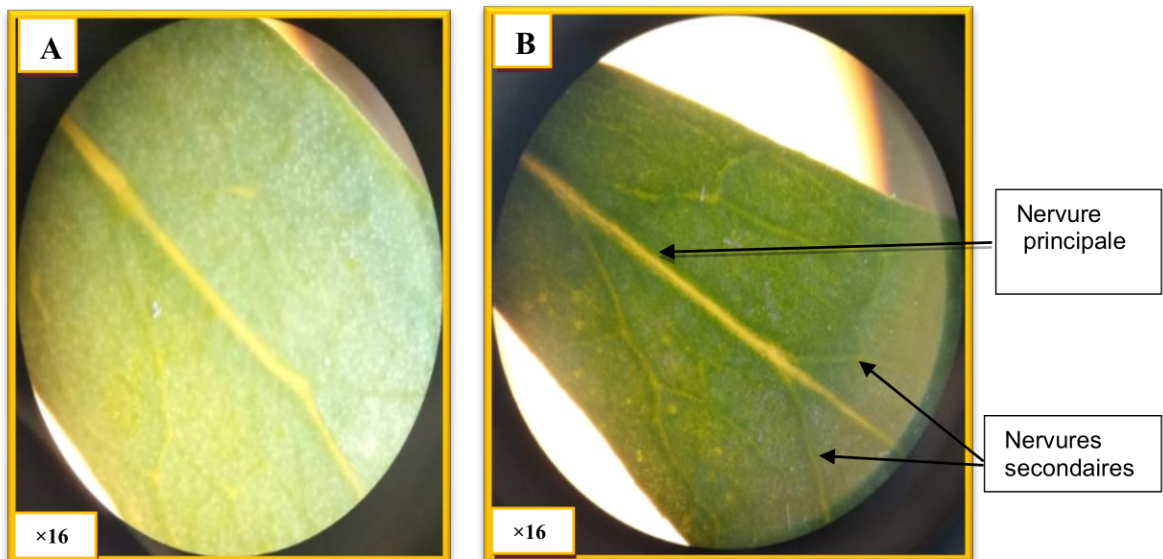


Figure 2.5 : Feuille d'*A. spinosa* sous loupe binoculaire (G×16)
(Photos originales).

A : Face inférieure, **B** : Face supérieure.



Figure 2.6 : Aspect des rameaux d'arganier avec des fruits (Station Baraki, Alger) (Mars 2016, photo originale).

Le fruit est une baie ovale, fusiforme de 2 à 3 cm de long environ, jaune-brun à maturité (**Figure 2.7**). Contenant une noix très dure (**Figure 2.8**), à téguments lignifiés très épais (**Figure 2.9 A**) de 2 à 3 mm d'épaisseur, abritant une à trois amandes (amandons) (**Figure 2.9 B**), ce dernier contient un embryon (**Figure 2.9 C**).



Figure 2.7 : Fruits secs d'*Argania spinosa* L. (Photo originale).



Figure 2.8 : Lot de noix d'*Argania spinosa* L.
(Photo originale).

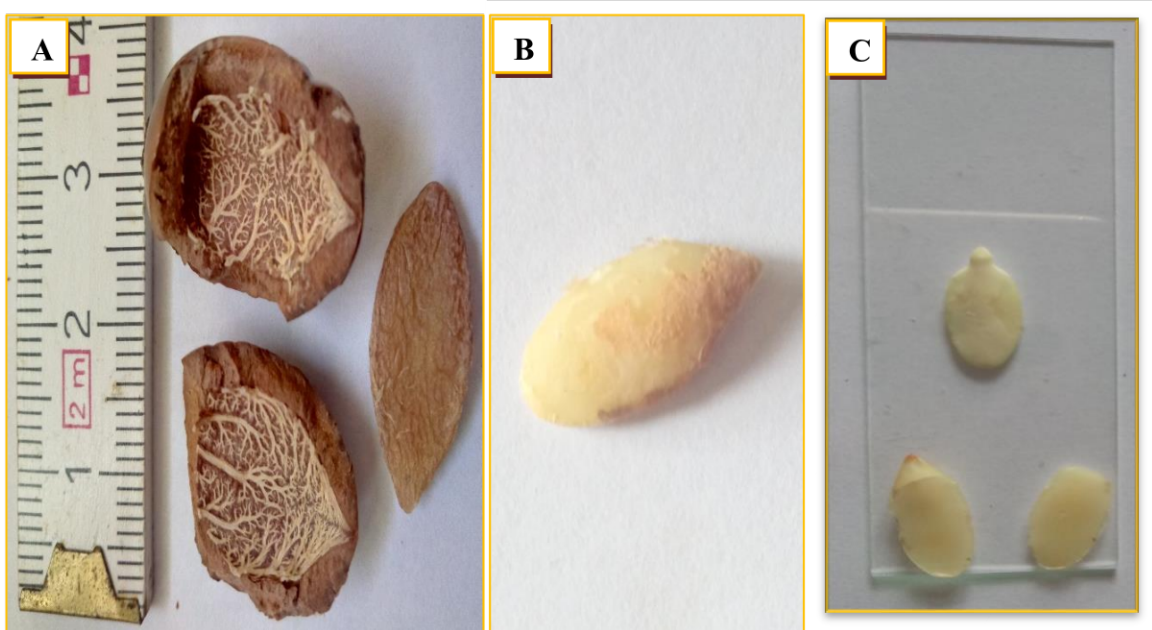


Figure 2.9 : Détails de noix d'*Argania spinosa* L.
(Photos originales).

- A : Noix ouverte montrant un tissu nourricier vascularisé,
- B : Amande,
- C : Embryon avec les deux cotylédons.

PREMIERE PARTIE : GERMINATION *IN VITRO* DES GRAINES

2.1. Germination des graines

Pour l'obtention du matériel végétal juvénile nous avons procédé à la détermination des conditions optimales de la germination *in vitro* des graines.

2.1. 1. Noix

Nous avons, dans un premier temps, effectué des essais préliminaires de la germination sur des noix (préalablement trempées dans de l'eau tiède) en réalisant une scarification chimique qui consiste en un trempage dans de l'eau oxygénée (H₂O₂) (10 volumes) à température de $25 \pm 2^\circ\text{C}$ pendant 2 , 4 et 7 jours afin de suivre le ramollissement de l'endocarpe d'aspect osseux (**Figure 2.10**).

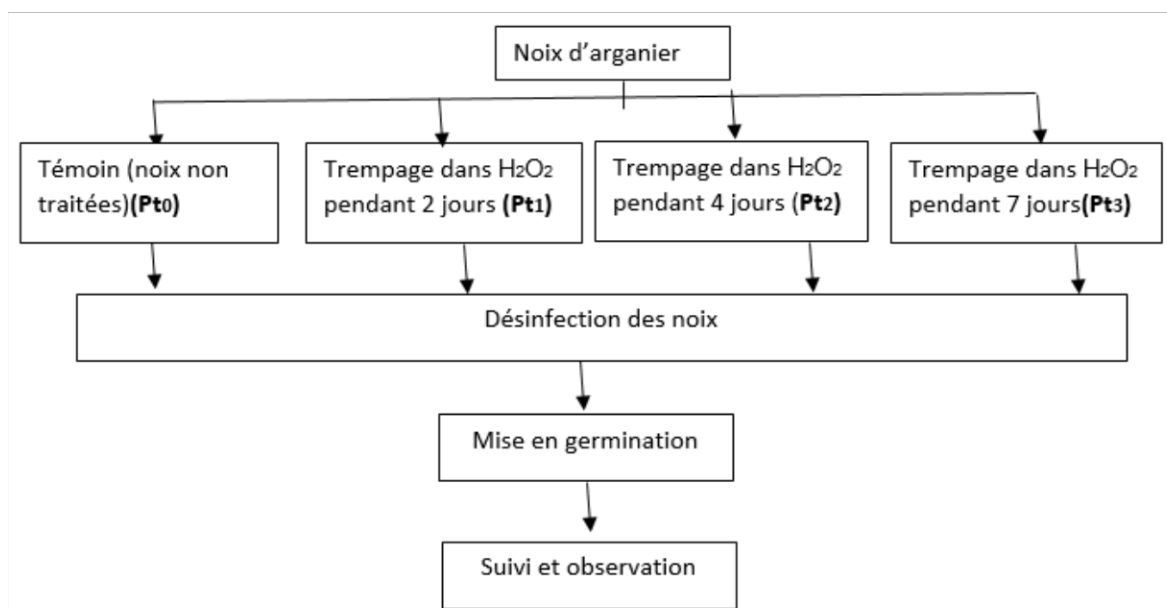


Figure 2.10 : Organigramme des différents prétraitements appliqués sur les noix.

Pt0 : prétraitement témoin, **Pt1** : prétraitement 1, trempage des noix dans H₂O₂ pendant 2 jours ; **Pt2** : prétraitement 2, trempage des noix dans H₂O₂ pendant 4 jours ; **Pt3** : prétraitement 3, trempage des noix dans H₂O₂ pendant 7 jours.

2.1.2. Amandes

Un second essai de scarification mécanique des noix réalisé avec un outil tranchant où nous avons testé l'effet de type de désinfection sur le pouvoir germinatif et le développement des vitro-semis.

2.2. Désinfection des graines

La désinfection est une étape importante de la culture *in vitro*, elle a pour objectif la stérilisation des noix et des amandes afin de diminuer les risques de contaminations ultérieures. Il s'agit d'une stérilisation en surface. Elle consiste en une série de traitements par immersion complète et pour des durées variables dans différents types de bains, elle est effectuée selon le protocole de désinfection suivant :

-Trempe dans une solution fongicide à 1 g/l dont la matière active est le thiophanate-méthyl à 70% pendant 40 mn sous agitation [80].

-Mise en agitation dans l'éthanol 70% (v/v) (**Annexe 3**) pendant une minute, afin d'améliorer l'efficacité des agents désinfectants [81].

-Immersion dans une solution désinfectante d'hypochlorite de sodium (NaClO) à 8° et à 16° pendant 5, 10, et 15 mn (**Tableau 2.1**) [80].

-Trois rinçages successifs à l'eau distillée stérile sont effectués après chaque trempage.

Tableau 2.1 : Conditions de désinfection des graines à NaClO

Concentrations de NaClO	Temps de trempage		
	5 mn	10mn	15 mn
8°	T1	T2	T3
16°	T4	T5	T6

T : traitement

2.3. Milieu de germination

Nous avons utilisé une eau minérale gélosée stérile (EG) pour la germination [82] (**Annexe 1**). Le pH est ajusté à 5,7 avant l'ajout de 7g/l d'agar, les milieux ainsi préparés sont transférés dans des tubes à essais de 25 x 75 mm, à raison de 30 ml par tube. Ils sont autoclavés, à une température de $121 \pm 5^\circ\text{C}$ pendant 20 minutes.

2.4. Mise en germination

Sous une hotte à flux laminaire et dans des tubes contenant 30 ml de milieu de culture stérilisé au préalable, les amandes et les noix désinfectées sontensemencées à raison d'une amande ou une noix par tube. Nous avons utilisé 20 noix pour chaque traitement de désinfection et prétraitement avec trempage dans H₂O₂ pendant 2 jours (Pt1), 4jours (Pt2), 7 jours (Pt3) et Pt0 (témoin : aucun trempage). Parallèlement, nous avons utilisé 20 amandes pour chaque type de traitement de désinfection (**Tableau 2.1**).

Les tubes sont scellés par du parafilm et placés dans la chambre de culture à une température de 25 ± 2°C et une photopériode de 16/8 h.

2.5. Paramètres mesurés

Nous avons effectué les paramètres suivants :

2.5.1. Taux de contamination

Il est effectué par un comptage des amandes contaminées par rapport au nombre total de 480 noix et 120 amandes.

2.5.2. Taux de germination

Un pourcentage des graines germées par rapport au nombre total est calculé selon la formule suivante :

$$\% \text{ de germination} = \frac{\text{nombre de plantules}}{\text{nombre d'embryons mis sur le milieu de germination}} \times 100$$

2.5.3. Croissance des vitro-semis

La hauteur des plantules est mesurée, après 45 jours de culture. Pour cela, les mesures ont été réalisées en couchant les plantules sur du papier millimétré.

2.5.4. Nombre de jeunes feuilles par vitro-semis

Un dénombrement des jeunes feuilles par plantule est effectué après 45 jours de culture.

DEUXIEME PARTIE : MICROPROPAGATION PAR MICROBOUTURAGE

Le microbouturage nécessite d'une part, des conditions d'aseptie par la désinfection du matériel végétal et d'autre part, un milieu de culture favorable.

2.1. Désinfection du matériel végétal

La stérilisation ne concerne que le matériel végétal adulte provenant des boutures de Tindouf (Oued El-Ma). Le matériel végétal juvénile utilisé provient des vitro-semis stériles.

La technique de stérilisation est réalisée sous une hotte à flux laminaire, après rinçage du matériel végétal à l'aide d'une eau distillée, le végétal est trempé dans une solution de fongicide à 1g/l (dont la matière active est le thiophanate-méthyl à 70%) pendant 40 mn sous agitation, ensuite, il est trempé rapidement (pendant 1mn) dans l'éthanol à 70° (**Annexe 3**), puis, dans une solution désinfectante d'hypochlorite de sodium (NaClO) à 8° pendant 10 mn. Après chaque trempage nous avons effectué trois rinçages à l'eau distillée stérile pour éliminer toutes traces de produits.

2.2. Milieux de culture de base

Afin de déterminer les conditions nutritives favorables au débourrement et à la croissance des explants, nous avons choisi le milieu de base Murashig et Skoog (MS), Gamborg (B5) et Woody plant médium (WPM). Les **Tableaux 2.2 ; 2.3 et 2.4** résument la composition chimique de chaque milieu testé.

Tableau 2.2 : Constituants du milieu MS [83].

Solutions	Composés	Concentrations (mg/l)	Volume de prélèvement pour 1l de milieu (ml)
Macroéléments MS (A)	NH ₄ NO ₃	1650	100
	KNO ₃	1900	
	CaCl ₂ .2H ₂ O	440	
	MgSO ₄ .7H ₂ O	370	
	KH ₂ PO ₄	170	
Microéléments MS (B)	MnSO ₄ .H ₂ O	16.9	1
	ZnSO ₄ .7H ₂ O	8.6	
	H ₃ BO ₃	6.2	
	KI	0.83	
	Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	0.25	
	CuSO ₄ .5H ₂ O	0.025	
	CoCl ₂ .6H ₂ O	0.025	
Fe EDTA(C)	Na ₂ -EDTA	3.725	10
	FeSO ₄ .7H ₂ O	2.785	
Sucre	Saccharose	30000mg	
Agar	Agar	7000mg	
Myo-inositol	Myo-inositol	100mg	
Vitamines (D)	Concentrations (mg/l)	Volume de prélèvement pour 1l de milieu (ml)	
Acide nicotinique	0.05	10	
Pyridoxine HCl	0.05		
Glycine	0.2		
Thiamine	0.01		

Tableau 2.3 : Constituants du milieu Gamborg (B5) [84].

Solutions	composés	Concentrations (g/l)	Volume de prélèvement pour 1l de milieu (ml)
A	(NH ₄) ₂ SO ₄	6.70	20
B	KNO ₃	125.00	20
C	H ₃ BO ₃	0.60	5
	NaH ₂ (PO ₄).H ₂ O	30.00	
	KI	0.15	
	Na ₂ MoOA. 2H ₂ O	0.05	
	CoCl ₂ .6.H ₂ O	0.005	
D	CaCl ₂ .2H ₂ O	30.00	5
E	MgSO ₄ .7H ₂ O	50.00	5
	MnSO ₄ .H ₂ O	2.00	
	ZnSO ₄ .7H ₂ O	0.40	
	CuSO ₄ .5H ₂ O	0.005	
F	Sequestrène 330Fe	5.60	5
G	Thiamine.HCl	2.00	5
	Ac.Nicotinique	0.20	
	Pyridoxine.HCl	0.20	
H	Myo-inositol	100mg	
sucre	Saccharose	30000mg	
Agar	Agar	7000mg	

Tableau 2.4: Composition du milieu Woody Plant Medium (WPM) [85].

Solutions mères	Constituants	Volume total pour chacune des solutions mères (ml)	Quantité à peser (g)	Volume de solution mère à prélever pour faire 1l de milieu WPM (ml)
A	NH ₄ NO ₃ Ca(NO ₃) ₂ , 4H ₂ O	400	8 11,12	20
B	K ₂ SO ₄	400	19,8	20
C	CaCl ₂ , 2H ₂ O	100	1,92	5
D	KH ₂ PO ₄ H ₃ BO ₃ Na ₂ MoO ₄ , 2H ₂ O	100	3,4 0,124 0,005	5
E	MgSO ₄ , 7H ₂ O MnSO ₄ , H ₂ O ZnSO ₄ , 7H ₂ O CuSO ₄ , 5H ₂ O	100	7,4 0,446 0,172 0,005	5
F	FeSO ₄ , 7H ₂ O Na ₂ , EDTA	100	0.557 0.745	5
G	Thiamine HCl Acide Nicotinique Pyridoxine HCl Glycine	100	0.02 0.01 0.01 0.04	5

Les milieux Murashige et Skoog (MS), Gamborg (B5) et Woody Plant Medium (WPM) sont préparés à partir des solutions mères qui sont préparées puis conservées au réfrigérateur (**Annexe 2**). Le pH des milieux de culture est ajusté à $5,7 \pm 0.1$ avec HCl (10%) ou NaOH (1N), nous ajoutons 30g/l de saccharose, 7g/l d'agar et 0.5 g / l de charbon actif. Aux milieux ainsi préparés, des régulateurs de

croissance, ont été incorporés, selon les essais entrepris lors de notre expérimentation.

Les milieux préparés sont transférés dans des tubes à essais de 25 x 75 mm, à raison de 30 ml par tube et/ou dans des bocaux à raison de 100 ml par bocal. Ils sont autoclavés, à une température de $121 \pm 5^\circ\text{C}$ pendant 20 minutes.

2.3. Régulateurs de croissance

Trois classes de régulateurs de croissances (cytokinines, auxines et gibbérellines) ont été testées à différentes concentrations. Une solution-mère par hormone de croissance a été préparée à une concentration de 0,1mg/ml. Pour cela, nous avons pesé 10 mg de chaque régulateur de croissance que nous avons dissous dans quelques gouttes de solvant approprié (NaOH, HCl et H₂O+ chauffage) le mélange est ajusté à 100 ml avec de l'eau distillée.

Les solutions mères ainsi préparées sont conservées dans des flacons bruns au réfrigérateur à 4°C jusqu'à leurs utilisation (**Tableau 2.5**).

Tableau 2.5 : Type de régulateurs de croissance et leur solubilité [80].

Régulateurs de croissance utilisés	Solvants
Auxines (AIA, AIB, ANA et 2,4-D)	NaOH
Cytokinines (BAP, Kin et 2-IP)	HCl
Gibbérelline A3 (GA3)	H ₂ O+ chauffage

La micropropagation se déroule en quatre étapes successives [86] :

- Etablissement de la culture aseptique ;
- Elongation ;
- Enracinement ;
- Acclimatation.

2.4. Néoformation des bourgeons

Afin de déterminer la combinaison hormonale favorable pour le débourrement d'*Argania spinosa* L. nous avons testé différentes concentrations de phytohormones, ce choix est réalisé après plusieurs tests préliminaires.

Pour les explants issus du matériel végétal adulte provenant de Oude El-Ma (Tindouf), nous avons testé les différentes combinaisons hormonales suivantes (Tableau 2.6).

Tableau 2.6 : Concentrations des phytohormones de néoformation des bourgeons (végétal adulte de Oude El-Ma Tindouf)

Milieux	BAP (mg /l)	KIN (mg /l)	AIA (mg /l)	AIB (mg /l)	ANA (mg /l)
Mi0	0	0	0	0	0
Mi1	1				
Mi2	1.5				
Mi3		1			
Mi4		1.5			
Mi5	1	1			
Mi6		1.5	0.5		
Mi7		1.5		0.5	
Mi8		1.5			0.5
Mi9	1.5		0.5		
Mi10	1.5			0.5	
Mi11	1.5				0.5
Mi12	3				

Pour les vitro-semis nous avons utilisé les concentrations suivantes : (Tableau 2.7).

Tableau 2.7 : Concentrations des phytohormones de néoformation des bourgeons (végétal juvénile provenant des vitro-semis de la station de Baraki d'INRF)

Milieux	BAP (mg /l)	KIN (mg /l)	AIA (mg /l)	AIB (mg /l)	ANA (mg /l)
Mi0	0	0	0	0	0
Mi1	1		0.5		
Mi2	1			0.5	
Mi3	1				0.5
Mi4	1.5				0.5
Mi5	2				0.1
Mi6		1	0.5		
Mi7		1		0.5	
Mi8		1			0.5
Mi9		1.5	0.5		
Mi10			0.5		
Mi11	1				

2.5. Elongation

Quatre milieux à différentes concentrations de gibbérelline A3 (GA3) sont testés, afin de mettre en évidence l'influence de cette hormone de croissance sur l'allongement caulinaire des vitro-plants obtenus (**Tableau 2.8**).

Tableau 2.8 : Concentrations de GA3 testées pour le milieu d'allongement

Milieux	Concentration de GA3 (mg /l)
Ma0	0
Ma1	0,5
Ma2	1
Ma3	1,5

2.6. Enracinement

Pour l'induction de primordiums racinaires deux essais ont été entrepris :

- 1^{er} essai, enracinement *in-vitro* : mise en culture des explants à enraciner dans des conditions stérile (*in vitro*) avec les différentes combinaisons hormonales (**Tableaux 2.9 et 2.10**).

Pour cette phase nous avons utilisé le milieu de base Murashige et Skoog, (1962) réduit (MS/2) additionné de différentes concentrations de régulateurs de croissance. Nous avons également, réduit la quantité d'agar à moitié (3,5 g/l) et nous avons testé l'effet du charbon actif (0,5 g /l) sur l'enracinement des explants d'*Argania spinosa* L. Deux lots ont été testés, avec et sans l'ajout de charbon actif.

- Le second essai, enracinement mixte : dans un premier temps, les pousses ont proliféré *in vitro* dans des tubes, puis elles sont enracinées dans un substrat horticole composé de tourbe, de perlite et d'endocarpe des graines d'arganier broyées (**Annexe 4**) à raison de (1:3 :1 ; v/v) préalablement autoclavé à $120 \pm 5^{\circ}\text{C}$ pendant 20 mn puis transférés dans une chambre de culture. Elles sont arrosées quotidiennement par une solution auxinique contenant un mélange de 1 mg/l d'AIB et d'ANA pendant deux semaines. Ensuite, elles sont transférées dans une serre d'acclimatation contrôlée.

Tableau 2.9 : Concentrations hormonales testées pour le milieu rhizogène
(végétal adulte de Oude El Ma Tindouf)

Milieux	AIA (mg /l)	AIB(mg /l)	ANA(mg /l)	GA3(mg /l)
M0	0	0	0	0
M1	2			0.5
M2		2		0.5
M3			2	0.5
M4	1	1		0.1
M5	1		1	0.1
M6		1	1	0.1
M7		1.5	1.5	
M8		5	5	
M9		2	2	0.5
M10		1	1	
M11	1.5	1.5	1.5	
M12		1	1	0.5
M13	1	1	1	0.1

Tableau 2.10 : Concentrations hormonales testées pour le milieu rhizogène
(végétal juvénile provenant des vitro-semis de la station de Baraki d'INRF)

milieux	AIB mg/l	ANA mg/l	GA3 mg/l	Kin mg/l	BAP mg/l	2.IP mg/l
Mr0	-	-	-	-	-	-
Mr0 ₁	-	-	-	-	-	-
Mr0 ₂	-	-	-	-	-	-
Mr3	1	1	-	-	-	-
Mr4	2	2	0,1	-	-	-
Mr5	5	5	0,05	-	-	-
Mr6	1	1,5	-	0,1	-	-
Mr7	1,5	-	-	0,1	-	-
Mr8	10	0,5	-	-	-	-
Mr9	20	0,5	-	-	-	-
Mr10	-	1	-	-	0,5	-
Mr11	-	1	-	-	-	0,5

Toutes les microboutures obtenues utilisées pour l'enracinement proviennent de l'étape d'élongation caulinaire (allongement) du milieu MS contenant GA3.

Exception faite pour les milieux Mr0₁ et Mr0₂ où nous avons utilisé des microboutures préalablement mises en culture sur milieu MS avec ajout de 0.5mg/l d'ANA et d'AIB respectivement, puis elles ont été transférées sur ces milieux Mr0₁, Mr0₂ qui ne contiennent pas des régulateurs de croissance pour favoriser la rhizogenèse.

2.7. Mise en culture

Pour initier la miropagation (débourrement), nous avons utilisé des explants d'environ 1 cm de longueur contenant des bourgeons axillaires mono ou bi-nodaux et sont introduits verticalement dans des bocaux contenant 100 ml de milieu de culture à raison de 10 microboutures et/ou dans des tubes à essai à raison d'un explant par tube. Ces derniers, sont scellés avec du parafilm pour éviter leur dessiccation et pour réduire les contaminations [87].

Ils sont placés ensuite dans la chambre de culture à une température de $25 \pm 2^\circ\text{C}$ sous une photopériode de 16/8h.

Des subcultures sont réalisées, à partir de la culture primaire, chaque 2 mois, les vitro-plants sont fragmentés (en explants de 1 cm) et remis sur le même milieu frais. Ensuite, ils sont transférés sur le milieu d'élongation.

Concernant la rhizogenèse, les vitro-plants vigoureux obtenus après 4 subcultures sont fragmentés et mis en culture sur les différents milieux d'enracinement testés, puis sont placés à l'obscurité dans une chambre de culture à une température de $25 \pm 2^\circ\text{C}$ pour favoriser l'émission racinaire au détriment de la partie aérienne.

Après l'émergence des radicelles, ces vitro-plants sont transférés sur un milieu MS/2 sans régulateurs de croissance et placés ensuite dans la chambre de culture sous une photopériode de 16/8h, afin de favoriser l'élongation racinaire et caulinaire.

2.8. Paramètres mesurés

A chaque subculture, et étape de microbouturage. Nous avons calculé :

- Taux de contamination ;
- Longueur des pousses (phase de néoformation de bourgeons) ;
- Nombre de feuilles par pousse ;
- Nombre de bourgeons néoformés par pousse ;
- Longueur caulinaire (phase d'élongation) ;

- Taux des micro-boutures enracinées ;
- Longueur des racines néoformées.

2.9. Acclimatation

Les vitro-plants enracinés sont repiqués dans des pots de volume 100 ml contenant un substrat naturel composé de tourbe, de perlite et d'endocarpe des graines d'arganier broyées (**Annexe 4**) à raison de (1:3 :1 ; v/v) préalablement autoclavé à $120 \pm 5^\circ\text{C}$ pendant 20 mn. Les pots sont mis en une chambre de culture pour la pré-acclimatation, puis en serre d'acclimatation contrôlée.

2.10. Etude histologique

L'étude histologique est effectuée par l'observation au microscope photonique aux différents grossissements ($\times 40$, $\times 100$ et $\times 400$) pour mieux observer les tissus existants.

Elle se base sur la réalisation des coupes au microtome des organes imprégnés dans de la paraffine. Elle nécessite plusieurs étapes fondamentales qui sont détaillées en (**Annexe 5**).

Concernant la coloration des coupes (pour notre essai, nous avons utilisé la double coloration) [88]. Elle est réalisée selon les étapes suivantes :

- Bain dans l'hypochlorite de sodium (NaClO) pendant 10 à 15 mn afin de vider les cellules de leur contenu cellulaire.
- Rinçage à l'eau pendant 10 à 20 mn pour éliminer les traces de NaClO .
- Bain rapide dans l'acide acétique pendant 1 mn.
- Rinçage à l'eau pendant 10 à 20 mn.
- Bain de vert de méthyle pendant 5 à 10 mn.
- Rinçage à l'eau pendant 10 à 20 mn.
- Bain de rouge Congo pendant 10 mn.
- Rinçage abondant à l'eau.

Tableau 2.11 : Technique de double coloration des coupes

Nature chimique de la paroi	Coloration
<ul style="list-style-type: none"> - Paroi pectocellulosique - Paroi lignifiée (Imprégnée de lignine) - Paroi subérifiée (Imprégnée de subérine). 	<ul style="list-style-type: none"> - Rose pâle à rose foncé (Rouge Congo) - Verte (vert de méthyle) - Verte (vert de méthyle puis vire au marron).

Le montage des préparations entre lame et lamelle permet la protection mécanique des coupes et la conservation aussi longue que possible des colorations ou réactions histochimiques.

Les lames prêtes à l'observation sont conservées dans une boîte de collection métallique hermétiquement fermée.

2.11. Analyses statistiques

L'analyse statistique a porté sur la comparaison des différents traitements à l'aide d'une analyse de variance (ANOVA) au seuil de 5% en utilisant le logiciel « STATISTICA version 8.0. » Cette analyse permet de déceler l'existence des effets significatifs des traitements appliqués, (on considère qu'il existe une différence significative entre les traitements quand $P \leq 0,05$), suivie d'une comparaison des moyennes (Test de Newman et Keuls).

CHAPITRE 3 : RESULTATS

PREMIERE PARTIE : GERMINATION DES GRAINES D'ARGANIER

3.1. Contamination des graines

Deux types de contamination des noix et des amandes sont observés après une semaine de mise en germination :

-Le premier type est caractérisé par un développement de mycélium à texture feutrée, souvent blanchâtre ou grisâtre ce sont les champignons.

-Le second type de contamination observé se présente sous forme d'un voile d'aspect laiteux à la surface et à l'intérieur du milieu, ce sont les bactéries.

Les deux types de contaminations (champignons et bactéries) sont décrits par **Augé et al., (1989) [89]** et confirmés par l'équipe du laboratoire de phytopathologie, ces dernières sont illustrées dans les (**Figures 3.1 A ; B ; C et D**).

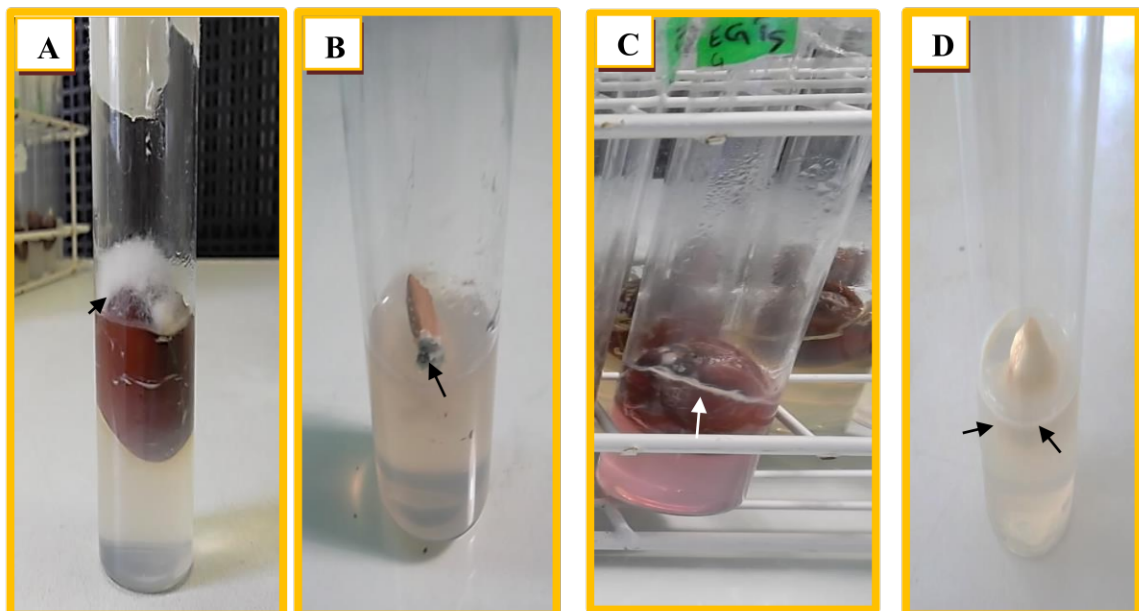


Figure 3.1 : Développement des contaminations des noix et des amandes.

A, B : Contamination fongique de noix (mycélium blanchâtre)
et d'amande (mycélium verdâtre).

C, D : Contamination bactérienne de noix (anneau laiteux blanc- rosâtre)
et d'amande (anneau laiteux blanc).

3.1.1. Taux de contamination des noix

Le taux de contamination des noix prétraitées en fonction de type de désinfection, montre qu'après une semaine de mise en germination, la contamination est variable selon les tests effectués. Le plus faible taux est enregistré pour le lot des noix trempées pendant une semaine dans une solution d'eau oxygénée (H₂O₂) (Pt₃) (il est nul pour **T4**, **T5**, et **T6** et il est de **5%** pour le **T1**, **T2** et **T3**. Quand aux autres types de prétraitements et de traitements de désinfection testés, le taux de contaminations oscille entre **10%** et **30%** (**Figure 3.2**).

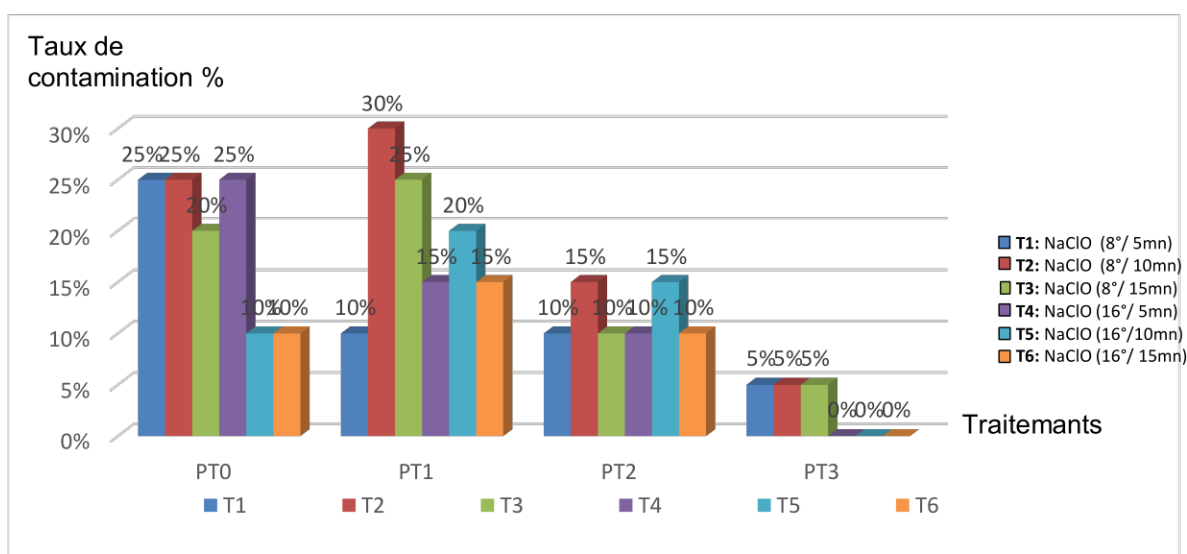


Figure 3. 2 : Taux de contamination des noix prétraitées.

3.1.2. Taux de contamination des amandes

Le pourcentage de contamination des amandes est très faible. Il est nul pour la quasi-totalité des traitements de désinfection testés (**T2**, **T3**, **T4**, **T5** et **T6**). Le traitement **T1** (NaClO à 8° pendant 5 mn) montre un taux très faible de **10%** (**Figure 3.3**).

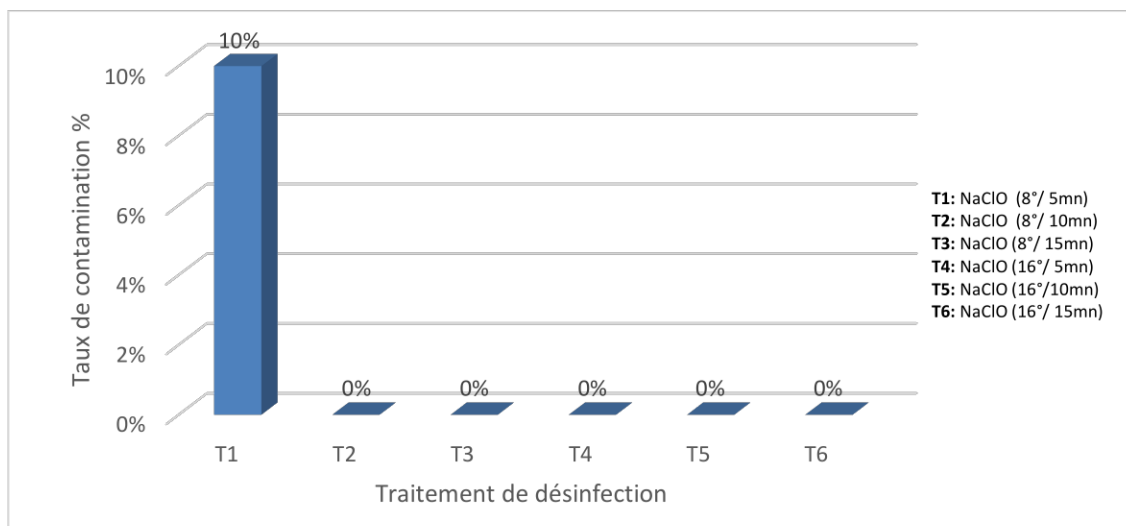


Figure3. 3 : Taux de contamination des amandes.

Après ces différents tests, le traitement **T2** (NaClO à 8° pendant 10 mn) a été sélectionné comme étant le plus favorable pour la désinfection des graines.

3.2. Germination des noix

Après la désinfection des noix prétraitées avec la solution de NaClO à 8° pendant 10 mn, nous remarquons que la moitié des noix (50%) ont percé, après 20 jours de mise en germination (**figure 3.4**). Ensuite, les noix ont stoppé leurs développement et nous avons observé un dessèchement total, elles ont été nécrosées par le double traitement que nous avons expérimenté à savoir la scarification chimique par le H₂O₂ et la désinfection par le NaClO.



Figure 3.4 : Noix éclatée après 20 jours de mis en germination.

Notons l'absence totale de l'évolution de la germination des noix, et ce quel que soit le type de prétraitement et le type de désinfection testé.

En effet, ce résultat enregistré, est dû à la nature des téguments lignifiés osseux ainsi qu'aux types de traitements testés (scarification chimique et désinfection).

Nous avons donc abandonné la germination des noix et nous nous sommes orientés vers la germination des amandes.

3.3. Germination des amandes

Les noix provenant de la station de Baraki ont été scarifiées mécaniquement par un outil tranchant, pour extraire les amandes qui ont été désinfectées et mises à germer.

3.3.1. Taux de germination des amandes

Après un mois de mise en culture des amandes d'arganier, nous avons enregistré un taux de germination très important il varie entre **90** et **100%** quel que soit le type de traitement de désinfection testé. En effet, le meilleur taux (**100%**) a été enregistré pour les amandes désinfectées par trempage pendant 5, 10 et 15 mn dans NaClO à 8° (**T1 ; T2 et T3**) (**Figure 3.5**).

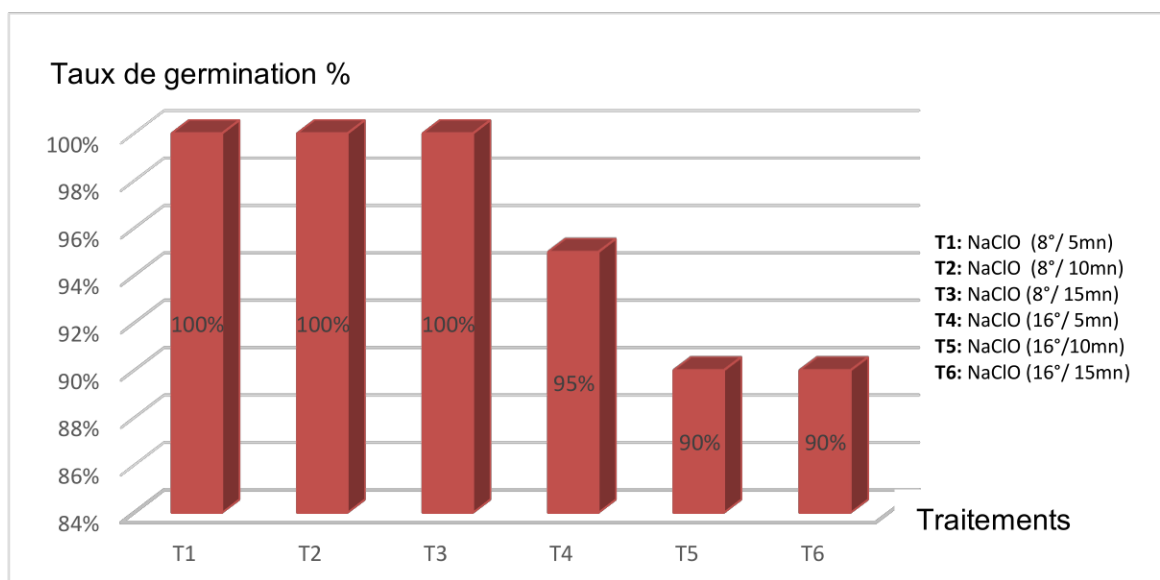


Figure 3.5 : Taux de germination des amandes d'arganier.

Le traitement **T1** (NaClO à 8°/5 mn) est retenu durant toute notre expérimentation comme le plus favorable à la désinfection des amandes d'arganier.

3.3.2. Effet de la désinfection sur le nombre de feuilles

Après 45 jours de culture, l'analyse de la variance (ANOVA) effectuée ne révèle aucune différence significative, avec $P=0,101$; $P>0,05$ de l'effet de traitement de désinfection sur le nombre moyen des feuilles néoformées par vitro-semis (**Figure 3.6**).

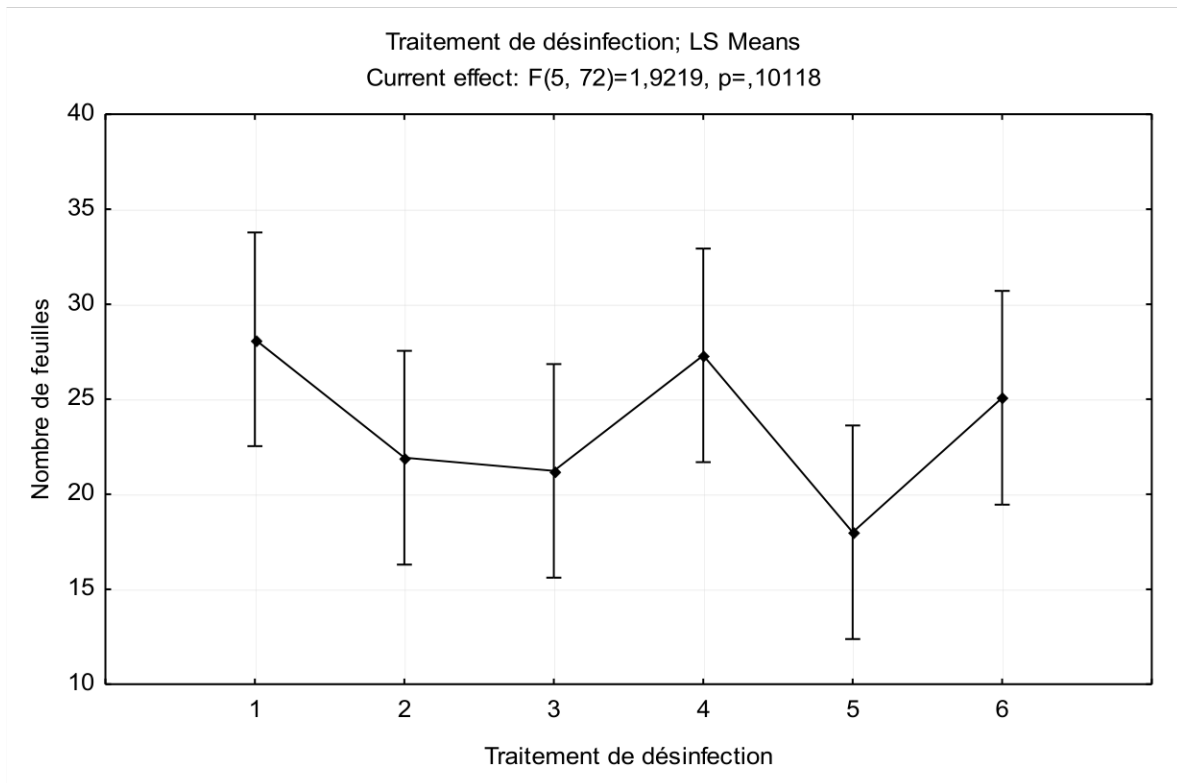


Figure 3.6 : Effet du traitement de désinfection sur l'apparition des feuilles.

3.3.3. Effet de la désinfection sur la hauteur des vitro-semis

L'analyse de la variance (ANOVA) effectuée sur la hauteur des pousses, après 45 jours de culture, ne révèle pas un effet significatif de traitement sur la longueur des pousses avec $P=0,197$; $P>0,05$ (**Figure 3.7**).

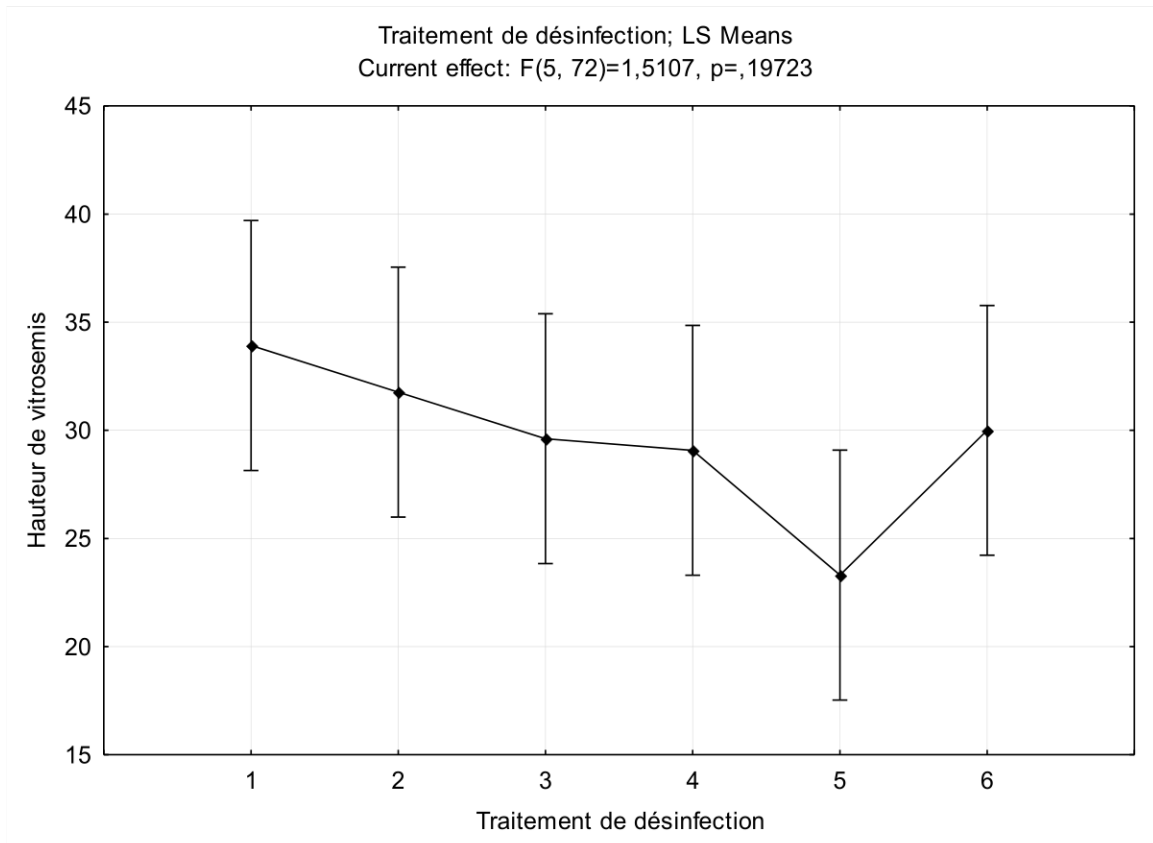


Figure 3.7 : Effet du traitement de désinfection sur la hauteur des vitro-semis.

3.3.4. Etapes chronologiques de germination

La germination est définie comme la somme des événements qui conduisent la graine déshydratée à germer, elle commence par la prise d'eau et se termine par l'allongement de l'axe embryonnaire.

3.3.4.1. Imbibition de l'amande

L'amande d'arganier une fois placée dans un milieu de culture eau gélosée (EG) commence par gonfler (**figure 3.8**), en absorbant de l'eau, c'est la phase d'imbibition, l'eau pénètre par capillarité dans les enveloppes [90].



Figure3.8 : Gonflement d'amande d'arganier (imbibition) après une semaine.

3.3.4.2. Germination *sensu-stricto*

Après deux semaines de mise en culture, l'amande éclate et donne naissance à une radicule qui continue de s'allonger (**Figure3.9**). C'est la phase de germination *sensu stricto* très importante car elle conditionne la croissance ultérieure [91].

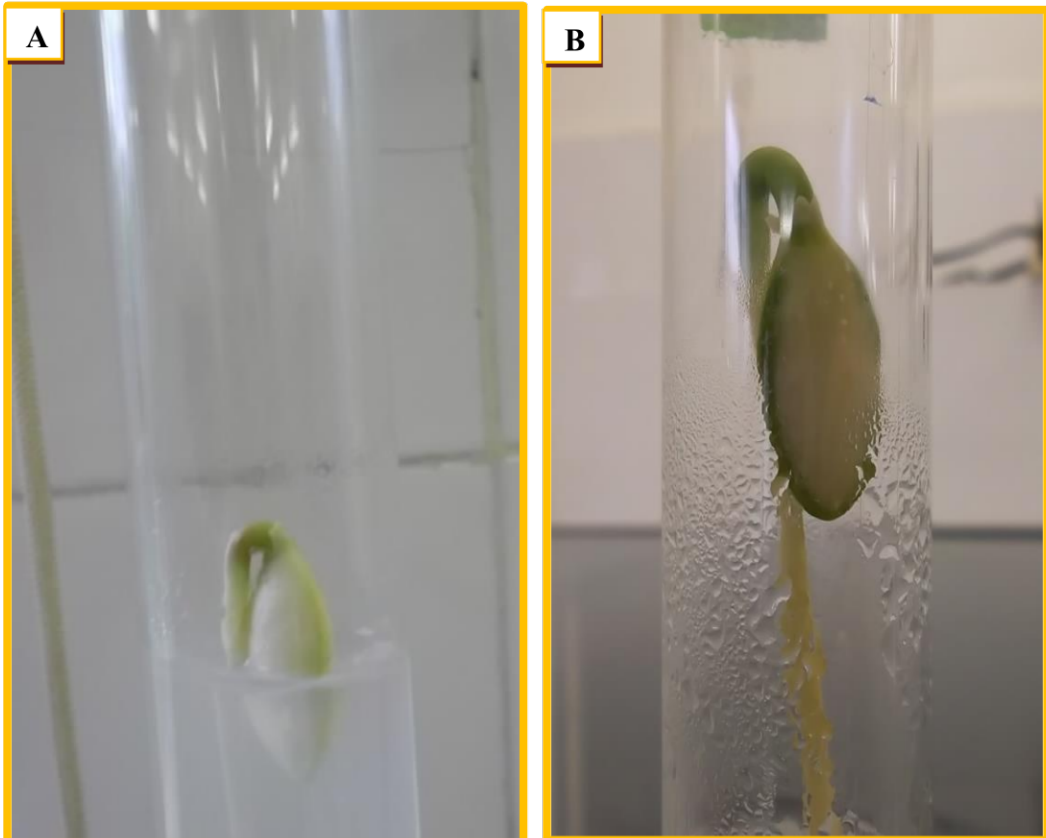


Figure 3.9 : Eclatement de l'amande et apparition de racine et tige.

A : Après deux semaines

B : Après trois semaines.

3.3.4.3. Croissance de la plantule

En grandissant, la tige s'allonge et entraîne avec elle les deux feuilles cotylédonnaires qui s'écartent. Au milieu, s'ouvrent les deux premières feuilles qui se développent, c'est la phase de croissance, elle est caractérisée par une augmentation de la respiration et l'entrée d'eau, l'étape photosynthétique est déclenchée (**Figure 3.10**).

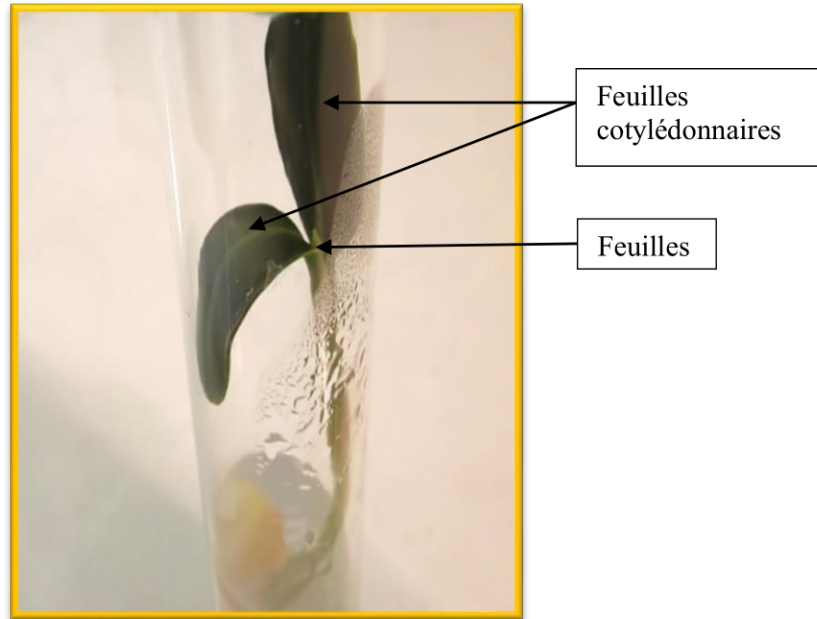


Figure 3.10 : Apparition des feuilles cotylédonnaires et feuilles après un mois.

La figure 3.11 montre l'aspect des vitro-semis obtenus après deux mois de mise en culture. Nous remarquons que leurs longueurs est importante atteignant 33,93 cm (**Annexe 6**) avec une tige d'environ 10 cm portant un nombre important de folioles estimé à 28 (**Annexe 7**) et une racine bien développée pouvant atteindre une longueur de 23 cm.



Figure 3.11 : Aspect de vitro-semis d'arganier âgé de deux mois.

Chez certaines amandes d'arganier, nous remarquons l'apparition de deux embryons (polyembryonie), donnant naissance à deux vitro-semis (**Figure 3.12**).



Figure 3.12 : Cas de polyembryonies d'une amande d'arganier (provenance : Baraki).

A : Amande avec deux radicules après 20 jours de germination ;

B : Amande avec deux radicules après un mois de germination ;

C : Aspect de deux vitro-semis issus d'une amande d'arganier a deux embryons après deux mois de germination.

DEUXIEME PARTIE : MICROPROPAGATION PAR MICROBOUTURAGE

3.1. Effet de milieu de culture sur le débourrement

Afin de déterminer le milieu de base le plus favorable au débourrement des bourgeons d'*Argania spinosa* L. Nous avons testé l'effet de trois milieux choisis, notamment MS, Gamborg (B5) et WPM.

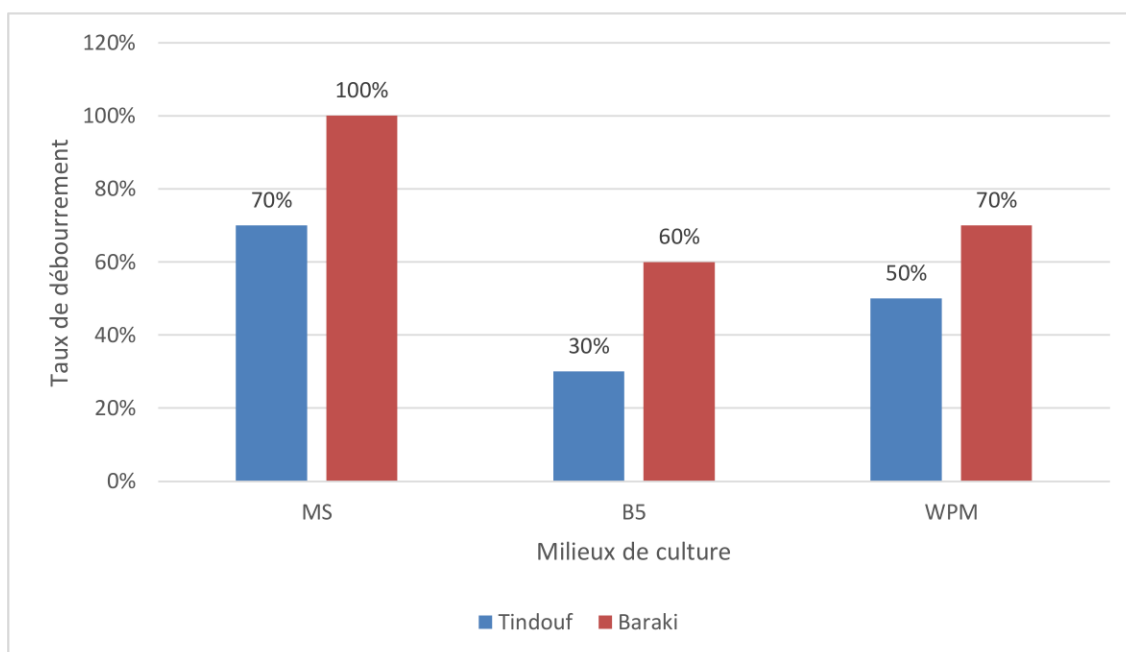


Figure 3.13 : Effet de milieux de base sur le débourrement.

Après 80 jours de mise en culture des deux types d'explants provenant de la zone de Oued El-Ma de Tindouf (boutures) et de la station de Baraki (vitro-semis de 60 jours) nous constatons que le milieu MS assure un meilleur taux de débourrement des bourgeons d'*Argania spinosa* L. avec **70%** pour des explants adultes (Tindouf) et **100%** pour ceux qui sont juvéniles (Baraki) (**Figure 3.13**). Nous avons retenu ce milieu MS pour toutes les expérimentations ultérieures.

3.2. Microbouturage des rameaux provenant de Tindouf

Dans cette partie de notre expérimentation nous avons utilisé un matériel végétal adulte provenant de la localité de Hamada de Draâ, zone de Touaref Bou-âam étendue d'arganeraie de Oued El-Ma.

3.2.1. Néoformation de bourgeons (débourrement)

3.2.1.1. Taux de contamination

Après dix jours de mise en culture des explants sur différents milieux de débourrement, le seul type de contamination observé est fongique que nous avons confirmé auprès de l'équipe du laboratoire de phytopathologie de département de Biotechnologies (**Figure 3.14**).

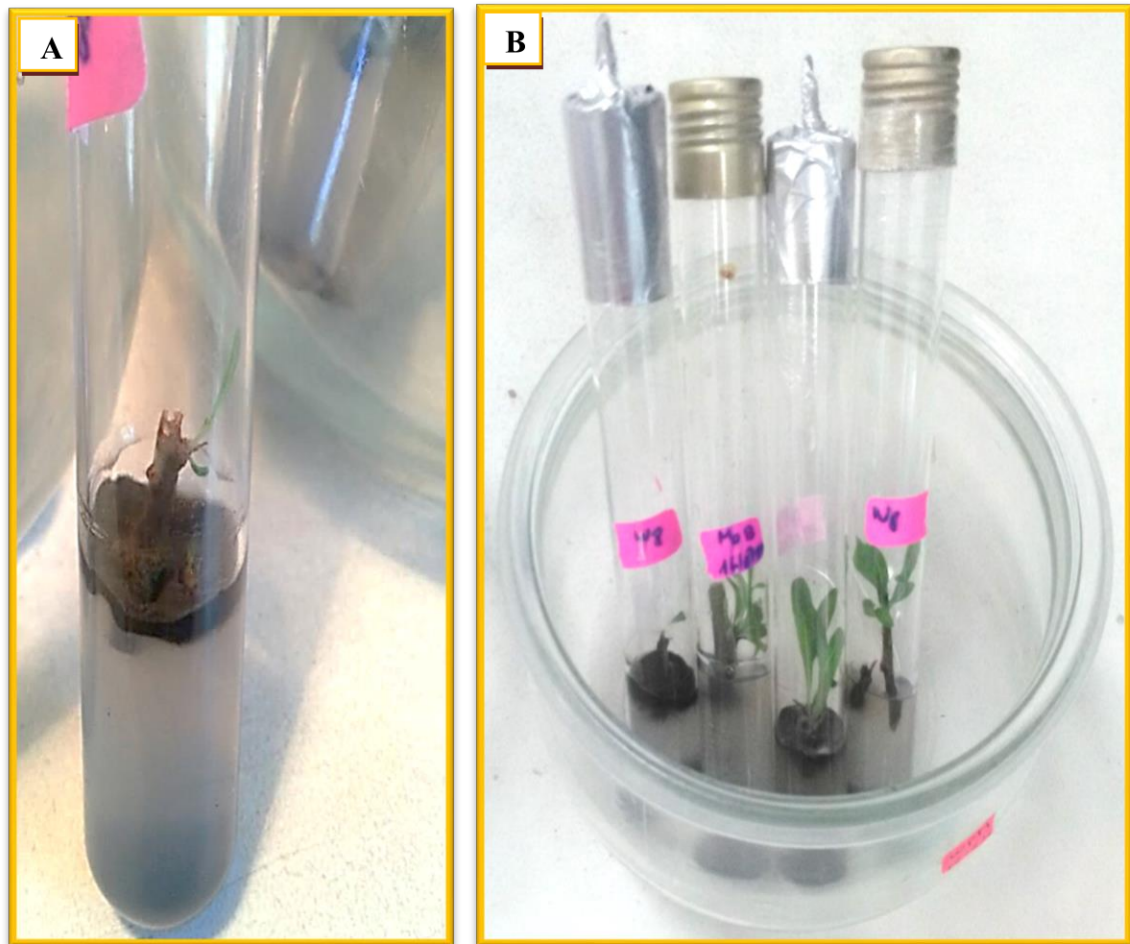


Figure 3.14 : Explants contaminés après dix jours de mise en culture

A : Mi0, B : Mi1.

Nous avons enregistré un taux de contamination de **10%** et **30%** respectivement pour les explants mis en culture sur le milieu **Mi1** et le témoin **Mi0**. Cette contamination fongique est probablement due à une mauvaise manipulation (**Figure 3.15**).

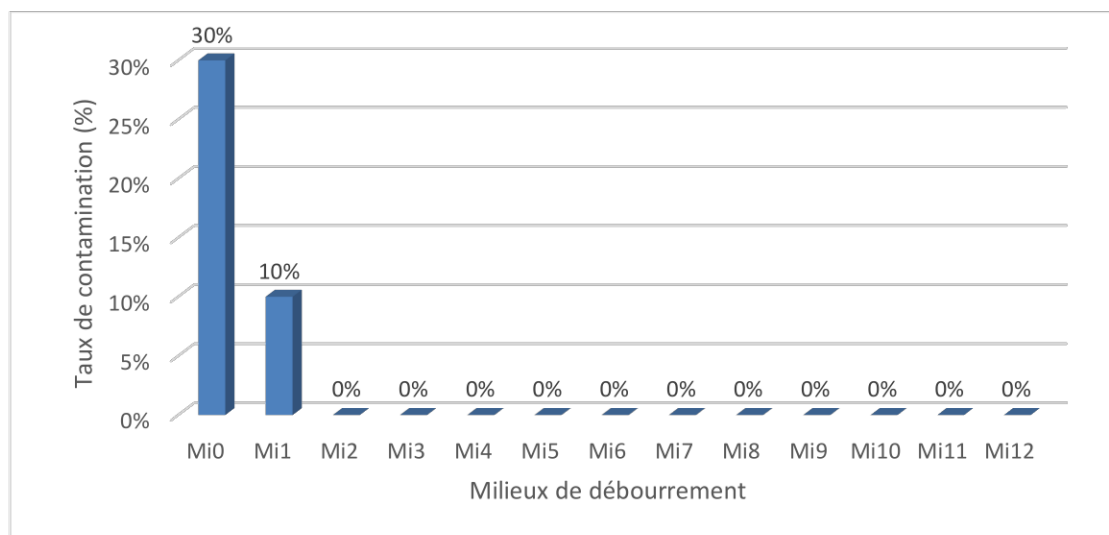


Figure 3.15 : Taux de contamination des explants sur milieux de débourrement.
(Provenance de Tindouf).

3.2.1.2. Taux de débourrement

Après 80 jours de mise en culture des explants, nous avons remarqué que les milieux **Mi6**, **Mi7**, **Mi8** et **Mi9** donnent des taux de débourrement des bourgeons très importants avec **100%** de reprise (**Figure 3.16**).

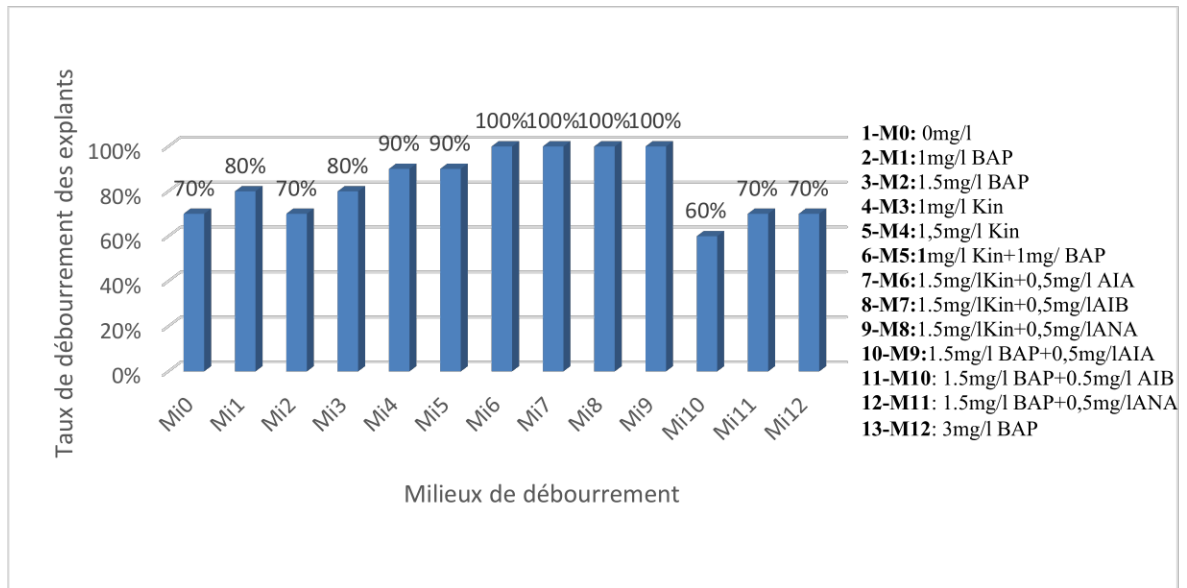


Figure 3.16 : Taux de débournement des bourgeons chez *Argania spinosa* (L.)

3.2.1.3. Développement des microboutures

L'analyse de variance (ANOVA) effectuée pour tous les paramètres suivants est réalisée après quatre subcultures successives durant une période de 32 semaines soit (8) huit mois de culture.

3.2.1.3.1. Effet du milieu sur la longueur des microboutures

L'analyse de variance effectuée sur les différents milieux de débournement révèle une différence significative des milieux de débournement sur la longueur des microboutures obtenues (**P=0,006 ; P<0,05**) (**Figure 3.17**).

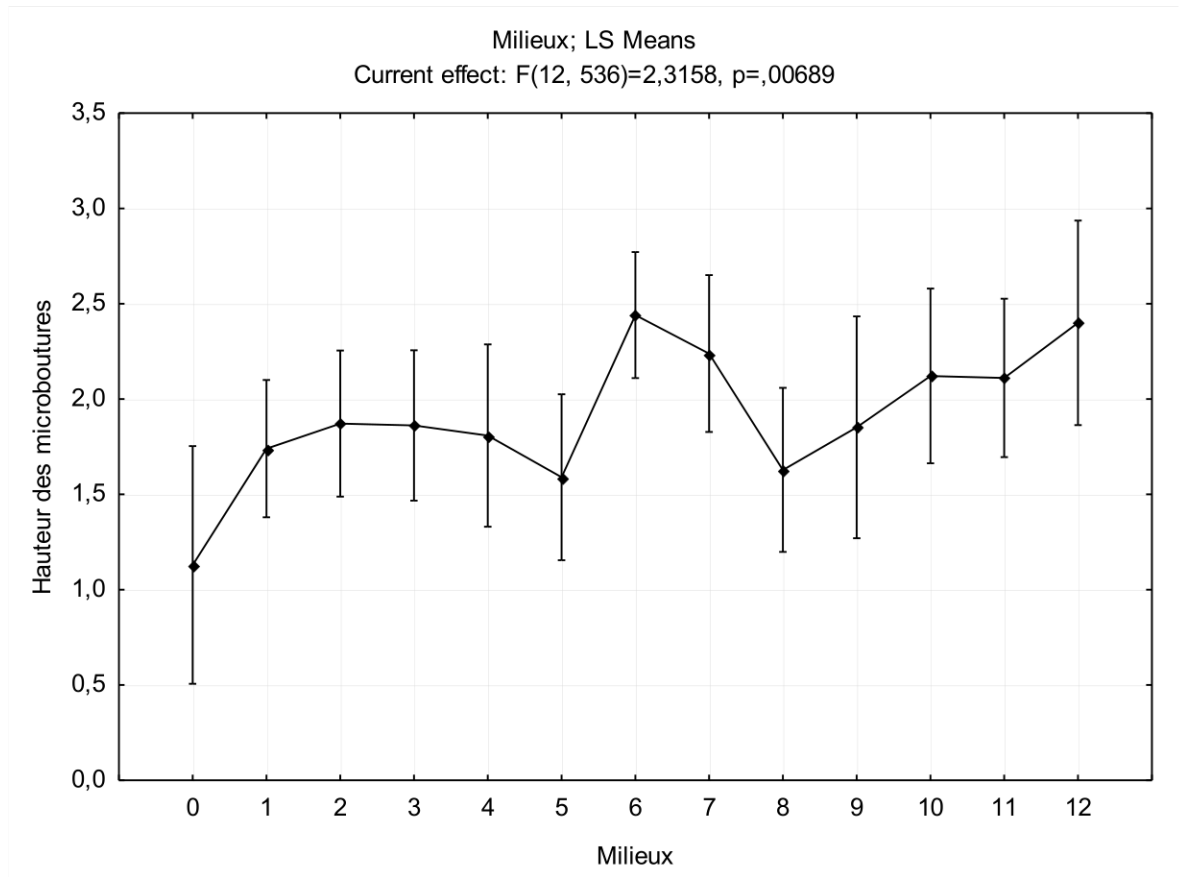


Figure 3.17 : Effet de milieux de débourement sur la longueur des microboutures.

Le test de Newman-Keuls fait ressortir deux groupes homogènes, le milieu **Mi6** (1.5mg/lKin/0,5mg/l AIA) est le plus favorable pour le débourement où nous avons enregistré une hauteur moyenne des microboutures atteignant **2.44 cm (Annexe 8)**, suivi par le milieu Mi12 et Mi7 avec **2.40** et **2.24 cm** respectivement (**Tableau 3.1**).

Tableau 3.1 : Effet du milieu sur la longueur des microboutures
(Test Newman-Keuls).

Test Newman-Keuls, alpha=0.50			
Milieu de culture	Hauteur moyenne des microboutures	1	2
Mi0	1.13	***	
Mi5	1.59	***	***
Mi8	1.63	***	***
Mi1	1.74	***	***
Mi4	1.81	***	***
Mi9	1.85	***	***
Mi3	1.86	***	***
Mi2	1.87	***	***
Mi11	2.11	***	***
Mi10	2.12	***	***
Mi7	2.24		***
Mi12	2.40		***
Mi6	2.44		***

3.2.1.3.2. Effet du milieu sur le nombre de bourgeons

Le milieu **Mi6** (1.5mg/IKin/0,5mg/l AIA) s'avère favorable pour la néoformation des bourgeons, l'analyse de variance montre une différence très hautement significative avec ($P=0,00000$; $P<0,05$) (Figure 3.18).

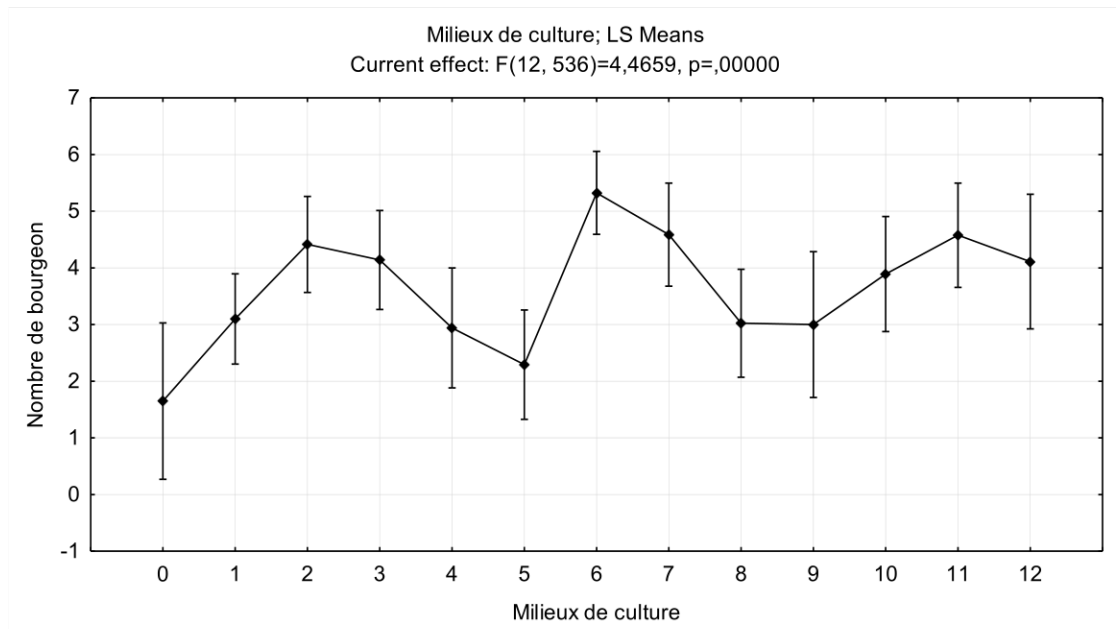


Figure 3.18 : Effet du milieu de débourrement sur le nombre de bourgeons néoformés

Le test de Newman-Keuls fait ressortir trois groupes homogènes, le milieu **Mi6** (1.5mg /l Kin/0.5mg /l AIA) est le plus favorable pour la néoformation des bourgeons avec un nombre moyen de **5** par microbouture (**Annexe 9**) (**Tableau 3.2**).

Tableau 3.2 : Effet du milieu sur le nombre des bourgeons (Test Newman-Keuls).

Test Newman-Keuls, alpha=0.50				
Milieus de culture	Moyenne des bourgeons	1	2	3
Mi0	1.65	***		
Mi5	2.29	***	***	
Mi4	2.94	***	***	
Mi9	3.00	***	***	
Mi8	3.02	***	***	
Mi1	3.10	***	***	
Mi10	3.89		***	***
Mi12	4.11		***	***
Mi3	4.14		***	***
Mi2	4.41		***	***
Mi11	4.58		***	***
Mi7	4.59		***	***
Mi6	5.32			***

3.2.1.3.3. Effet du milieu sur le nombre de folioles

L'analyse statistique ANOVA effectuée, révèle une différence très hautement significative ((**P=0,00000** ; **P<0,05**) nous avons constaté que le milieu **Mi6** (1.5mg/lKin/0,5mg/l AIA) est favorable pour la formation des folioles (**Figure 3.19**).

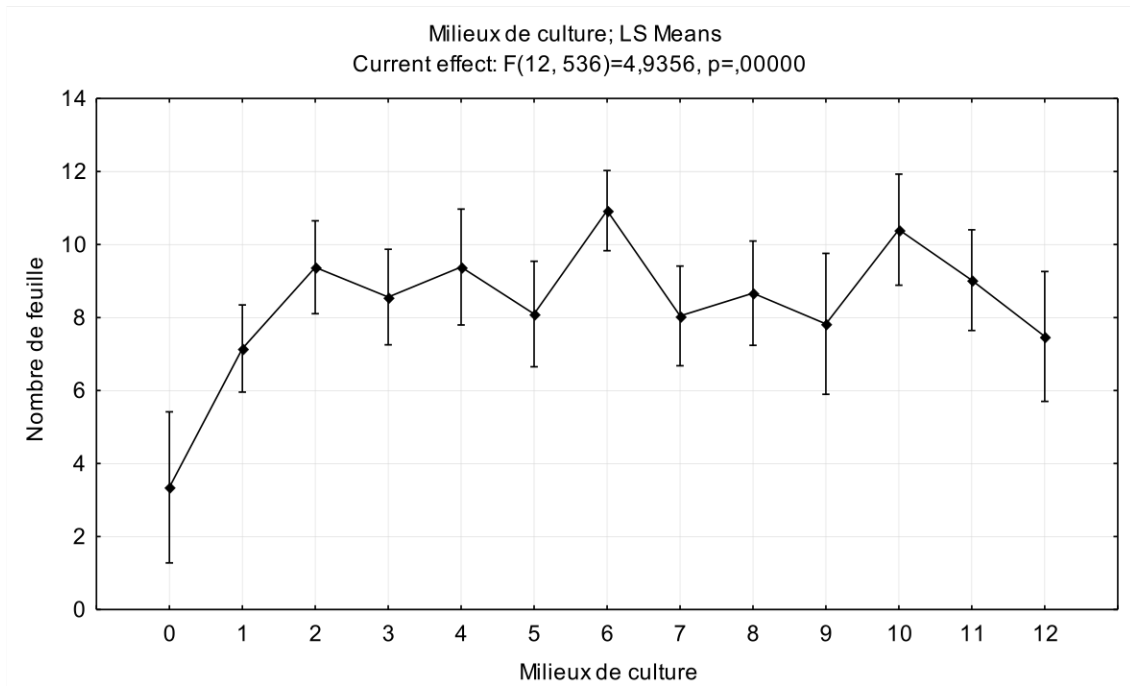


Figure 3.19 : Effet du milieu de culture sur le nombre de feuilles néoformées.

Le test post hoc de Newman-Keuls fait ressortir trois groupes homogènes avec un nombre moyen de **11** folioles néoformées par microbouture sur le milieu **Mi6** (1.5mg/Ikin/0,5mg/l AIA) suivi par le milieu Mi10 et Mi4, avec **10** et **9** folioles (**Annexe 10**) (**Tableau 3.3**).

Tableau 3.3 : Effet du milieu sur le nombre de feuilles néoformées (Test Newman-Keuls)

Test Newman-Keuls, alpha=0.50				
Milieux de culture	Moyenne des feuilles néoformées	1	2	3
Mi0	3.35	***		
Mi1	7.15		***	
Mi12	7.48		***	***
Mi9	7.83		***	***
Mi7	8.04		***	***
Mi5	8.10		***	***
Mi3	8.56		***	***
Mi8	8.67		***	***
Mi11	9.02		***	***
Mi2	9.37		***	***
Mi4	9.38		***	***
Mi10	10.40		***	***
Mi6	10.93			***

L'aspect des microboutures sur différents milieux de débourement est représenté dans les **Figures 3. 20, 3.21 et 3.22**.

Le taux de reprise des explants était différent selon le type de balance hormonale utilisée pour le débourement. Le taux le plus important est enregistré sur le milieu **Mi6** (1.5mg/lKin/0,5mg/l AIA).

A la première subculture qui a duré deux mois, nous avons enregistré un développement assez lent des explants qui présentent une longueur moyenne de **2.36 cm** et un nombre de folioles de l'ordre de **9**, ces dernières sont de petite taille et de couleur vert vif (**Figure 3.20 C**).

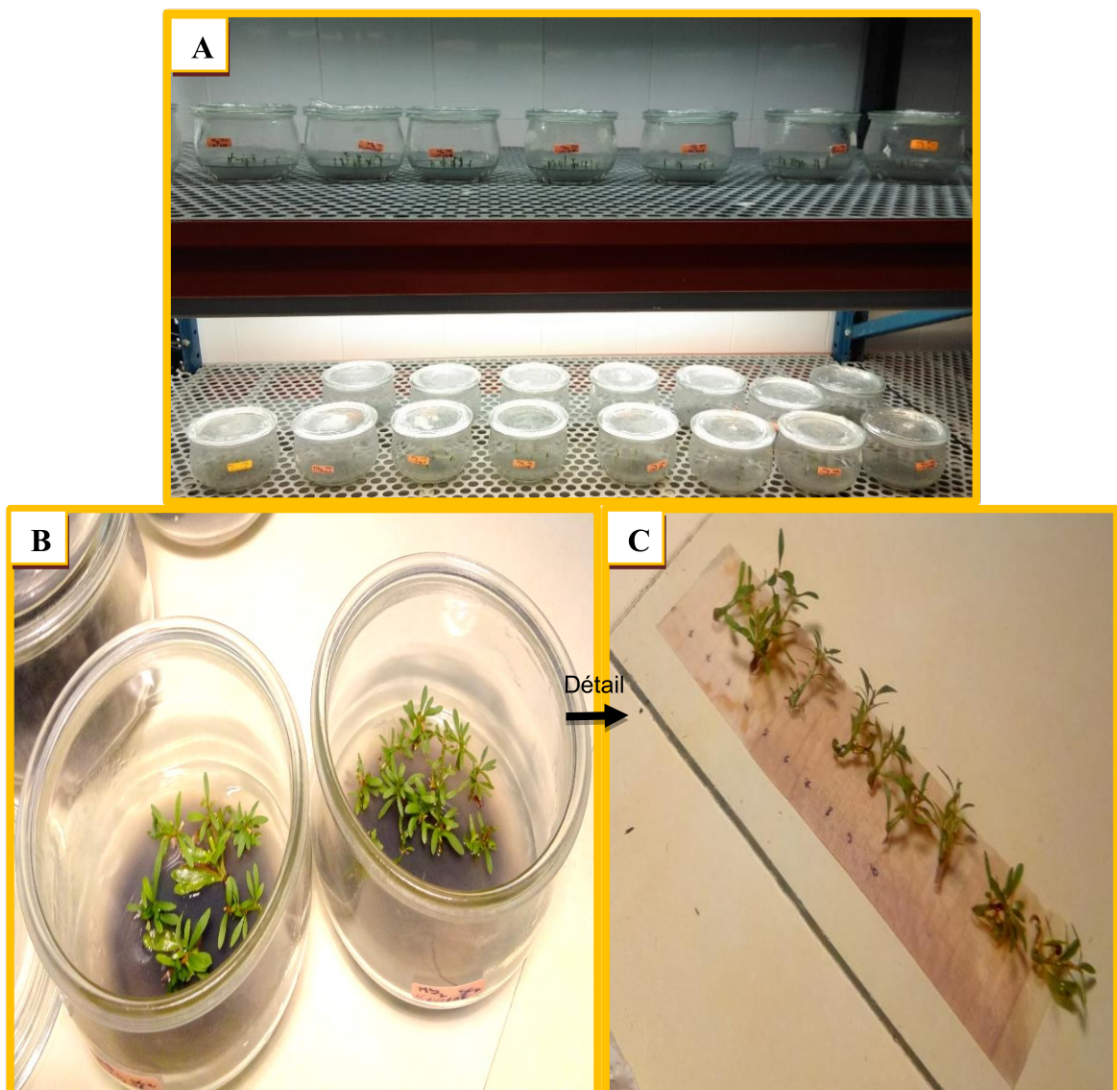


Figure 3.20 : Aspect des vitro-plants sur milieux de débourement (1^{ère} subculture).

A : Aspect des vitro-plants sous différentes conditions hormonales ;
B, C : Aspect des vitro-plants mis en culture sur milieu Mi6 à la 1^{ère} subculture

Par contre à la 2^{ème} et la 3^{ème} subculture après environ 6 mois de culture, les microboutures deviennent vigoureux atteignant une longueur très importante de **8 cm** (avant la segmentation) sur le milieu favorable au débourrement **Mi6** caractérisé par un nombre important de folioles plus larges que celles développées à la première subculture au nombre de **14** environ (**Figure 3.21**).

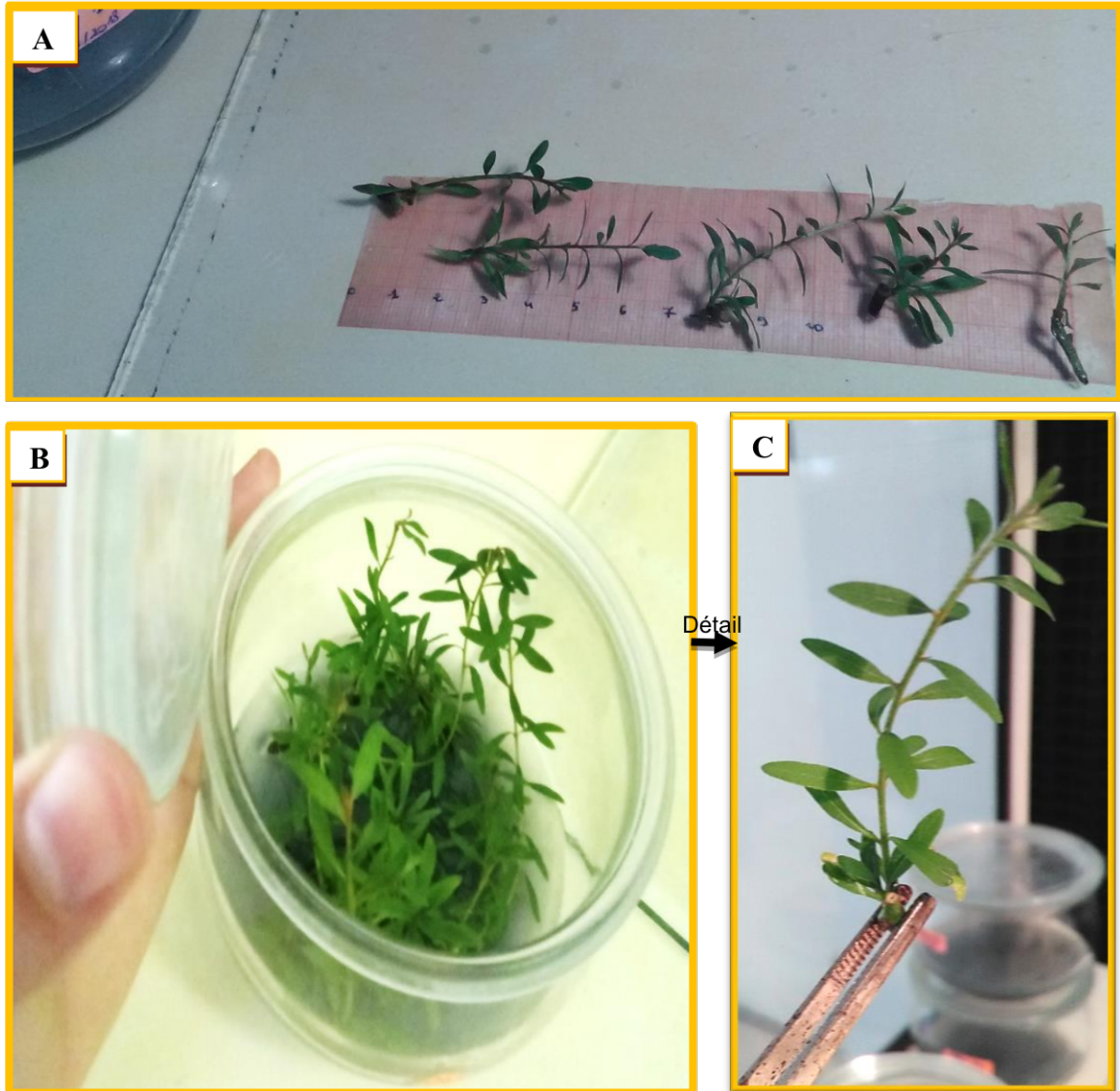


Figure 3.21 : Aspect des vitro-plants à 2^{ème} et 3^{ème} subculture.

A : Aspect des vitro-plants vigoureux mis en culture sur milieu Mi6 à la 2^{ème} subculture.
B, C : Aspect des vitro-plants mis en culture sur milieu Mi6 à la 3^{ème} subculture.

Pour la 4^{ème} subculture soit 8 mois après la mise en culture, nous avons obtenu des microboutures à port dressé plus vigoureux à appareil végétatif bien développé avec formation de touffes (ramification des microboutures). Une certaine homogénéité a été observée sur le milieu favorable **Mi6**. Les tiges atteignent une hauteur importante, ramifiées dès la base (en touffe) avec **5 à 6** tigelles qui portent un nombre important des feuilles (d'ordre de **16** par tigelle). Elles sont plus larges et plus claires que celles des subcultures précédentes (2^{ème} et 3^{ème}) avec un nombre de bourgeon estimé à **5** par tigelle (**Figure 3.22**).

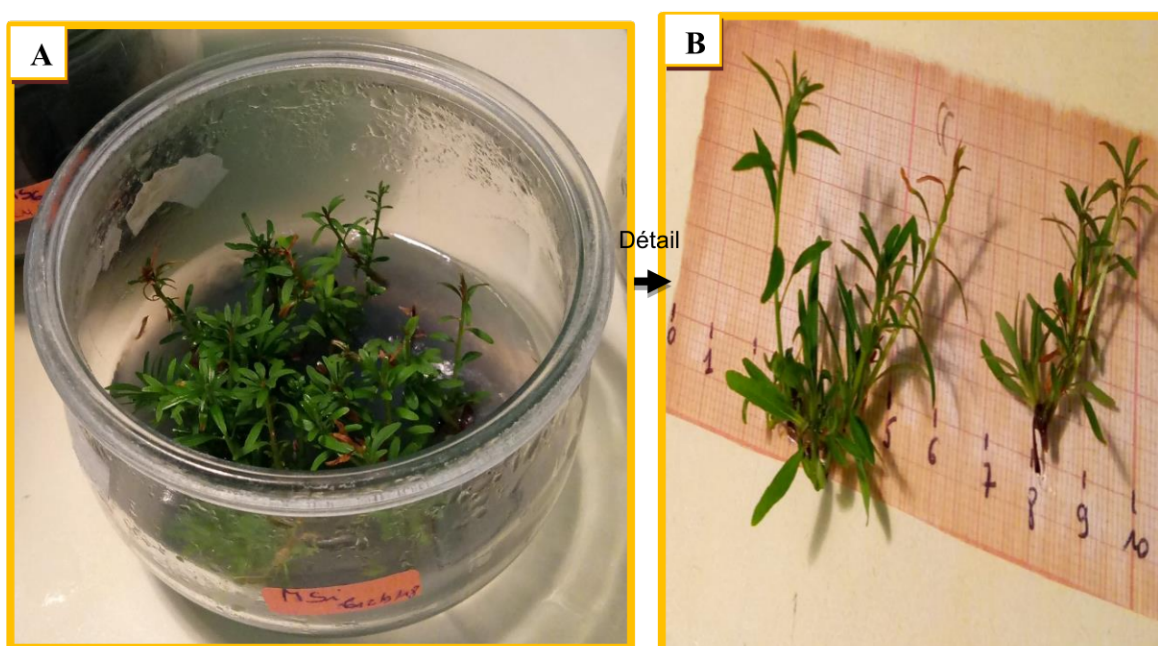


Figure 3.22 : Aspect des vitro-plants sur milieu Mi6 à la 4^{ème} subculture (Provenance de Tindouf).

A : Aspect général des microboutures en touffe issu sur Mi6 à la 4^{ème} subculture
B : Ramification de la tige principale en tigelles

3.2.2. Elongation des microboutures

L'analyse ANOVA effectuée après 50 jours de mise en culture des vitro-plants sur les milieux d'allongement caulinaire révèle une différence très hautement significative des différentes concentrations de GA3 testées (**P=0,00000 ; P<0,05**) (**Figure 3.23**).

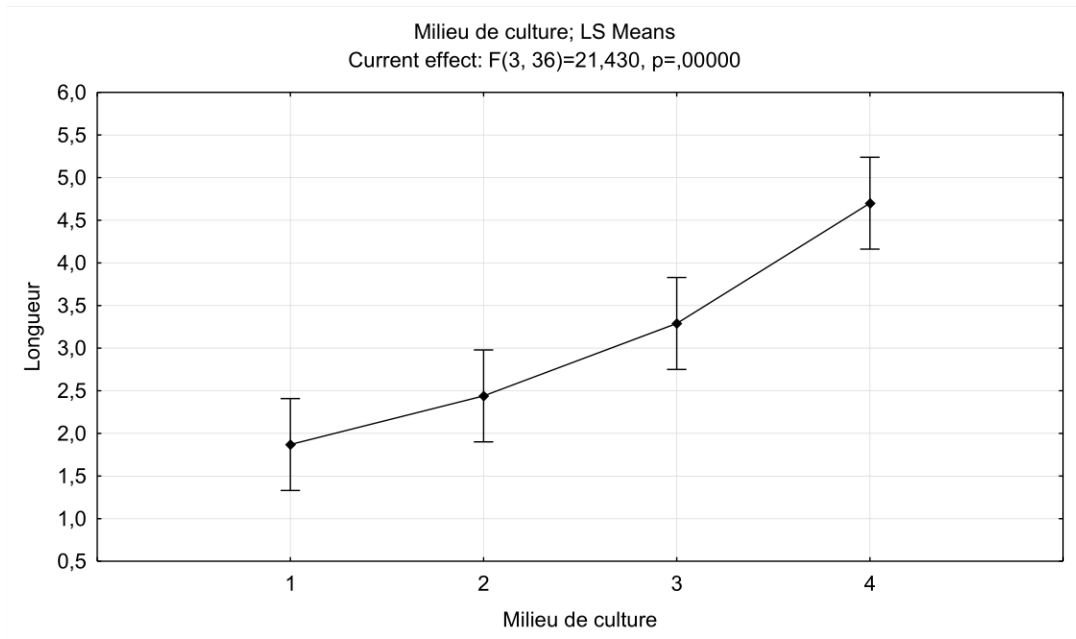


Figure 3.23 : Effet de GA3 sur l'élongation caulinaire

Le test post-hoc de Newman-Keuls (**Tableau 3.4**) fait ressortir trois groupes homogènes. En effet, c'est le milieu **Ma3** (1.5mg/l GA3) qui permet un meilleur allongement caulinaire des vitro-plants avec une moyenne de **4.7 cm** (**Annexe 11**).

Tableau 3.4 : Effet de milieu d'allongement
(Test post hoc)

Test Newman-Keuls, alpha=0.50				
Milieus de culture	Moyenne de la longueur caulinaire	1	2	3
Ma0	1.87	***		
Ma1	2.44	***	***	
Ma2	3.29		***	
Ma3	4.70			***

L'aspect des vitro-plants sous différentes concentrations testées de gibbérelline GA3 est représenté dans la figure 3.24.



Figure 3.24 : Aspect des vitro-plants d'*Argania spinosa* L. sur milieu d'élongation.

3.2.3. Enracinement

3.2.3.1. Induction des racines

3.2.3.1.1. Sans charbon actif

Les microboutures mises en cultures sur les milieux d'enracinement sans ajout du charbon actif n'ont manifesté aucune aptitude rhizogène. Cette inhibition de l'émission du primordium racinaire est dûe à la synthèse des polyphénols sécrété chez les ligneux en général.

En effet, nous remarquons à la base des microboutures la formation un tissu spongieux (cal) qui ne se différencie pas en radicules. Ces microboutures forment des petites feuilles de couleur vert-pâle voire marron qui se nécrosent au sommet (**Figure 3.25**).



Figure 3.25 : Aspect morphologique des microboutures avec formation de cals sur milieu d'enracinement (sans charbon actif).

3.2.3.1.2. Avec charbon actif

Après plusieurs essais préliminaires et après environ deux mois de culture des vitro-plants sur les milieux d'enracinement nous avons pu sélectionner deux milieux **M7** (1.5mg/l AIB/1.5mg/l ANA) et **M6** (1mg/l AIB/1mg/l ANA) qui favorisent le stimulus radiculaire avec des taux moyens atteignant de **30** et **36** % respectivement (**Figure 3.26**).

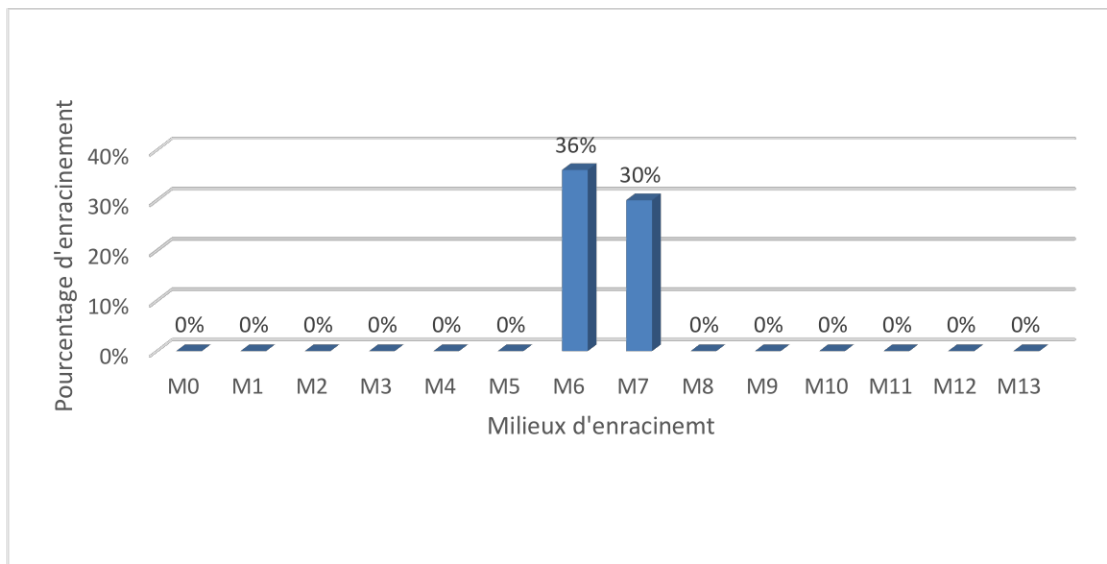


Figure 3.26: Effet de la balance hormonale sur l'enracinement des microboutures.

L'aspect des micoboutures enracinées après 45 jours de mises en culture est représenté dans les **figures 3.27 (A, B)**.



Figure 3.27 : Aspect morphologique des vitro-plants enracinés

A : Microboutures enracinées sur milieu M6, après 45 jours d'induction.

B : Détails des microboutures avec racines longues et filiformes.

3.2.3.2. Elongation racinaire

Durant cette étape, et malgré l'ajout du charbon actif (0,5 g/l), nous avons remarqué que les racines se nécrosent au bout de quelques jours (**Figure 3.28**).



Figure 3.28 : Aspect des racines nécrosées (phase d'élongation racinaire).

Pour faire face à ce phénomène de nécroses qui a influencé de façon négative l'élongation des racines néoformées, nous avons opté pour l'utilisation d'un autre antioxydant notamment l'acide ascorbique (100 mg/l) en combinaison avec le charbon actif. Les résultats obtenus montrent que ce dernier a permis d'améliorer le développement des racines dont la longueur moyenne a atteint **6** et **7.5 cm** respectivement après 2 mois de culture (**Figure 3.29**).

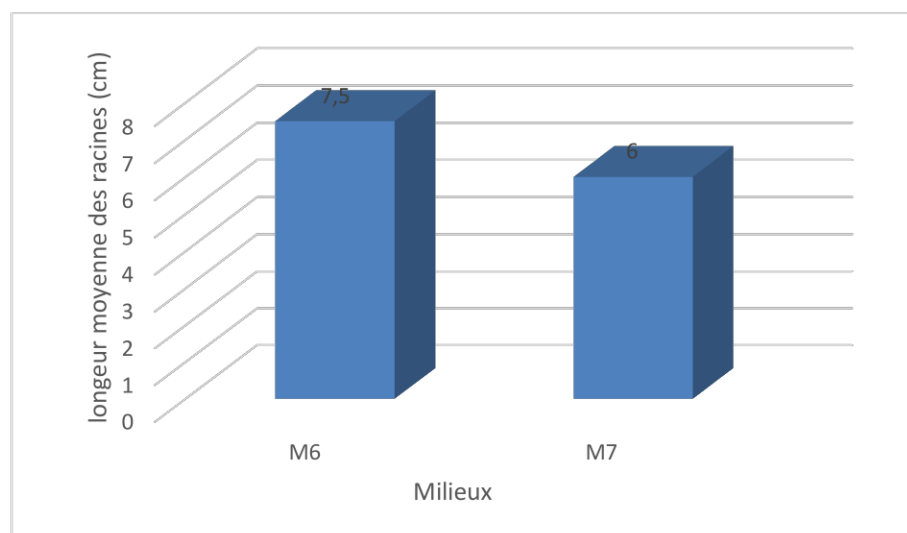


Figure 3.29 : Longueur moyenne des racines après l'ajout d'acide ascorbique.

3.3. Microbouturage à partir des vitro-semis de Baraki

Durant cette étape, nous avons utilisé pour le microbouturage, de végétal juvénile (vitro-semis) issus de germination *in vitro* des graines d'*Argania spinosa* L. provenant de la station de Baraki de l'INRF.

3.3.1. Néoformation des bourgeons

3.3.1.1. Taux de débourrement

Les résultats obtenus, après 80 jours de mise en culture, montrent que les milieux **Mi0**, **Mi1**, **Mi5** et **Mi6** donnent un taux de débourrement des bourgeons maximale avec **100%** de reprise (**Figure 3.30**).

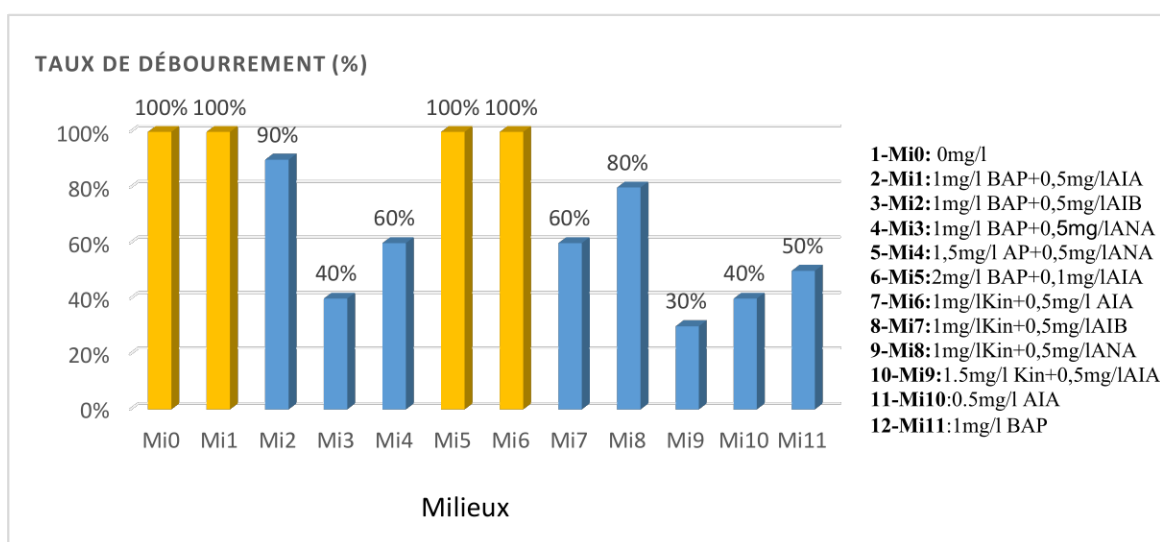


Figure 3.30 : Taux de débourrement des bourgeons chez *Argania spinosa* L.

3.3.1.2. Développement des microboutures

3.3.1.2.1. Effet de milieu sur la hauteur

L'analyse de la variance a révélé une différence très hautement significative ($P < 0,000001$) du facteur milieu de culture sur la longueur des microboutures (**Figure 3.31**).

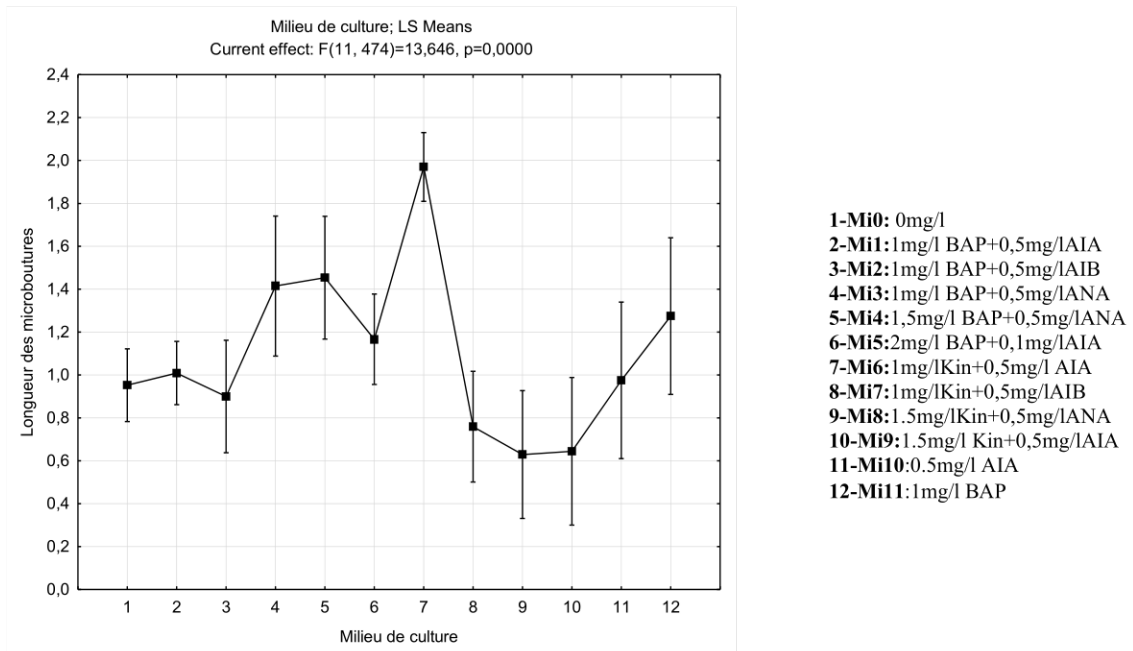


Figure 3.31 : Effet de l'équilibre hormonal sur la longueur des microboutures.

Le test post hoc (Newman-Keuls) au seuil $\alpha=5\%$ fait ressortir 4 groupes homogènes. En effet, le milieu **Mi6** (1 mg /l Kin/0.5 mg /l AIA) a un effet favorable sur l'élongation des microboutures avec **1,96 cm**, suivi juste après par les deux milieux **Mi4** (1,5mg/l BAP/0,5mg/lANA) et **Mi3** (1mg/l BAP/0,5mg/lANA) avec des longueurs de **1.45** et **1.41 cm** respectivement (**Annexe 12**) (**Tableau 3.5**).

Tableau 3.5 : Effet du milieu sur la longueur des microboutures (Test Newman-Keuls)

Test Newman-Keuls, alpha=0.50					
Milieux de culture	Longueur moyenne des microboutures	1	2	3	4
Mi8	0.63	***			
Mi9	0.64	***			
Mi7	0.76	***		***	
Mi2	0.90	***	***	***	
Mi0	0.95	***	***	***	
Mi10	0.97	***	***	***	
Mi1	1.01	***	***	***	
Mi5	1.17	***	***	***	
Mi11	1.28		***	***	
Mi3	1.41		***		
Mi4	1.45		***		
Mi6	1.96				***

3.3.1.2.2. Effet du milieu sur le nombre de bourgeons

L'analyse de la variance montre qu'il y a une différence très hautement significative de l'effet du milieu de débourement sur le nombre moyen des bourgeons néoformés des microboutures (**Figure 3.32**).

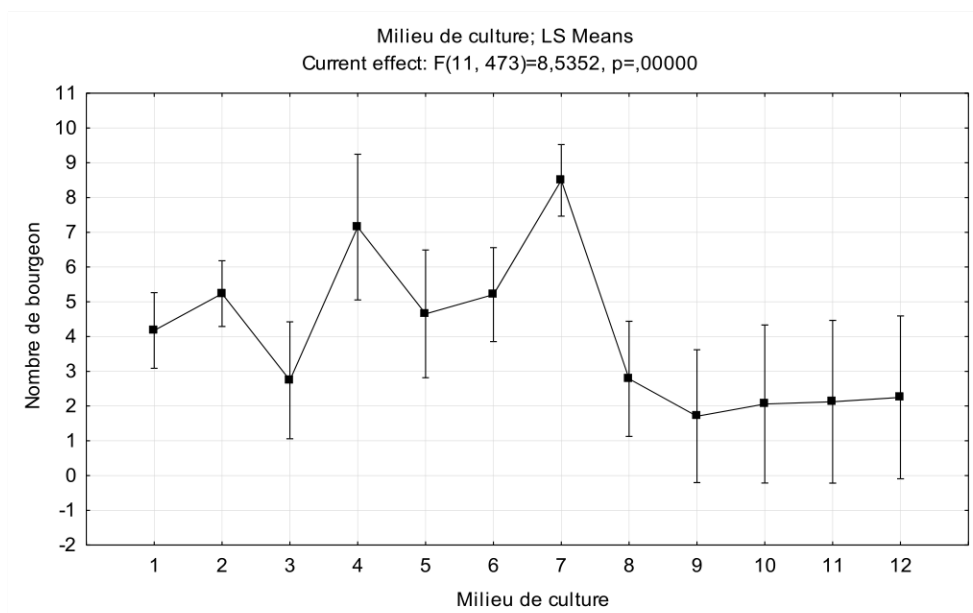


Figure 3.32 : Effet de l'équilibre hormonal sur le nombre de bourgeon/microbouture.

Le test de Newman-Keuls fait ressortir trois groupes homogènes, le milieu **Mi6** (1mg/l Kin/0.5mg/l AIA) est le plus favorable pour la néoformation des bourgeons, qui sont avec un nombre de **8 (Annexe 13) (Tableau 3.6)**.

Tableau3.6 : Effet du milieu sur le nombre des bourgeons (Test Newman-Keuls).

Test Newman-Keuls, alpha=0.50				
Milieux de culture	Moyenne des bourgeons	1	2	3
Mi8	1.71	***		
Mi9	2.06	***		
Mi10	2.12	***		
Mi11	2.25	***		
Mi2	2.74	***		
Mi7	2.78	***		
Mi0	4.17	***	***	
Mi4	4.65	***	***	
Mi5	5.21	***	***	***
Mi1	5.23	***	***	***
Mi3	7.15		***	***
Mi6	8.49			***

3.3.1.2.3. Effet du milieu sur le nombre de feuilles

L'analyse de la variance révèle une différence très hautement significative ($P < 0,000001$) du facteur milieu de culture sur le nombre des feuilles néoformées par microbouture (**Figure 3.33**).

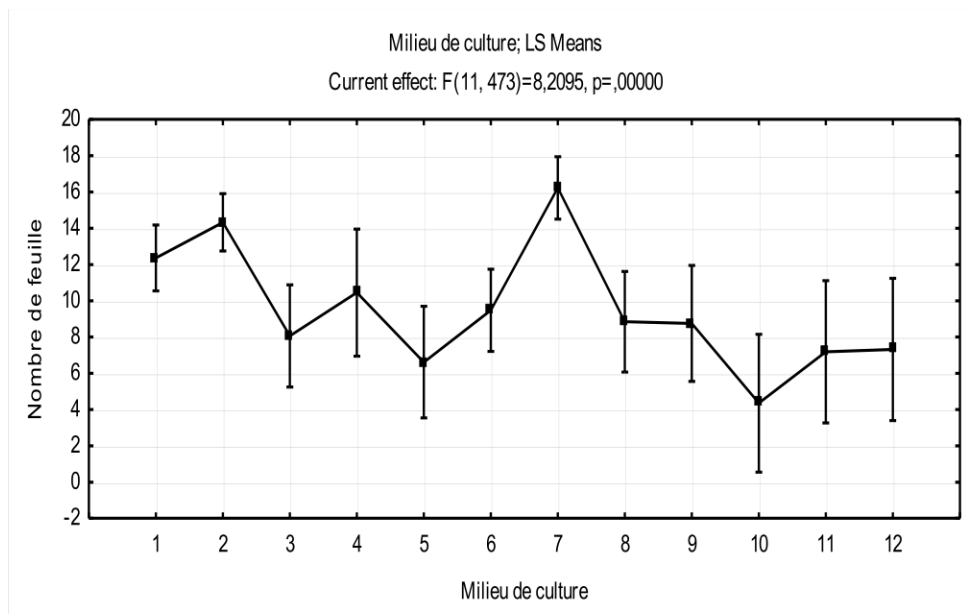


Figure 3.33 : Effet de l'équilibre hormonal sur le nombre des feuilles néoformées.

Le test de Newman-Keuls fait ressortir quatre groupes homogènes, le milieu **Mi6** (1mg /l Kin/0.5mg /l AIA) est le plus favorable avec un nombre moyen de feuilles néoformées de l'ordre de **16 (Annexe 14) (Tableau3.7)**.

Tableau 3.7: Effet du milieu sur le nombre de feuilles
(Test Newman-Keuls)

Test Newman-Keuls, alpha=0.50					
Milieu de culture	Moyenne des feuilles néoformées	1	2	3	4
Mi9	4.35	***			
Mi4	6.61	***			
Mi10	7.19	***		***	
Mi11	7.31	***	***	***	
Mi2	8.06	***	***	***	
Mi8	8.75	***	***	***	
Mi7	8.84	***	***	***	
Mi5	9.48	***	***	***	
Mi3	10.45		***	***	
Mi0	12.36		***		
Mi1	14.33		***		
Mi6	16.23				***

L'aspect morphologique de quelques microboutures sur milieu optimal Mi6 avec un nombre de feuilles néoformées important est représenté dans la **Figure 3.34**,



Figure 3.34 : Aspect des vitro-plants sur milieu Mi6 à la 4^{ème} subculture
(Provenance station de Baraki).

3.3.2. Elongation

L'analyse de variance montre un effet très hautement significative (($P=0,000001$, $P<0,05$) du milieu d'allongement sur l'élongation des microboutures (**Figure 3.35**).

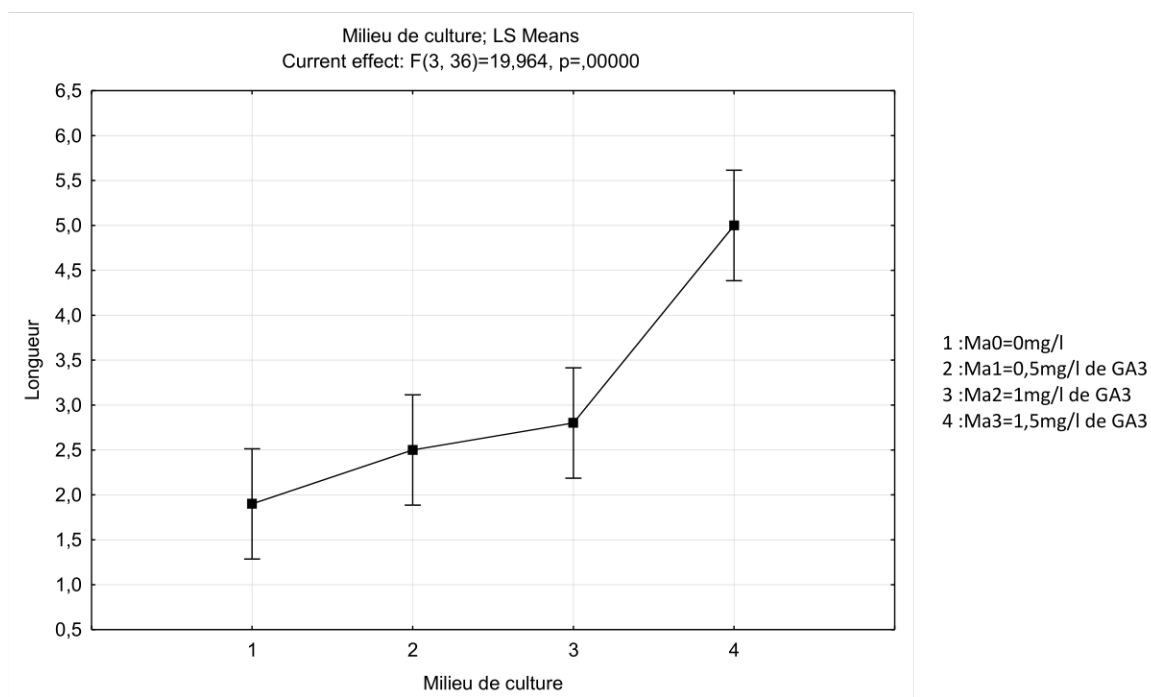


Figure 3.35 : Effet de GA3 sur l'allongement caulinaire des microboutures.

Le test de Newman-Keuls fait ressortir deux groupes homogènes. Le plus important comporte le milieu Ma3 (1.5mg/l GA3) qui reste le plus favorable pour l'allongement des microboutures avec une hauteur moyenne de **5 cm** (**Annexe 15**) (**Tableau 3.8**).

Tableau 3.8 : Effet du milieu sur la longueur des microboutures
(Test Newman-Keuls).

Test Newman-Keuls, alpha=0.50			
Milieus de culture	Moyenne de la longueur caulinaire	1	2
Ma0	1.90	***	
Ma1	2.50	***	
Ma2	2.80	***	
Ma3	5.00		***

La **Figure 3. 36** montre la longueur des vitro-plants sur milieu Ma3 contenant une concentration optimale (1.5 mg/l) de GA3.



Figure 3.36 : Aspect des microboutures sur milieu l'élongation Ma3

3.3.3. Rhizogénèse

Cette étape est subdivisée en deux parties, l'étape d'induction des primordiums racinaires en premier temps, puis l'élongation racinaire.

3.3.3.1. Induction des primordiums racinaires

3.3.3.1.1. Sans charbon actif

Notons que durant cette expérimentation, nous n'avons testé l'induction et la stimulation sur différents milieux de rhizogénèse exempte de charbon actif.

➤ Taux d'enracinement

Un faible taux d'enracinement de 17 et 27% a été enregistré des vitro-plants mis en culture sur milieu **Mr0₁** et **Mr3** respectivement (**Figure 3.37**). Ce milieu optimal

Mr3 contient un mélange des hormones de croissance à une concentration optimale 1mg/l d'AIB et 1mg/l d'ANA.

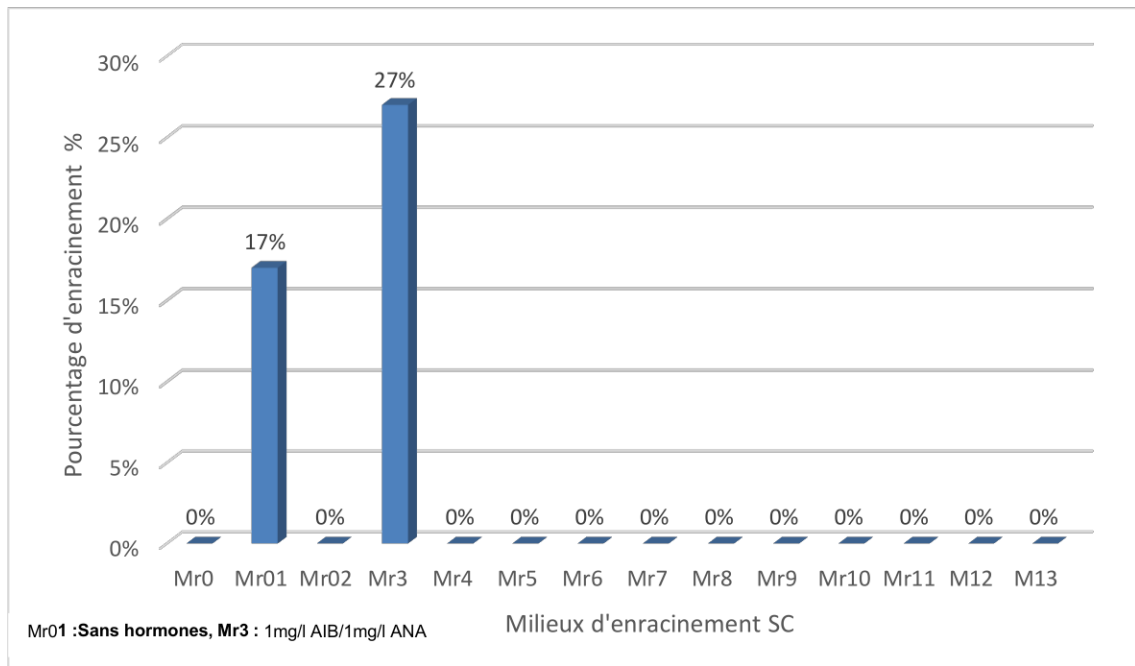


Figure 3.37 : Effet de l'équilibre hormonal sur l'enracinement des microboutures (Sans charbon actif).

La figure **Figure 3.38** montre l'aspect morphologique des radicelles néoformées sur le milieu optimal sans charbon actif (Mr3) où nous remarquons l'émission des radicelles courtes, primaires ou secondaires d'aspect filamenteux.

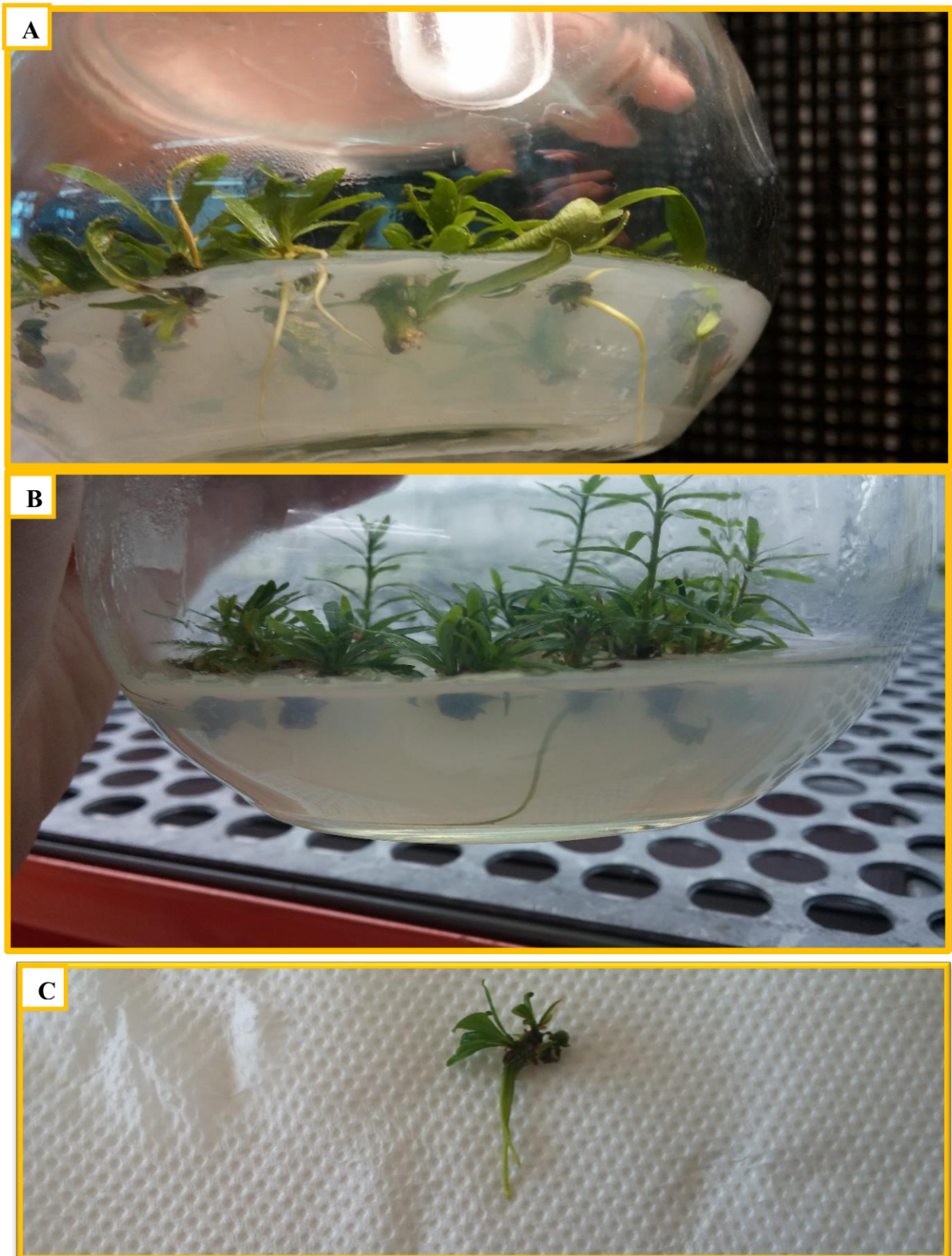


Figure 3.38 : Aspect des vitro-plants enracinés (sans charbon actif).

A, B : Vitro-plants enracinés sur milieu Mr3 sans charbon actif
C : Détail de vitroplant enraciné.

3.3.3.1.2. Avec charbon actif

➤ Taux d'enracinement

Au terme de 45 jours de culture in vitro, le meilleur taux d'enracinement des vitro-plants est obtenu sur le milieu **Mr3** (1mg/l AIB/1mg/l ANA) où **50%** des vitro-plants ont pu initier la formation des racelles. Dans le milieu **Mr0₁** (MS sans hormones de croissance où les vitro-plants proviennent du milieu contenant (0,5mg/l d'ANA) ces derniers se sont enracinés avec un taux plus faible atteignant **37,5 %**.

Par ailleurs les vitro-plants mis en culture sur les autres milieux n'ont manifesté aucune aptitude rhizogène (**Figure 3.39**).

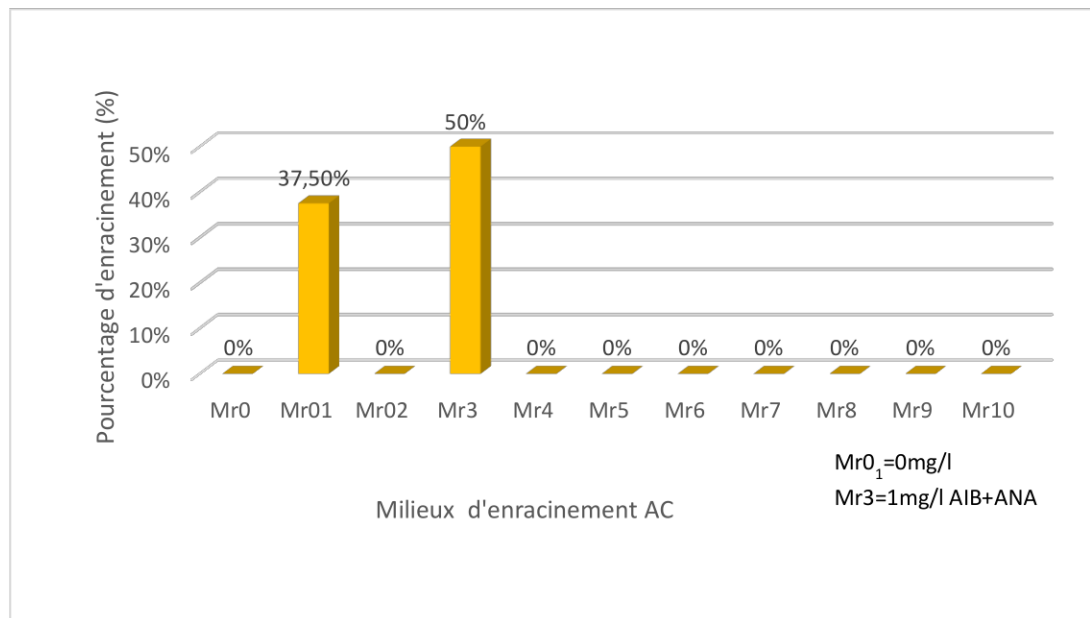


Figure 3.39 : Effet de l'équilibre hormonal sur l'enracinement des microboutures (Avec charbon actif).

3.3.3.2. Elongation racinaire

Les résultats obtenus montrent que les milieux **Mr0₁** et **Mr3** ont permis de développer des racelles dont la longueur moyenne est de **3,66** et **5 cm** après 2 mois de culture respectivement (**Figure 3.40**).

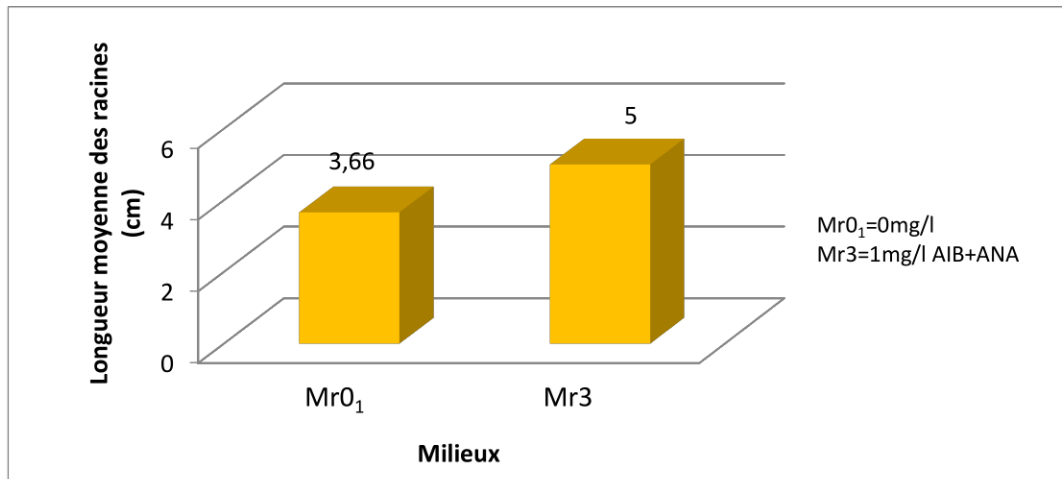


Figure 3.40 : Effet de l'équilibre hormonal sur la longueur moyenne des racines.

L'aspect des vitro-plants enracinés sur milieu Mr3 avec ajout du charbon actif et 100 mg/ d'acide ascorbique est présenté dans la figure 3.41.

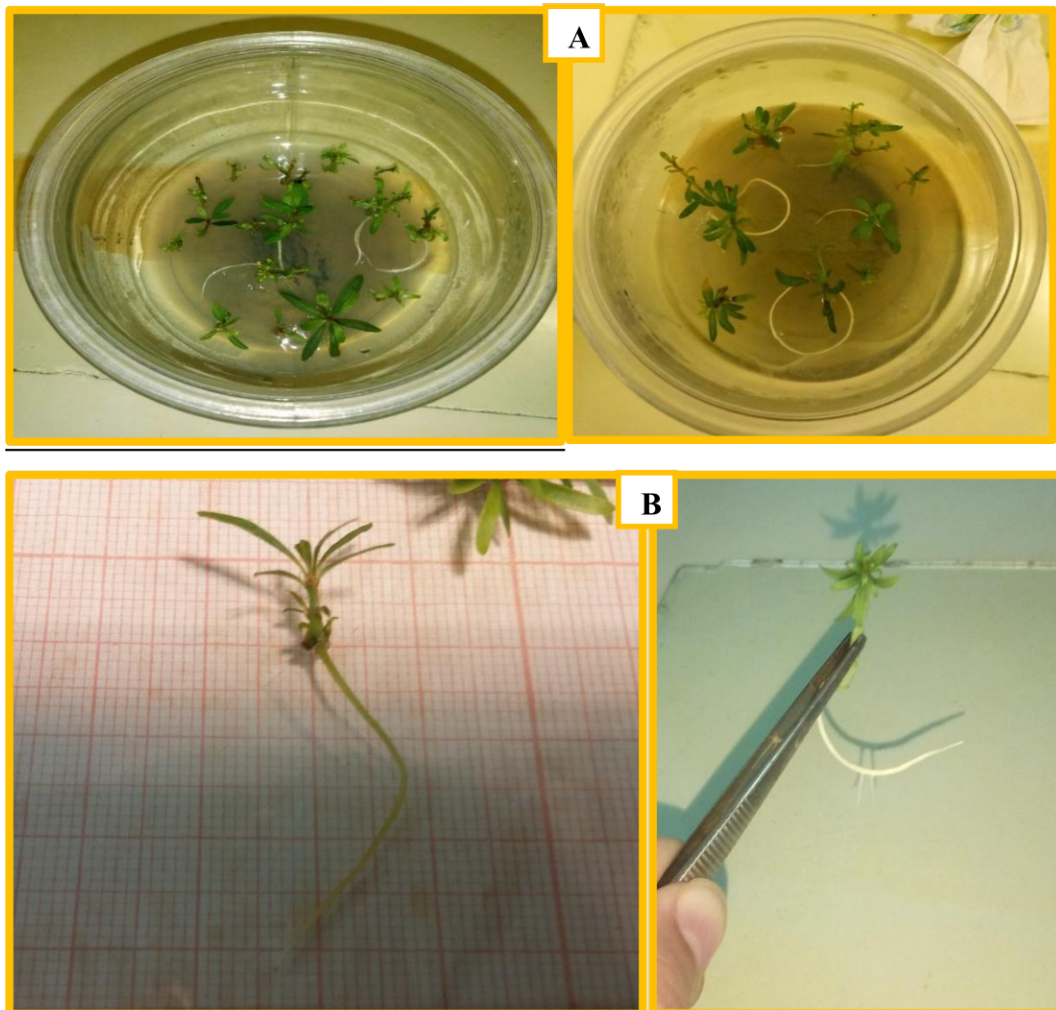


Figure 3.41 : Aspect des vitroplants enracinés sur milieu Mr3 avec charbon actif.

A : Vitro-plants enracinés sur milieu Mr3 avec charbon actif.

B : Détail de vitroplants enracinés sur milieu Mr3.

L'enracinement mixte : Les vitro-plants (avec et sans ajout du charbon actif) qui ont été mis à enraciner n'ont pas réagi (un taux nul a été enregistré) et ce quel que soit leurs provenance (Tindouf ou Baraki), ils ont flétris après un mois de mise en culture.

En effet la combinaison des deux auxines (1mg/l d'AIB/ANA) utilisée pour l'arrosage des vitro-plants, ne présentent aucun effet sur l'aptitude rhizogène.

3.4. Effet d'écotype sur les caractéristiques morphologique des microboutures

L'effet de l'écotype (provenance de matériel végétal (Tindouf et Baraki) sur les caractéristiques morphologiques des microboutures a été testé pendant 4 subcultures. En effet, l'analyse statistique (Test de Student) effectuée à chaque subculture révèle une différence très hautement significative entre les deux types de matériel végétal utilisés sur la hauteur des microboutures, le nombre de bourgeons et le nombre de feuilles (**P<0,05**) (**Annexe 16**) (**Tableau 3.9**).

Tableau 3.9 : Effet d'écotype sur le développement des microboutures

subcultures paramètres	1 ^{ère} subculture			2 ^{ème} subculture			3 ^{ème} subculture			4 ^{ème} subculture		
	Moy PB	Moy PT	p	Moy PB	Moy PT	p	Moy PB	Moy PT	p	Moy PB	Moy PT	p
Hauteur	2.36	1.44	0.00 000	1.83	0.91	0.00000	1.47	1.06	0.000 08	2.27	1.59	0.00 003
Nb. de bourgeons	3.67	3.00	0.04 354	4.31	3.29	0.01779	4.05	2.94	0.000 07	4.76	2.89	0.00 000
Nb. de feuilles	9.77	6.66	0.00 071	12.5 7	9.15	0.00001	14.07	11.67	0.004 90	16.81	14.43	0.00 009

PT : Provenance de Tindouf

PB : Provenance de Baraki

Nb. : Nombre

Moy : Moyenne.

P : Probabilité.

3.5. Acclimatation

Les plantules obtenues par culture *in vitro* sont très fragiles, elles nécessitent une pré-acclimatation, suivie après quelques jours d'une acclimatation, avant de les placer dans des conditions naturelles.

En ce qui concerne l'étape de pré-acclimatation qui a duré 20 jours, les plantules ont été placées dans une chambre de culture à une température de $25 \pm 2^\circ\text{C}$ sous une photopériode de 16/8h.

Elles sont recouvertes d'un sachet en plastique transparent afin de créer un micro-climat humide. Le substrat utilisé se compose de tourbe, de perlite et d'endocarpe des graines d'arganier broyées à raison de (1:3 :1 ; v/v) est enrichi par les micro-éléments et les macro-éléments du milieu MS (**Figure 3.42**).



Figure 3.42 : Aspect des plantules d'arganier en acclimatation.

A : Après 20 jours (pré-acclimatation).

B : Après 50 jours (acclimatation).

Au terme de 20 jours de pré-acclimatation le taux de reprise est de 90%. Le nombre moyen de feuilles est de 14 par plantule, le nombre de bourgeons est de 8. La hauteur mesurée de la partie aérienne a atteint 14 cm. A partir de 50 jours d'acclimatation, les plantules s'allongent et forment de nouveaux bourgeons et de nouvelles feuilles vertes plus larges à celles déjà formées *in vitro* (**Figure 3.43**).

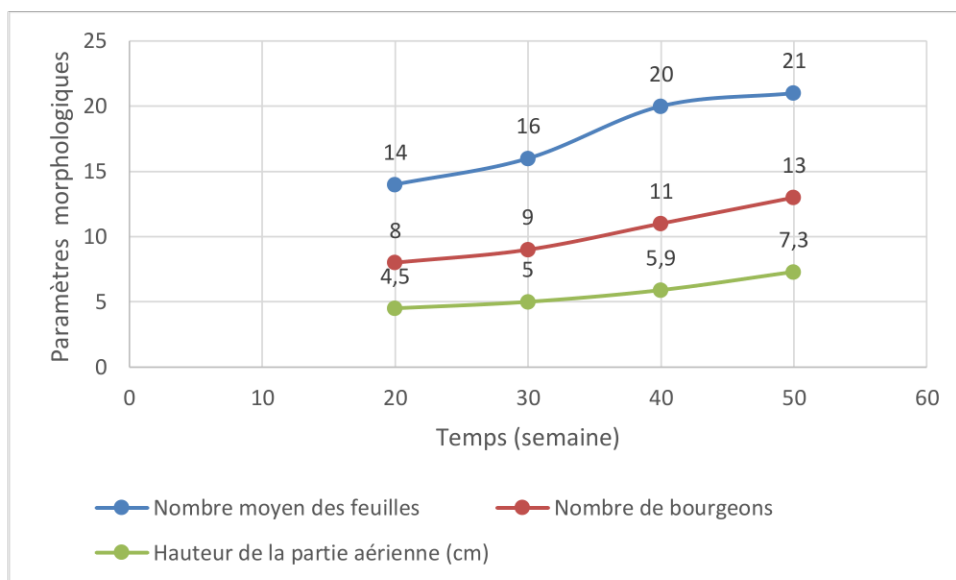


Figure 3.43 : Suivi de plantules acclimatées.

3.6. Etude histologique

Les tissus observés aux différents grossissements du microscope photonique ($\times 40$, $\times 100$ et $\times 400$) et confirmés par Saidi, 2020 du département de biologie (communication personnelle) sont représentés dans les **Figures 3.44, 3.45, 3.46, 3.47, 3.48, 3.49 et 3.50**.

3.6.1. Entre-nœuds

Les observations des différentes coupes réalisées nous ont permis l'identification, ainsi que l'organisation des tissus des entre-nœuds d'*Argania spinosa* L., où nous distinguons de l'extérieur vers l'intérieur les tissus suivants :

- ✓ **L'épiderme**, constitué par une seule assise de cellules protégeant les tissus internes, entourant le parenchyme cortical.

- ✓ **Le parenchyme cortical** qui est composé des cellules arrondies iso-diamétriques à méats et des canaux sécréteurs entourés par des petites cellules, ce sont éventuellement des cellules sécrétrices en forme d'étoiles (même constatations pour les entre-nœuds obtenus *in vitro* et *in vivo*).
 - ✓ **Les tissus conducteurs** à savoir le phloème puis le xylème (spiralé), situé au-dessus du parenchyme médullaire.
 - ✓ **Le parenchyme médullaire ou moelle** se trouve à l'intérieur de la coupe, formé des cellules arrondies avec la présence de méats bien visibles
- (Figures 3.44, 45 et 46).

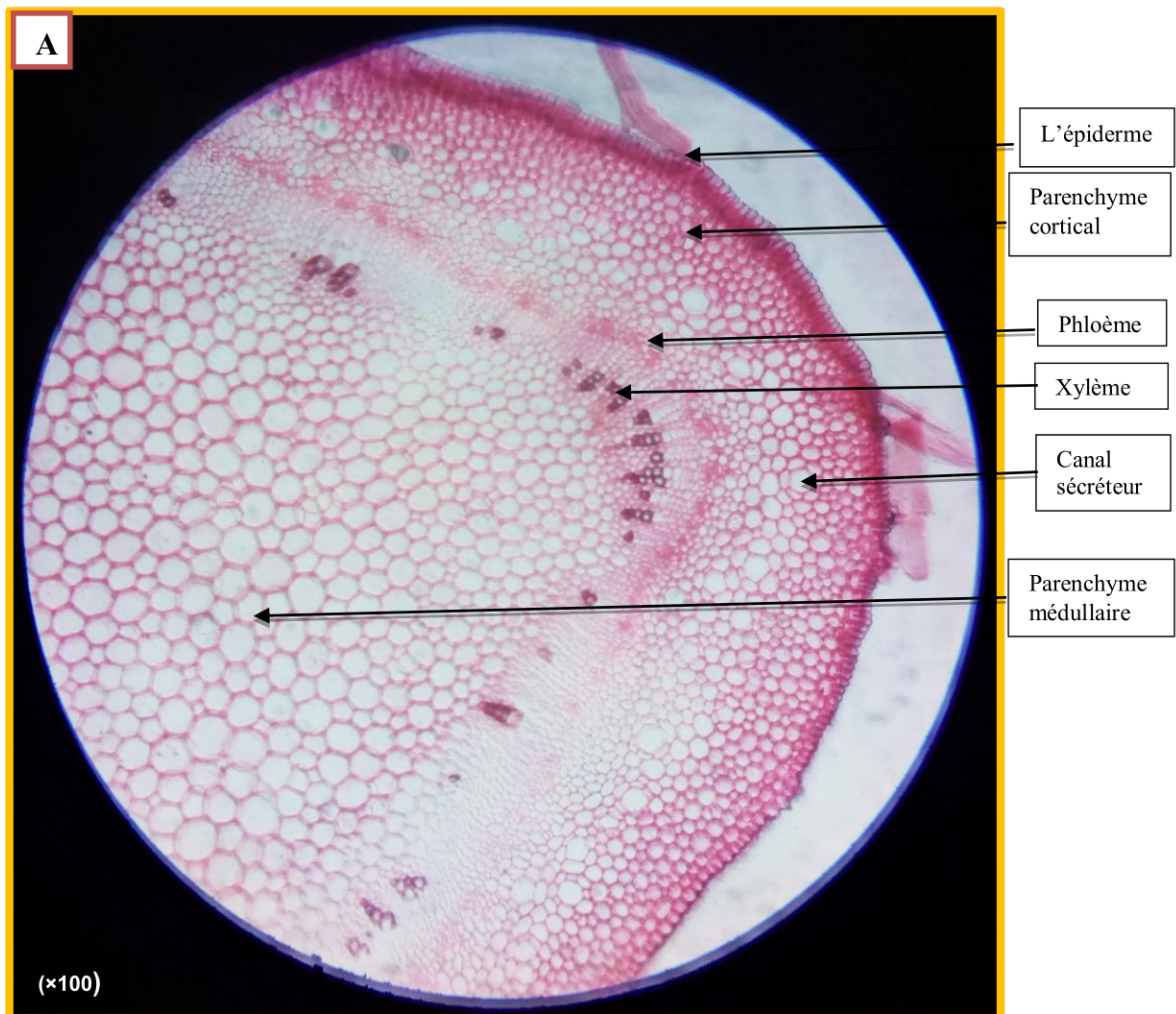


Figure 3.44 : Coupe transversale d'entre-nœud *in vitro* (G×100).

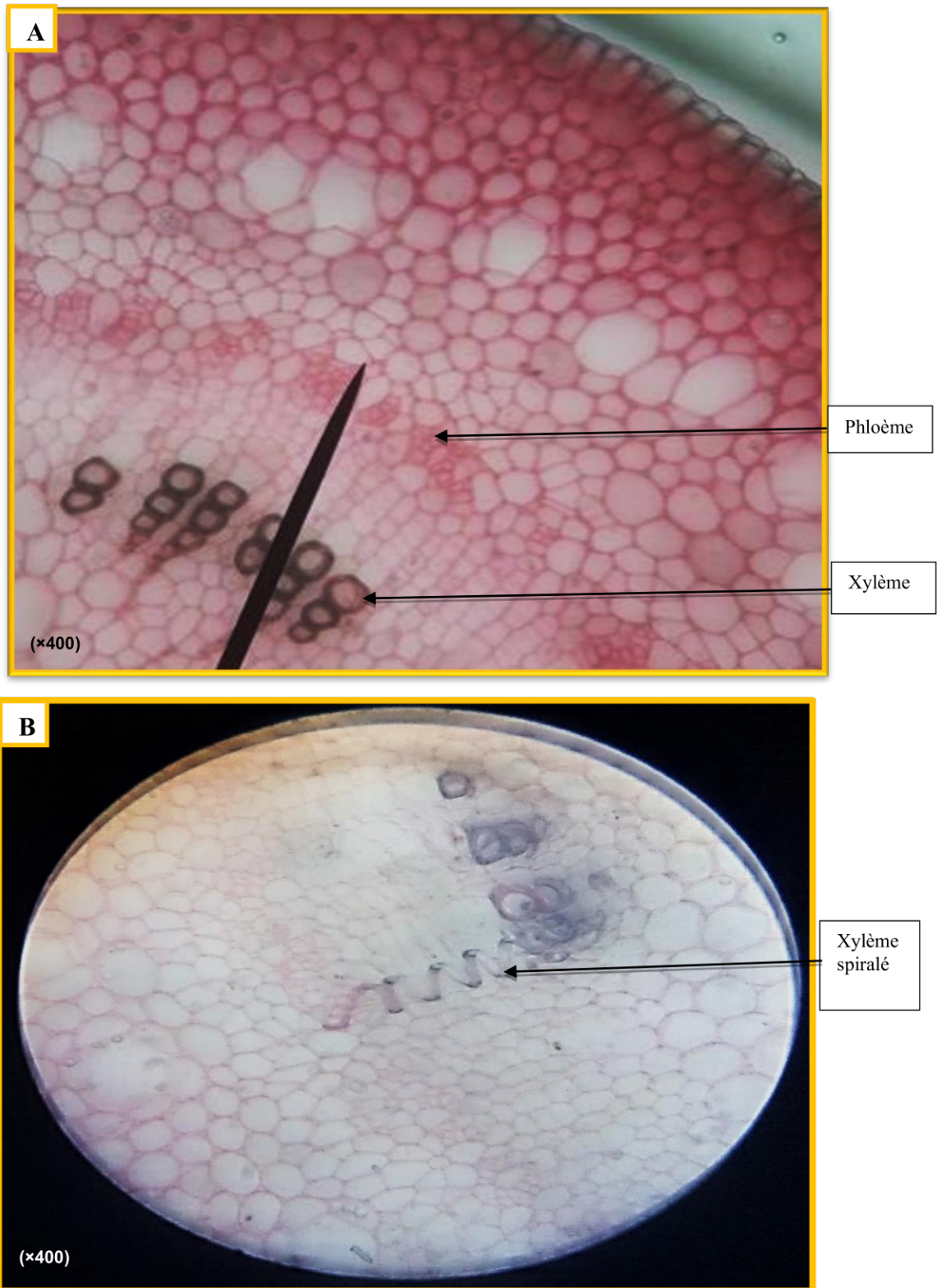


Figure 3.45 : Détail d'un faisceau conducteur d'entre-nœud de vitro-plants
A : Faisceau cribro-vasculaire, **B** : xylème spiralé (G×400).

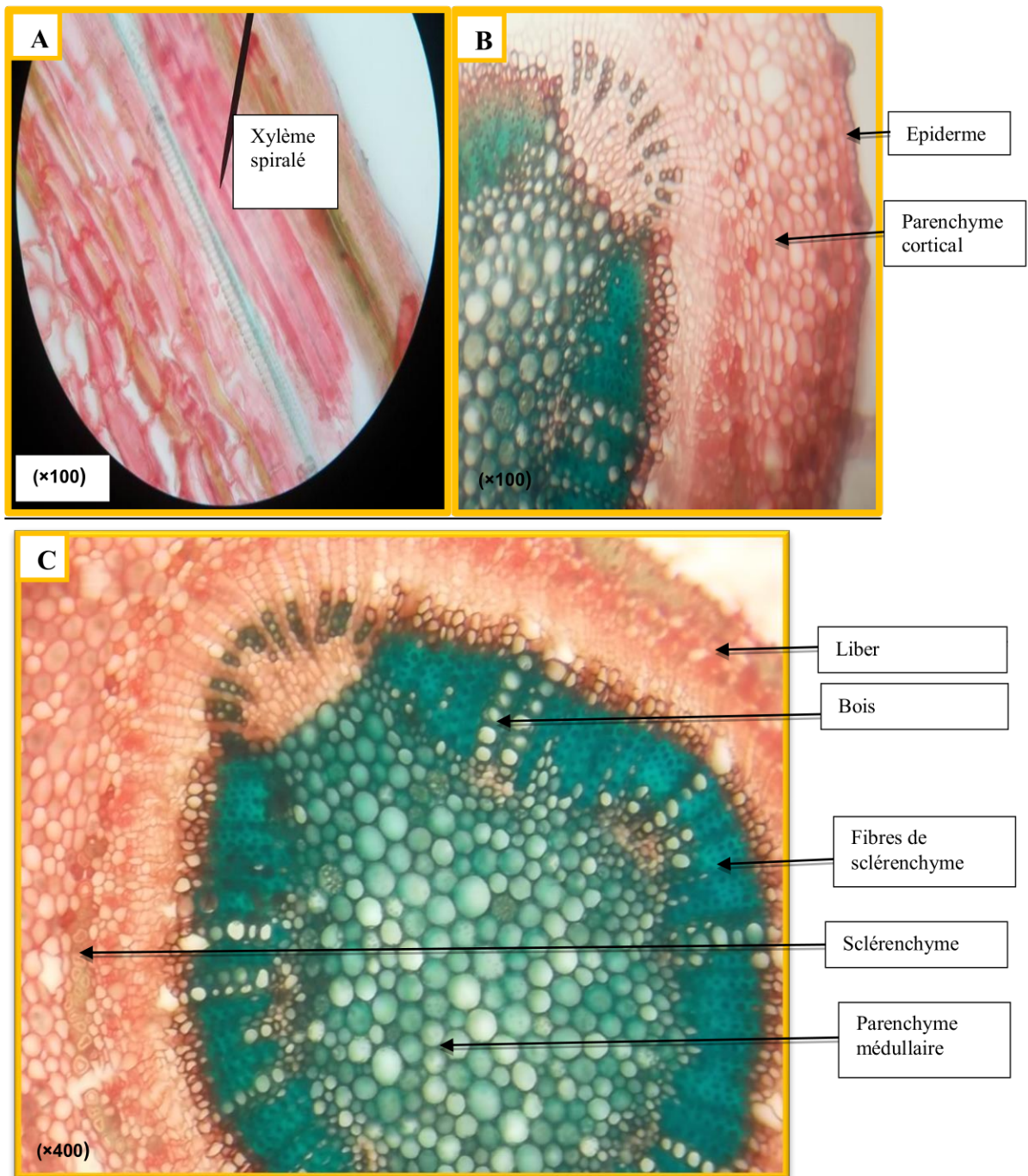


Figure 3.46 : Coupes au niveau d'entre-nœuds du rameau provenant de Tindouf.

A : Coupe longitudinale montrant un xylème spiralé (G×100).

B : Aspect d'une coupe transversale au niveau d'un entre nœud *in vivo* (G×100).

C : Aspect d'une coupe transversale au niveau d'un entre nœud *in vivo* (G×400).

3.6.2. Feuilles

Les coupes histologiques des feuilles nous ont permis d'identifier l'existence de deux épidermes et une couche de cuticule recouvrant ce dernier, elle est fine chez les folioles obtenues *in vitro* et plus épaisse chez celles rencontrées *in vivo*.

Entre ces deux épidermes, nous avons une organisation de différents tissus, sous l'épiderme ventral nous avons un parenchyme chlorophyllien palissadique suivi d'un parenchyme chlorophyllien lacuneux qui est en relation avec l'épiderme dorsal. Nous avons également signalé la présence des tissus conducteurs au niveau de la nervure principale et des nervures secondaire, formés de xylème et de phloème (**Figures 3.47 et 48**).

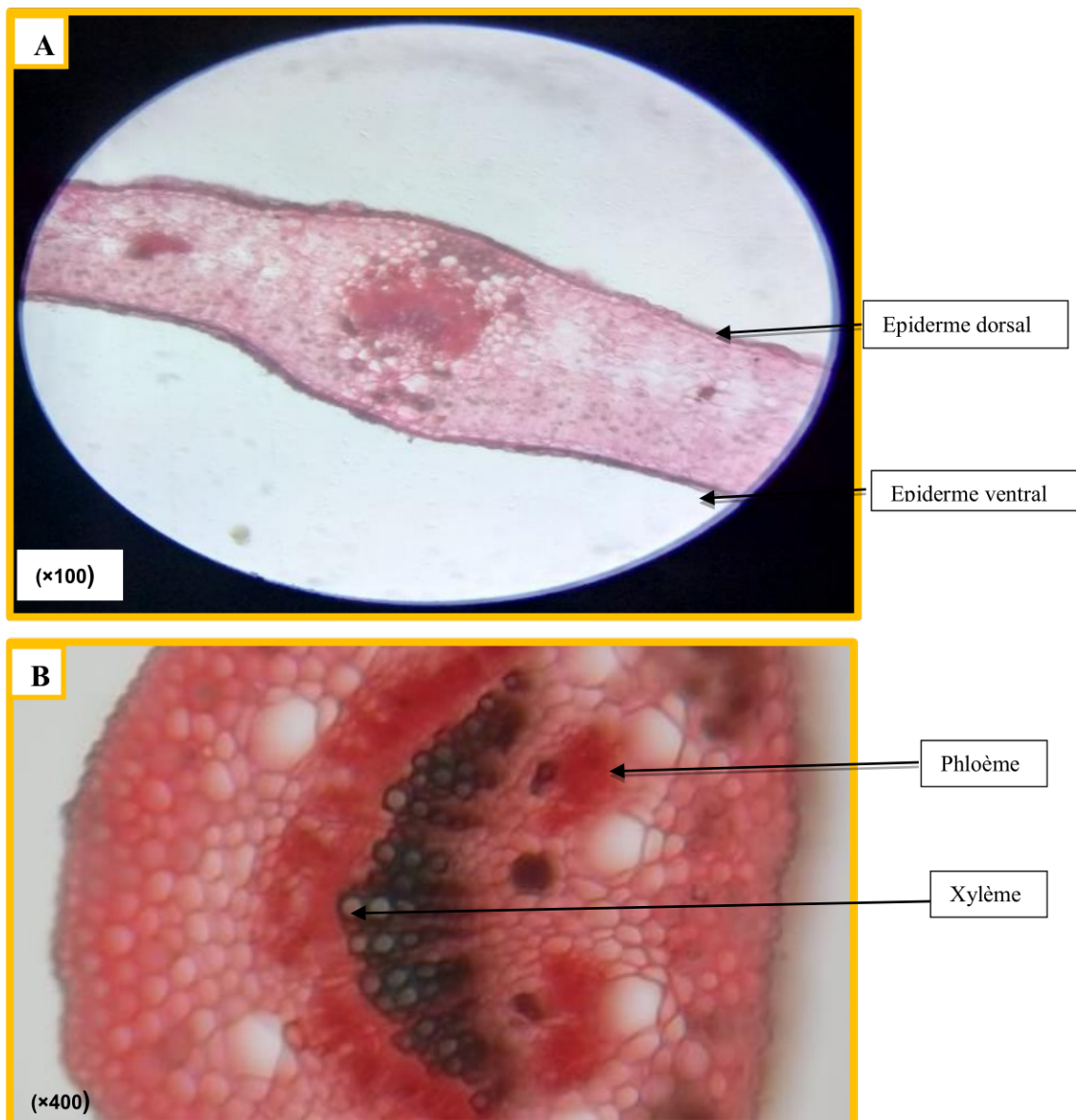


Figure 3.47 : Coupes transversales au niveau de folioles *in vitro* d'arganier.

A : Coupe transversale au niveau de folioles (G×100).

B : Coupe transversale au niveau de la nervure principale (G×400)

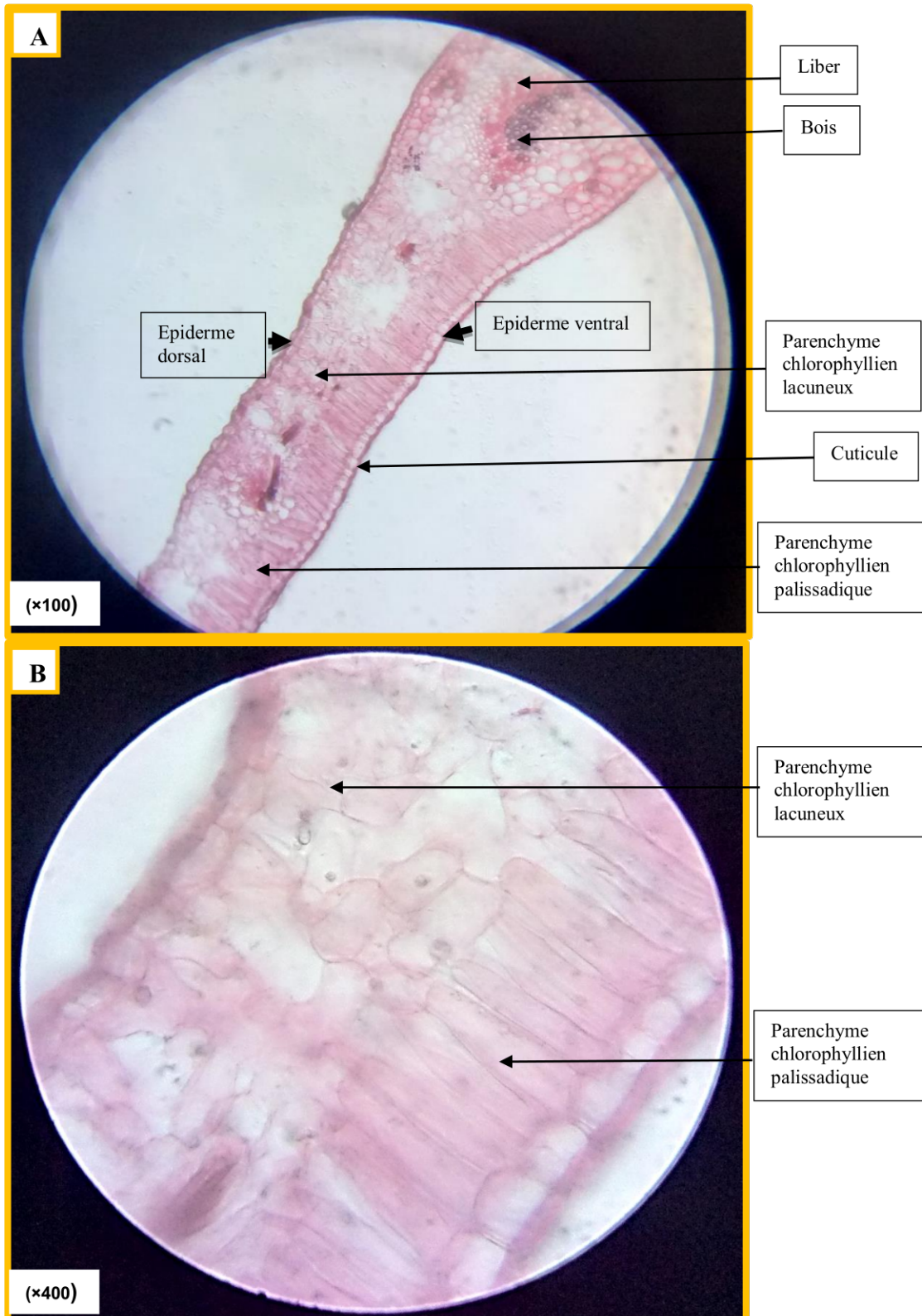


Figure 3.48 : Coupe transversale au niveau de la feuille d'arganier (Végétal adulte provenance de Tindouf).

A : Coupe transversale *in vivo* (G×100).

B : Coupe transversale *in vivo* montrant les parenchymes chlorophylliens (G×400).

3.6.3. Racines

Les coupes histologiques des racines obtenues *in vitro* mettent en évidence l'existence de l'extérieur vers l'intérieur :

- ✓ Un rhizoderme entourant un parenchyme cortical formé de cellules isodiamétriques à méats.
- ✓ L'endoderme est observé dans le cercle central, il est composé d'une couche de cellules épaisses entourant le péricycle.
- ✓ Les tissus conducteurs (pôle ligneux) formés de phloème alterné par le métaxylème et le protoxylème (**Figure 3.49 B**).

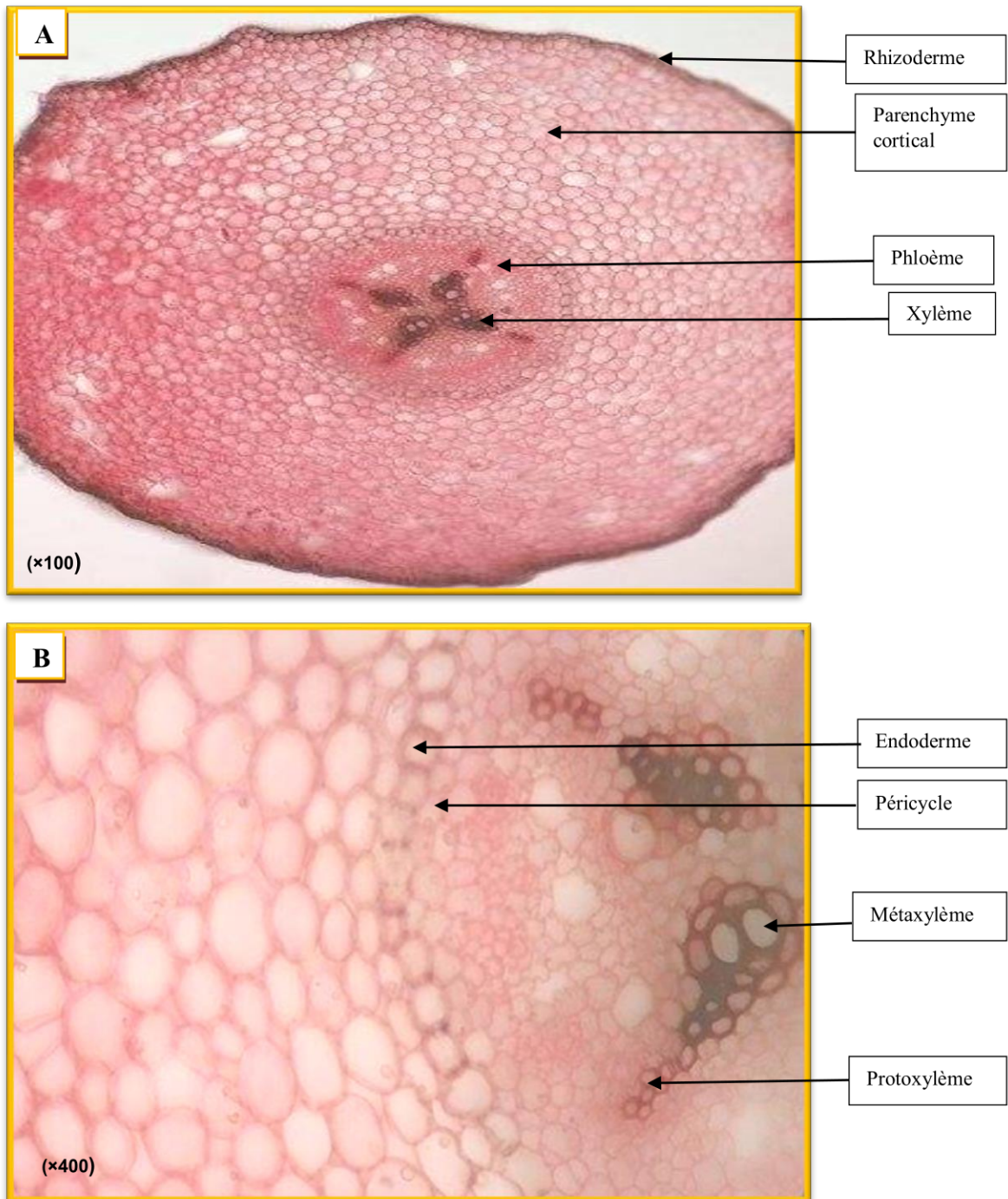


Figure 3.49 : Coupes transversales au niveau d'une racine néoformée *in vitro*.

A : Aspect d'une coupe histologique *in vitro* (G×100).

B : Faisceau cribro-vasculaire *in vitro* (G×400).

✓ Les coupes *in vivo* montrent l'installation des structures secondaires où nous constatons que le xylème est repoussé vers le centre de la racine, la structure secondaire prend place en l'occurrence le bois (**Figure 3.50**).

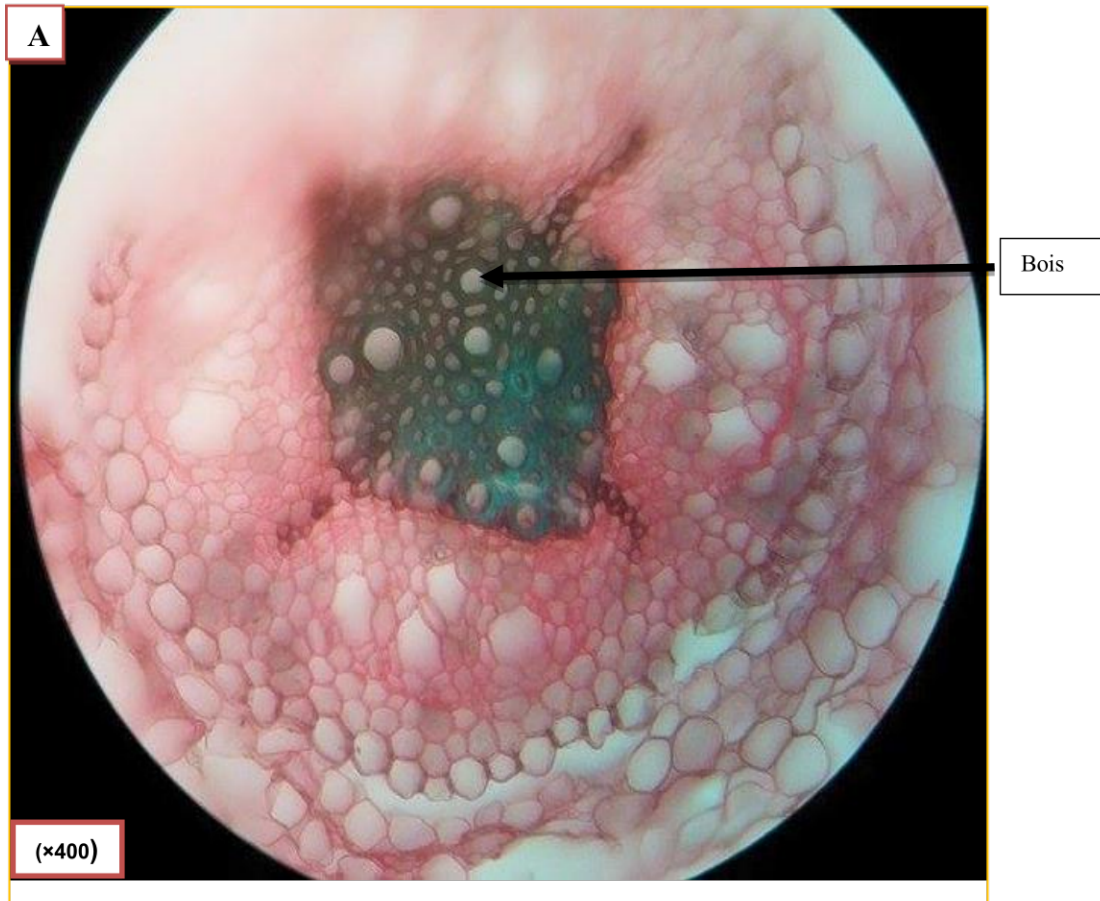


Figure 3.50 : Coupe transversale au niveau d'une racine d'arganier de Tindouf (Gx400).

CHAPITRE 4 : DISCUSSION

PREMIERE PARTIE : GERMINATION

4.1. Germination

La germination est un phénomène biologique très complexe qui nécessite la maîtrise et l'identification des facteurs à l'origine. Dans notre recherche, nous nous sommes intéressés à la détermination des conditions optimales de germination *in vitro* des noix possédant une coque ligneuse ainsi que des amandes d'*Argania spinosa* L. Les graines sont désinfectées afin de les débarrasser des micro-organismes qui inhibent la germination et le bon développement des plantules.

La stérilisation du matériel végétal avant la mise en culture est délicate, le degré d'infection des tissus en surface est très variable.

Boccon-Gibod, (1989) [92] souligne que des essais de stérilisation sont nécessaires en combinant différents produits chimiques pour éliminer toute trace de micro-organismes pouvant nuire à la germination des graines.

Pour cela, nous avons testé lors de notre expérimentation différentes combinaisons de produits chimiques (éthanol à 70°, hypochlorite de sodium).

Nous avons enregistré pour les noix pré-traitées, un faible taux de contamination variant entre **10 à 30%** (pour tous types de traitement de désinfection testés). Cette écart (**10 à 30%**) peut être dû à une mauvaise asepticité lors des manipulations entreprises sous hotte à flux laminaire. La contamination est inversement proportionnelle à la durée de trempage des noix dans l'eau oxygénée (H₂O₂). Elle peut s'expliquer par l'effet de l'eau oxygénée considérée comme un puissant désinfectant sur l'élimination des micro-organismes. En effet, c'est un produit qui libère des radicaux libres oxydant très fortement et rapidement la matière organique (MO).

Notons que ce désinfectant a inhibé la germination des noix mises dans un milieu eau gélosée (EG), ce résultat négatif a été enregistré, pour tous les pré-traitements et les traitements de désinfection testés. Certains changements

morphologiques ont été enregistrés après 20 jours de mise en germination avec un gonflement, éclatement des téguments de noix et apparition de l'amande sur la moitié des noix testées (50%). Nous avons remarqué un arrêt de développement de ces dernières au bout de 20 jours.

L'obstacle majeur de cette germination peut s'expliquer, par la nature des téguments lignifiés et osseux empêchant la pénétration de l'eau et le ramollissement des tissus [93]. Il a été également évoqué comme principal problème par d'autres chercheurs notamment **khelifi et al., (1996) [94]**. Nous pouvons également déduire que la durée d'exposition des graines aux produits chimiques (H_2O_2 et $NaClO$) peut aussi les altérer et brûler.

Par ailleurs, **Renard, (1975) [95]** note d'autres difficultés, en signalant que parmi les graines mises en essais (mêmes conditions d'expérimentation) certaines ne germent pas à cause de la dureté du tégument et/ou les facteurs endogènes inhibiteurs ou dormants.

Dans ces conditions, il est indispensable d'optimiser les conditions pour la germination *in vitro* des graines d'arganier, pour cela, durant notre expérimentation nous avons testé la scarification mécanique pour extraire l'amande et la mettre à germer directement après l'avoir désinfectée.

En ce qui concerne, la stérilisation des amandes nous avons enregistré un pourcentage de contamination des amandes très faible, il est nul pour la quasi-totalité des traitements de désinfection testés (**T2** ($NaClO$ à 8° pendant 10mn), **T3** ($NaClO$ à 8° pendant 15mn) **T4** ($NaClO$ à 16° pendant 5mn) **T5** ($NaClO$ à 16° pendant 10mn) et **T6** ($NaClO$ à 16° pendant 15mn), il est de **10%** pour le traitement **T1** ($NaClO$ à 8° pendant 5mn). Ce faible taux de contamination révèle l'efficacité du $NaClO$ à 8° comme produit désinfectant des amandes d'arganier qui sont moins exposées aux agents pathogènes à l'intérieure de la coque.

Le taux de germination des amandes après scarification mécanique des téguments, est très important, avec un optimum de **100%** pour les amandes désinfectées par trempage pendant 5 mn dans $NaClO$ à 8° (**T1**). Le pourcentage

de germination est amélioré par la levée de la dormance tégumentaire après scarification mécanique.

Nous pouvons déduire que l'utilisation de milieu eau gélosée (**EG**) est largement suffisante pour déclencher la germination *in vitro* des amandes d'arganier et la croissance des vitro-semis [82] et [94]. En effet, **Lafron et al., (1998) [88]** signalent que les réserves sont activement métabolisées pour assurer normalement la croissance des plantes.

DEUXIEME PARTIE : MICROPROPAGATION PAR MICROBOUTURAGE

4.2. Etapes de microbouturage

L'utilisation de l'hypochlorite de sodium **NaClO** à 8° pendant **10 mn** a permis d'avoir un taux de contamination nul (0%) des explants provenant de Tindouf mis en culture sur la quasi-totalité des milieux testés. En revanche, le faible taux de contamination fongique qui a été enregistré **10 et 30 %** pour le milieu (Mi1) et le milieu témoin (Mi0) pourrait s'expliquer par des erreurs de manipulation.

La composition des milieux de mise en culture joue un rôle très important dans la culture *in vitro*. Certains d'entre eux stimulent les processus du développement *in vitro*, d'autres par contre ont peu d'influence sur le débourrement [96] [97] [98] [99] [100].

Nous avons sélectionné le milieu MS comme milieu de base le plus favorable au débourrement des bourgeons axillaires d'*A spinosa* L. (avec un taux de débourrement de **70 et 100%** pour les deux types de végétal provenant de Tindouf et Baraki comparé au milieu Gamborg (B5) et Woody plant medium (WPM). En effet, [51] [4] [9] préconisent d'employer ce milieu de Murashige et Skoog qui induit un bon développement de pousses de plus de 5 cm chez certains clones. Notons également que le milieu MS est caractérisé principalement par une très forte teneur en azote dont le tiers est apporté sous forme réduite (ions NH_4^+) et une concentration élevée en potassium (K^+). Ces deux composants, interviennent fortement dans le développement des plantes. En outre, l'azote est l'élément minéral qui favorise le développement végétatif, tandis que le potassium favorise la division cellulaire [101].

Pour l'étape d'initiation, les résultats obtenus ont montré des réactions très différentes du comportement des explants suivant les régulateurs de croissance utilisés. Le meilleur taux de débourrement (100%) des bourgeons axillaires a été enregistré pour les combinaisons (1.5 mg/l Kin/0,5 mg/l AIA) et (1 mg/l Kin /0,5 mg/l AIA) du milieu **Mi6** cette association a fourni des vitro-plants vigoureux ayant un port dressé avec un appareil végétatif vert et dense.

Selon **Margara, (1982) [101]** les cytokinines associées aux auxines, favorisent généralement la prolifération *in vitro* des méristèmes préexistant ce qui explique le meilleur taux de débourrement des bourgeons. Mais chez l'*Argania spinosa* L. l'utilisation de la Kinétine a donné des taux de débourrement très intéressants comparés aux BAP. L'application du BAP ou Kin séparément n'a pas amélioré le taux de débourrement des bourgeons axillaires, mais au contraire provoque une baisse de ces taux. Une tendance similaire a également été signalé au niveau de plusieurs autres plantes ligneuses lors d'utilisation de la BAP seule **[102] [103]**.

Par contre, le meilleur taux de débourrement enregistré atteignant **70** et **100%** respectivement pour les explants provenant de Tindouf et Baraki est obtenu sur le milieu **Mi0** (témoin sans hormones de croissance) pourrait s'expliquer par l'existence de l'apport interne des régulateurs de croissance qui sont utilisés par l'explant.

Concernant l'étape d'élongation caulinaire, plusieurs auteurs (**Chlyah et Demarly, 1993) [104]** signalent que la phase d'allongement préalable à l'enracinement peut être indispensable. Au cours de cette phase, l'acide gibbérellique peut être un activateur de l'enracinement notamment chez le *Prunus myrobolan* et chez le *Pinus mugho*. Dans notre experimentation sur l'*Argania spinosa* L. , l'utilisation de GA3 a amélioré significativement l'allongement caulinaire à la concentration de 1.5mg/l GA3 (**Ma3**) avec une longueur moyenne de **4.7** et **5 cm** des deux types de végétal utilisé provenant de Tindouf et de Baraki respectivement.

Par contre, certains auteurs tel que **Lamaoui, (2015) [105]** a signalé l'inefficacité de l'hormone de croissance **GA3** sur l'élongation des tiges d'*Argania spinosa* L. lors d'utilisation des faibles concentrations (0.1, 0.5, 1 mg/l). Les résultats obtenus ont montré que **GA3** était inefficace sur l'élongation des tiges.

Au terme de la phase d'induction des racines, qui a duré deux mois, l'apport combiné de deux auxines l'AIB et l'ANA, à concentrations égales dans le milieu **Mr3** a donné le meilleur pourcentage d'induction racinaire avec un taux de **36 %** pour les explants de Tindouf et **50 %** pour ceux de Baraki. L'aptitude à l'enracinement décroît également avec l'augmentation de l'âge du végétal, à partir duquel sont prélevés les explants **[106]**. Nous déduisons que pour l'obtention de plantules enracinées, il est judicieux d'utiliser un matériel végétal juvénile.

Ces résultats obtenus concordent avec ceux de **Lamaoui, (2015) [105]** qui a utilisé la même combinaison hormonale permettant d'enregistrer un taux de 54.85%. Ils sont en accord également avec les travaux de **Bousselmame et al., (2001) [107]** qui obtiennent un taux plus élevé de 85%, avec la même combinaison (AIB/AIA), mais à une concentration plus élevée de 5 mg/l. En outre, **Sané et al., (2001) [108]** trouvent que, l'apport de l'ANA et l'AIB simultanément sont nécessaires, pour induire la formation des primordiums racinaires chez *Acacia raddiana*.

Une telle stimulation de l'enracinement *in vitro* sous l'effet de l'association des deux auxines (AIB / ANA) a déjà été observée chez *Vitis labrusca* **[109]** (**Lewandowski, 1991**), *Gmelina arborea* **[110]** (**Sen et al., 1992**), *Quercus sp.* (**Ostrolucka et Bezo, 1994**) **[111]** et *Fraxinus excelsior* (**Silveira et Cottignies, 1994**) **[112]**. Certaines espèces comme *Artocarpus heterophyllus*, l'utilisation de la combinaison hormonale englobant trois auxines en même temps (AIA/AIB/ANA) à concentrations égales donne une meilleure rhizogénèse **[113]**.

Le transfert des vitro-semis d'un milieu contenant des régulateurs de croissance à un autre milieu neutre **Mr0₁** (sans hormones) a permis d'obtenir **37,5%** des pousses enracinées de provenance de Baraki. D'après **Zryd, (1988) [60]** la rhizogénèse peut être déclenchée chez certains types de plantules lors du transfert de sub-culture d'un milieu qui contient des hormones de croissance vers un autre milieu sans hormones ce qui confirme les résultats obtenus dans notre étude chez l'arganier (*Argania spinosa* L.).

Les plantules enracinées ont montré un taux de reprise intéressant atteignant les 90% au bout de 20 jours de pré-acclimatations. Cette étape est un autre défi particulier qui est tributaire de la qualité du système racinaire. Ces plantules ont montré un développement particulièrement, lent. Au bout de 50 jours d'acclimatation la hauteur moyenne de la partie aérienne a atteint **7.3 cm** avec néoformation de **13** bourgeons axillaires et **21** feuilles plus larges que celles obtenues *in vitro* sur un ensemble de 60 plantules mises en culture.

A partir des résultats obtenus, l'étude histologique des différentes parties d'arganier (entre-nœuds feuilles et racines), nous a permis de bien connaître les différents tissus d'*Argania spinosa* L., et leurs disposition, ces derniers sont similaires pour les vitro-plants et pour le matériel végétal adultes en provenance de Baraki et Tindouf respectivement.

CONCLUSION

Les arganiers poussant spontanément à Tindouf (sud-ouest Algérien) subissent des coupes illicites bien marquées ainsi qu'un surpâturage depuis fort longtemps, car l'aire naturelle de l'arganeraie est considérée comme un champ ouvert pour les animaux (cheptel) et les nomades, si son intérêt écologique dans la lutte contre la désertification est immense, sa réputation dans la composition des produits cosmétiques et ses bienfaits pharmaceutiques n'est plus à démontrer. Malgré tous ces intérêts, cette espèce précieuse est en régression dramatique irréversible. Pour cela, la maîtrise des techniques de multiplication d'arganier est nécessaire pour régénérer et préserver cette espèce endémique de l'Algérie en voie de disparition.

À l'issue des essais de germination *in vitro* des graines d'arganier entrepris, nous avons constaté que ces dernières ne présentent pas de problème de dormance. En revanche, elles sont affectées d'une inhibition tégumentaire qui pourrait être éliminée par une simple scarification mécanique des téguments. Les principaux résultats obtenus de cette étape montrent une absence de germination des noix pré-traitées par l'eau oxygénée et mis en culture sur milieu eau gélosée comparés à l'utilisation des amandes d'arganier stérilisées elles aussi par l'hypochlorite de sodium (NaClO : 8°/5 mn). Nous avons enregistré un meilleur pourcentage de germination des amandes atteignant les 100% avec développement des vitro-semis sur le milieu eau gélosée EG.

Pour la phase d'initiation, nous avons constaté que l'utilisation de milieu MS additionné à des combinaisons hormonales (1.5mg/IKin/0,5mg/IAIA) (1mg/IKin/0,5mg/IAIA) donne les meilleurs taux avec 70 et 100% de débourrement des bourgeons axillaires des explants provenant de Tindouf (PT) et Baraki (PB) respectivement. Ces phytohormones assurent ainsi, un bon développement des vitro-plants atteignant une hauteur de 2.44 et 1.96 cm, avec un nombre moyen des bourgeons néoformés de 5 et 8 et un nombre moyen de folioles de l'ordre de 11 et 16 respectivement pour les deux provenances de matériel végétal, après quatre subcultures.

La phase d'élongation, nous a permis de sélectionner la concentration optimale (1,5 mg/l) de gibbérelline (GA3) favorisant ainsi l'élongation caulinaire qui atteint 4.7 et 5 cm pour les deux provenances de végétal (Tindouf et Baraki).

Concernant la phase d'enracinement, l'utilisation du milieu MS/2 contenant 0,5 g de charbon actif, et deux auxines associées à concentration égale (1mg/l AIB /1mg/l ANA) a permis l'induction de primordiums racinaires des vitro-plants avec un taux de 36 et 50 % respectivement pour le végétal de Tindouf et Baraki.

L'élongation des racelles est effectuée, avec succès, sur milieu MS/2 sans régulateurs de croissance contenant 0,5 g de charbon actif et 100 mg d'acide ascorbique. Au terme de deux mois d'allongement racinaire nous avons enregistré une longueur moyenne des racines de 5 et 7,5 cm.

Les plantules enracinées sont acclimatées, elles présentent un taux de reprise très intéressant atteignant 90%.

Ces résultats méritent d'être poursuivis et approfondis. Il est souhaitable dans le cadre d'une recherche future et en perspectives d'axer les travaux sur les points suivants :

- Optimisation de la germination en maîtrisant les paramètres physico-chimiques (Température de la chambre de culture et pH de milieu de culture);
- Mise au point des techniques de mycorhization des jeunes plants acclimatés, lors de la transplantation ;
- Sélectionner les conditions optimales de transplantation, avec un suivi de plantules transplantées dans leurs habitat naturel ;
- Lancer un projet national de plantation d'arganier, espèce rustique et tolérantes aux stressés abiotiques pour ralentir l'avancée de la désertification et relancer l'économie nationale.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. Loussert R. Les agrumes, production. Ed sci. Vol 2, Liban, (1989). 280p.
2. Kechairi, R., Étude de l'arganeraie de Tindouf : État des lieux, contraintes et perspectives de son développement. Thèse Doctorat Ès Sciences en Foresterie. Université Abou Bekr Belkaid –Tlemcen (2018). 182p.
3. Nouaim, R., "Biologie de l'arganier ": Acte des journées d'étude sur l'arganier ESSAOUIRA 29-30 septembre (1995). 81p.
4. Nouaim, R, Mangin G, Breuil MC, and Chaussod R. The argan tree (*Argania spinosa*) in Morocco: Propagation by seeds, cuttings and in-vitro techniques. *Agroforestry Systems* V.54, n°1, (2002), 71-81.
5. Benkheira, A., "L'arganeraie algérienne". Conservation de la biodiversité et gestion durable des ressources naturelles, publication du projet ALG/00/G35, Numéro spécial, n°9. (Juin 2009), 1-15.
6. M'Hirit O., L'arganier: Une espèce fruitière à usage multiple, Formation forestière continue, thème «l'arganier», division de recherche et d'expérimentations forestières. Rabat, (1989), 59-64.
7. Nouaim, R., Chaussod, R., El Aboudi, A., Schnabel, C. et Peltier, J.P., "L'arganier : essai de synthèse des connaissances sur cet arbre", *Physiologie des arbres et arbustes en zones arides et semi-arides*, Editions, Paris, (1991), 9, 388p.
8. Kenny, L., & De Zborowski, I. Histoire de l'arganier, Chapitre I. In : Atlas de l'Arganier et de l'Arganeraie. Institut agronomique et vétérinaire Hassan II. Agadir, Maroc. (2007), 12-38.

9. Nouaim, R., " L'arganier au Maroc : entre mythes et réalités ", une civilisation née d'un arbre, Harmattan France, (2005), 7. 217p.
10. Riedacker, A., Dreyer, E., Pafadnam, C., Joly, H. et Bory, G., " Physiologie des arbres et arbustes en zones arides et semi-arides ", groupe d'étude de l'arbre observation du sahara et du sahel. John Libbey Eurotext, Paris. (1993), 493p.
11. Baumer, M. et Zeraia, L., " La plus continentale des stations de l'Arganier en Afrique du nord ". Rev. For. Fr. V.51, (1999), 446-452.
12. Peltier, J.P., " Les séries de l'arganeraie steppique dans le Souss (Maroc) ". Ecol. Medit. Marseille, V.9, (1983), 77.688.
13. Emberger, L., " Les limites naturelles climatiques de l'arganier ". Bulletin de la société des Sciences Naturelles du Maroc, V.5 n°1 et 2, (1925), 94-97.
14. Le Houerou, H.N., " Classification éco-climatique des zones arides de l'Afrique du Nord ". Ecol. Medit, V.15, n°3 et 4, (1989), 95-144.
15. Botineau, M., Botanique systématique et appliquée des plantes à fleurs, édition Tec & Doc, (2010).1403p.
16. Kechairi, R., Étude de l'arganeraie de Tindouf : État des lieux, contraintes et perspectives de son développement. Thèse Doctorat Ès Sciences en Foresterie. Université Abou Bekr Belkaid –Tlemcen (2018) 182p.
17. Kechairi, R., Abdoun, F. , État des lieux cartographiques de l'arganier *Argania spinosa* (L.) Skeels (Sapotaceae) en Afrique Nord-Occidentale (Algérie et Sahara Occidental), International Journal of Environmental Studies, (2016). 1029-0400.

18. Ayad, A., " Présentation générale de l'arganier ". In : *Formation Forestière Continue ; Thème « l'Arganier »*. Station de Recherche Forestière Rabat.13-17 (Mars1989), 9-18.
19. M'Hirit, O., Benzyane, M., Benchakroun, F., El Yousfi, S.M., Bendaanoun, M., L'ARGANIER une espèce fruitière-forestière à usages multiples, Pierre Margara éditeur(1998).150p.
20. Benzyane, M., " Le rôle socio-économique et environnemental de l'arganier" in : Actes des journées d'études sur l'arganier. Essaouira Maroc, (29 au 30 septembre 1995).12-23.
21. Charrouf, Z., Dubé, S. et Guillaume, D., " L'arganier et l'huile d'argane, d'Ibn Al- Baytar à nos jours ". Editions Glyphe Paris, (2011), 179p.
22. Dobignard, A et Chatelain, C Index synonymique et bibliographique de la flore d'Afrique du Nord (2010-2013) Vol.1-5.457p.
23. Nouaim, R. et Chaussod, R., La mycorhization des plantes forestières en milieu aride et semi-aride et la lutte contre la désertification dans le bassin méditerranéen. Rôle des mycorhizes dans l'alimentation hydrique et minérale des plantes, notamment des ligneux de zones arides, CIHEAM Cahiers Options Méditerranéennes ; n° 20, (1996), 9- 26.
24. Aci, L. Smail-Saadoun, N. Saidi, F., Architecture racinaire de l'arganier de Touiref Bou-aam (Tindouf Algérie) Algerian journal of arid environment (Juin 2018) Vol :8 n°1. 72-87.
25. Nouaim, R. et Chaussod, R L'arganier et ses champignons. Les végétaux insolites pour la science dossier N°77 / octobre'décembre (2002).1-5

26. Bousselmane, F. Kenny, L Achouri, M, Effet des mycorhizes à vésicules et arbuscules sur la croissance et la nutrition de l'arganier (*Argania spinosa* L.) Actes Inst. Agron. Vet. (Maroc) 2002, Vol. 22 (4): 193-198.
27. Boudy P., Guide forestière de l'Africaine Tome 2 : Monographie et traitement des essences forestières, (Ed). LAROSE. Paris (1952) : 505 p
28. Challot, J.P., " Observation sur la régénération naturelle des forêts d'arganier ". Maroc, V.2, (1948), 3-15.
29. Pumareda, L., Henry, F., Charrouf, Z., Pauly, G. et Falconnet, G., "Valorisation des feuilles d'arganier " « impact environnemental » Rapport en Revue : *Bois et Forêt des tropiques* n° 287, (2006).35-44.
30. Perrot E. Le Karité, l'Argan et quelques sapotacées à graines grasses de l'Afrique, pp. 127-158. In : Perrier E., Roume E., Chevalier A. Editions. Les végétaux utiles de l'Afrique tropicale Française, fascicule2 : Le karité, l'argan et quelques autres sapotacées à graines grasses de l'Afrique. Challamel, Paris, (1907), 194 p.
31. Bani-Aameur F. " *Argania spinosa* (L.) Skeels flowering phenology ". Genetic Resources and Crop Evolution, V.49, (2002), 11-19.
32. Ferradous, A., Bani-Aameur, F. et Dupuis, P., " Climat stationel, phénologie et fructification de l'arganier ". Actes de l'Institut agronomique et vétérinaire Hassan II V.17, (1996), 51-60.
33. Bani-Aameur F, " Phenological phases of *Argania spinosa* (L.) Skeels flower " Forest Genetics V.7, (2000 a), 333-338.
34. Bani-Aameur, F., Ferradous, A. and Dupuis P., "Typology of *Argania spinosa* (Sapotaceae) fruits and stones ". Forest Genetics V.6, n°1, (1999), 213-219.

35. Bani-Aameur, F. et Benlahbil, S. " La pollinisation de l'arganier est surtout entomophile". In : F. Bani-Aameur (éd.). Colloque international sur les ressources végétales : L'arganier et les plantes des zones arides et semi-arides. Faculté des Sciences d'Agadir (23-25 avril 1999), 119-120.
36. Bani-Aameur, F., " *Argania spinosa* (L.) Skeels flowering phenology". Genetic Resources and Crop Evolution. In press. (2000 b).7(4), 333-338.
37. Bani-Aameur, F., Floraison et production de fruits de l'arganier : " Des modèles biologiques à l'amélioration des plantes" , IRD Editions, (2001), 893p.
38. Adlouni A. L'huile d'argan, de la nutrition à la santé. Phytothérapie. (2010) ; 8, 89-97.
39. Saint-Laurent, J., Etudes sur les caractères anatomiques du bois et du liber secondaire dans quelques essences forestières du Maroc dernièrement récoltées par le Dr Maire, R. Bull.Stat. Rech. Du Nord de l'Afrique. Tome2, (1932), 49-60.
40. Boudy, P., " Les forêts du Maroc ". Exposition Coloniale Internationale, Paris, (1931), 14p.
41. Khay, M., " Traitements sylvicoles et aménagement ". Formation Forestière Continue.thème « l'Arganier ». Station de Recherche Forestière. Rabat, (13-17 Mars, 1989). 59-65.
42. Guillaume, D. et Charrouf, Z., " Saponines et métabolites secondaires de l'arganier (*Argania spinosa*) ". Cahiers Agricultures vol. 14, n° 6, (novembre-décembre 2005).509-516.
43. Aziz L., Mormont M. et Allali K., Effets de la marchandisation de l'arganier sur la vie socioéconomique des populations de l'arganeraie marocaine. Vertigo,(2013) vol.13, n° 01: 02-13.

44. Boudy P., Guide forestière de l'Africaine Tome 2 : Monographie et traitement des essences forestières, (Ed). LAROSE. Paris (1950): 505 p
45. Nouaim, R. et Chaussod, R., L'arganier (*Argania spinosa* (L.) Skeels), le flamboyant bulletin de liaison des membres du réseau, arbres tropicaux N° 21 Mars (1992).21, 1-8.
46. Nouaim, R. et Chaussod, R., Mycorrhizal dependency of two clones of micro propagated argan tree (*Argania spinosa*).I) Growth and biomass production. *Agroforestry Systems*, V.27, (1994), 53-65.
47. Msanda, F., Gasquez, J., Chaussod, R. et Peltier J.P. " Polymorphisme et régime de reproduction de trois populations d'arganier (*Argania spinosa*, L. Skeels) endémiques du Maroc ". Premiers résultats. In : Deuxièmes Journées de l'Arbre, Univ. Cadi Ayad, Marrakech, 20-21/04/ (1994), 154-158.
48. Msanda, F., El Aboudi A. et Peltier J.P. " Biodiversité et biogéographie de l'arganeraie marocaine". *Cahiers Agriculture*, V.14, (2005), 357-364.
49. El Mousadik, A. et Petit, R., " High level of genetic differentiation for allelic richness among populations of the argan tree (*Argania spinosa* L. Skeels) endemic to Morocco". *Theoretical and Applied Genetics*, V.92, (1997), 832-839.
50. EL Mazzoudi H et Errafia M. Contribution à l'étude de la germination des noyaux d'argan (*Argania spinosa* L.,) par des prétraitements chimiques. *Ann. Rech. For. du Maroc*, (1977). 17, 59-66.
51. Nouaim R. Ecologie microbienne des sols d'arganeraies : activités microbiologiques des sols et rôle des endomycorhizes dans la croissance

- et la nutrition de l'arganier (*Argania spinosa* (L.) Skeels). Thèse Doctorat ès Sciences, Université Ibnou Zohr, Faculté des Sciences, Agadir, (1994) 1-21
52. Loutfi F. Germination, levée et survie des plantules d'arganier (*Argania spinosa* L., Skeels). CEA « Environnement ». Université Ibnou Zohr, Agadir, (1994). 34 p.
53. Mokhtari, M., Production rapide de plants d'arganier , Bulletin mensuel d'information et de liaison de PNTTA. N° 95 Août , (2002).1-14.
54. Kaaya M. Contribution à la domestication de l'arganier : sélection et multiplication, université Ibn Zohr, Agadir (1998).175p.
55. Harrouni M. Multiplication de l'arganier par bouturage. Bull de Transfert de Technologie en Agriculture (2002). 95: 2-4.
56. Alouani M. Régénération de l'arganier (*Argania spinosa* (L.) Skeels): protocole de production de plants de semis et par bouturage et réussite de la transplantation, Université Ibn Zohr, Agadir. Doctorat (2003).428-436.
57. Metougui M.L. Mokhtari M. Machati I. Azeroual I. et Benlhabib O. Multiplication végétative de l'arganier (*Argania spinosa*) par bouturage et par greffage. Rev. Mar. Sci. Agron. Vét. (2017) 5, 4:428-436.
58. Mokhtari M., Benismail M.C., Ljirri L., Nassiri S. Développement d'un système de production de plants d'arganier par greffage. Premier Congrès International de l'Arganier, Agadir. (2011).100-108.
59. Taoufiq M.S., Bouzoubaa Z., Hatimi A., Tahrauch S. Étude et optimisation des techniques de régénération chez l'arganier (*Argania spinosa* (L.) Skeels). Premier Congrès International de l'Arganier, Agadir. (2011).100-108.

60. Zryd, J.P., "Cultures de cellules, tissus et organes végétaux", fondements théoriques et utilisations pratiques. Presses polytechniques Romandes. (1988), 308p.
61. Beauchesne, G., L'historique et les fondements de la culture *in vitro* " La culture in vitro et ses applications horticoles ", 3^{ème} Edition, Tec et Doc, Paris, (1989), 225p.
62. Neil, A.C. et Jane, B.R., " Biologie", Edition, Boeck Université, (2006).1606p.
63. Raven. P.H., Evert, R.F. et Eichhorn S.E., " Biologie végétale", De Boeck Diffusion, (2003), 968p.
64. Tourte, Y., "Génie génétique et biotechnologie", concepts, méthodes et application agronomique, 2^{ème} Edition Dunod, Paris, (2002), 241p.
65. Hughes, K.W., " Ornamental species ", In : *Cloning Agricultural Agricultural Plants via in vitro Techniques*, Ed: Conger, B.V., CRC Press Inc., Boca Raton, Florida, (1981), 5-50.
66. Kar, D.K., Sen, S., " Effect of hormone on chromosoms behavior in callus cultures of *Asparagus racemosus* ", *Biol. Plant.* V.27, (1985), 6-9.
67. Levin, R., Gaba, V., Hirsch, S., De Noia, D. et Vasil, IK., " Automated plant tissue culture for mass propagation". *Bio/Technology* V.6 : (1988), 1035-1040.
68. Rithershaus, E., Wrich, J., Weiss, A. et Westphal K. "Large scale industrial fermentation of plant cells": design, instalation and initial operation of a fermentation unit (75 000 litres) for plant cell cultures. *Bio Engineering* V.5: (1989), 8-10.

69. Westphal, K., " Large scale production of biologically active compound in plant cell cultures". In : Nijkamp HJJ, Van der Pias LHW, Van Aartrijk J, eds. *Progress in plant cellular and molecular biology*. Proc. Vth IAPTC Congress, Kluwer Acad. Pubi., The Netherlands. (1990).
70. Preil, W., " Application of bioreactors in plant propagation". In : Debergh PC, Zimmerman RH, eds. *Micropropagation*. Kluwer Acad. Pubi., The Netherlands. (1991), 425-445.
71. Durzan, D.J. et Durzan, P.E., Future technologies: model, reference control systems for the scale-up of embryogenesis and polyembryogenesis in cell suspensions cultures. In : Debergh PC, Zimmerman RH, eds. *Micropropagation*, Kluwer Acad. Pubi., The Netherlands. (1991), 389-423.
72. Kenny, L., Atlas de l'Arganier et de l'Arganeraie. Institut agronomique et vétérinaire Hassan II. Agadir, Maroc. (2007), 1-191.
73. Mdarhri Alaoui, M., Boukmou, J. et Bouzoubaa, Z., " Application de la biotechnologie pour la sauvegarde de l'arganeraie " : étude de la multiplication *in vitro*. Actes du Premier Congrès International de l'Arganier, Agadir, (2011), 119-123.
74. Giguère, R., "Botanique et horticulture dans les jardins de Québec ", Editions MultiMondes Québec, V.2, (2003), 174p.
75. Nouaim, R., Linères M., Esvan, J.M. et Chaussod, R., Mycorrhizal dependency of two clones of micro-propagated argan tree (*Argania spinosa*). II) Mineral nutrition. *Agroforestry Systems*, V.27, (1994), 67-77.
76. Barlass M, Skene KGM. In vitro plantlet formation from citrus species and hybrids. *Horticultural Science*. (1982) 17:333-341.
77. Sasson A., Biotechnologies in developing countries: Present and future. UNESCO Publishing, Paris, (1993) 764 p.

78. Rai MK, Asthana P, Jaiswal VS, Jaiswal U,. Biotechnological advances in guava (*Psidium guajava* L.): Recent developments and prospects for further research. *Trees Structure and Function*. (2010) 24:1-12.
79. Gabe, M., " Techniques histologiques ", Editions, Masson, Paris, (1968).1113p.
80. Anonyme., "Cahier technique. Micropropagation pour l'entreprise d'EHEV", (Entreprise Horticole et Espaces Verts) (2001).
81. Monter, A.V., "Méthodes aseptique". Fondements théoriques et pratiques de la culture de tissus végétaux. FAO. Rome, (1992), 164p.
82. Aizer, N. Essais de détermination des conditions optimales de la callogenèse de l'arganier (*Argania spinosa* L. SKEELS) mémoire de magister (2015) 157p.
83. Murashige. T. et Skoog. F., "A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures", *physiol. Plant* V.15, (1962), 473-497.
84. Gamborg, O.L., Miller, R.A. et Ojima, K., « Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells ». *Exp Cell Res* V. 50, n°1; (1968), 151-158.
85. McCown B.H. & Lloyd G.. Woody Plant Medium (WPM), a mineral nutrient formulation for microculture for woody plant species *.Hortic Sci.* (1981)16-453.
86. Bouterin, D. et Bron, G., "Multiplication des plantes horticoles" 3^{ème} Editions Tec & Doc Lavoisier Paris, (2013), 276p.

87. Strosse, H., Domergue, R., Panis, B., Escalant J-V. et Côte, F., "Suspensions cellulaires embryogènes de bananiers et bananiers plantain", guides techniques International Plant Genetic Resources Institute (INIBAP), France, (2003), 31p.
88. Lafon, J-P., Tharaud-Prayer, C. et Lévy, G., "Biologie des plantes cultivées": physiologie du développement génétique et amélioration Tome2, 2^{ème} Edition, Lavoisier. Technique & Documentation Paris, (1998), 150p.
89. Augé, R., Beauchesne G., Boccon-Gibod J., Decourtye L., Digat B., Jalouzot R., Minier R., Morand J-Cl., Reynoird J.P., Strullu D.G., et Vidalie H., " La culture *in vitro* et ses applications horticoles ", 3^{ème} Edition, Tec et Doc, Paris, (1989), 225p.
90. Caussat R et Ledeurff Y ., La germination des semences .Ed.Bordars,Paris, (1975) 232p.
91. Côme D. Germination, dans Croissance et développement – Physiologie Végétale II, Mazliak P., Collection Méthodes, Herman, Paris, (1982). 129-225.
92. Boccon-Gibod, J., la culture *in vitro* et ses applications horticoles, La technique de la culture *in vitro* 3^{ème} Edition, Tec et Doc, Paris, (1989), 225p.
93. Miloudi, A. et Belkhodja, M., "Effet du pré- traitement à l'eau et la température sur la germination des graines d'arganier (*Argania Spinosa L.*)" ScienceLib Editions Mersenne, V.5, n°131102, (2013), 15p.
94. Khelifi, L., Morsli. A. et Khelifi-Salaoui, M., "Premiers résultats sur l'obtention *in vitro* de germination d'arganier (*Argania spinasa L. Skeels*)". Annales de ENSA El-harrach, V.17 ,n° 1 et 2, (1996), 120-126.

95. Renard H.A. Les techniques de la germination, critères pratiques et signification. critères chimiques, biochimiques, physiques, physiologiques et moléculaires. Laboratoire de l'Université d'Avignon, France, (1975). 24-35.
96. Thorpe, TA. Organogenesis *in vitro*: structural physiological and biochemical aspects. In Vasil IK. (ed) International review of cytology. Suppl. II, (1980). 71-111.
97. Rugini E. Olive (*Olea europaea* L.). In Bajaj YPS. (ed.). Biotechnology in agriculture and forestry. Vol 5. Trees I. Berlin: Springer-Verlag, (1986). 253-267.
98. Rugini E., Caricato G. Somatic embryogenesis and recovery from mature tissues of olive cultivars (*Olea europaea* L.) "Canino" and "Moraiolo". Plant Cell Rep. (1995). 14. 257-260.
99. Grigoriadou K., Vasilakakis M., Eleftheriou EP. In vitro propagation of the Greek olive cultivar Chondrolia Chalkidikis. Plant Cell, Tissue Org. Cult. 71 (1) (2002).p. 47-54
100. Brhadda N., Abousalim A., Walali LDM. Effets du milieu de culture et de la lumière sur l'embryogenèse somatique de l'olivier (*Olea europaea* L.) cv Picholine marocaine. Fruit 85 (3), (2003). 1-14.
101. Margara, J., " Bases de la multiplication végétative, Les méristèmes et l'organogenèse" INRA, Paris, (1989), 262p.
102. Sahoo Y, Chand P K, Micropropagation of *Vitex negundo* L., a woody aromatic medicinal shrub, through high-frequency axillary shoot proliferation. Plant Cell Reports. (1998).18:301-307.
103. Shyamkumar B, Anjaneyulu C, Giri CC. Multiple shoot induction from cotyledonary node explants of *Terminalia chebula*. Biologia Plantarum , (2003) 47:585-588.

104. Chlyah, H. et Demarly, Y., "Le progrès Génétique passe-t-il par Le Repérage et l'Inventaire des Gènes ? " actualité scientifique Edition JohnLibbey ; Paris (1993), 411p.
105. Lamoui, M, Sélection *in vitro* de gynotype de l'arganier (*Argania spinosa* L.) tolérants aux stress hydrique et salin et multiplication par microbouturage. Thèse de doctorat université cadi ayyad faculté des sciences semlalia– MARRAKECH N° d'ordre: 71 (2015).108p.
106. Haissig BE, Davis TD, Riemenschneider DE,. Researching the controls of adventitious rooting. *Physiologia Plantarum*. (1992) 84:310-317.
107. Bousselmame, F., Kenny, L. et Chlyah, H., "Optimisation des conditions de culture pour l'enracinement *in vitro* de l'arganier (*Argania spinosa* L.) ". *Biologie et pathologie végétales/plant biology and pathology* Éditions scientifiques et médicales Elsevier SAS. V.324, (2001), 995-1000.
108. Sané, D., Borgel, A., Chevallier, M-H., et Gassama-Diaa, Y-K., "Induction *in vitro* de l'enracinement de microboutures d'*Acacia tortilis subsp. raddiana* par traitement transitoire à l'auxine", INRA, EDP Sciences, Ann. For. Sci. V.58, (2001), 431-437.
109. Lewandowski, V.T., "Rooting and acclimatization of micropropagated *Vitis labrusca* « Delaware »", *HortScience* V.26, (1991) 586-589.
110. Sen, J., Islam, M.S., Roy, S.K. et Hadiuzzaman, S., "Micropropagation of juvenile and adult *Gmelina arborea*", *Plant Tissue Culture* 2 (1992) 89-95.
111. Ostrolucka, M.G. et Bezo, M., "Utilisation of meristem cultures in propagation of oak (*Quercus* sp.) ", *Genetica Polonica* V.35 (1994) 161-169.

112. Silveira, C.E. et Cottignies, A., "Period of harvest, sprouting ability of cuttings and *in vitro* plant regeneration in *Fraxinus excelsior*", *Can. J. Bot.* V.72, (1994), 261-267.
113. Roy S.K., Islam M.S., Sen J. et Hadiuzzaman S., "Effects of auxins, sucrose and agar concentrations on *in vitro* rooting of callus induced microshoots of jackfruit (*Artocarpus heterophyllus lam.*) ", *J. Bot.* V.21, (1992) 93-98.
114. Alaoui, A., Z. Charrouf, M. Soufiaoui, V. Carbone, A. Malorni, C. Pizza, and S. Piacente, Triterpenoid Saponins from the Shells of *Argania spinosa* Seeds. *J. Agric. Food Chem*, (2002). 50, 4600-4603.
115. Charrouf Z et Pioch D., Valorisation du fruit d'arganier Huile d'argan: qualité, diversification Projet UE / MEDA / ADS « Appui à l'amélioration de la situation de l'emploi de la femme rurale et gestion durable de l'arganeraie dans le sud-ouest du Maroc » (fév, 2009), 20-21.
116. Coujard, R., Poirier J., et Racadot J., "Précis d'histologie humaine", Editions, Masson, Paris, (1980), 756p.
117. Prat, R., "Expérimentation en biologie et physiologie végétales", Hermann, Quæ Editions. Paris, (2007), 302p.

ANNEXES

Annexe 1 : Composition chimique du milieu de germination

Tableau 1 : Composition minérale de l'eau N'Gaous

Composition mg/l	
Calcium	143
Magnésium	65,4
Sodium	63,4
Potassium	3,76
Sulfates	44,4
Fluor	1,20
Nitrates	2,07
Nitrites	0,00
Chlorures	75
pH	7,66
Résidus secs à 180°C	962

Annexe 2 : Préparation des solutions mères de milieu MS et Gamborg et WPM

- Préparation de la solution mère de macroéléments et microéléments de milieu MS

Elle consiste à :

- Verser 400 ml d'eau distillée dans une fiole jaugée de 1l;
 - Peser et dissoudre chacun des sels indiqués (A) et (B),
 - Compléter la solution à 1l avec l'eau distillée,
 - Transférer la solution dans un flacon, identifier le, puis ranger le au réfrigérateur.
- Préparation de la solution mère de Fe-EDTA (milieu MS)

Elle consiste à :

- Verser 400 ml d'eau distillée dans une fiole jaugée de 1l;
- Chauffer jusqu'à ébullition ;
- Couper la source de chaleur;
- Ajouter le Na₂ EDTA et mélanger jusqu'à dissolution ;
- Ajouter FeSO₄-7 H₂O;
- Compléter la solution à 1 l avec l'eau distillée ;

- Transférer la solution dans un flacon, identifier le, puis ranger le au réfrigérateur.

- Préparation de la solution mère des vitamines (milieu MS)

La préparation de la solution mère consiste à :

- Verser 40 ml d'eau distillée dans une fiole jaugée de 100 ml;
- Peser et dissoudre les vitamines indiquées (D);
- Compléter la solution à 100 ml avec l'eau distillée ;
- Transférer la solution dans un flacon, identifier le, puis ranger le au réfrigérateur.

Lors de la préparation des solutions mères, les différents éléments sont apportés dans l'ordre décroissant de leur concentration afin d'éviter tout risque de précipitation. Ensuite toutes les solutions mères sont étiquetées, puis conservées au froid (4°C) et à l'abri de la lumière.

- Préparation des solutions mères du milieu Gamborg

La composition minérale, ainsi que le volume à prélever, de milieu Gamborg est rapporté en-dessus.

Préparation des solutions mères (A, B, C, D, E, F et G) de milieu Gamborg

Elle consiste à :

- Verser 400 ml d'eau distillée dans une fiole jaugée de 1l;
- Peser et dissoudre chacun des sels indiqués (A) (B) (C) (D) (E) (F) (G) ;
- Compléter la solution à 1 l avec l'eau distillée ;
- Transférer la solution dans un flacon, identifier le, puis ranger le au réfrigérateur.

Préparation des solutions mères (A, B, C, D, E et F) de milieu WPM

Le milieu décrit ci-dessus a été réalisé plusieurs fois à partir de solutions mères. Ces solutions mères sont au nombre de 8. Il s'agit des solutions A, B, C, D, E, F, G et H

Ces solutions mères ont été préparées avec de l'eau ultra-pure et ont été conservées à faible température afin de retarder la prolifération bactérienne.

Annexe 3 : Dilution d'alcool**Tableau 2** : Tableau pour la dilution d'alcool (Table de Gay-Lussac)

		Concentration initiale													
		100	99	98	97	96	95	90	85	80	75	70	65	60	50
Concentration finale	95	6,5	5,15	3,83	2,53	1,25									
	90	13,25	11,83	10,43	9,07	7,73	6,41								
	85	20,54	19,05	17,58	16,15	14,73	13,33	6,56							
	80	28,59	27,01	25,47	23,95	22,45	20,95	13,79	6,83						
	75	37,58	35,9	34,28	32,67	31,08	29,52	21,89	14,48	7,2					
	70	47,75	45,98	44,25	42,54	40,85	39,18	31,05	23,14	15,35	7,64				
	65	59,37	57,49	55,63	53,81	52	50,22	41,53	33,03	24,66	16,37	8,15			
	60	72,82	70,80	68,8	65,85	64,92	63	53,65	44,48	35,44	26,47	17,58	8,76		
	55	88,6	86,42	84,28	82,16	80,06	77,99	67,87	57,9	48,07	38,32	28,63	19,02	9,47	
	50	107,44	105,08	102,75	100,44	98,15	95,89	84,71	73,90	63,04	52,43	41,73	31,25	20,47	
	45	130,26	127,67	125,11	122,57	120,06	117,57	105,34	93,30	81,38	69,54	57,78	46,09	34,46	11,41
	40	158,56	155,68	152,84	150,02	147,22	144,46	130,8	117,34	104,01	90,76	77,58	64,48	51,43	25,55
	35	194,63	191,39	188,19	185,01	181,85	178,71	163,28	148,01	132,88	117,82	102,84	87,93	73,08	43,59
	30	242,38	238,67	234,99	231,33	227,70	224,08	206,22	188,57	171,05	153,61	136,04	118,94	101,71	67,45
	25	308,9	304,52	300,18	295,86	291,56	287,28	266,12	245,15	224,3	203,61	182,83	162,21	141,65	100,73
20	408,5	403,13	397,79	392,47	387,17	381,9	355,8	329,84	304,01	278,26	252,58	226,98	201,43	150,55	
15	574,75	567,43	560,53	553,55	546,59	539,66	505,27	471	436,85	402,81	368,83	334,91	301,07	233,64	
10	907,09	896,73	886,4	876,1	865,15	855,15	804,5	753,65	702,89	652,21	601,6	551,06	500,50	399,85	

Les chiffres en noir indiquent la quantité d'eau en ml à ajouter à 100 ml d'alcool de concentration initiale x (en bleu) pour obtenir la concentration désirée.

Annexe 4 : composition chimique d'endocarpe d'arganier

La composition chimique de la coque s'est révélée riche en fibres ADF. L'extrait non azoté est assez important et renferme probablement plusieurs classes de métabolites secondaires comme les saponosides (**Tableau 3**). En effet, 4 saponosides ont été isolés par l'équipe de Charrouf, (2009), dont 2 (Arganines M et N) sont nouvelles (**Alaoui et., al 2002**) [114]. Les autres sont aussi présentes dans la pulpe du fruit (arganine K et Mi-saponine A). Ces saponosides ont la même aglycone que celle du tourteau et diffèrent uniquement par la partie osidique (**Figure 1**). Les éléments minéraux sont donnés au (**Tableau 4**) (**Charrouf et Pioch, 2009**) [115].

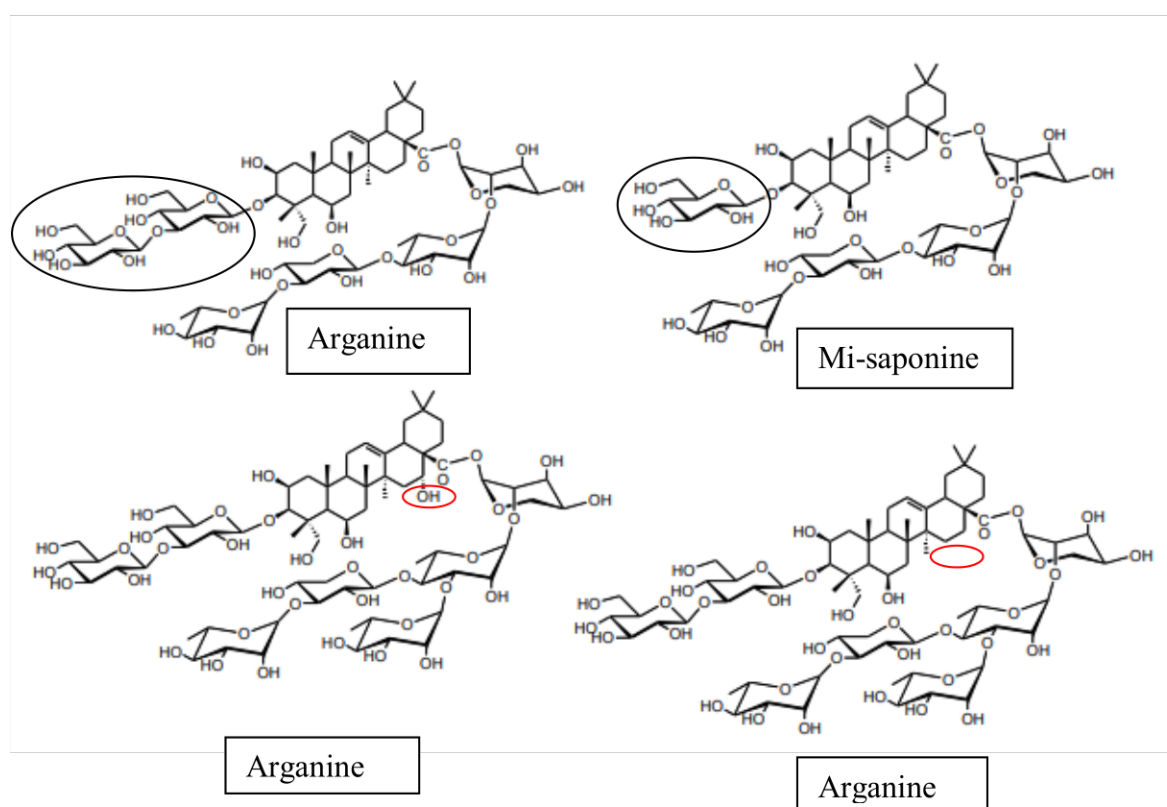
Tableau 3 : Composition de l'endocarpe de l'arganier (% pondéral/matière sèche)

Matière organique	Fibre ADF	Protéines brutes	Extrait éthéré	Extractif non azoté
99.1	73.6	3.3	2.7	19.5

ADF: Acid detergent fiber

Tableau 4 : Composition en éléments minéraux de l'endocarpe d'arganier

Ca	P	Na	K	Mg	Cu	Zn	Mn	Fe
g/kg	g/kg	g/kg	g/kg	g/kg	mg/kg	mg/kg	mg/kg	mg/kg
0.9	0	0.6	4.5	0.2	1.7	6.1	7.8	143.3

**Figure 1** : Arganine K, Mi-saponin A, Arganine M,t Arganine N [115].**Annexe 5** : Etude histologique

- **Préparation des coupes histologique de différent organe**

Selon **Coujard et al., 1980 [116]** les coupes histologiques sont des tranches d'organes ou de tissus que l'on assimile à des sections planes au moment de l'observation.

Nous avons suivi les trois étapes fondamentales et qui sont

- ✓ Fixation des organes
- ✓ Inclusion des organes dans la paraffine
- ✓ Coloration des coupes [79].

- **Fixation**

La fixation est l'étape la plus importante de la préparation histologique, sa réussite est prépondérante. Elle consiste à figer à un moment donné des cellules, tissus, organes ou fragments d'organes dans un état aussi proche que possible de l'état vivant [116].

Le but de la fixation histologique est d'immobiliser les structures cellulaires. Cette opération permet la confection des coupes.

Les fixateurs sont généralement des substances toxiques (un mélange acide-base). Ils possèdent un pouvoir pénétrant très élevé, et leur mode d'action est basé sur la coagulation ou la précipitation des protéines membranaires.

Nous avons utilisé le formol, alcool, acide acétique (FAA). Il est composé de :

- 8 volumes d'éthanol
- 1 volume de formol
- 1 volume d'acide acétique

Un passage sous vide pendant 1 heure est nécessaire pour assurer une pénétration rapide du fixateur dans les tissus et l'élimination de l'eau des cellules. Le temps de fixation est de 48 heures, le fixateur est remplacé par l'alcool 70°.

Inclusion des organes dans la paraffine

L'inclusion n'est pas seulement un enrobage. Il est souhaitable pour la confection des coupes que la pièce incluse possède la même consistance que l'ensemble du bloc, c'est-à-dire que le matériel d'inclusion infiltre totalement la pièce avant de se solidifier [116].

Le matériel ordinaire d'inclusion est la paraffine, mais la pièce fixée est presque toujours aqueuse et la paraffine n'est pas miscible à l'eau. Elle ne peut donc pas la remplacer directement. On doit procéder à la déshydratation en utilisant des bains successifs d'alcool de concentration croissante dans lesquels l'eau peut diffuser. De l'alcool absolu on passe aux bains de toluène ou de xylène. Ces bains sont nécessaires car la paraffine y est soluble, ce qui permet d'infiltrer totalement la pièce avant de couler le bloc qui la contiendra et durcira par simple refroidissement [116].

-Déshydratation

La déshydratation consiste à éliminer l'eau qui se trouve dans des tissus par des passages successifs des explants dans des bains d'éthanol à concentration croissante mais à des temps d'exploitation différents.

- ✦ Ethanol 95° pendant 1 heure.
- ✦ Ethanol 95° pendant 30 minutes.
- ✦ Ethanol 100° pendant 45 minutes.
- ✦ Ethanol 100° pendant 45 minutes.
- ✦ Ethanol 100° pendant 1 heure.

-Imprégnation

L'imprégnation par le toluène permet d'éliminer toute trace d'éthanol, et cela pour une meilleure pénétration de la paraffine dans les tissus. Cette étape se fait à chaud dans la paraffine dont le point de fusion se situe entre 54 °C et 56 °C pour le maintenir de la paraffine à l'état liquide.

Les étapes sont les suivantes :

- ✦ Toluène + alcool (1 volume+ 1 volume) pendant 30 minutes
- ✦ Toluène pur pendant 30 minutes
- ✦ Toluène pur pendant 30 minutes
- ✦ Toluène pur pendant 1 heure
- ✦ Toluène + paraffine (1 volume + 1volume) pendant 30 minutes
- ✦ Paraffine pendant 1 heure
- ✦ Paraffine pendant 1 heure
- ✦ Paraffine pendant une nuit.

Les quatre dernières étapes ont lieu dans l'étuve réglée à 56 °C.

-Inclusion à la paraffine

La paraffine est coulée à chaud dans des moules métalliques qui s'associent à des cassettes en plastique servant à maintenir les blocs de paraffine.

Nous y plongeons rapidement l'explant avec une pièce préalablement chauffée, tout en orientant l'explant dans le sens de la coupe désirée.

La polymérisation de la paraffine à température ambiante aboutit à l'obtention de blocs prêts à être coupés.

-Confection et étalement des coupes

Avant de passer à la confection des coupes, les blocs sont d'abord taillés à l'aide d'un scalpel jusqu'à l'apparition des organes.

La confection des coupes est réalisée à l'aide d'un microtome de type « LEICA ». Les coupes sont réalisées dans un laboratoire où la température ambiante se situe entre 20 et 25 °C. Elles présentent une épaisseur de 10 µm.

Une fois les coupes faites, les rubans sont placés sur des lames propres nettoyées dans bain d'alcool et séchées à l'aide du papier absorbant. L'étalement se fait avec de l'eau gélative filtrée (5 g de gélatine dans 100 ml d'eau distillée).

Les lames sont mises sur une plaque chauffante afin d'étaler les coupes évitant leur plissement. Elles sont ensuite égouttées et étiquetées.



Figure 2 : Confection des coupes et préparation des rubans

- Déparaffinage

Le déparaffinage sert à enlever la paraffine des tissus pour faciliter la pénétration des colorants. Pour ce fait, les étapes suivantes sont nécessaires :

- ✦ Toluène pur pendant 15 à 20 minutes sur la plaque chauffante
- ✦ Toluène pur pendant 10 minutes
- ✦ Toluène pur pendant 10 minutes
- ✦ Alcool absolu pendant 10 minutes
- ✦ Alcool absolu pendant 10 minutes
- ✦ Alcool absolu pendant 10 minutes

- ✦ Alcool absolu + formol (4 volume/1volume) pendant 5 minutes
- ✦ Rinçage à l'eau courante.

- Réhydratation

Comme les colorants sont en solution aqueuse, les coupes doivent d'abord subir une réhydratation. Celle-ci est effectuée après déparaffinage des coupes (par la chaleur et des bains de toluène) en immergeant les lames dans des bains d'alcool de degré décroissant puis dans l'eau distillée.

- Coloration

La coloration topographique permet, par leurs affinités différentielles, de colorer les tissus avec des couleurs différentes [117].

Il existe plusieurs, dont la double coloration qui est la plus courante et la plus utiliser.

Cette technique permet de distinguer les tissus dont la paroi est essentiellement pecto cellulosique (coloration rose à rouge) de ceux dont la paroi est imprégnée de lignine ou de substance proche (coloration verte) [117].

Nous avons utilisé le protocole développé au sein du laboratoire de biotechnologie végétale.

Les observations sont réalisées à l'aide d'un microscope photonique de type « LEICA ».

Annexe 6 : Moyenne de longueur des vitro-semis en fonction de traitement de désinfection.

Traitements de désinfection (moyenne) F(5.72)=1.51, p=0.19				
Traitements de désinfection	Hauteur moyenne des vitro-semis	Hauteur des vitro-semis Std.Err	Hauteur des vitro-semis -95.00%	Hauteur des vitro-semis +95.00%
T1	33.92	2.89	28.14	39.69
T2	31.76	2.89	25.99	37.54
T3	29.61	2.89	23.83	35.39
T4	29.07	2.89	23.30	34.85
T5	23.30	2.89	17.53	29.08
T6	30.00	2.89	24.22	35.77

Annexe 7 : Moyenne de folioles des vitro-semis en fonction de traitement de désinfection.

Traitements de désinfection (moyenne) F(5.72)=1.92, p=0.10				
Traitements de désinfection	Nombre moyen des feuilles	Nombre de feuilles Std.Err	Nombre de feuilles -95.00%	Nombre de feuilles +95.00%
T1	28.15	2.82	22.53	33.77
T2	21.92	2.82	16.30	27.54
T3	21.23	2.82	15.60	26.85
T4	27.30	2.82	21.68	32.93
T5	18.00	2.82	12.37	23.62
T6	25.07	2.82	19.45	30.69

Annexe 8 : Moyenne de hauteur microboutures en fonction milieu de débourrement (Provenance de Tindouf).

Milieus de culture (moyenne) F(12.53)=2.31, p=0.006				
Milieus	Hauteur moyenne des microboutures	Hauteur des microboutures Std.Err	Hauteur des microboutures -95.00%	Hauteur des microboutures +95.00%
M0	1.13	0.31	0.50	1.75
M1	1.74	0.18	1.37	2.10
M2	1.87	0.19	1.48	2.25
M3	1.86	0.20	1.46	2.25
M4	1.80	0.24	1.33	2.28
M5	1.59	0.22	1.15	2.02
M6	2.44	0.16	2.10	2.77
M7	2.23	0.20	1.82	2.65
M8	1.62	0.21	1.19	2.05
M9	1.85	0.29	1.27	2.43
M10	2.12	0.23	1.66	2.58
M11	2.11	0.21	1.69	2.52
M12	2.40	0.27	1.86	2.93

Annexe 9 : Moyenne de nombre de bourgeon des microboutures en fonction de milieu de débourement (Provenance de Tindouf).

Milieus de culture (moyenne) F(12.53)=4.46, p=0.000				
Milieus	moyenne de bourgeons néoformés	Bourgeons néoformés Std.Err	Bourgeons néoformés -95.00%	Bourgeons néoformés +95.00%
Mi0	1.65	0.70	0.26	3.03
Mi1	3.10	0.40	2.30	3.89
Mi2	4.41	0.43	3.56	5.26
Mi3	4.14	0.44	3.26	5.01
Mi4	2.94	0.53	1.88	3.99
Mi5	2.29	0.49	1.32	3.25
Mi6	5.32	0.37	4.59	6.05
Mi7	4.58	0.46	3.67	5.49
Mi8	3.02	0.48	2.07	3.97
Mi9	3.00	0.65	1.71	4.28
Mi10	3.89	0.51	2.87	4.90
Mi11	4.57	0.46	3.65	5.49
Mi12	4.11	0.60	2.92	5.29

Annexe 10 : Moyenne de nombre de feuilles des microboutures en fonction de milieu de débourement (Provenance de Tindouf).

Milieus de culture (moyenne) F(12.53)=4.93, p=0.000				
Milieus	moyenne de feuilles néoformées	Feuilles néoformées Std.Err	Feuilles néoformées -95.00%	Feuilles néoformées +95.00%
Mi0	3.35	1.05	1.28	5.41
Mi1	7.15	0.60	5.95	8.34
Mi2	9.37	0.64	8.10	10.64
Mi3	8.56	0.66	7.25	9.86
Mi4	9.38	0.80	7.79	10.96
Mi5	8.09	0.73	6.65	9.54
Mi6	10.92	0.55	9.83	12.02
Mi7	8.04	0.69	6.67	9.40
Mi8	8.66	0.72	7.23	10.09
Mi9	7.82	0.98	5.89	9.75
Mi10	10.40	0.77	8.88	11.92
Mi11	9.02	0.70	7.64	10.40
Mi12	7.48	0.90	5.70	9.26

Annexe 11 : Moyenne de hauteur caulinaire des microboutures en fonction de milieu d'élongation (Provenance de Tindouf).

Longueur caulinaire, alpha=0.05000	
Milieux	Moyenne de la longueur caulinaire(cm)
Ma0	1.87
Ma1	2.44
Ma2	3.29
Ma3	4.70

Annexe 12 : Moyenne de longueur des microboutures en fonction milieu de débourrement (Provenance de station de Baraki).

Milieux de culture (moyenne) F(11.47)=13.64, p=0.000				
Milieux	Longueur moyenne des microboutures	Longueur des microboutures Std.Err	Longueur des microboutures -95.00%	Longueur des microboutures +95.00%
Mi0	0.95	0.08	0.78	1.12
Mi1	1.00	0.07	0.86	1.15
Mi2	0.90	0.13	0.63	1.16
Mi3	1.41	0.16	1.08	1.74
Mi4	1.45	0.14	1.16	1.74
Mi5	1.16	0.10	0.95	1.37
Mi6	1.96	0.08	1.80	2.13
Mi7	0.75	0.13	0.50	1.01
Mi8	0.62	0.15	0.33	0.92
Mi9	0.64	0.17	0.30	0.98
Mi10	0.97	0.18	0.61	1.33
Mi11	1.27	0.18	0.91	1.63

Annexe 13 : Moyenne de nombre de bourgeon des microboutures en fonction de milieu de débourrement (Provenance de station de Baraki).

Milieux de culture (moyenne) F(11.47)=8.53, p=0.000				
Milieux	Moyenne des bourgeons néoformés	Bourgeons néoformés Std.Err	Bourgeons néoformés -95.00%	Bourgeons néoformés +95.00%
Mi0	4.17	0.55	3.08	5.26
Mi1	5.23	0.48	4.28	6.18
Mi2	2.74	0.85	1.05	4.42
Mi3	7.15	1.06	5.05	9.24
Mi4	4.65	0.93	2.81	6.49
Mi5	5.20	0.68	3.85	6.56
Mi6	8.49	0.52	7.46	9.52
Mi7	2.78	0.84	1.12	4.43
Mi8	1.70	0.97	-0.20	3.62
Mi9	2.05	1.15	-0.21	4.33
Mi10	2.012	1.19	-0.21	4.46
Mi11	2.25	1.19	-0.09	4.59

Annexe 14 : Moyenne de feuilles des microboutures en fonction milieu de débourrement (Provenance de station de Baraki).

Milieus de culture (moyenne) F(11.47)=8.20, p=0.000				
Milieus	Moyenne de feuilles néoformées	Feuilles néoformées Std.Err	Feuilles néoformées -95.00%	Feuilles néoformées +95.00%
Mi0	12.36	0.92	10.54	14.18
Mi1	14.32	0.80	12.74	15.91
Mi2	8.06	1.43	5.24	10.88
Mi3	10.45	1.78	6.94	13.95
Mi4	6.61	1.56	3.54	9.69
Mi5	9.47	1.15	7.21	11.74
Mi6	16.22	0.87	14.50	17.95
Mi7	8.84	1.41	6.07	11.61
Mi8	8.75	1.62	5.54	11.95
Mi9	4.35	1.93	0.54	8.15
Mi10	7.18	1.99	3.26	11.10
Mi11	7.31	1.99	3.39	11.23

Annexe 15 : Moyenne de hauteur caulinaire des microboutures en fonction de milieu d'élongation (Provenance de station de Baraki).

Longueur caulinaire, alpha=0.05000	
Milieus	Moyenne de la longueur caulinaire(cm)
Ma0	1.90
Ma1	2.50
Ma2	2.80
Ma3	5.00

Annexe 16 : Effets de l'écotype du végétal sur les paramètres morphologiques des microboutures.

Tableau 5 : Effet de l'écotype du végétal sur la hauteur des microboutures (1^{ère} subculture).

Variable	T-tests ; provenance du végétal Groupe 1 : Baraki Groupe 2 : Tindouf						
	Moyenne Baraki	Moyenne Tindouf	T-value	df	p	N Tindouf	N Baraki
Hauteur des microboutures	2.36	1.44	5.73	188	0.000	113	77

Tableau 6 : Effet de l'écotype du végétal sur la hauteur des microboutures
(2^{ème} subculture).

Variable	T-tests ; provenance du végétal Groupe 1 : Baraki Groupe 2 : Tindouf						
	Moyenne Baraki	Moyenne Tindouf	T-value	df	p	N Tindouf	N Baraki
Hauteur des microboutures	1.83	0.91	6.44	290	0.000	138	154

Tableau 7 : Effet de l'écotype du végétal sur la hauteur des microboutures
(3^{ème} subculture).

Variable	T-tests ; provenance du végétal Groupe 1 : Baraki Groupe 2 : Tindouf						
	Moyenne Baraki	Moyenne Tindouf	T-value	df	p	N Tindouf	N Baraki
Hauteur des microboutures	1.47	1.06	3.98	313	0.000	159	156

Tableau 8 : Effet de l'écotype du végétal sur la hauteur des microboutures
(4^{ème} subculture).

Variable	T-tests ; provenance du végétal Groupe 1 : Baraki Groupe 2 : Tindouf						
	Moyenne Baraki	Moyenne Tindouf	T-value	df	p	N Tindouf	N Baraki
Hauteur des microboutures	2.27	1.59	4.20	291	0.000	139	154

Tableau 9 : Effet de l'écotype du végétal sur le nombre moyen des bourgeons des microboutures (1^{ère} subculture).

Variable	T-tests ; provenance du végétal Groupe 1 : Baraki Groupe 2 : Tindouf						
	Moyenne Baraki	Moyenne Tindouf	T-value	df	p	N Tindouf	N Baraki
Nombre de bourgeons	3.67	3.00	2.03	182	0.04	113	71

Tableau 10 : Effet de l'écotype du végétal sur le nombre moyen des bourgeons des microboutures (2^{ème} subculture).

Variable	T-tests ; provenance du végétal Groupe 1 : Baraki Groupe 2 : Tindouf						
	Moyenne Baraki	Moyenne Tindouf	T-value	df	p	N Tindouf	N Baraki
Nombre de bourgeons	4.31	3.29	2.38	290	0.01	138	154

Tableau 11 : Effet de l'écotype du végétal sur le nombre moyen des bourgeons des microboutures (3^{ème} subculture).

Variable	T-tests ; provenance du végétal Groupe 1 : Baraki Groupe 2 : Tindouf						
	Moyenne Baraki	Moyenne Tindouf	T-value	df	p	N Tindouf	N Baraki
Nombre de bourgeons	4.05	2.94	4.00	313	0.000	159	156

Tableau 12 : Effet de l'écotype du végétal sur le nombre moyen des bourgeons des microboutures (4^{ème} subculture).

Variable	T-tests ; provenance du végétal Groupe 1 : Baraki Groupe 2 : Tindouf						
	Moyenne Baraki	Moyenne Tindouf	T-value	df	p	N Tindouf	N Baraki
Nombre de bourgeons	4.76	2.89	5.18	293	0.000	139	156

Tableau 13 : Effet de l'écotype du végétal sur le nombre moyen des folioles des microboutures (1^{ère} subculture).

Variable	T-tests ; provenance du végétal Groupe 1 : Baraki Groupe 2 : Tindouf						
	Moyenne Baraki	Moyenne Tindouf	T-value	df	p	N Tindouf	N Baraki
Nombre de feuilles	9.77	6.66	3.44	182	0.000	113	71

Tableau 14 : Effet de l'écotype du végétal sur le nombre moyen des folioles des microboutures (2^{ème} subculture).

Variable	T-tests ; provenance du végétal							
	Groupe 1 : Baraki		Groupe 2 : Tindouf		T-value	df	p	N Tindouf
	Moyenne Baraki	Moyenne Tindouf						
Nombre de feuilles	12.57	9.15	4.41	290	0.000	138	154	

Tableau 15 : Effet de l'écotype du végétal sur le nombre moyen des folioles des microboutures (3^{ème} subculture).

Variable	T-tests ; provenance du végétal							
	Groupe 1 : Baraki		Groupe 2 : Tindouf		T-value	df	p	N Tindouf
	Moyenne Baraki	Moyenne Tindouf						
Nombre de feuilles	14.07	11.67	2.83	313	0.004	156	159	

Tableau 16 : Effet de l'écotype du végétal sur le nombre moyen des folioles des microboutures (4^{ème} subculture).

Variable	T-tests ; provenance du végétal							
	Groupe 1 : Baraki		Groupe 2 : Tindouf		T-value	df	p	N Tindouf
	Moyenne Baraki	Moyenne Tindouf						
Nombre de feuilles	16.81	14.43	3.96	291	0.000	154	139	