

République Algérienne Démocratique et Populaire

Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique

Université SAAD DAHLAB Blida



Faculté des Sciences de la nature et de la vie

Département de Biologie des Populations et des Organismes

Mémoire de fin d'étude en vue de l'obtention du

Diplôme Master en biologie

Option : Génomique et Biotechnologie Végétale

### Thème

Contribution à la régénération de deux variétés autochtones (Amellale et Ahchichen) de la vigne *vitisvinifera* L par embryogenèse somatique

**Présenté par :**

**AISSANI Amira** Date de soutenance : 20 Septembre 2016

**KHETTOU Oardia**

**Devant le jury :**

M<sup>me</sup> CHABATTA.N      PRESIDANTE MAJUSTERUB1

M<sup>me</sup> AMEDJKOUH.HEXAMINATRICE      MAJUSTERUB1

M<sup>me</sup> ZERKAOUI. A      PROMOTRICE      MAJUSTER UB1

M<sup>me</sup> HADDADE. N      CO-PROMOTRICE      MAJUSTER      ITAFv

**Promotion : 2015-2016**

# Remerciements

*Je tiens remercier tout d'abord le dieu tout puissant de nous avoir donné le courage, la force et la patience pour réaliser ce travail.*

*Par la suite j'exprime mes profondes gratitudee à Mme ZERKAOUI.A, notre promotrice qui a bien voulu diriger notre travail, merci pour votre confiance.*

*Co-promotrice Mme HADDAD.N chef de service (La culture in vitro), pour ses orientations, sa gentillesse et ses conseils.*

*Je remercie le directeur d'ITAFV et Mme GHAZLI chef de département de production et Mme RADJI, à Mme BRANECI et Mme AMEUR, ainsi que tous les agents de l'ITAFv.*

*Je remercie aussi l'ensemble du jury :*

*A Mm CHABATA pour nous avoir fait l'honneur de présider ce jury.*

*A M<sup>me</sup> AMEDJKOUH.H d'avoir si aimablement accepté d'examiner ce travail.*

*Enfin, un grand merci à toute personne ayant participé de près ou de loin à la réalisation de ce modeste travail.*

## *Dédicaces*

*A ceux qui m'ont tout donné sans rien en retour*

*A ceux qui m'ont encouragé et soutenu dans mes moments les plus difficiles*

*Et à ceux à qui je dois tant*

*A mon mari ISMAIL : qui a toujours été à mes coté, qui n'a jamais cessé de*

*M'encourager et m'aider dans mes études,*

*A mes parents : FATIHA et MOHAMED pour leur amour et leur support continu,*

*Votre affection sans limites, m'a accompagnée tout le long de la réalisation  
de cette œuvre, je ne pourrai jamais vous en remercier assez.*

*A mes chères frères : WAHID, FARID, SELIMENNE , pour le soutien moral ,*

*A toute la famille AISSANI et GROUCI sans exception*

*A mon amie Ouardia avant d'être mon binôme, pour les moments que nous avons  
partagé durant la réalisation de ce travail.*

*Atoute mes amies : NADIA, NARIMEN, HANANE,  
HALIMA, WAHIDA, AMIRA, NOURELHOUDA, SOUMAIA, F. EL ZOUHRAA, SARA.*

AMIRA

# Liste des tableaux

---

**Tableau 1 :** les différentes compositions des milieux de culture MS et CP..... 26

**Tableau 2:** Résultats de la désinfection des explants à l'hypochlorite de sodium 7% sur le milieu MS..... 30

**Tableau 3:** Résultats de la désinfection des explants à l'hypochlorite de sodium 7% sur le milieu CAP..... 31

**Tableau 4 :**Résultats de calogénèse chez les deux variétés Amellale et Ahchichen..... 33-34

**Annexe :**

**Tableau 5 :**(Annexe II) Micro-élément du milieu MS selon MURASHIG et SKOOG ,1962.

**Tableau 6 :**(Annexe II) Macro-élément du milieu MS selon MURASHIG et SKOOG ,1962.

**Tableau 7 :**(Annexe II) Micro-élément du milieu CAP selon CHEE et POOL.

**Tableau 8 :**(Annexe II) Macro-élément du milieu CAP selon CHEE et POOL.

# Liste des figures

<b>Figure 1</b> : Classification de la vigne .....	3
<b>Figure 2</b> : La vigne, présentation des différents organes.....	4
<b>Figure 3</b> : Top 10 des vignobles en 2014 (en milliers d’hectares).....	6
<b>Figure 4</b> : Stades phénologiques de la vigne d’après Meier (2001).....	7-8
<b>Figure 5</b> : Aperçu de la diversité des cépages dans la collection internationale du Domaine de Vassal.....	10
<b>Figure 06</b> : Différentes méthodes de multiplication végétative pour la vigne. A) Marcottage, B) Greffage, C) Culture <i>in vitro</i> .....	12
<b>Figure 07</b> : Schéma explicatif de la micro-propagation <i>in vitro</i> .....	17
<b>Figure 08</b> : La Chambre de culture et les conditions de lumière.....	18
<b>Figure 09</b> : Laboratoire central de l’Institut Technique de l’Arboriculture Fruitière et de la Vigne à Tessala El Merdja – Alger.....	23
<b>Figure 10</b> : Matériel végétal original.....	24
<b>Figure 11</b> : Image originelle de variété Amellale.....	25
<b>Figure 12</b> : Image originelle de variété Ahchichen.....	25
<b>Figure 13</b> : Appareil de stérilisation des milieux de culture.....	28
<b>Figure 14</b> : La mise en culture des explants dans les boîtes de pétri.....	29
<b>Figure 15</b> : Les boîtes de pétri placés dans la chambre de culture.....	29
<b>Figure 16</b> : les explants (demi-fleur) de la variété Amellale (1) après une semaine, (2) cals produits après 8 semaines.....	35
<b>Figure 17</b> : L’aptitude à la callogenèse chez la variété Amellale dans les deux milieux de culture MS et CP.....	36
<b>Figure 18</b> : L’aptitude à la callogenèse chez la variété Ahchichen dans les deux milieux de culture MS et CP.....	37
<b>Figure 19</b> : Aspect des cals produits par la variété Amellale après deux mois de culture.....	38
<b>Figure 20</b> : Les taux de callogenèse obtenus chez les deux variétés étudiés dans les deux milieux de culture MS et CP.....	39

# Liste des abréviations

---

**2,4 D** : acide 2,4 dichloro-phénoxy-acétique.

**CaCl<sub>2</sub>**: chlorure de calcium.

**NaOH** : hydroxyde de sodium.

**HCl** : acide chlorhydrique.

**ITAFv** : institut technique de l'arboriculture fruitière et de la vigne.

**FAO** : Food and Agriculture Organisation.

**MS**: Murashige et SKoog.

**CP**: Chee and pool.

**NOA** :Acide naphto-oxy-acétique.

**TC** : Taux de contamination.

**TD** : Taux de dessèchement.

**TR** : Taux de reprises.

# Sommaire

---

INTRODUCTION.....	01
<b>Partie bibliographique</b>	
<b>Chapitre I</b>	
I-1 : Présentation de la vigne.....	03
I-1-1-Définitions de la vigne.....	03
I-1-2-Systématique.....	03
I-2-Eléments de morphologie et d'anatomie de la vigne adulte.....	04
I-3-Viticulture mondiale.....	06
I-4- Cycles de développement (Cycle végétatif et reproducteur).....	07
I-5- Influence des conditions environnementales.....	09
I-6-Les pratiques culturales.....	09
I-7- Notion de variétés, cépages, clones, cultivars.....	09
I-8-Encépagement algérien.....	10
<b>Chapitre II : la multiplication et la génétique de la vigne.</b>	
II-1-Multiplications.....	12
II-2-Application de la biologie moléculaire sur la vigne.....	14
II-3-Conservation des ressources génétiques du genre <i>vitis</i> .....	14
<b>Chapitre III : la culture in vitro.</b>	
III-1-Historique de la culture in vitro.....	15
III-2-Principes de la culture in vitro.....	15
III-3-Les techniques de culture in vitro.....	16
III-4-Conditions de réussite la culture in vitro.....	18
III-5-Applications de culture in vitro.....	20
III-6-Intérêt de culture in vitro.....	20
III-7-Avantages de la culture in vitro.....	21
III-8-Néanmoins , un certain nombre de problèmes se posent.....	21
<b>Partie expérimental</b>	
<b>Chapitre I : Matériels et méthode.</b>	
I-1-Lieu de l'expérimentation.....	23

# Sommaire

---

I-2-matériel végétale.....	24
I-3- méthode.....	24
<b>Chapitre II : Résultats et discussion :</b>	
II-1-Méthode de désinfection.....	30
II-2-Aptitude à la calogenèse chez les deux variétés AMELLAL et AHCHICHEN dans les différents milieux (MS ;CAP).....	34
II-3-Comparaison entre l'aptitude à la callogenèse chez deux variétés étudiées.....	39
Conclusion.....	41
Références bibliographiques.	
Annexe.	



## Glossaire :

Selon encyclopédie,( 2015):

**Autochtone** : variété locale.

**Aoutement** : les rameaux vert de la vigne devient brun, de souple il devient dur et cassant.

**Cal** : Amas des cellules végétales indifférenciées. Structure de prolifération cellulaire obtenue notamment en culture in vitro par l'ajout d'hormones végétales, il peut être localisé au niveau des blessures ou s'étendre à des régions indemnes, sa croissance peut être indéfinie au cours des repiquages. Il peut être homogène ou hétérogène.

**Callogenèse** : néoformation d'un cal.

**Clones** : plantes produits de façon asexuée à partir d'un plant.

**Le débourrement** : Sorti des rameaux provenant des bourgeons latents. La date de débourrement varie suivant : la température, la taille plus on taille tard plus en retard le débourrement)

**Explant** : fragment d'organisme (apex, organe...etc.) excisé et éventuellement mis en culture in vitro .

**Génome** : constitué les introns et les exons, les partis codants et les partis non codants.

**Multiplication végétative** : synonyme de reproduction asexuée. elle aboutit à la constitution des clones homogènes.

**Organogénèse** : formation et développement des différents organes.

**Pleurs** : c'est un écoulement de sève suite à la reprise de l'activité de la vigne. Réchauffement du sol en Février donc absorption de l'eau et des sels minéraux par les racines. Ils permettent de rincer les tissus conducteurs (dure quelques jours).

**Protoplaste** : une cellule dépourvue de sa paroi cellulaire mais entourée d'une membrane.

**Repos végétatif** : c'est une période où la vigne se repose. La **dormance** (du bourgeon latent) est un arrêt d'activité du 15/8 au 15/4. Toutefois cette dormance passe 6 étapes successives dont une qui s'appelle la **dormance vraie**. C'est la totale cession d'activité du bourgeon qui se déroule du 15/08 jusqu'au grand froid (fin nov.).

# Glossaire

---

**Somaclonale** : la variation somaclonale est la modification observé chez certaines cellules, laprès un long cycle de culture in vitro sans régénération, elles ne sont plus alors identique à la plant mère.

**Totipotence** : La capacité d'une cellule à se différencier en n'importe quel type de cellule et former ainsi un nouvel organisme ou régénérer une partie d'un organisme; par exemple, un ovocyte fécondé, ou d'une petite partie excisée d'un planaires, qui est capable de régénérer un nouvel organisme complet.

## *Dédicaces*

*Je dédie ce modeste travail à :*

*A mes très chers parents Mahfoud et Salima Pour tout l'amour qu'ils me portent et pour leurs encouragements et leurs grands sacrifices. Aucune dédicace ne pourrait exprimer mon respect, ma considération et mes profonds sentiments envers eux. Je leur dédie ce travail en témoignage d'un grand amour et reconnaissance infinie, Que Dieu vous protège.*

*A mes très chers frères Djamel aldine, Ahmed, Zouhir et Houssine, pour le soutien moral et encouragement qu'ils n'ont cessé de me prodiguer.*

*A toutes les personnes qui me sont chères surtout :*

*Fatma/Z, Houria, Karima, Fatima, Zohra et Halima.*

*Spécial dédicace à mon binôme Amira.*

*A toute la famille KHETTOU sans exception.*

*A toute mes amies : Djidjiga, Sabrina, Salma, Hiba, Fateh, Ayoub , Habib,*

*A tous ceux qui me connaissent.*

### Résumé :

L'embryogenèse somatique à partir de la culture des fleurs immatures des 3 explants (étamines, demi fleurs ,ovaires) de la vigne *in vitro* permis de régénérer des plants de la vigne sains et génétiquement identique à la plante mère.

L'objectif de ce travail est l'application de cette technique sur deux variétés autochtones de la vigne *Vitis Vinifera L.*

Le passage rapide des explants dans une solution d'alcool 70° et le trempage de ces derniers dans l'hypochlorite de sodium à 7% pendant 4 à 10 min, c'est savéré comme une meilleure méthode de désinfection, avec un taux de contamination très faible .

4 à 8 semaines après la culture initiale, certains explants des deux variétés de la vigne ont exprimés une bonne aptitude à la callogenèse dans les milieux de culture traités avec différent Dose d'hormones l'NOA ,BAP et TDZ à savoir la variété Ahchichen (2.5% MS<sub>2</sub>-14.06%MS<sub>3</sub>) et la variété Amellal (0.16% -61.53%) dans le milieu MSI<sub>3</sub> .

L'intérêt essentiel des recherches sur l'embryon somatique a été de montrer que la capacité de reproduire un nouvel individu est une aptitude fondamentale de la cellule végétale (totipotence cellulaire)

Mots clés : embryogenèse somatique, *Vitis Vinifera L.*, régénération, variété, autochtone, Hormone.

## Abstract:

Somatic embryogenesis from immature flower cultivation of explants 3 (stamens, half flowers, ovaries) of vines in vitro allowed to regenerate plants of the vine healthy and genetically identical to the parent plant.

The objective of this work is the application of this technique on two indigenous varieties of *Vitis vinifera* L. vineyard.

The rapid change of the explants in a solution of alcohol 70 ° and the dipping them in sodium hypochlorite at 7% for 4 to 10 min, is Saveré as a best method of disinfection, with a contamination rate very weak.

4 to 8 weeks after the initial culture, some explants of the two varieties of vines have expressed a good aptitude the callus in the treated culture media with different hormone dose of the NOA, BAP and TDZ namely Ahchichen variety ( 2.5% MS2-14.06% MS3) and the variety Amellal (0.16% -61.53%) in the middle MS13.

The main interest of research on somatic embryo was to show that the ability to reproduce a new individual is a fundamental ability of the plant cell (cell totipotency)

Keywords: somatic embryogenesis, *Vitis Vinifera* L, regeneration, variety, native, Hormone.

## الملخص

التخلق الجسماني انطلاقا من زراعة زهرة الكرمة في المختبر يسمح لتجديد نباتات الكرمة صحية ومتطابقة وراثيا للنباتة الأم

الهدف من هذا العمل هو تطبيق هذه التقنية على اثنين من التراكيب المحلية لكرمة العنب

*vitis vinifer*

التمرير لبضع ثواني للاطراف في محلول الكحول 70 درجة وغطسها في هيبوكلوريت الصوديوم إلى 7٪ لمدة 4 إلى 10 دقيقة، كما هو تبين أفضل طريقة التطهير مع معدل العدوة منخفض جدا .

بعد 4-8 أسابيع من الزراعة الأولية، اظهرت بعض explants لنوعين من الكروم قدرة جيدة على تكوين انسجة لينة في الوسط الزراعي المعالج بالهرمونات TDZ, BAP , NOA (MS<sub>2</sub>2.5% -14,06MS<sub>3</sub>) للنوع Ahchichen في وAmellale (0.16-61.53) في MSI3.

وكان الاهتمام الرئيسي للبحث على الاجنة الجسمانية لإظهار أن القدرة على إعادة إنتاج الفرد الجديد هو القدرة الأساسية للخلية النباتية

## الكلمات المفتاحية

تكوين انسجة جسمانية , *Vitis Vinifera L* , تجديد الهرمونات -المحلي .

# Introduction

# Introduction

---

La vigne *Vitis Vinifera L.* présente un intérêt majeur pour les pays du climat tempéré, notamment ceux du bassin méditerranéen. L'importance de la vigne en Algérie est principalement liée à son adaptabilité vis-à-vis de la diversité pédoclimatique et topographique du pays (Anonyme , 2003).

Avant l'indépendance, l'Algérie était le 4<sup>ème</sup> pays viticole du monde par sa production et l'étendue du vignoble et le 1<sup>er</sup> pays exportateur du monde (AOUANE ,2005).

Dernières années, le pays vit une crise écologique sévère, due à la déforestation, dégradation des ressources en eau, pollution et l'appauvrissement de la diversité biologique (RAHMANI, 2001).

Le vignoble actuel occupe une superficie appréciable de l'ordre de 77461 ha dont 49338 ha pour le vignoble de table et 28049 ha pour le vignoble de cuve avec une production de l'ordre 3500000 quintaux des raisins de table et 525000 quintaux de raisin de cuve il est caractérisé surtout par une relance progressive des plantations très insuffisantes, la production et les rendements enregistrés sont relativement .bas ; la consommation par habitant reste moyenne à faible, et le marché interne des raisin de table ne connaît pas de véritable organisation et l'absence quasi-totale de la production de raisin sec avec une totale dépendance de l'importation.( ITAFv;2014)

Les ressources en viticulture sont malheureusement dégradées (FAO,2004). L'état phytosanitaire des vignobles algériens menace l'existence des cépages autochtones. Cela est dû à de multiples facteurs, entre autres le mode de multiplication par voie végétative qui favorise la propagation des maladies et l'introduction du matériel végétal étranger ayant une qualité variétale et sanitaire non contrôlé.



# Introduction

---

Afin de préserver les cépages autochtones algériens, les recours à la culture in vitro (micro bouturage, micro greffage d'apex, culture de méristème), est une bonne alternative pour remédier à ces problèmes (FOURNIOUX, HELOIR ; 1999).

L'objectif de notre travail est de régénérer deux variétés autochtones de la vigne *Vitis Vinifera L* var Amellale et Ahchichen, par la technique de l'embryogénèse somatique en utilisant 3 explants (ovaire, étamine, demis fleur).

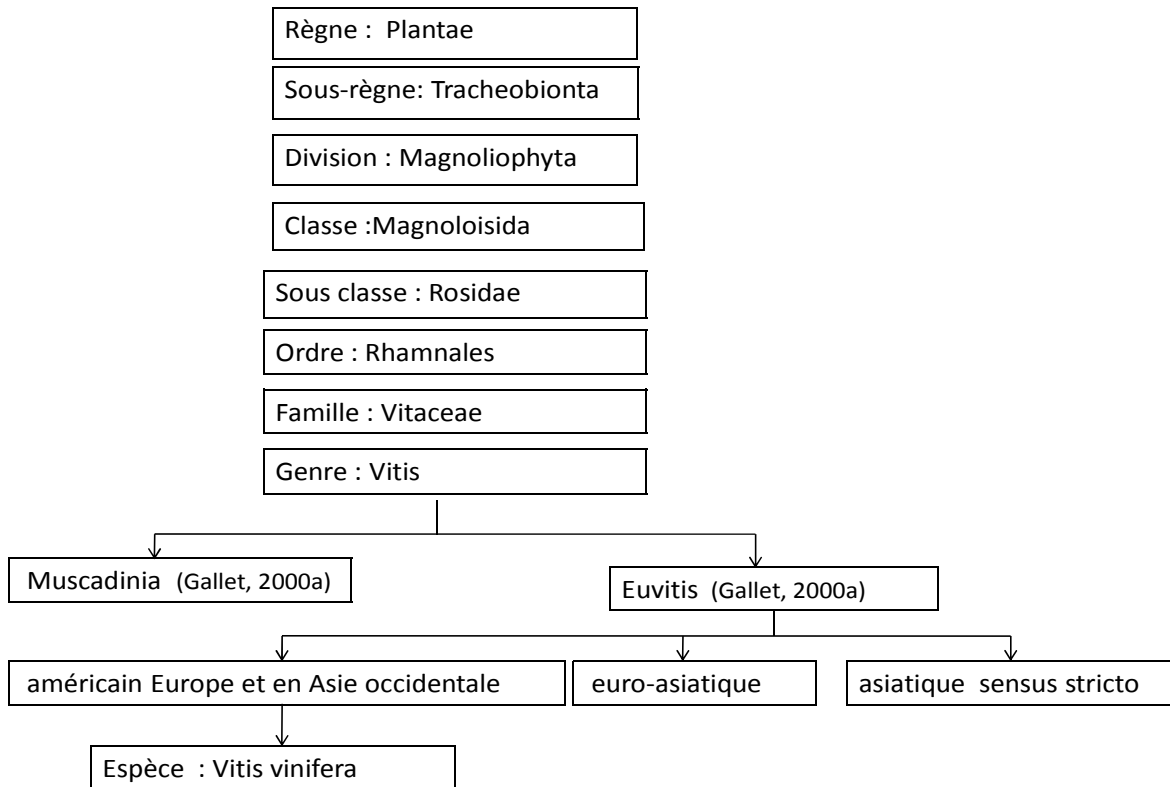
# Partie Bibliographique

## 1-Présentation de la vigne :

### 1-1- Définitions de la vigne :

La vigne est une plante qui se développe de manière anarchique, elle est capable de vivre plusieurs siècles, voire plusieurs milliers d'années (vigne de Pausonias, en Grèce).

### 1-2 - Systématique :



**Figure 01** : Classification de la vigne (Gallet, 2000a).

## 2 - Eléments de morphologie et d'anatomie de la vigne adulte :

Avant d'aborder la physiologie de la vigne, il est indispensable d'avoir quelques notions de la morphologie et de l'anatomie de cette plante (figure02).



**Figure 02:** La vigne, présentation des différents organes (Huglin et Schneider, 1998 ).

### 2-1- Morphologie de la vigne :

D'après (Huglin et Schneider, 1998 ; Galet, 2000).

#### 2-1-1- Racines :

Les racines d'une souche de vigne sont des racines adventives. Elles ont pour fonctions principales de puiser dans le sol l'eau et les matières minérales nécessaires à la vigne, mais également de produire des hormones de croissance (gibbérélines et Cytokinine).

#### 2-1-2- Tronc :

Le tronc sert au transport de la sève brute et de la sève élaborée par l'intermédiaire des vaisseaux du bois et du liber. Il joue également un rôle de réservoir pour les substances de réserve qui s'accumulent dans les cellules du bois.

#### 2-1-3- Rameaux :

Chaque rameau est composé d'une succession de nœuds (parties renflées) et de mérithalles (ou entre-nœuds). La longueur des mérithalles, varie en fonction des espèces. Le rameau reste herbacé devient ligneux eu mois d'août puis s'aoûte.

#### 2-1-4-Feuille :

Le limbe comprend 5 nervures principales qui partent du point pétiolaire ; elles se ramifient en nervures secondaires. La villosité du limbe, la forme et la profondeur des dents,

ainsi que la couleur interviennent également dans la description qui permet de classer les cépages.

### **2-1-5- Bourgeons :**

#### **2-1-5-1 : Types de bourgeons :**

On distingue plusieurs types de bourgeons :

Le prompt-bourgeon, bourgeon latent, bourgeons du vieux bois et bourgeon terminal

### **2-1-6- Inflorescence et fleur :**

#### **2-1-6-1- Inflorescence :**

La forme générale de l'inflorescence varie avec l'espèce et le cépage. Le nombre d'inflorescence portée par un rameau est très variable.

#### **2-1-6-2-Fleurs :**

Les fleurs sont très petites variant de 2 à 7 mm, La fleur hermaphrodite est composée de cinq pièces : Le calice, La corolle, L'androcée, Le disque, Le gynécée.

### **2-1-7-Grappes et baies :**

#### **2-1-7-1- Grappes :**

Les grappes peuvent varier de 6 à 24 cm de longueur, et de 100 g à 500 g pour la plupart des cépages. Chez certains cépages (Muscat d'Alexandrie, Aramon, Carignan), les grappes peuvent peser jusqu'à 1 kg.

#### **2-1-7-2-Les baies :**

Les baies résultent du développement des tissus de l'ovaire, après la fécondation. Ils sont constitués d'une pellicule entourant la pulpe, des faisceaux vasculaires et des pépins.

### **2-1-8-Vrille :**

Une vrille se compose de trois parties : le pédoncule basilaire, la branche majeure et la branche mineure. Les vrilles, d'abord herbacées, deviennent ligneuses à l'automne.

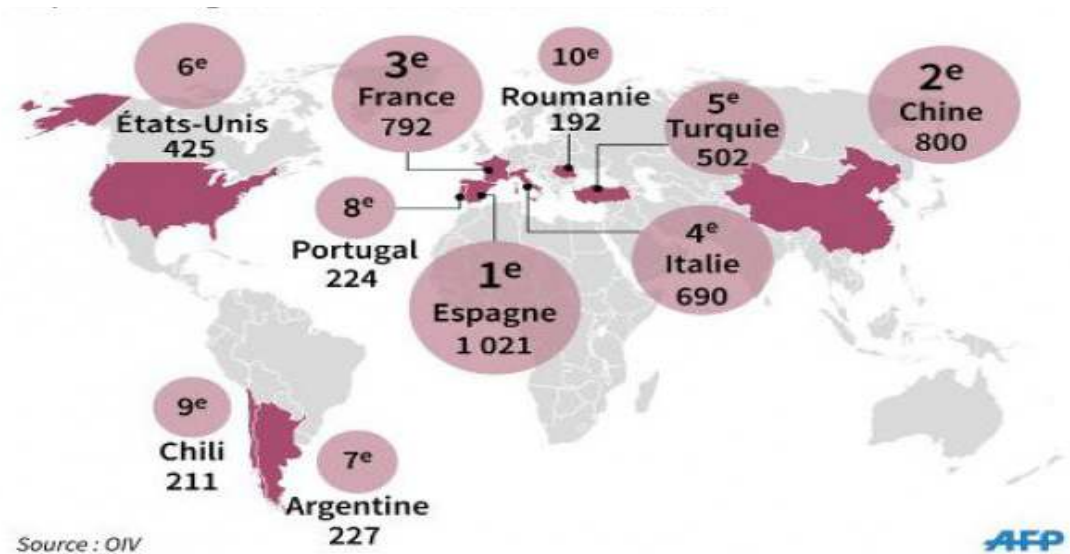
### **2-1-9- Graine**

La graine ou pépin résulte du développement de l'ovule fécondé (Bugnon et Bessis, 1968). Le pépin comprend trois parties : l'embryon qui se développera en plantule, l'albumen qui

contient des réserves pour la survie de l'embryon et son développement, et le tégument qui protège l'embryon et son albumen.

### 3-Viticulture mondiale :

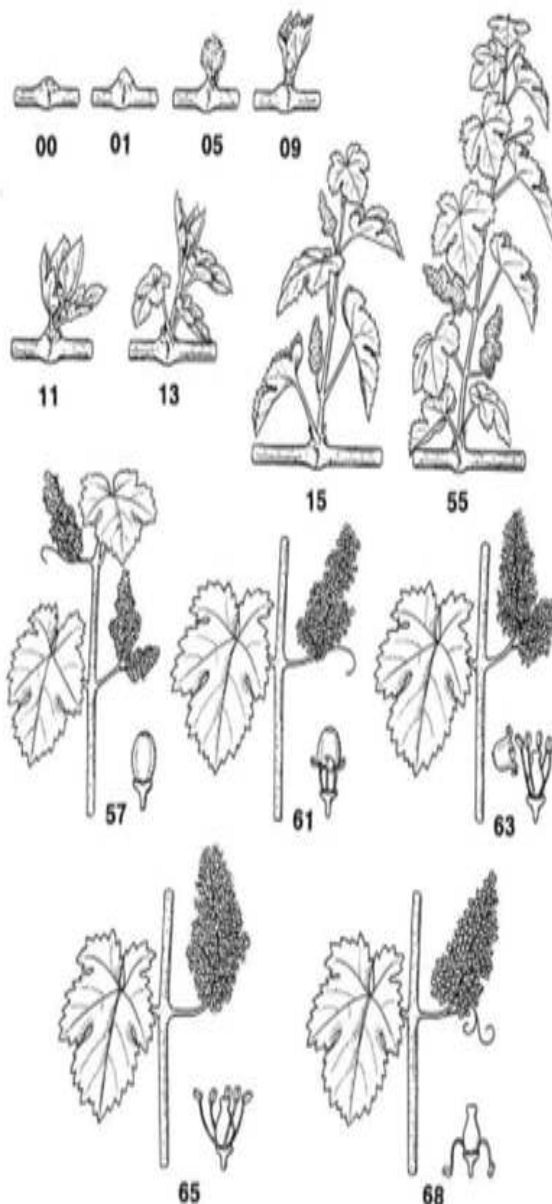
Le vignoble mondial atteint 7.9 millions d'ha en 2001. A signaler que durant ces dernières années il y a eu une progression des vignobles européens (DUTRUC-ROSSET : 2001)(figure03).



**Figure 03** : Top 10 des vignobles en 2014 (en milliers d'hectares).

### 4- Cycles de développement (Cycle végétatif et reproducteur):

Suite au repos hivernal, le développement de la vigne va correspondre à la Super position du cycle végétatif et du cycle reproducteur (Figure 04).



## Stade principal 0 : bourgeonnement ou débourrement

- 00 Dormance : les bourgeons d'hiver sont pointus à arrondis, suivant la variété ils sont brun clair à foncé et les écailles sont plus ou moins appliquées aux bourgeons
- 01 Début du gonflement des bourgeons : les bourgeons s'allongent à l'intérieur des écailles
- 03 Fin du gonflement des bourgeons, les bourgeons ne sont pas encore verts
- 05 « Stade de la bourre » : une protection cotonneuse est nettement visible
- 07 Début de l'éclatement des bourgeons (débourrement) : l'extrémité verte de la jeune pousse est juste visible
- 09 Débourrement : l'extrémité verte de la jeune pousse est nettement visible

## Stade principal 1 : développement des feuilles

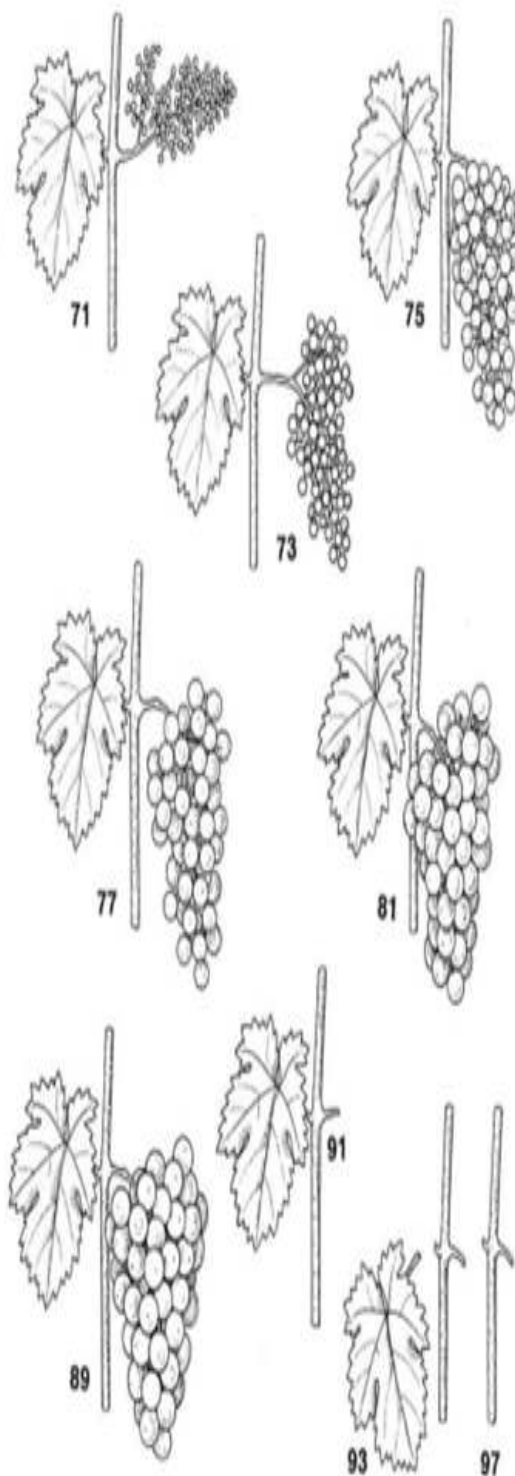
- 11 Première feuille étalée et écartée de la pousse
- 12 2 feuilles étalées
- 13 3 feuilles étalées
- 1. Et ainsi de suite...
- 19 9 ou davantage de feuilles sont étalées

## Stade principal 5 : apparition des inflorescences

- 53 Les grappes (inflorescences) sont nettement visibles
- 55 Les grappes augmentent de taille, les boutons floraux sont agglomérés
- 57 Les grappes sont bien développées, les fleurs se séparent

## Stade principal 6 : la floraison

- 60 Les premiers capuchons floraux se séparent du réceptacle
- 61 Début de la floraison : 10% des capuchons floraux sont tombés



- 62 20% des capuchons floraux sont tombés
- 63 Floraison partielle : 30% des capuchons floraux sont tombés
- 64 40% des capuchons floraux sont tombés
- 65 Mi-floraison : 50% des capuchons floraux sont tombés
- 66 60% des capuchons floraux sont tombés
- 67 70% des capuchons floraux sont tombés
- 68 La floraison s'achève : 80% des capuchons floraux sont tombés
- 69 Fin de la floraison

### Stade principal 7 : développement des fruits

- 71 Nouaison : début du développement des fruits, toutes les pièces florales sont tombées
- 73 Les fruits (baies) ont la grosseur de plombs de chasse, les grappes commencent à s'incliner vers le bas
- 75 Les baies ont la grosseur de petits pois, les grappes sont en position verticale
- 77 Début de la fermeture de la grappe (les baies commencent à se toucher)
- 79 La fermeture de la grappe est complète, les fruits ont fini de grossir

### Stade principal 8 : maturation des baies

- 81 Début de la maturation : les baies commencent à s'éclaircir et/ou à changer de couleur
- 83 Eclaircissement et/ou changement de couleur en cours
- 85 Les baies deviennent molles au toucher
- 89 Les baies sont mûres pour la vendange

### Stade principal 9 : sénescence ou début du repos végétatif

- 91 Après la vendange : l'açotement du bois est terminé
- 92 Début de la coloration des feuilles
- 93 Début de la chute des feuilles
- 95 50% des feuilles sont tombées
- 97 Fin de la chute des feuilles
- 99 Baies mûres en phase de conservation

Figure 04: Stades phénologiques de la vigne d'après Meier (2001)



### **5- Influence des conditions environnementales :**

D'après (Champagnol,1984; Huglin et Schneider, 1998 ; Galet, 2000).

**5-1- Sol, altitude :** La nature du sol mais surtout sa composition en éléments minéraux (N, P, K), sa teneur en eau et en éléments organiques influent sur la vigueur des plants de vigne et par conséquent sur la fertilité des bourgeons (§ fertilité des bourgeons) ainsi que sur la croissance des baies.

**5-2- Climat :** La vigne est une plante dite héliophile, et son développement sera favorisé sous les climats chauds et bien ensoleillés.

**6-Les pratiques culturales :** La vigne est cultivée sous des climats très différents et les pratiques culturales ont du s'adapter à des conditions extrêmes. (Champagnol, 1984 ; Huglin et Schneider, 1998 ; Galet, 2000).

### **7- Notion de variétés, cépages, clones, cultivars :**

La vigne cultivée *Vitis Vinifera L.* comprend plus de 6000 variétés, que les botanistes modernes appellent cultivars, et les vigneronns cépages.

Un clone, ou cultivar, peut être défini comme le descendant par voie végétative, d'une souche mère (Galet, 2000).

Le terme cépage est plus général, car un cépage peut être un clone unique ou, au contraire, provenir de plusieurs clones apparemment très proches entre eux, au point d'être confondus sous un même nom, on parle de cépage-population (Galet, 2000).

#### **7-1 :Diversité des cépages :**

La vigne cultivée compte actuellement de 6000 (Galet, 2000) à 10 000 cépages (Galet,2000) (figure 05).



**Figure 05 :** Aperçu de la diversité des cépages autochtones dans la collection internationale du Domaine de Vassal (Boursiquot JM.1999).

### **8 : Encépagement algérien :**

L'encépagement algérien est le résultat des brassages des peuples et des civilisations le long de l'histoire de ce pays. Ainsi ce sont les croisements des cépages, qui ont donné naissance à des populations locales bien acclimatées aux conditions naturelles de l'Algérie (LEVADOUX, 1971).

#### **8-1- Classement du patrimoine variétal se fait en trois catégories :**

##### **8-1-1 : Cépages des vignes classiques :**

D'après LEVADOUX (1971), CHETOUH (2004).

Ce sont toutes les introductions des cépages cultivées par les colons et qui occupent les régions privilégiées au dépens des cépages autochtones, ces cépages constituent actuellement la gamme la plus connue et cultivée.

##### **8-1-2 : les cépages des vignes autochtones :**

Ils se répartissent généralement dans les massifs de la Kabylie et l'Aurès, où nous trouvons même des cépages sauvages de vigne.

a : Les cépages de Montagne : les cépages de cette zone résistent aux gelées tardives, possédant des fruits à chair ferme, craquante à épaisse peu juteuse : (AHMAR BOU AMAR, AMESSASSE, AMELLAL, ABARKANE, AHMAR MECHTRAS I et II)

b : Les cépages du Sud : ils sont résistants à la chaleur relativement tôt possèdent des fruits à pellicule plus épaisse et plus juteuse, la baie est moins croquante :BOUNI, SEDDOUK.

**8-1-3 : les cépages des vignes nouvelles:** l'introduction des nouveaux cépages à grande échelle est une opération sous le contrôle de I.T.A.F.V. c'est ainsi que les cépages PRIMA et ORA ont été introduits en 2004

### 1-Multiplications :

La vigne peut se reproduire par voie sexuée ou par voie végétative (Viala & Vermorel, 1910).

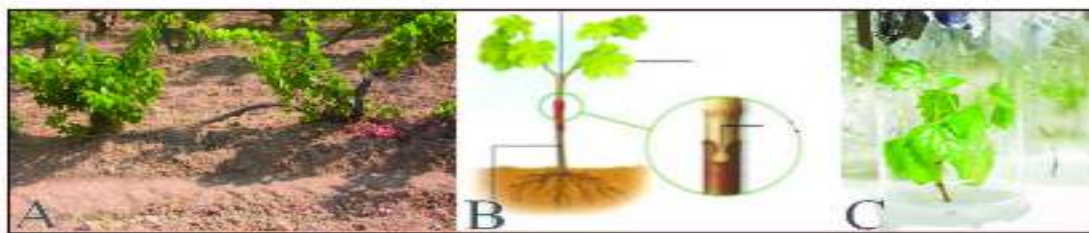
#### 1-1- Multiplication sexuée :

La reproduction sexuée implique un parent de chaque sexe et aboutit à une descendance génétiquement nouvelle, composée d'individus génétiquement différents des parents et différents entre eux. Ils possèdent une partie des gènes recombinés de chaque parent. En ce sens, la reproduction sexuée engendre de nouvelles recombinaisons génétiques.

#### 1-2-Multiplication asexuée :

A l'état sauvage, la vigne peut se multiplier par voie végétative sous la forme de marcottes. Une partie du sarment enterré va être capable de se bouturer et de régénérer un nouveau système racinaire (Levadoux, 1956). En viticulture, la reproduction végétative est très utilisée car elle permet la multiplication et la conservation des différents cépages sélectionnés. Elle permet également une homogénéité de culture et le maintien de la typicité du cépage. Certains cépages très anciens possédant des qualités particulières ont ainsi pu être conservés. C'est le cas par exemple du Muscat à petits grains, de la Sultanine ou du Pinot.

Cette multiplication peut être réalisée par différentes méthodes qui sont : le marcottage, le bouturage, et le greffage (figure06) (Pouget, 1990).



#### 1-2-1-Marcottage

Cette méthode consiste à placer dans un milieu favorable, un fragment de sarment non détaché du cep, jusqu'à ce qu'il ait reproduit un nouveau plant ; ensuite, il est normalement sevré (REYNIER, 2000). Ce procédé est pratiqué pour remplacer dans une vigne des pieds manquants.

### 1-2-2-Bouturage

Le bouturage consiste à prélever sur un arbre, ou un sujet bien développé sain et authentifié, une portion de bois appelée bouture qu'on placera dans un milieu cultural approprié en vue d'émettre des racines adventives, des tiges et des feuilles pour former un individu complet identique au plant mère dont il est issu (BOUHAFRA, 2002).

Les rameaux porte boutures seront choisis sur des ceps fertiles, c'est-à-dire des sarments ayant porté des grappes.

En pratique, on distingue deux catégories de boutures : Les boutures greffons et Les boutures greffables de porte greffe.

Depuis l'invasion phylloxérique, ce procédé a pratiquement été abandonné pour les cépages de Vitis vinifera, mais il est encore utilisé pour la production de plants racinés de porte greffes (REYNIER, 2000).

### 1-2-3-greffage :

Le greffage est une technique de multiplication végétative qui consiste à effectuer une greffe, c'est-à-dire à mettre un greffon issu d'une plante dans une autre plante qu'on appelle porte-greffe pour les qualités recherchées dans cette plante (Pouget, 1990).

les deux plantes doivent être de même famille botanique. Il y a plusieurs techniques de greffage dont les plus connues sont :

- la greffe en écusson ex. : l'abricotier, le pêcher...
- la greffe en fente ex. : le pommier, le poirier...
- **2-Application de la biologie moléculaire sur la vigne :**
- **2-1-Le génome de la vigne :**

Le génome de *Vitis Vinifera L.* est composé de 19 paires de chromosomes ( $n=38$ ). La taille du génome est évaluée à 470 Mb (Séquençage PN40024, 12X), similaire à celle du peuplier (485 Mb) et du riz (430 Mb) mais environ quatre fois plus importante qu'*Arabodipsis Thaliana* (125 Mb). La taille des chromosomes varie de 16,6 Mb pour le chromosome 17, à 29,7 Mb pour le chromosome 14. Actuellement, deux individus de *Vitis Vinifera L.*

### **3-Conservation des ressources génétiques du genre *Vitis* :**

Par suite de son hétérozygotie ; la conservation des ressources génétique de la vigne ne peut se concevoir, sous forme de banque des gènes des graines ce qu'il importe donc de la réaliser sous forme des plante vivantes.

Les méthodes de conservation les plus utilisées sont :

-La première : est celle des collections ; nombreuses dans le monde ; comme exemple ; station de recherche viticoles INRA de Montpellier ; qui comprend environ 5200 clones de 2100 variétés de 25 espèces de vitis.

-la seconde : est celle de la conservation des génotypes in vitro ; en utilisant la thérapie.

-une troisième : possibilité semble être plus prometteuse ; il s'agit d'une technique de cryoconservation d'apex (HUGLIN ; 1998).

### 1 : Historique de la culture in vitro :

En 1878 ; il y a donc plus de 120 ans. CL Bernard formulait les principes théoriques de la création d'un système artificiel dans lequel les organes pourraient survivre hors de l'influence de l'organisme entier. Depuis cette orientation de recherche lentement d'abord ; d'une manière plus rapide ensuite ; a permis de grands développements à la biologie (Nozron et Bancihon.1972) ;

La culture indéfinie des tissus des végétaux à été réalisée il y a 70 ans ; c'est en effet au printemps 1937 qui fut isolée la première souche tissulaire dans l'activité c'est maintenue jusqu'à présent grâce à des repiquages réguliers ;

Dés ; 1941 ; on savait obtenir des plantes entières à partir des petits fragments d'organes ou colonies tissulaire ; leur enracinement ne posait aucun problème grâce aux auxines rhizogènes dont le maniement était connu depuis assez longtemps (Margara ; 1989).

En 1944 ; Buvat par les techniques de culture des tissus met en évidence le phénomène de dédifférenciation : la juvénalisation ;

En 1949 ; Limasset et Cornet notent l'absence de virus dans les méristèmes de tabacs viroses ;

En 1955 ; la découverte de la kénétine ; substance douée d'une puissante activité calogène ; puis d'autres Cytokinine ont permis de provoquer presque à volonté la néoformation de bourgeons adventifs.

En 1966, Guha et Maheswari en Inde obtenaient des plantes haploïdes de *Datura innoxia* MLL à partir de culture d'anthères,

En 1971 ; au Japon ; Takebe et Col régénéraient des plantes entières de *Nicotiana tabacum* à partir de protoplaste (Bergman ; 1960).

### 2 : Principes de la culture in vitro :

La culture in vitro, permet en particulier le sauvetage d'embryon, l'accélération des générations et la reproduction à l'identique d'un génotype (micro-propagation)( Gallais, 2013).Et selon Bergman, 1960, les principes fondamentaux de la culture des tissus végétaux sont :

1. isolement des fragments des tissus ou organes d'une plantes complète(explants)

2. fourniture d'un milieu ambiant approprié permettant aux explants d'exprimer leur capacité de morphogenèse.

### **3-Les techniques de culture in vitro :**

#### **3-1-Culture de méristèmes :**

Dès 1952, Georges Morel de l'INRA de Versailles réussit à obtenir une plante entière à partir d'un méristème (Ochatte et *al.*, 2005). Le méristème étant toujours indemne de virus, on peut obtenir des plantes saines à partir de plantes malades en le cultivant.

Cette technique est donc utilisée pour obtenir des plants sains à partir de plants virosés (Auge, 1992). Sur le pied mère choisis, on prélève des boutures à l'extrémité des rameaux.

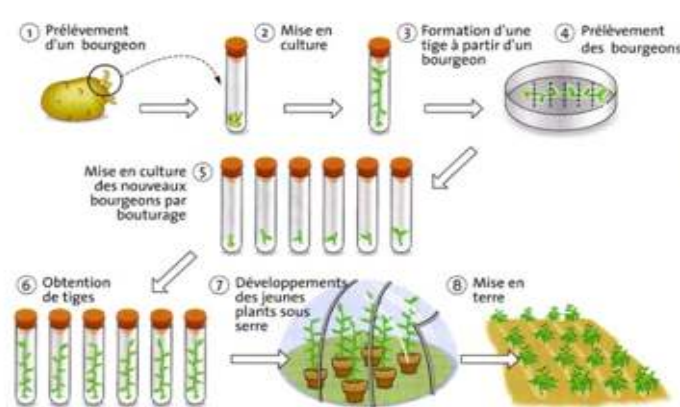
#### **3-2- La micropropagation :**

Les plantes se multiplient par semis ou par multiplication végétative. Cette dernière est indispensable quand on veut conserver les caractères d'une variété donnée. C'est ce que l'on fait depuis des siècles quand on effectue des boutures, des greffes ou de la division de touffe. Mais le taux de multiplication que l'on peut obtenir par ces méthodes est souvent très faible.

La multiplication végétative in vitro apporte un progrès considérable par rapport aux méthodes traditionnelles, avec un taux de multiplication de 100 à 1000 fois plus élevé (Ochatte et *al.*, 2005).

Grâce à cette technique, on part d'une petite quantité de tissu au départ pour produire une infinité de plantes. La vitesse de multiplication est élevée, on propage des plantes identiques à celle du départ, on peut constituer des collections de pieds-mères, des banques de clones, faire de la sauvegarde d'espèces en voie d'extinction, programmer des cultures tout au long de l'année, éviter la dormance, conserver des plantes au froid (Ochatte et *al.*, 2005). (figure 07).





### 3-3- L'Embryogenèse somatique :

L'embryogenèse somatique est une technique couramment utilisée en culture *in vitro*. Elle permet de générer un embryon à partir d'un cal ou de suspensions cellulaires. Cette technique fait appel à la notion de totipotence (spécifique des végétaux) (ZRYD et *al.*, 1988), en effet on part ici de cellules somatiques et non de cellules germinales.

#### 3-3-1 : Principe :

L'embryogenèse somatique permet d'obtenir des plantules génétiquement identiques à la plante mère. Dans une graine, on trouve la future plante sous forme d'embryon (embryon zygotique) qui résulte de la reproduction sexuée (William et maheshwarm, 1986). Cette technique consiste alors à provoquer l'apparition des tissus végétaux mis en culture *in vitro*, qui provoque de nombreuses divisions cellulaires. Cette embryogenèse somatique génère alors des embryons dans ces divisions cellulaires ou dans les cals, c'est-à-dire un amas de cellules indifférenciées (qui ont été différenciées sur l'explant de la plante mère avec le phénomène de totipotence végétale).

Sous certaines conditions, les cultures cellulaires s'organisent ensuite en nombreux petits massifs à structure bipolaire (avec un méristème de racines et un méristème de tiges) nommés embryons somatiques (Margara, 1989, Boccon Gibod et Jalouzot, 1995). Comme les embryons zygotiques présents dans les graines, les embryons somatiques obtenus à partir de cellules non sexuées (sans fécondation) se développent en un nombre illimité de plantes génétiquement identiques. C'est actuellement la technique la plus performante pour la multiplication végétative des conifères.

### 3-4-Culture de protoplaste :

Ces cellules végétales dépourvues de paroi peuvent être obtenues soit à partir d'organes des plantes, soit à partir des suspensions cellulaires (Robert et al.,1998). Les exigences nutritionnelles des protoplastes nécessitent une composition minérale, adaptée, notamment pour le calcium qui joue un rôle important par son influence sur les divisions (Karp et al., 1982).la technique de culture de protoplaste est très fortement inductrice de variabilité porte souvent sur le nombre chromosomique ; cela a été montré chez la pomme de terre (Sheparid, 1982 ;Karp at al.,1982).

### 4-Conditions de réussite la culture in vitro :

La technique in vitro est un mode de multiplication végétative artificielle des plantes. Il s'agit d'un ensemble des méthodes faisant intervenir des conditions de culture parfaitement contrôlées (milieux de culture définis pour chaque type de plante, lumière, température, humidité).

#### 4-1 : Lumière et photopériode :

la lumière est un facteur déterminant pour la culture in vitro des plantes, elle à une grande influence de part la durée d'exposition (photopériode), selon Hussey et al.(1981).d'autre part la longueur de jour qui affecte la vigueur et le développement des proliférations et la croissance des cals, cette dernière pourrait aussi contribuer à la formation des cals (Briggs,1964), de façon général le début de croissance nécessite une faible intensité lumineuse (500 à 1000 lux) avec 12 à 16 heures de photopériode (Bommeneniet jauhar , 2003).Lorsqu'il s'agit de préparer la plantule au repotage en serre, il apparait souvent préférable d'augmenter l'intensité de l'éclairage (par exemple 10000 lux) (Margara, 1989)(figure08).



**Figure 08** : La Chambre de culture et les conditions de lumière.

### 4-2-Température :

La température de chambre de culture est constante de l'ordre de 22° à 25°C selon l'espèce (Margara ,1989).

### 4-3-Milieu de culture :

#### le milieu de culture est constitué de :

1) **l'eau** : généralement l'eau utilisée est « désionisée » par passage sur une colonne remplie des résines échangeuses d'ions (Auger et al, 1989).

2) **Sels minéraux** : comme pour la plupart des plantes supérieures, se divisent en deux catégories ; les macro-éléments sont N, P,K,S, Mg, Ca et les micro-éléments ou oligo-éléments ;B, Mn, Zn, Cu, Ni, Co, Mo, Al, Fe. Les besoins des cultures des tissus en éléments minéraux diffèrent selon le type de culture.

#### 3/ éléments organiques :

##### a-sucres :

Dans le cas de tissus végétaux placés en culture *in vitro*, l'assimilation Chlorophyllienne est nulle ou insuffisante pour assurer la survie et le développement de l'explant.

Dès lors, on ajoute des sucres, le plus souvent du saccharose, aux milieux de culture pour fournir à l'explant une source de carbone. Dans la nature, les sucres sont photosynthétisés à partir du gaz carbonique atmosphérique et de l'eau du sol.

##### b-vitamines :

L'emploi de diverses vitamines favorise fréquemment le développement des cultures *in vitro*: elles appartiennent essentiellement au groupe B.

##### c- acides aminés :

Il a parfois été observé que l'apport d'acides aminés favorisait la prolifération.

#### 4) Les régulateurs de croissance :

Appelés généralement hormones végétales, ils induisent les phénomènes de croissance et de néoformation des organes.

On trouve ces substances de croissance naturellement dans toutes les plantes ;

cependant, on a pu synthétiser artificiellement des molécules possédant les mêmes propriétés.

Les hormones utilisées sont principalement les Auxines, les Cytokinine, car ces hormones sont capables d'orienter les explants vers la formation de nouveaux organe. Les milieux ainsi constitués sont liquides. Il est nécessaire de les solidifier par l'ajout d'un gélifiant pour éviter que les explants ne tombent au fond des récipients.

### 5-Applications de culture in vitro :

La culture in vitro est utilisée pour :

- Obtention rapide de semences d'élites pour les espèces ligneuses.
- Obtention de semences pour des variétés stériles (pommes de terre polyploïdes, bananier...).
- Possibilité de culture en réacteur : production de semences artificielles à grande échelle (gymnospermes).
- Obtention de germplasma, utilisé ainsi lors de la création de banques de souches pour la conservation génétique des plantes.
- Sauvegarde et multiplication de plantes en voie d'extinction.

### 6-Intérêt de culture in vitro :

D'après Auge et al.(1989), la culture in vitro à plusieurs objectifs, dont les plus importants sont :

- une très grande vitesse de multiplication et de propagation des plantes identiques à la plante mère.
- une collection des pieds mères ; permet la création des banques des plantes.
- protection d'espèce en voies de disparition ; dans le cas des certains cactacées.
- obtention des plantes plus vigoureuses.
- limitation de l'extension des viroses.

### 7-Avantages de la culture in vitro :

La culture in vitro permet :

- ❖ l'obtention de clones sélectionnés pour leur vigueur, leur caractères intéressants (Chrysanthème, Fraisier, Bananier), leur rareté (Orchidées) ;

- ❖ la possibilité de conservation des ressources végétale et faire une banque de génotypes et réaliser ainsi des plantations hors la période de croissance (LE et al. 2002)
- ❖ l'assainissement des végétaux (plantes sans virus)
- ❖ la production rapide et en masse, à n'importe quel moment de l'année (Smith et al ., 1985 ; Collet et LE ; 1988)
- ❖ le raccourcissement des cycles de développement ; alimentaires et pharmaceutiques.
- ❖ la diminution des coûts de production (peu de personnel) et des dépenses énergétiques (réduction des surfaces de culture et éclairage réduit) ;
- ❖ la facilité de stockage et conservation (au froid) de millions de plantes sur de très petites surfaces, à l'état sain et à l'abri des contaminations ;
- ❖ la facilité de leur transport d'une région à l'autre.
- ❖ le rajeunissement d'un végétal.
- ❖ la production de substances biochimiques intéressantes pour l'industrie, les secteurs.

### **8-Néanmoins , un certain nombre de problèmes se posent :**

- ❖ la vitrification : certains accidents, non prévisibles au départ, peuvent intervenir en cours de culture in vitro, comme des malformations dues à un déséquilibre hormonal : la vitrification.
- ❖ la perte des caractères intéressants : la production répétée de grands nombres de plants uniformes (clones) peut entraîner la perte des gènes nécessaires, par exemple, à la résistance aux maladies nouvelles ; il faut donc conserver les pieds mère et à certains moments, repasser par la reproduction sexuée.
- ❖ Problèmes inhérents à la technique : l'asepsie des explants ; la présence de micro-organismes, bactéries, champignons, virus, qui, s'ils ne sont pas totalement éliminés, contaminent la culture et tuent les jeunes plantules.
- ❖ acclimatation : le passage à des conditions de culture normale est parfois délicat. En effet, durant son séjour in vitro, la plante est à l'abri des stress.
- ❖ apparition d'anomalies génétiques (certains cas d'hyperfloraison, perte de sexualité chez certaines espèces, apparition d'organes anormaux) : c'est la variation somaclonale.

**1-Lieu de l'expérimentation :**

Notre travail a été réalisé au sein du laboratoire central d'amélioration des plantes de l'institut technique d'arboriculture fruitière et de la vigne (ITAFv), à Tessala El Merdja Alger (figure09).durant la période Mars – Aout 2016.



**Figure 09:**Laboratoire central de l'Instituts Technique de l'Arboriculture Fruitière et de la Vigne à Tessala El Merdja – Alger.

- ✚ Régénérer deux variétés de la vigne *Vitis vinifera* L : Amellal et Ahchichen, par la culture in vitro, en utilisant la technique de l'embryogénèse somatique.
- ✚ Utiliser une méthode de désinfection par l'hypochlorite de sodium à 7% de 3 explants (étamines, demi fleurs, ovaires)des deux variétés étudiées.
- ✚ Rechercher des milieux de culture favorableavec différents doses d'hormones(BAP,NOA et TDZ) pour la callogenèse chez les deux variétés étudiées.
- ✚ Le milieu MSI<sub>3</sub> est plus favorable à la callogenèse(TDZ=0.09g/l, NOA=4ml/l).

**2- matériel végétale :**

Durant la période allant de fin mars jusqu'au début d'avril 2016, les boutons floraux (étamines, demi fleurs, ovaires) de deux variétés de la vigne appartenant de l'espèce *Vitis Vinefera* ont été collectés à partir des verges de collection national de Ben Chichao de Media relevant de l'Institut Technique De L'arboriculture Fruitière et de la vigne (ITAF) à Tessala El Merdja Alger. une période de stage de 6 mois (figure 10).



**Figure 10:** Matériel végétal original.

Le matériel végétal utilisé au cours de notre expérimentation est représenté par même pied de deux variétés autochtones (locales) de vigne de table (*Vitis Vinefera L*): Ahchichene, Amellale.

**a – Description des variétés :**

Variété : Amellale (figure 11)

- C'est un cépage autochtone cultivé dans toute la Kabylie, ainsi que dans les zones des montagnes et les sols humide.
- Ce cépage est une vigne de table et leur culture à recommander en plaine.
- Sa maturité s'étend du 15 Septembre au 15 Novembre.
- C'est un bon cépage de table à grappe Cylindro conique, moyennement compactes (poids de grappe : 500 gr et la longueur : 23,5 cm, diamètre de bais : 18 mm).
- Le fruit c'est un bais arrondie, de couleur jaune doré.
- Il est très sensible aux maladies et parasites : sensible au mildiou et à l'oïdium (ITAFv ; 2014).



**Figure11:** Image originelle de variété Amellale.

Variété : Ahchichen(figure12)

- C'est un cépage autochtone cultivé dans les régions montagneuses, et les sols humides.
- C'est un cépage de table à très bon grappe de forme cylindrique, compactes (poids de grappe : 250 gr et leur longueur 22cm, et le diamètre de bais :16 mm).
- Leur fruit appelé le bais, de couleur vertes et de consistances juteuses ,de forme arrondies.
- Sa maturité s'étend des 1 semaines de septembre jusqu'à 1 semaine de novembre.
- Sensible aux maladies et parasites aux mildious et l'oïdium (ITAFv, 2014).



**Figure12 :** Image originelle de variétéAhchichen

### **3- méthode :**

#### **3-1- préparation de milieu de culture :**

##### **3-1-1- les solutions mères :**

Pour chaque produit entrant dans la composition du milieu nous avons utilisées des solutions concentrées (solution mère) de ces produits que nous diluons de manière adéquate.

Chaque composé a été dilué dans une faible quantité d'eau distillée et ajusté d'eau distillée jusqu'à 1litre (voir les compositions des milieux, Annexe II).



**3-1-2-Les milieu de culture :**

(8) milieux de cultures ont été préparés (2) milieux (témoin) sans hormones et (6=3MS+3CAP) milieux avec différents doses d'hormones pour l'induction de l'embryogenèse somatique.

**Tableau 01 :les compositions de défférents milieux MS et CP :**

	Compositions	MS <sub>1</sub>	MS <sub>2</sub>	MS <sub>3</sub>	MS <sub>0</sub> (sans hormone)
MS	Macro-élément(MS)	100m	100m	100m	100m
	Micro-élément(MS)	10ml	10ml	10ml	10ml
	Chelat	10ml	10ml	10ml	10ml
	Vitamine	2ml	2ml	2ml	2ml
	Myoinositole	0.1g	0.1g	0.1g	0.1g
	BAP	1ml	1ml	-	-
	NOA	2ml	1ml	4ml	-
	TDZ	-	-	0.09ml	-
	Saccharose	30g	30g	30g	30g
	<i>Agar</i>	7g	7g	7g	7g
	<i>pH</i>	5.7	5.71	5.7	5.7
CP	Macro-élément(CP)	100m	100m	100m	100m
	Micro-élément(CP)	10ml	10ml	10ml	10ml
	Chelat	10ml	10ml	10ml	10ml
	Vitamine	2ml	2ml	2ml	2ml
	Myoinositole	0.1g	0.1g	0.1g	0.1g
	BAP	1ml	1ml	-	-
	NOA	2.0221ml	1ml	4ml	-
	TDZ	-	-	0.09ml	-
	Saccharose	30g	30g	30g	30g
	<i>Agar</i>	7g	7g	7g	7g
	<i>pH</i>	5.7	5.7	5.7	5.7

Les deux milieux :

MS qui décrit par MURASHIG et SKOOG en 1962 et Le milieu CAP décrit par CHEE et POOL sont enrichi par des vitamines (2ml/l), Saccharose (30g/l), source de carbone, l'agar (7g/l) pour solidifier le milieu sans ou avec une ou deux hormones de croissance (NOA, BAP, TDZ) avec différentes quantités selon le traitement étudié.

D'après ZRYD et ROSSI, 2001, le pH du milieu de culture est ajusté à 5.7 - 5.8 avec une base NaOH et/ou un acide HCL avant leurs stérilisations par l'autoclave à une température de 120°C pendant 20 min et sous une pression de 2 bars. Par la suite, les milieux sont écoulés dans des boîtes de pétri (90mm) à raison de 20ml par boîte, ensuite scellé par du Parafilm et conservé au laboratoire à la température ambiante en attendant leur utilisation.

### **3-2-Techniques de stérilisation :**

La technique de la culture in vitro exige beaucoup de soin afin d'éviter tout type de contamination et pour le maintien des cultures en condition d'asepsie, mais il faut toujours se rappeler que les micro-organismes sont partout (spores de champignon, et bactéries), la stérilisation du milieu de culture a pour but d'éliminer ces micro-organismes.

Le maintien des cultures en conditions sous-entend la stérilisation des milieux de cultures, d'instruments de manipulation et de dissection.

#### **3-2-1-stérilisation du matériel de laboratoires :**

Toutes les manipulations se font sous haute à flux d'air laminaire stérilisé en tenant compte de certaines précautions :

- ✓ Nettoyage de la haute à l'alcool 70°C avant et après chaque manipulation.
- ✓ Allumage de la lampe à UV 15 à 20 min avant chaque manipulation.
- ✓ Les instruments (les pince, scalpels, bistouris) et toute verrerie sont préalablement stérilisés dans l'étuve à 240°C pendant deux heures.
- ✓ les instruments sont trempés dans de l'alcool 70°C puis flambés et placés sur leur portoir stérilisé après chaque usage.

Nous avons pris en compte toutes ces considérations car la première condition pour la réussite d'une culture in vitro est l'asepsie.

### 3-2-2-stérilisation des milieux de cultures :

Les milieux utilisés dans cette étude sont stérilisés à l'autoclave à 120°C, sous une pression de 1 bar pendant 20 minutes, après ajustement du Ph dont la valeur est de 5.7 à 5.8, dont avec NaOH ou avec HCL, selon le milieu, acide ou basique (Figure 13).



**Figure13:** Appareil de stérilisation des milieux de culture.

### 3-3. Préparation de l'explant :

#### 3-3-1: désinfection du matériel végétal :

Les fleurs utilisés pour l'embryogenèse somatique ont été collectés avant la fécondation des fleurs pour éviter l'introduction des gènes étrangères, et avant l'anthèse afin d'éviter l'introduction des solutions stérilisantes à l'intérieures durant l'étape de stérilisation. Une partie des fleurs a été utilisée directement par la culture in vitro, l'autre partie a été conservée à 4°C dans des sachets fermés pour une période de 5 à 7 jours en attendant leurs utilisations.

Il y a lieu de souligner que pour désinfecter le matériel végétal, nous utilisons généralement de l'hypochlorite de sodium ou de calcium. Et pour notre matériel nous avons utilisés de l'hypochlorite de sodium.

#### I-3-3-1-1- la désinfection à l'hypochlorite de sodium à 07% :

##### A-Préparation de la solution d'hypochlorite de sodium à 07% :

Nous avons mis en solution 07ml d'hypochlorite de sodium ajouté a 100ml d'eau distillée, et deuxgouttes de tween 20 qui est un détergent.

##### B-Désinfection des fleurs :

Nous avons effectués plusieurs étapes :

- ✓ Les boutons floraux sont stérilisés par immersion dans une solution d'alcool 70% pendant quelque secondes.

- ✓ Les fleurs sont ensuite traitées pendant 10 min avec une solution d'hypochlorite de sodium.
- ✓ Rinçages des fleurs à l'eau distillée stérilisée (3 rinçages, 3min par rinçages)
- ✓ La stérilisation et les rinçages à l'eau distillée se font sous hotte à flux laminaire en devant un bec benzène.
- ✓ A la fin de la stérilisation, les fleurs sont étalées pour séchages sur un papier stérile.

Dans les conditions adéquates et après stérilisation et séchage des boutons floraux ; les fleurs sont mises en culture in vitro selon le procédé suivant :

- boutons floraux sont déposés sous loupe, les calices sont éliminés à l'aide d'une pince et un scalpel stéril.
- Les fleurs sont ensuite coupées longitudinalement, et mise en culture dans les boîtes de pétri, à raison de huit explants par boîtes avec 12 répétition : la surface de la coupe doit être en contact avec le milieu de culture(Figure 14) .



**Figure14:** La mise en culture des explants dans les boîtes de pétri.

Après la mise en culture, les boîtes de pétri sont scellées et placées dans la chambre de culture à une température maintenue entre 22et25°C avec un photopériode de 16h de lumière et 8h d'obscurité(Figure 15).



**Figure 15:** Les boîtes de pétri placés dans la chambre de culture.

# Chapitre II

## la multiplication et la génétique de la vigne

# Chapitre III : La culture in vitro

# Chapitre I

## Matériels et Méthode

# Chapitre II

## Résultats et discussions



Notre travail a pour but la régénération des plants de la vigne *Vitis Venifiravia* l'embryogenèse somatique à partir de la culture des fleurs fermés in vitro.

Les fleurs utilisées appartenant à deux variétés de la vigne Amellale et Ahchichen.

### 1-Méthode de désinfection :

Nous avons utilisés une méthode de désinfection par l'hypochlorite de sodium à 7% et le trempage dans l'alcool 70°.

Les fleurs des deux variétés étudiées ont été cultivées sur 2 milieux déférents : milieu MS et milieu CP ; ou les cultures ont été déposées pour une période de 10 jours au niveau de la chambre de culture pour être isolée de tous facteurs externe.

#### ➤ La désinfection :

Nous avons manipuler sur 2016 explants ; à l'hypochlorite de sodium 7% pour le milieu MS et CP ; avec une durée de trempage de 10 minute et quelque seconde dans l'alcool 70° avec 2 gouttes de tween et 3 rinçages successifs de 3 minutes à l'eau distillée stérile .

Nous avons obtenus les résultats suivants :

**Tableau 02** : Résultats de la désinfection des explants à l'hypochlorite de sodium 7% sur le milieu MS :

Type de désinfection	Nbrs d'explants totale	Nbrs d'explants contaminés	TC %	Nbrs d'explants desséchés	TD %	Nbrs d'explants repris	TR %
Hypochlorite de sodium 7%	2016	528	26,19	960	47,61	528	26,19

**Taux de contamination :**

Nous remarquons sur le tableau 1 que parmi les 2016 explants testés de 2 variété étudiée, 528 se sont contaminés, donc un taux de contamination moyen atteignant les 26,19%.

Nous pouvons expliquer ce taux de contamination par le fait que les boutons floraux utilisés renferment beaucoup des germes (bactérie et champignon) malgré la désinfection (tableau 02).

**Taux de dessèchement :**

Le taux de dessèchement des explants est très élevé, atteignant les 47,61% ; donc 960 se sont desséchés.

Nous pouvons expliquer ce taux de dessèchement par le fait que l'hypochlorite de sodium et l'alcool pénètrent facilement dans les tissus végétaux des fleurs (tableau 02).

**Tableau 03 :** Résultats de la désinfection des explants à l'hypochlorite de sodium 7% sur le milieu CP :

Type de désinfection	Nbrs d'explants totale	Nbrs d'explants contaminés	TC%	Nbrs d'explants desséchés	TD%	Nbrs d'explants repris	TR%
Hypochlorite de sodium	2016	928	46,03	792	39,28	296	14,68

**Taux de contamination :**

Selon le tableau 2, nous remarquons que parmi les 2016 explants testés, 928 se sont contaminés, donc un taux de contamination très élevé atteignant les 46,03 %.

Ces contaminations provoquées par l'introduction des germes à l'intérieur des fleurs (tableau 03).

### **Taux de dessèchement :**

nous remarquons que le taux de dessèchement des explants est élevé atteignant 39,28%.

La désinfection par l'hypochlorite de sodium et l'alcool pénètrent aléatoirement dans les tissus végétaux (tableau 03).

### **2-Aptitude à la calogénèse :**

Chez les deux variétés de la vigne étudiées, la calogénèse s'est déclenchée 4 à 8 semaines après la mise en culture des explants.

Chez les deux variétés étudiées, tous les cals qui sont formés atteignent leur taille maximale 4 à 8 semaines après la transplantation chaque 45 jours et présentent une structure friable de couleur blanchâtre ou verdâtre à la base de la vigne et à la surface de la section en contact avec le milieu de culture.

Le pourcentage d'explants callogènes ainsi que leur taille diffèrent selon les géotypes de la même espèce et selon le milieu de culture utilisé avec différentes combinaisons d'hormones.

Les différentes concentrations d'hormones sont utilisées afin de stimuler l'induction de l'embryogénèse somatique.

Aucun développement obtenu dans les milieux sans hormones.

### 2-1-Aptitude à la calogénèse chez les deux variétés AMELLAL et AHCHICHEN dans les différents milieux (MS ;CP) :

**Tableau 04** :Résultat de calogénèse chez les deux variétés Amellale et Ahchichen :

L'importance des cals +++ (2-2.5) ;++(1-1.5) ; +(moins de 0.5) ; - aucune résultat :

Amellale	Etamine		Importance	%de calogénèse	texture	Couleur	N°de boites	Répétitions
		MS1	-	-	-	-	18	8
		MS2	-	-	-	-	12	8
		MS3	+	0.16	friable	Brunâtre	12	8
		CP1	+	4.23	friable	Blanchâtre	12	8
		CP2	-	-	-	-	12	8
		CP3	-	-	-	-	12	8
	ovaire	MS1	+++	2.16	friable	Blanchâtre	12	8
		MS2	++	3.75	friable	Verdâtre	12	8
		MS3	++	14.06	friable	Blanchâtre	12	8
		CP1	-	-	-	-	12	8
		CP2	-	-	-	-	12	8
		CP3	-	-	-	-	12	8
	½ fleur	MS1	+++	25	friable	Blanchâtre	12	8
		MS2	+++	18.85	friable	Blanchâtre	12	8
		MS3	+++	61.53	friable	Blanchâtre, verdâtre	12	8
		CP1	-	-	-	-	12	8
		CP2	-	-	-	-	12	8

		CP3	-	-	-	-	12	8
Ahchich en	Etamine	MS1	+	3.7	friable	Verdâtre	12	8
		MS2	-	-	-	-	12	8
		MS3	+	6.5	friable	Blanchâtre	12	8
		CP1	-	-	-	-	12	8
		CP2	-	-	-	-	12	8
		CP3	-	-	-	-	12	8
	ovaire	MS1	-	-	-	-	12	8
		MS2	+	5.25	friable	Verdâtre	12	8
		MS3	++	14.06	friable	Blanchâtre, brunâtre	12	8
		CP1	-	-	-	-	12	8
		CP2	-	-	-	-	12	8
		CP3	-	-	-	-	12	8
	½ fleur	MS1	-	-	-	-	12	8
		MS2	+	2.5	friable	Brunâtre	12	8
		MS3	++	4.95	friable	Blanchâtre	12	8
		CP1	-	-	-	-	12	8
		CP2	+	1.3	friable	Brunâtre	12	8
		CP3	-	-	-	-	12	8

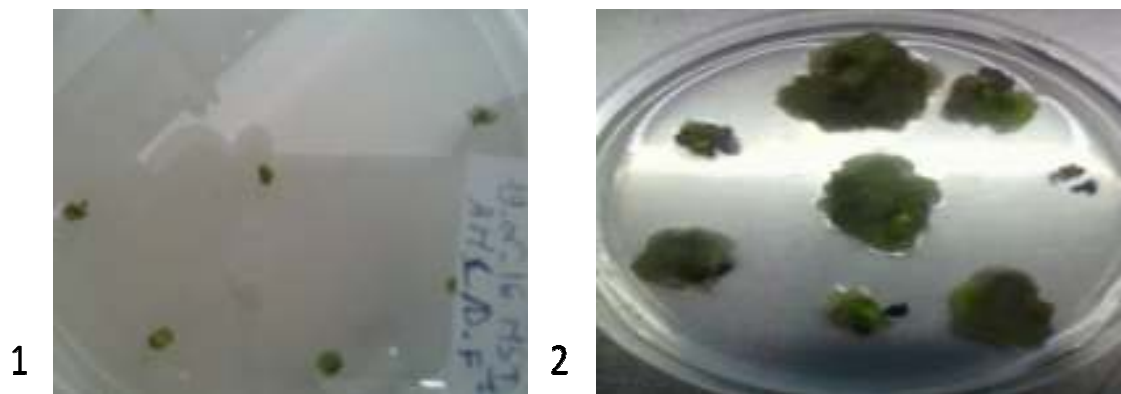
D'après le tableau 04 Les milieux (MS<sub>1</sub>, MS<sub>2</sub>, MS<sub>3</sub> et CP<sub>1</sub>, CP<sub>2</sub>) ont donné des cals chez les deux variétés avec des différents pourcentages.

Le déclenchement de la callogenèse a été constaté chez les deux variétés, 4 à 8 semaines après la mise en culture des explants. Selon (Carimi;2005) la callogenèse dépend de la qualité et la nature de l'explant.

(Carimi et de Pasquale (2003) ont rapporté l'effet génotypique des espèces sur les réponses à la callogenèse. En effet, les espèces d'agrumes répondent plus rapidement à la callogenèse (après 4 à 9 jours de la culture initiale).

Aucune manifestation de callogenèse (0%) n'a été observée dans les autres milieux.

Après 4 semaines de culture, un brunissement a été constaté sur la majorité des explants ensemencés dans ces milieux.



**Figure 16 :** les explants(demi-fleur) de la variété Amellale (1) après une semaines,(2)cals produits après 8 semaines.

Le milieu  $MSI_3$  est plus favorable à la callogenèse avec un taux atteignant 61.53% pour l'explant  $\frac{1}{2}$  fleur chez la variété Amellal, suite à la présence d'hormone thidiazuron (TDZ) avec concentration de 0.09 ml.

selon Brhadda et al.(2006).TDZ est une molécule connue par son effet déterminant dans l'accélération des divisions cellulaires avec sa combinaison avec l'auxine qui favorise le développement des embryons somatiques.

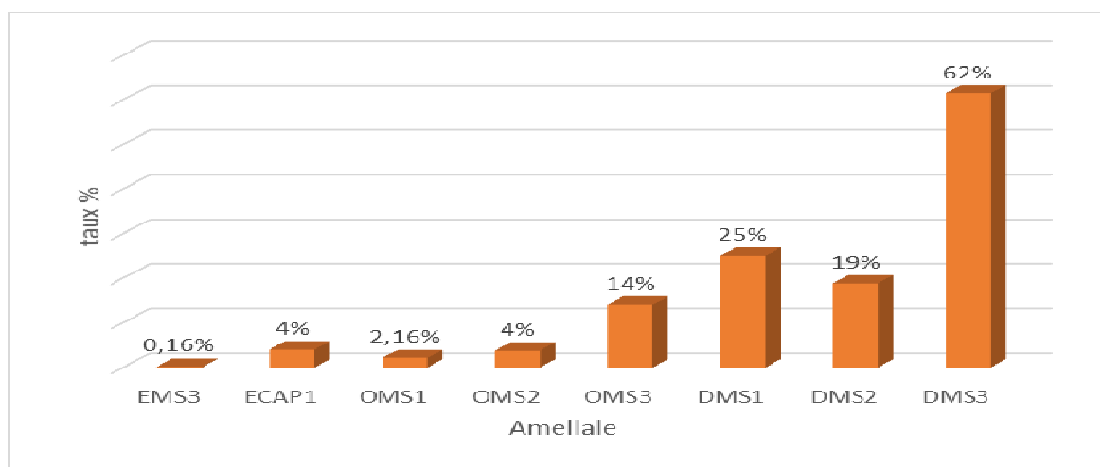
La principale composition du milieu de culture  $MSI_3$ , le TDZ(cytokinine) est plus active. La cytokinine induit l'apparition des cals (2001)

La variété Ahchichene présente aussi une aptitude à la callogenèse dans le milieu  $MS_3$  avec un taux de 14.06% (ovaire),6,5%(étamine) et 4,95% (ovaire).

D'après nos résultats nous constatons que le traitement hormonal par le Zéatine(Cytokinine) et la combinaison d'Auxine , donne une bonne callogenèse dans le milieu MS3.

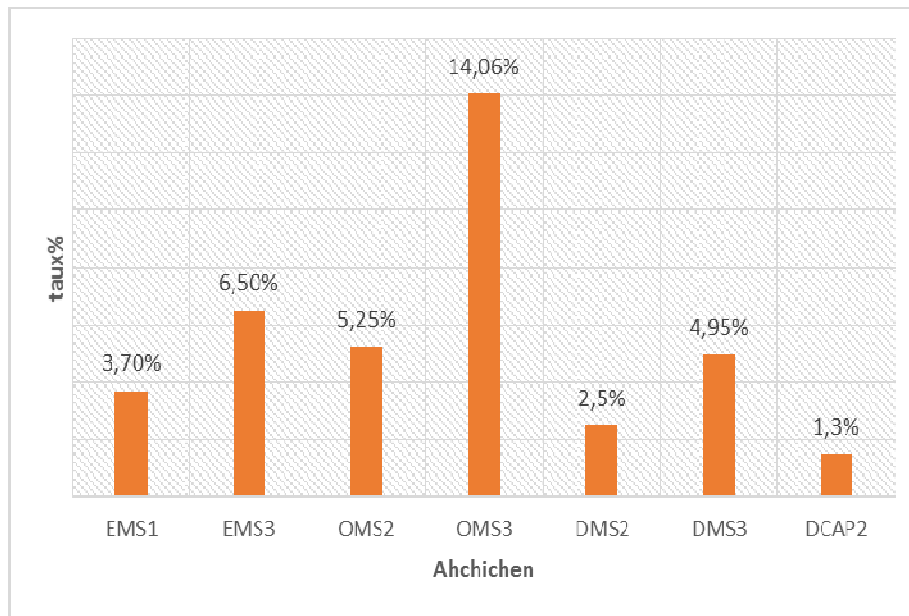
La croissance et la morphogenèse des tissus in vitro sont largement influencées par la composition des milieux de culture. Les phytohormones (notamment le rapport Auxine /Cytoknine) contrôlent le déclenchement de toute morphogenèse, ceci confirme les résultats obtenus dans le milieu MS3 (Yakoub,et al,2003).

L'ensemble des cals produits par les explants de la variété Ahchichen, sont marqués par une taille moins importante et un faible pourcentage de callogenèse par rapport à la variété Amellale.



E : étamines, D: demi fleurs, O :ovaires.

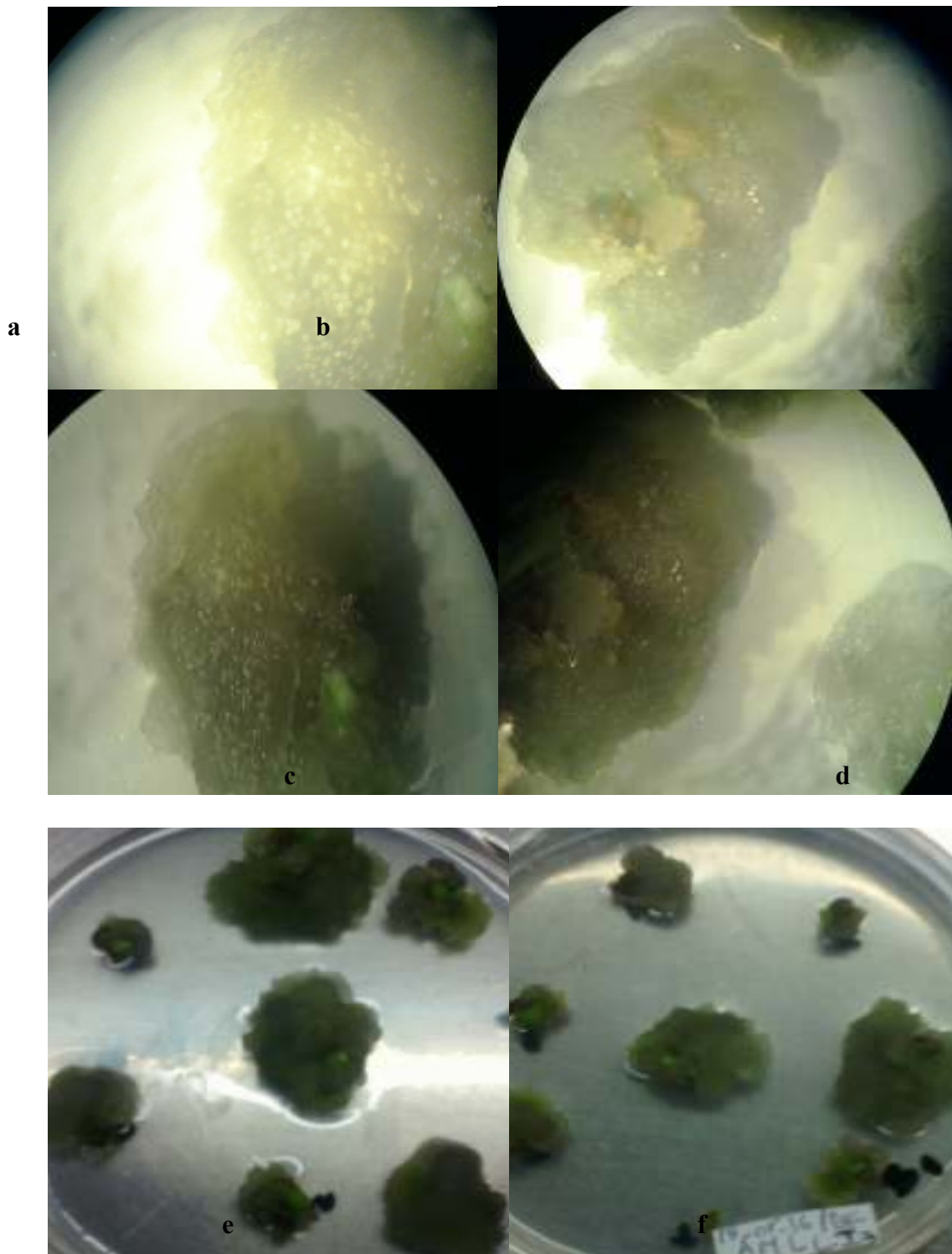
**Figure 17 :** L'aptitude à la callogenèse chez la variété Amellale dans les deux milieux de culture MS et CP.



E : étamines, D: demi fleurs, O : ovaires.

**Figure 18** : L'aptitude à la callogenèse chez la variété Ahchichen dans les deux milieux de culture MS et CP.





**Figure 19:** Aspect des cals produits par la variété Amellale après deux mois de culture observé sous loupe : a, b , c, d dans le milieu  $MSI_3$  G : 10x .

E, f aspect des cals produits par la variété Amellale après deux mois de culture observé à l'œil nue dans le milieu  $MSI_3$ (TDZ=0.09ml, NOA=4ml).

### **3 : Comparaison entre l'aptitude à la callogénèse chez deux variétés étudiées :**

Les deux variétés étudiées (AMELLALE & AHCHICHEN) ont répondu à la callogénèse presque dans les mêmes milieux de cultures.

Les meilleures aptitudes à la callogénèse ont été observées chez la variété Amellale.

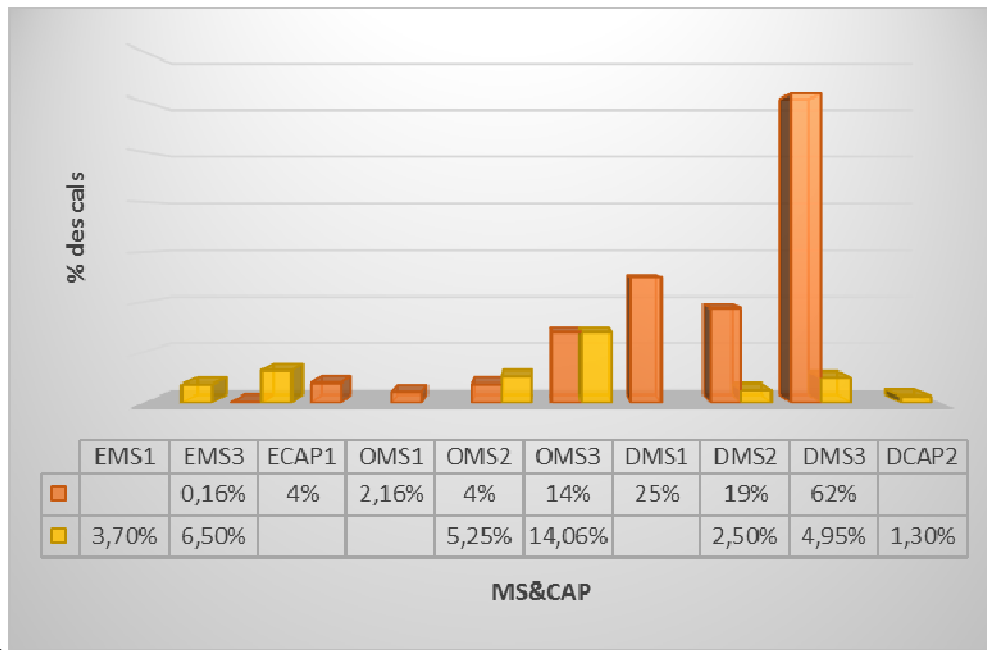
L'induction de la callogénèse chez la variété Amellale est marqué par le meilleure pourcentage obtenu dans le milieu MS3 (demis fleure) avec 61,53% qui est très élevé par rapport à celui obtenu chez la variété Ahchichen 4,95% dans le même milieu.

Le meilleure pourcentage de callogénèse pour la variété Ahchichen a été enregistré dans le milieu MSI3 (ovaire) avec 14,06% ; qui est le même avec celui obtenus par la variété Amellale 14,06% dans le même milieu.

Pour les milieux MSI<sub>1</sub> (ovaire) ; MSI1 (demis f) ; MS2 (DF) ; MS3 (DF) ; CAP2 (DF), les explants de la variété Amellale ont marqué une aptitude à la callogénèse mieux à celui observé chez les explants de la variété Ahchichen dans les même milieux.

Aucune callogénèse n'a été observé dans les milieux MS1 (ovaire) ; MS1 (DF) concernant les explants de la variété Ahchichen. Contrairement aux explants de la variété Amellale, qui sont marqué par un taux de 2,16% dans le milieu MS1 (ovaire) et 25% dans le milieu MS1 (DF).

Aucune callogénèse n'a été observé dans les milieux CP2 (DF) ; MS1 (étamine) concernant la variété Amellale, marqué par un taux de 1,3% dans le milieu CP2(DF) et 3,7% dans le milieu MS1 (étamine).



■ Ahchichen 
 ■ Amellale

**Figure 20 :** Les taux de callogenèse obtenus chez les deux variétés étudiés dans les deux milieux de culture MS et CP.

## Conclusion :

L'embryogenèse somatique permet d'obtenir des plantules génétiquement identiques à la plante mère. Cette technique consiste à provoqué l'apparition des tissus végétaux mis en culture *in vitro*.

L'embryogenèse somatique génère des embryons dans les divisions cellulaires ou dans les cals.

L'objectif de notre travail est l'apparition de l'embryon sur deux variétés autochtones de la vigne *Vitis Vinifera L* (Amellale est Ahchichen).

La réussite de la culture *in vitro* nécessite la maitrise de toutes ses étapes essentiellement l'asepsie, c'est pour cela nous avons essayé de rechercher une meilleure méthode de désinfection en utilisant une solution d'alcool 70°, et une solution d'hypochlorite de sodium à 7%.

La meilleure méthode de désinfection est le passage rapide des explants dans la solution d'alcool 70% ; puis le trempage de ces derniers dans la solution d'hypochlorite de sodium 7% avec 2gouttes de tween pendant 10 minutes.

Après 2 à 4 semaines de la culture initiale, certains explants des deux variétés ont produits des cals friables de couleur blanchâtre ou verdâtre, le pourcentage d'explants callogenèses diffère selon les génotypes et les milieux de culture utilisé.

Les meilleures aptitudes à la callogenèse et la taille importante des cals ont été observées chez la variété Amellaledans le milieu MSI<sub>3</sub>(TDZ=0.09ml, NOA=4ml) avec un taux de 61.53 % (demis fleur).

Les plus faibles pourcentages de callogénèse sont obtenus avec un taux de 0.6 % dans le milieu MSI<sub>3</sub>(les étamines); 1.3 % dans le milieu CP<sub>2</sub>(NOA=1ml, BAP=1ml).

La maitrise de tous les étapes de l'embryogénèse somatique par la culture *in vitro* permettra à la préservation et à la valorisation de notre patrimoine de la vigne algérienne.

## Références bibliographique

---

- Adam-Blondon AF, Roux C, Claux D, Butterlin G, Merdinoglu D, This P. 2004. Mapping 245 ssr markers on the vitisvinifera genome: A tool for grape genetics. TAG Theoretical and Applied Genetics 109(5): 1017-1027.
- Auger et al ; 1989. « La culture in vitro et ses application horticoles). Technique et documentation Lavoisier ;1989, paris p 48,49.
- Baggiolini M, 1952. Les stades repères dans le développement annuel de la vigne et leur utilisation pratique. Revue Romande d'Agricultures et d'Arboriculture 8, 4-6
- Bergman ;L ;1960.Growth and division of Signale cells af higher plants in vitro.3.Gen.Pysiol.43.
- Bouquet A, Boursiquot JM. 1999. La sauvegarde des vieux cépages et la création de variétés nouvelles: Une démarche conjointe pour concilier tradition et innovation en france. PAV 72(825-26): 753-761
- Boursiquot JM, Audeguin L, Charmont S, Desperrier JM, Dufour MC, Jacquet O, Lacombe T, LeguayM,Moulliet C, Ollat N, Schneider C, Serreno C. 2007. Catalogue des varietes et clones de vignes cultives en france. InstitutFrancais de la Vigne et du Vin 2
- Boursiquot JM, Dessup M, Rennes C. 1995. Distribution of the main phenological, agronomical and technological characters of vitis-vinifera l. Vitis 34(1): 31 - 35.
- Briggs W B.;1964;phototropis; in higher plants in physiology academic press P223

## Références bibliographique

---

- **Carimi.F,2005. Somatic Embryogenesis Protocol: citrus.In : Protocol for somatic Embryogenesis in woody plants . springer (eds), p 115-128.**
- **Carimi . F, et de Pasquale .F, 2003, Micropropagation of citrus. Micropropagation of woody tree and fruits. Kluwver Academic Publishers.P 840.**
- **CAROLUS M., Recherche sur l'organogénèse et l'évolution morphologique du bourgeon latent de la vigne (Vitis vinifera L. var Merlot), Bordeaux, 1970**
- **CHAMPAGNOL F., Eléments de physiologie de la vigne et de viticulture générale, Champagnol,1984**
- **Edwards A, Caskey CT. 1991. Closure strategies for random DNA sequencing. Methods 3: 41 - 47.**
- **Eichhorn KW, Lorenz HK, 1977. PhäenologischeEntwicklungsstadien der Rebe. Nachrichtenblatt der DeutschePflanzenschutzdienstes 29, 119-20**
- **GALET P., Dictionnaire encyclopédique des cépages, Hachette, 2000**
- **GALET P., Précis de viticulture, JF impression, Saint Jean de Vedas, 2000**
- **HUGLIN P. et SCHNEIDER C., Biologie et écologie de la vigne, Tec & doc, Paris, 1998**
- **Hussey; G Stacey ; NJ. ; 1981.In vitro propagation of potato (Solanumtubercurim of potato of photoperiod on in vitro tuberisation of potato. S tubercium. JEA SeabookShirlyn m CD .levey . 1993. Plant cell m tissue and organe culture. P120.**

## Références bibliographique

---

- Jaillon O, Aury JM, Noel B, Policriti A, Clepet C, Casagrande A, Choisne N, Aubourg S, Vitulo N, Jubin C, Vezzi A, Legeai F, Huguency P, Dasilva C, Horner D, Mica E, Jublot D, Poulain J, Bruyere C, Billault A, Segurens B, Gouyvenoux M, Ugarte E, Cattonaro F, Anthouard V, Vico V, Del Fabbro C, Alaux M, Di Gaspero G, Dumas V, Felice N, Paillard S, Juman I, Moroldo M, Scalabrin S, Canaguier A, Le Clainche I, Malacrida G, Durand E, Pesole G, Laucou V, Chatelet P, Merdinoglu D, Delledonne M, Pezzotti M, Lecharny A, Scarpelli C, Artiguenave F, Pe ME, Valle G, Morgante M, Caboche M, Adam-Blondon AF, Weissenbach J, Quetier F, Wincker P. 2007. The grapevine genome sequence suggests ancestral hexaploidization in major angiosperm phyla. *Nature* 449: 463 - 467. 12-Feb-2010.
- Karp A ; Nelson R.S; Thomas F, Bright S; W; J; ; 1982; chromosomes; protoplast derived potato plants; *Theor. Appl. Génét.*; p63.
- Lacombe T. 2009. Historique du domaine de vassal <http://www1.montpellier.inra.fr/vassal/index.html>
- Laucou V, Lacombe T, Dechesne F, Siret R, Bruno JP, Dessup M, Dessup T, Ortigosa P, Parra P, Roux C, Santoni S, Varès D, Péros JP, Boursiquot JM, This P. 2011. High throughput analysis of grape genetic diversity as a tool for germplasm collection management. *TAG Theoretical and Applied Genetics* 122(6):1233-1245
- LE.C.L; Thomas, D; Nowbuth; L; .2002; conservation des pommes de terre in vitro et caractérisation des variétés cultivées en Suisse; *Suisse Agric* P34.
- Levadoux L. 1956. Les populations sauvages et cultivées de vitisvinifera l. *Ann Amélioration des plantes* 6: 59-118.

## Références bibliographique

---

- **Margara J ;1989. Base de la multiplication végétatives. les méristèmes et l'organogénèse. Institut national de la recherche Agronomique**
- **Meier U, 2001. Grapevine. Growth stages of mono- and dicotyledonous plants. Berlin, Allemagne.**
- **MORRISON J. C., Bud development in Vitisvinifera L, Botanical Gazette (Chicago), 152 (3), 1991**
- **MULLINS M. G., BOUQUET A. and WILLIAMS L. E., Biology of grapevine, Cambridge, 1992**
- **Nozron et Bancihon,1972; les cultures in vitro en tant que technique pour l'approche poses par l'amélioration des plantes. In Ann. Amélioration. plantes 22 (2). Page 167.**
- **OchetteC .;2005;growth;quality and biotechnology,WPP.publisher.Finland.**
- **Ochatt et al in « Crops : growth, quality and biotechnology », 2005, WFL Publisher, Finland**
- **Pouget R. 1990. Histoire de la lutte contre le phylloxéra de la vigne en france : 1868-1895. Institut national de la rechercheagronomique**
- **Robert D. Dumas C; Bayon C.,1998. La reproduction. Edt. Doun initiatives santé p373.**
- **SheparidJ.;1982; la regenerations in vitro des plantes de pomme de terre pour la science; Juillet ; 34.**



## Références bibliographique

---

- **Simonin G., INRA-Dijon : La culture in vitro. Dossier de synthèse. 2006.**
- **Smith R.H ,Bhaskaran S, Miller F.R. ;1985. Screening for drought tolerance in sorghum activity: localization using cell culture. In vitro cell. Dev.Biol.541.**
- **Valleau WD. 1916. Inheritance of sex in the grape. The American Naturalist.**
- **VIALA P. and VERMOREL V., Ampélographie, Masson, Paris, 1910**
- **Williams E.G ;Maheshuan G. ; 1986.Somatic embryogenesis: factors influencing coordinator behavior of cell as an embryonic group.Ann.Botany.P57.**
- **Zryd.J.P.,1988,cultures des cellules; tissus et organes végétaux; éditions presse polytechnique romande ;308p.**

### **Sites:**

**<http://www.inra.fr/chercheurs.etudiants/biotechnologies>.**

**<http://www.gnis.pedagogie.org/>.**

**<http://www.universalis.fr/encyclopedie>.**

**<http://www.genoscope.cns.fr/>**

↑ a, b, c, d, e, f et g Définitions lexicographiques et étymologiques de « vigne » (sens ongle « vigne1 », B, 2) du Trésor de la langue française informatisé, sur le site du Centre national de ressources textuelles et lexicales (consulté le 7 février 2016)

## *ANAXE I :*

### I-Matériels utilisés :

#### I-1 : Culture in vitro

##### I-1-1 :préparation de milieu :

- Erlenmeyers 50,100,250 ,500ml.
- Béchers :50,100,250,500.
- Pipettesgraduées :5,10,25ml.
- Eprovettes :250,500,1000ml.
- Fioles jaugées :100,250ml.
- Entonnoirs en verres.
- Agitateurs magnétique.
- Balance magnétique.
- Balance.
- Autoclave.
- Eau distillée.
- Milieu MS.
- Milieu CAP.
- Saccharose.
- Agar.
- Récipients de culture :  
Tubes de verres pyrex.  
Toutes sortes de flacons, bouteilles.

##### I-1-2 : Mise en culture :

- Pinces.
- Bec bunsen.
- Une grande quantité des fleurs de Vitis Vinefera.
- Hôte à flux laminaire.

### I-1-3/ Produits d'utilisation courante :

- Ethanol 70°.
- Hypochlorite de sodium.
- EAU de javel.
- Cotton.
- Papier aluminium.
- Etiquettes autocollantes.
- Parafilm.

**ANNEXE II :****Tableau 05 : Micro-élément du milieu MS selon MURASHIG et SKOOG ,1962 :**

Macro-élément	Composition en g/l
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	0.62
MnSO <sub>4</sub> 4H <sub>2</sub> O	0.169
ZnSO <sub>4</sub> 7H <sub>2</sub> O	0.86
KI	0.083
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> 2H <sub>2</sub> O	0.025
CuSO <sub>4</sub> 5H <sub>2</sub> O	0.0025
CoCl <sub>2</sub> 6H <sub>2</sub> O	0.0025

**Tableau 06 : Macro-élément du milieu MS selon MURASHIG et SKOOG ,1962 :**

Macro-élément	Composition en g/l
NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	16.5
KNO <sub>3</sub>	19
CaCl <sub>2</sub> 2H <sub>2</sub> O	4.4
MgSO <sub>4</sub> 7H <sub>2</sub> O	3.7
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1.7

**Tableau 07: Micro-élément du milieu CAP selon CHEE AND POOL :**

Micro-élément	Composition en g/l
$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0.026
$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	0.025
$\text{H}_3\text{BO}_3$	6.2
$\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	0.85
$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0.25
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	8.6

**Tableau 08 : Macro-élément du milieu CAP selon CHEE AND POOL :**

Macro-élément	Composition en g/l
$\text{KNO}_3$	19
$\text{NH}_4\text{NO}_3$	16.5
$\text{KH}_2\text{PO}_4$	1.7
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	1.806
$\text{Ca}(\text{NO})_2$	4.923