

**UNIVERSITE DE BLIDA 1**

**Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie**

**Département de Biologie et Physiologie Cellulaire**

**MEMOIRE DE MAGISTER**

En Biologie

Spécialité : Biotechnologie Végétale

**ESSAIS DE DETERMINATION DES CONDITIONS OPTIMALES DE**

**LA CALLOGENESE DE L'ARGANIER (*Argania spinosa* L. SKEELS)**

Par

**Nassima AIZER**

Devant le jury composé de :

HAMAIDI Mohand Said	Maître de conférences (A)	Université de Blida1	Président
BELHADJ Safia	Professeur	Université de Djelfa	Examinatrice
CHAOUCH FatmaZohra	Maître de conférences (A)	Université de Blida1	Examinatrice
CHAOUIA Cherifa	Maître de conférences (A)	Université de Blida1	Promotrice

Blida, Jui 2015

## ملخص

الأركان *Argania spinosa* شجرة مستوطنة جزائرية - مغربية من عائلة سبوتسيا نوع غابي ذو أهمية بيئية واقتصادية كبيرة, يواجه هذا النوع عدة مشاكل من الإتلاف وصعوبة التجديد بالتقنيات التقليدية, تكاثر الأركان بتقنية بيوتكنولوجيا من الممكن أن تكون أفضل بديل.

إنتاش بذور الأركان المنقوعة لمدة 5 دقائق في ماء جافيل ذو تركيز 8°, في وسط زرع ماء معدني مضاف إليه الأجار, أعطى أفضل النتائج.

فيما يخص تحسين زراعة الأنسجة ونمو Les cals , أفضل النتائج المتحصل عليها كانت بزراعة عضو ما بين العقود في الظلام داخل وسط الزرع MS مضاف إليه 0,5 ملغ/ل من BAP , 0,5 ملغ/ل من 2,4-D , 0,5 غ من الكربون النشط و 0,1 غ من حمض الأسكوربيك, حيث تحصلنا على نسبة تكلد مرتفعة 86,66% مع سرعة معتبرة في نمو Les cals المقدره بالوزن الطازج الذي تطور من 69,13 ملغ إلى 167,10 ملغ بعد أربعة أشهر و من 100,3 ملغ إلى 1142,3 ملغ بعد مرور ستة أشهر فوق وسط الزرع MS6 المكون من MS مضاف إليه 0,5 ملغ/ل من BAP , 0,5 ملغ/ل من 2,4-D و MS6 المثالي المكون من MS6 و مضادات الأكسدة , بالترتيب.

بالنسبة لمرحلة التطور الجنى الجسدي, فإننا نجحنا في الحصول على أجنة جسدية بعد شهرين فقط من الزرع في معلق خلوي و لآكن تطورها توقف في المرحلة الكروية.

أما بالنسبة ل microbouturage تبين أن استعمال 1 ملغ/ل من KIN + 0,5 ملغ/ل من AIA جد ملائمة للتبرعم 100%, إضافة 1,5 ملغ/ل من GA3 لوسط الزرع مكن بتطويل الشتيلات (5 سم) حيث نجحنا بنسبة 50% في تجذيرها فوق وسط الزرع MS/2 المضاف إليه 1 ملغ/ل من AIB , 1 ملغ/ل من ANA و 0,5 غ من الكربون النشط, حيث بلغ متوسط طول الجذور 4,3 سم و في الأخير قمنا بوضع الشتيلات المتحصل عليها للتأقلم.

**كلمات المفتاح:** الأركان, إنتاش, زراعة الأنسجة, تكلد, التطور الجنى الجسدي, التكاثر.

## RESUME

L'Arganier (*Argania spinosa* L. Skeels) arbre endémique Algéro-marocain, de la famille des sapotacées. C'est une essence forestière à grand intérêt écologique et économique. Il est confronté aux problèmes de dégradation et de difficulté de régénération par les techniques traditionnelles. Le recours à la multiplication par voie biotechnologique pourrait pallier à ce problème.

La germination des amandes d'arganier préalablement trempées pendant **5 mn** dans le **NaClO** à **8°** sur milieu eau-gélosée donne de meilleurs résultats.

L'optimisation de culture des tissus (callogenèse) montre que les meilleurs résultats sont obtenus à partir d'entre-nœuds mis en culture, à l'obscurité, sur le milieu MS additionné de BAP et de 2,4-D à concentration égale de 0,5mg/l, de 0,5g de charbon actif et de 0,1g d'acide ascorbique. Le taux obtenu de callogenèse a atteint **86,66%** avec une croissance importante de la masse callogène, estimé par le poids frais des cals, qui passe de **69,13 mg** à **167,10 mg** après 4 mois et de **100,3mg** à **1142,3mg** après 6 mois de mise en culture sur milieu **MS6** (MS contenant 0,5mg/l **2,4-D** et 0,5mg/l **BAP**) et **MS6 optimisé** (MS6+ antioxydants) respectivement.

Des embryons somatiques sont obtenus, après seulement deux mois de culture en suspension cellulaire, mais leur développement s'est achevé au stade globulaire.

L'utilisation de la combinaison (1mg/l **Kin** ; 0,5mg/l **AIA**) pour le microbouturage est favorable au débourrement des bourgeons avec un taux de **100%**. L'adjonction de 1,5mg/l de **GA3** au milieu de culture (**MS**) permet un allongement de **5cm** des vitro-plants d'arganier. L'enracinement est réussi sur milieu MS/2 contenant 1mg/l **AIB**, 1mg/l **ANA** et 0,5 g de charbon actif avec un taux de **50%** et une longueur moyenne des racines de **4,3 cm**. Les vitro-plants obtenus sont acclimatés sous serre.

**Mots clés :** *Argania spinosa* (L.), germination, callogenèse, embryogenèse somatique, microbouturage.

## ABSTRACT

The argan (*Argania spinosa* L. Skeels) endemic tree Algerian-Moroccan of the family Sapotaceae, is an important essence with great ecological and economic interest, this species is facing the problems of degradation and difficulty of regeneration by traditional techniques. The multiplication of the argan through biotechnology could be a better solution.

The germination of argan almonds soaked for **5** minutes in the **NaClO 8 °** on water agar medium gives better results.

The tissue culture optimization (callus) shows that the best results are obtained from the internodes cultured in the dark on **MS** medium supplemented with **BAP** and **2,4-D** concentration equal 0.5 ml / l, 0.5 g of activated carbon and 0.1 g of ascorbic acid. The resulting rate of callus reached **86.66%**, with a significant growth rate of the exhibiting callus mass estimated by the fresh weight of callus, which increased from **69.13 mg** to **167.10 mg** after 4 months and from **100,3mg** to **1142, 3mg** after 6 months of cultivation on environment **MS6** (MS + 0,5mg/l **2,4-D** et 0,5mg/l **BAP**)and **MS6 optimized** (MS6+antioxydants) respectively.

Somatic embryos are obtained after only two months of cell suspension culture, but their development was completed at the globular stage.

The use of the combination (1mg / l **Kin**; 0.5 mg / l **AIA**) for micropropagation is favorable to the clear from the bubs with a rate of **100%**. The addition of 1.5 mg/l from **GA3** to the culture medium (**MS**) allows good elongation of argan vitroplants (**5cm**), as regards the rooting medium was achieved on MS/2 containing 1mg/l **AIB**, 1 mg/l **ANA** and 0.5 g of activated carbon with a rate of **50%** and an average length of the roots of **4,3** cm these vitro-plants were acclimated.

**Key words:** *Argania spinosa* (L.), germination, callus, somatic embryogenesis, micropropagation.

## REMERCIEMENTS

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

**Mme. CHAOUIA C**, maitre de conférences à l'université de 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 de Blida1, pour son aide à identifier les coupes histologiques.

Mes vifs remerciements vont aussi au membre de jury :

**Mr. HAMAIDI M/S**, maitre de conférences à l'université de Blida1, pour l'honneur qu'il me fait en acceptant de présider le jury.

**Mme. BELHADJ S**, professeur à l'université de Djelfa, d'avoir accepté d'examiner ce travail.

**Mme. CHAOUCH F/Z**, maître de conférences à l'université de Blida1, d'avoir accepté d'examiner ce travail. Que je la remercie particulièrement pour son aide technique.

Je tiens à exprimer mes sincères gratitude 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.

Mes remerciements vont aussi aux enseignants de biologie et mes collègues de promotion.

Enfin, ce travail n'aurait pas été mené à terme sans les concessions et les encouragements de tous ceux qui m'ont aidé de près ou de loin à réaliser ce travail, auxquels je dis tout simplement **MERCI**.

## DEDICACES

*Je dédie ce modeste travail réalisé grâce à DIEU tout puissant*

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

**A** *mon 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** *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	1
RESUME	2
ABSTRACT	3
REMERCIEMENTS	4
DEDICACES	5
TABLE DES MATIERES	6
LISTE DES ILLUSTRATIONS, GRAPHIQUES ET TABLEAUX	10
LISTE DES ABREVIATIONS ET SYMBOLES UTILISES	13
INTRODUCTION	14
CHAPITRE 1 : SYNTHÈSE BIBLIOGRAPHIQUE	16
1.1. GENERALITES SUR L'ARGANIER	16
1.1.1. Historique	16
1.1.2. Aire de distribution géographique	16
1.1.2.1. En Algérie	16
1.1.2.2. Au Maroc	17
1.1.2.3. Introduction de l'arganier dans le monde	17
1.1.3. Origines de l'arganier en Algérie	17
1.1.4. Classification botanique de l'arganier	18
1.1.5. Biologie de l'arganier	18
1.1.5.1. Bois	19
1.1.5.2. Racines	19
1.1.5.3. Rameaux	20
1.1.5.4. Feuilles	20
1.1.5.5. Fleurs	21
1.1.5.6. Fruit	21
1.1.6. Exigences écologiques	24
1.1.6.1. Température	24
1.1.6.2. Sol	24
1.1.7. Importance écologique et économique de l'arganier	24
1.1.7.1. Ecologique	24
1.1.7.2. Socio-économique	24
1.1.7.3. Biodiversité	25
1.1.8. Diversité génétique et multiplication de l'arganier	25
1.2. CULTURE <i>IN VITRO</i>	26
1.2.1. Fondement de la culture <i>in vitro</i>	26
1.2.2. Callogenèse	27
1.2.2.1. Principes fondamentaux de la callogenèse	28
1.2.2.2. Balance hormonal	28
1.2.3. Catégories de la culture <i>in vitro</i>	29
1.2.3.1. Culture <i>in vitro</i> conforme	29
1.2.3.2. Culture <i>in vitro</i> non conforme	29
1.2.3.3. Culture des protoplastes	29
1.2.4. Voies de la culture <i>in vitro</i>	29

1.2.4.1. Multiplication par bourgeonnement	29
1.2.4.2. Multiplication par bourgeonnement adventif	31
1.2.4.3. Embryogenèse somatique	31
1.2.4.3.1. Origine de l'embryogenèse somatique	32
1.2.4.3.2. Induction de l'embryogenèse somatique	33
1.2.5. Culture <i>in vitro</i> d'arganier	34
1.2.6. Besoins nutritifs des tissus cultivés en conditions aseptiques	36
1.2.6.1. Milieux de culture	36
1.2.6.1.1. Sels minéraux	36
1.2.6.1.2. Substances organiques	37
1.2.6.1.3. Régulateurs de croissance	37
1.2.6.1.4. Produit naturel complexe	38
1.2.6.2. Facteurs physiques de l'environnement des cultures <i>in vitro</i>	38
1.2.7. Avantages et inconvénients de la culture <i>in vitro</i>	39
1.2.7.1. Avantages de la culture <i>in vitro</i>	39
1.2.7.2. Inconvénients de la culture <i>in vitro</i>	39

## CHAPITRE 2 : MATERIEL ET METHODES 40

2.1 Matériel végétal utilisé	42
2.2. Préparation des solutions	42
2.2.1. Solutions hormonales	42
2.2.2. Milieux de culture utilisés	42
2.2.3. Milieu de culture final	43
2.3. Germination	43
2.3.1. Pouvoir germinatif	43
2.3.2. Désinfection des graines	44
2.3.3. Milieu de germination	44
2.3.4. Mise en culture	44
2.3.5. Paramètres mesurés	45
2.4. Induction de la callogenèse	46
2.4.1. Milieu de callogenèse	46
2.4.2. Mise en culture	46
2.4.3. Repiquage et entretien de la masse callogène	47
2.4.4. Paramètres mesurés	47
2.4.5. Optimisation de callogenèse	48
2.4.6. Essai d'induction de l'embryogenèse somatique	49
2.4.6.1. Principe	49
2.4.6.2. Milieu de culture liquide	49
2.4.6.3. Techniques et conditions de culture	49
2.4.6.4. Renouvellement de milieu de culture	50
2.4.6.5. Maturation des embryons somatiques en milieu gélosé	50
2.4.6.6. Paramètre mesurés	50
2.5. Multiplication par microbouturage	51
2.5.1. Milieu de culture	51



2.5.1.1. Milieu d'initiation	51
2.5.1.2. Milieu d'allongement	52
2.5.1.3. Milieu rhizogène	52
2.5.2. Mise en culture	53
2.5.3. Paramètres mesurés	54
2.5.4. Acclimatation	54
2.6. Analyse statistique des résultats	56
CHAPITRE 3 : RESULTATS	57
3.1. Germination	57
3.1.1. Taux de contamination	57
3.1.2. Taux de germination des amandes	59
3.1.3. Effet du traitement et du milieu sur la qualité des pousses	62
3.1.3.1. Effet du traitement sur la hauteur des pousses et le nombre de feuilles	62
3.1.3.2. Effet du milieu sur la hauteur des pousses et le nombre de feuilles	63
3.2. Induction de la callogenèse	66
3.2.1. Réactivité des explants en cal	66
3.2.2. Contamination	66
3.2.3. Brunissement	68
3.2.3.1. Effet du phénomène de brunissement sur le milieu de culture	68
3.2.3.2. Effet du phénomène de brunissement sur le type d'explant	69
3.2.3.2.1. Effet du brunissement sur le type d'explant mis sur milieu MS	69
3.2.3.2.2. Effet du brunissement sur le type d'explant mis sur milieu Gamborg	70
3.2.3.3. Effet de l'équilibre hormonal sur le phénomène de brunissement	71
3.2.3.3.1. Phénomène de brunissement sur le milieu MS	71
3.2.3.3.2. Phénomène de brunissement sur le milieu Gamborg	72
3.2.4. Aptitude à la callogenèse	73
3.2.4.1. Effet des milieux de culture sur l'induction de callogenèse	73
3.2.4.2. Effet de type d'explant sur l'induction de callogenèse	74
3.2.4.2.1. Callogenèse sur le milieu MS	74
3.2.4.2.2. Callogenèse sur le milieu Gamborg	75
3.2.4.3. Effet de l'équilibre hormonal sur l'induction de callogenèse	76
3.2.4.3.1. Effet de l'équilibre hormonal sur l'induction de callogenèse sur milieu MS	76
3.2.4.3.2. Effet de l'équilibre hormonal sur l'induction de callogenèse sur milieu Gamborg	78
3.2.5. Aspect morphologique des cals	80
3.2.6. Coupes histologiques des cals	82
3.2.7. Entretien de masse callogène	83
3.2.7.1. Reprise de croissance	83
3.2.7.2. Croissance de la masse callogène	83

3.2.7.2.1.Effet du milieu de culture sur la croissance de cal	83
3.2.7.2.2.Effet de l'équilibre hormonal sur la croissance des cals	84
3.2.7.2.2.1. Milieu MS au 4 <sup>ème</sup> mois	84
3.2.7.2.2.2. Milieu MS au 6 <sup>ème</sup> mois	85
3.2.7.2.2.3. Milieu Gamborg au 4 <sup>ème</sup> mois	87
3.2.7.2.2.4. Milieu Gamborg au 6 <sup>ème</sup> mois	88
3.2.8. Optimisation de la callogenèse	90
3.2.9. Embryogenèse somatique	91
3.2.9.1. Aspect morphologique de la suspension cellulaire	91
3.2.9.2. Développement des embryons somatiques en milieux gélosés	93
3.3. Multiplication par microbouturage	93
3.3.1.Phase d'initiation	93
3.3.1.1.Taux de débourrement	93
3.3.1.2. Développement des vitro-plants	94
3.3.1.2.1.Longueur	94
3.3.1.2.2.Nombre de bourgeons	95
3.3.1.2.3.Nombre de feuilles	96
3.3.2.Phase d'allongement	98
3.3.3.Phase de rhizogenèse	99
3.3.3.1.Taux d'enracinement	99
3.3.3.2.Longueur des racines	99
3.3.4.Acclimatation	101
3.3.5.Coupes histologiques des plantules	101
3.3.5.1.Entre-nœuds	101
3.3.5.2.Feuilles	103
3.3.5.3.Racines	104
CHAPITRE 4 : DISCUSSION	105
4.1. Germination	105
4.2. Induction de la callogenèse	106
4.3. Multiplication par microbouturage	112
CONCLUSION	115
ANNEXES	117
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	140

## LISTE DES ILLUSTRATIONS, GRAPHIQUES ET TABLEAUX

Figure 1.1	Aire de répartition de l'arganier en Algérie	17
Figure 1.2	Comparaison des plants d'arganier	20
Figure 1.3	Fruit de l'arganier	22
Figure 1.4	Vue générale d'un arbre et ses organes	23
Figure 1.5	Représentation schématique de différentes voies d'évolution cellulaire	27
Figure 1.6	Equilibre entre auxines et cytokinines déterminant l'orientation de l'organogenèse en culture <i>in vitro</i>	28
Figure 1.7	Origine des embryons somatiques	33
Figure 1.8	Etapas de culture <i>in vitro</i> de <i>Argania spinosa</i>	35
Figure 2.1	Aspect morphologique de différentes parties de l'arganier	41
Figure 2.2	Protocole expérimental adopté lors de l'expérimentation	55
Figure 3.1	Développement des contaminations	57
Figure 3.2	Taux de contamination des amandes	58
Figure 3.3	Etapas chronologiques de la germination des amandes de l'arganier	60
Figure 3.4	Taux de germination des amandes d'arganier	61
Figure 3.5	Effet des traitements testés sur la hauteur des pousses	62
Figure 3.6	Effet des traitements testés sur le nombre de feuilles	63
Figure 3.7	Effet du milieu sur la hauteur des pousses	64
Figure 3.8	Effet du milieu sur le nombre de feuilles	65
Figure 3.9	Developpement d'un cal	66
Figure 3.10	Contamination des explants	67
Figure 3.11	Pourcentage de contamination	67
Figure 3.12	Brunissement des cals issus de feuilles cotylédonaires sur milieu MS	68
Figure 3.13	Pourcentage du brunissement sur les milieux de base	69
Figure 3.14	Effet de brunissement sur le type d'explant (Milieu MS)	70
Figure 3.15	Effet de brunissement sur le type d'explant (Milieu Gamborg)	71
Figure 3.16	Effet de l'équilibre hormonal sur le brunissement sur milieu MS	72
Figure 3.17	Effet de l'équilibre hormonal sur le brunissement sur milieu Gamborg	72
Figure 3.18	Pourcentage de callogenèse sur les deux milieux	74
Figure 3.19	Effet de type d'explant sur l'induction de callogenèse (Milieu MS)	74
Figure 3.20	Effet de type d'explant sur l'induction de callogenèse (Milieu Gamborg)	75
Figure 3.21	Effet de l'équilibre hormonal sur la callogenèse (Milieu MS)	77
Figure 3.22	Effet de l'équilibre hormonal sur la callogenèse (Milieu Gamborg)	78
Figure 3.23	Aspect des cals obtenus	81
Figure 3.24	Coupes histologiques au niveau d'un cal secondaire (3 <sup>ème</sup> subculture) d' <i>Argania spinosa</i>	82
Figure 3.25	Poids frais des cals en fonction des milieux de base	84
Figure 3.26	Poids des cals en fonction d'équilibre hormonal (Milieu MS/ 4 <sup>ème</sup> mois)	85

Figure 3.27	Poids des cals en fonction d'équilibre hormonal (Milieu MS/ 6 <sup>ème</sup> mois)	86
Figure 3.28	Poids des cals en fonction d'équilibre hormonal (Milieu Gamborg/ 4 <sup>ème</sup> mois)	88
Figure 3.29	Poids des cals en fonction d'équilibre hormonal (Milieu Gamborg/ 6 <sup>ème</sup> mois)	89
Figure 3.30	Evolution de poids des cals avant et après l'optimisation	91
Figure 3.31	Aspect morphologique de différentes formes issues de la suspension cellulaire	92
Figure 3.32	Taux de débourrement des bourgeons chez <i>Argania spinosa</i> L. en fonction du traitement hormonal	94
Figure 3.33	Effet de l'équilibre hormonal sur la hauteur moyenne des vitro-plants	95
Figure 3.34	Effet de l'équilibre hormonal sur le nombre moyen des bourgeons	96
Figure 3.35	Effet de l'équilibre hormonal sur le nombre moyen des feuilles des vitro-plants	96
Figure 3.36	Aspect des vitro-plants d' <i>Argania spinosa</i> L	97
Figure 3.37	Effet de GA3 sur la longueur des vitro-plants d' <i>Argania spinosa</i> L	98
Figure 3.38	Aspect des vitro-plants d' <i>Argania spinosa</i> (L.) après l'ajout de GA3	98
Figure 3.39	Effet de l'équilibre hormonal sur l'enracinement des vitro-plants	99
Figure 3.40	Effet de l'équilibre hormonal sur la longueur moyenne des racines	100
Figure 3.41	Aspect morphologique des vitro-plants enracinés	100
Figure 3.42	Vue de haut des plantules acclimatées	101
Figure 3.43	Coupe transversale d'entre-nœuds	102
Figure 3.44	Coupe transversale au niveau de feuille <i>in vitro</i> d'arganier	103
Figure 3.45	Coupe transversale au niveau d'une racine <i>in vitro</i> d'arganier	104
Tableau 2.1	Type de régulateurs de croissance et leur solubilité	42
Tableau 2.2	Conditions de désinfection des graines à l'hypochlorite de sodium	44
Tableau 2.3	Equilibres hormonaux testés sur les différents explants d'arganier	46
Tableau 2.4	Nombre d'explants par traitement et par milieu de culture testé	47
Tableau 2.5	Milieu liquide d'induction de l'embryogenèse somatique	48
Tableau 2.6	Balance hormonale du milieu d'initiation à la micropropagation/MS	51
Tableau 2.7	Concentrations testées pour le milieu d'allongement	52
Tableau 2.8	Concentration testées pour le milieu rhizogène	53
Tableau 3.1	Test Newman et Keuls : Hauteur des pousses/traitement	62
Tableau 3.2	Test Newman et Keuls : Nombre de feuilles/traitement	63
Tableau 3.3	Test Newman et Keuls : Hauteur des pousses/milieu	64

Tableau 3.4	Test Newman et Keuls : Nombre de feuilles/milieu	65
Tableau 3.5	Effet de milieu de base sur le nombre moyen des cals affectés	69
Tableau 3.6	Test Newman-Keuls: Effet de brunissement sur le type d'explant/MS	70
Tableau 3.7	Test Newman-Keuls: Effet de brunissement sur le type d'explant/Gamborg	71
Tableau 3.8	Effet de milieu sur l'induction de callogenèse	73
Tableau 3.9	Test Newman-Keuls : Effet de type d'explant sur l'induction/MS	75
Tableau3.10	Test Newman-Keuls : Effet de type d'explant sur l'induction/Gamborg	76
Tableau3.11	Test Newman et Keuls : Effet de l'équilibre hormonal/ MS	78
Tableau3.12	Test Newman et Keuls : Effet de l'équilibre hormonal/ Gamborg	79
Tableau3.13	Aspect des cals en fonction du traitement hormonal	80
Tableau3.14	Effet de milieu de base sur la croissance des cals	83

## 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 indolylbutylique
ANA	: Acide $\alpha$ -Naphthalène-Acétique
2,4-D	: 2,4 Dichlorophénoxyacétique
2 iP	: isopentényladénine
BAP	: BenzylAminoPurine
Kin	: Kinétine
GA3	: Acide Gibbérellique A3
MS	: Murashige et Skoog
G	: Gamborg
ANOVA	: ANalysis Of VAriance
GN	: Gélose Nutritive

## INTRODUCTION

L'Algérie par l'immensité de son territoire et sa richesse en ressources végétales, recèle des espèces dont l'importance écologique et économique lui assure un développement agricole et rural d'une durabilité indéniable [1].

Nonobstant cette importance, ces ressources ne sont guère exploitées de façon appropriée. Les espèces végétales avec toutes les variétés qui les caractérisent, sont peu connues ou en voie d'extinction [1]. Or, la disparition d'une seule espèce végétale peut entraîner la disparition de tout un biotope.

Parmi les espèces menacées, l'arganier, (*Argania spinosa* L. Skeels), unique représentant de la famille des sapotaceae en Algérie et au Maroc. Il joue un rôle très important tant par son intérêt écologique dans le maintien d'écosystème fragilisé par la désertification, que par son intérêt économique. L'arganier est un arbre oléagineux à multi-usages dont chaque partie ou production de l'arbre (bois, feuilles, fruits et huile) est utilisable [2].

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 [3].

L'élaboration d'une stratégie nationale pour la conservation et la lutte contre la disparition de l'espèce en question s'avère indispensable. Elle doit reposer sur la protection et l'intensification du reboisement. Cependant la multiplication végétative traditionnelle pose d'importants problèmes. En effet, les travaux menés sur le bouturage **MOKHTARI et ZAKRI, [4] HARROUNI et al., [5] MOKHTARI et KERBERNES, [6]** montrent que les meilleurs résultats se réalisent sous serre à nébulisation et avec des plants rajeunis, (les boutures donnent des racines après une période très longue (5 mois pour la rhizogenèse et plus 2 mois pour l'acclimatation). Le marcottage a été aussi mis au point mais ce procédé est abandonné car ne répond pas aux besoins d'intensification souhaitée.

Le recours à la multiplication par la culture *in vitro* s'est avéré nécessaire pour préserver cette espèce en voie de disparition. Dans ce contexte s'inscrit notre travail et vise la maîtrise de régénération *in vitro* d'arganier.

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

- Le premier consiste à déterminer les conditions optimales de germination *in vitro* des graines. Cette étape permet d'obtenir des vitro-semis qui seront utilisés pour induire la callogenèse et la micropropagation.
- Le deuxième volet consiste à optimiser les conditions d'induction des cals d'arganier (*Argania spinosa* L.), afin de procéder à des essais d'embryogenèse somatique.
- Le troisième s'articule autour de la recherche des conditions optimales de multiplication *in vitro* d'arganier, par microbouturage.

Une comparaison entre les deux modes de multiplication par microbouturage et embryogenèse somatique sera réalisée.



## CHAPITRE 1

### SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE

#### 1.1. GENERALITES SUR L'ARGANIER

##### 1.1.1. Historique

Les premiers écrits sur l'arganier sont ceux de géographes et médecins arabes qui ont étudié la région de Maghreb [7].

Ibn-Al-Beïtar en 1219 in [8], 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'Epaulaire1956) [8].

A partir seulement de rameaux séchés et sans fleurs, Linné (1737) in [8], donne la description spécifique de son "*Hortus cliffortianus*" sous le nom de *Sideroxylon spinium* L. du genre (*Argania*).

Hösst, (1781) in [8], mentionne l'utilisation de l'huile dans les usines, surtout à Marseille pour la fabrication du savon.

**Gentil**, (1906) in [9] a, précisera l'aire géographique de l'arganier.

En 1998, l'arganeraie a été classé en « Réserve de biosphère » par l'UNESCO [10].

**NOUAIM**, [7] a décrit l'arbre et ses caractéristiques ainsi que ses exigences climatiques.

##### 1.1.2. Aire de distribution géographique de l'arganier

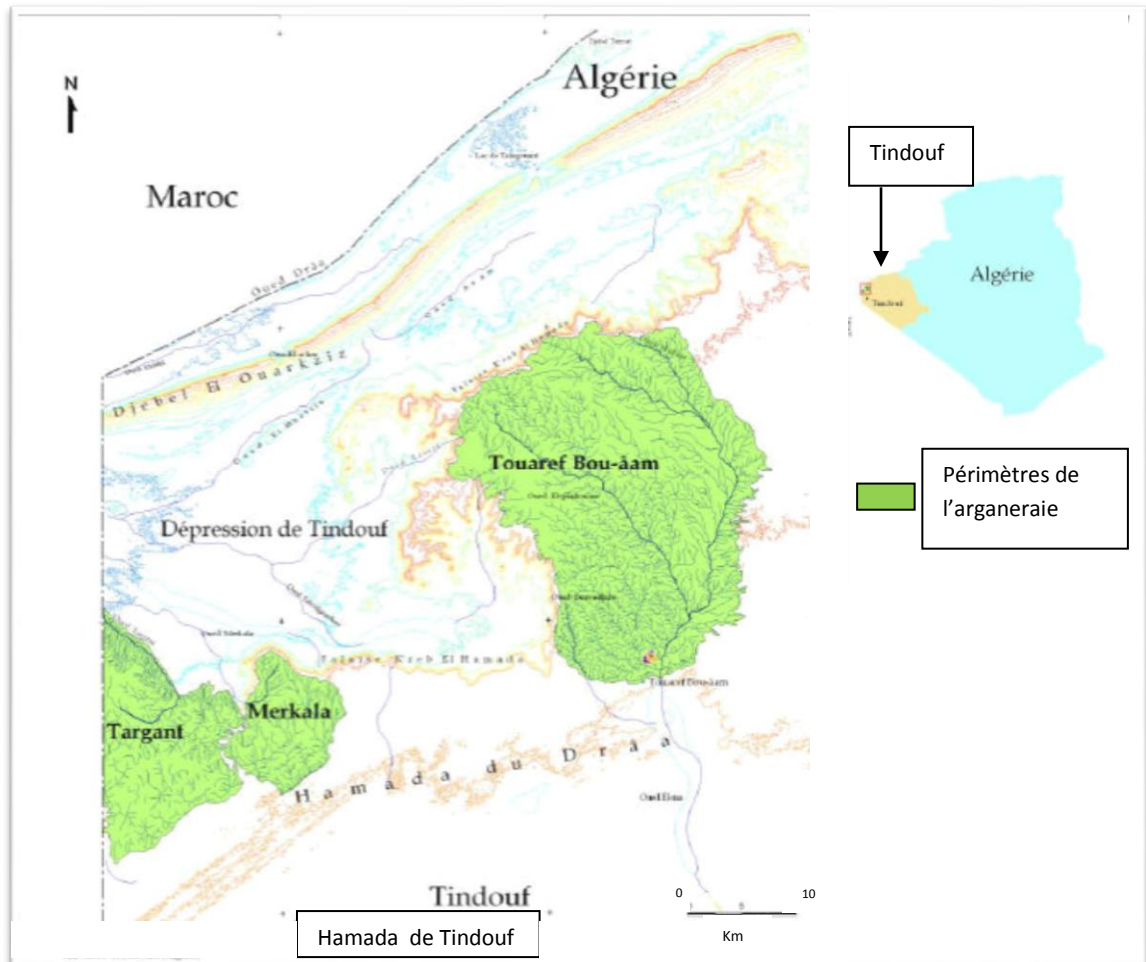
L'Arganier est un arbre de la famille des Sapotaceae (*Argania spinosa* L. Skeels) endémique de l'Algérie [11] [12] et du Maroc [13] [14].

##### 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* [3].

Il forme dans ce territoire (Hamada de Tindouf), des populations dispersées, regroupées selon un mode contracté, le long des berges des oueds où il trouve les compensations hydriques nécessaires (**Figure 1.1**) [3].

A l'époque coloniale, quelques tentatives de plantation de cet arbre a été menées à Mostaganem et à Mascara [15].



**Figure 1.1** : Aire de répartition de l'arganier en Algérie [16]

#### 1.1.2.2. Au Maroc

Au Maroc, Il s'étend sur 828.000 ha [17]. Il est localisé principalement dans le Sud-ouest marocain [7].

#### 1.1.2.3. Introduction de l'arganier dans le monde

Vu l'intérêt qu'il présente sur le plan écologique, certains pays l'ont introduit pour enrichir leur patrimoine forestier. Parmi ces pays: la Hollande (1697), l'Angleterre (1711), la France (1852), les Etats Unis (1927), la Tunisie, la Libye et même la Palestine occupée tentant de l'introduire [18].

### 1.1.3. Origines 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 [3].

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 [3].

### 1.1.4. Classification botanique de l'arganier

L'arganier (*Argania spinosa* L. Skeels) appartient à la famille des Sapotaceae regroupant environ 600 espèces dont *Argania spinosa*, seul représentant de son genre [7]. 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 [19].

Embranchement : Phanérogames  
 Sou embranchement : Angiospermes  
 Classe : Dicotylédones  
 Sous-classe : Gamopétales  
 Ordre : Ebénales  
 Famille : Sapotaceae  
 Genre : *Argania*  
 Espèce : *Argania spinosa* (L.) Skeels.

### 1.1.5. Biologie de l'arganier

Les connaissances sur la biologie de l'arganier étaient limitées [20]. Mais les travaux pluridisciplinaires engagés à la faculté des sciences d'agadir, notamment dans le cadre d'une action intégrée franco-marocaine suivie de diverses actions de coopération entre chercheurs marocains et français, ont permis des avancées décisives dans plusieurs domaines [21].

L'arganier, *Argania spinosa* (L.) Skeels, est un arbre qui peut atteindre 8 à 10 mètres de hauteur (**Figure1.4**). Sa couronne est largement déployée ou dense et arrondie. Le port, variable, peut être dressé ou pleureur. Le tronc est court (2 à 3 mètres), il est tortueux et souvent formé par plusieurs tiges entrelacées.

#### 1.1.5.1. Bois

Le bois de l'arganier (**Figure1.4 A**), est très dur, compact, dense (de densité 0,9 à 1), appelé « bois de fer », sa charge de rupture est de 1250 à 1500 kg par centimètre carré. L'aubier ne constitue qu'une fine bande de couleur jaune claire, les fibres libériennes présentes dans les jeunes rameaux sont peu apparentes à l'état adulte [22].

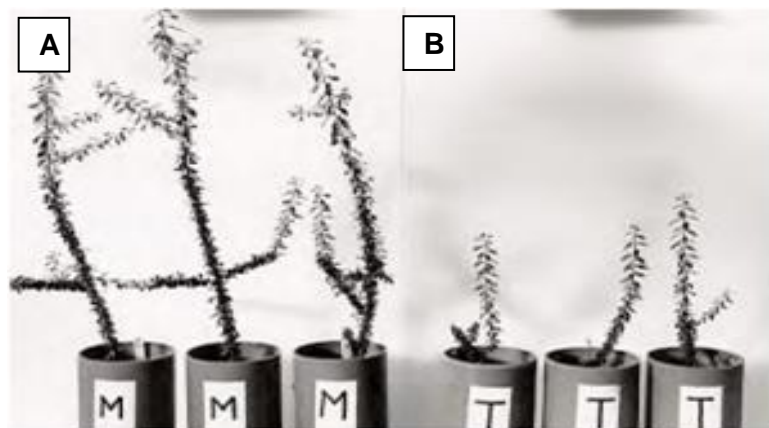
L'âge de l'arganier ne peut être estimé qu'approximativement, en raison de la croissance irrégulière du bois. Les cernes, peu visibles, correspondent à des périodes de végétation et non à des années [23] [24]. Au-delà de 30 ans, la croissance de l'arbre ralentit nettement. L'arganier ayant un tronc de 35 à 40 cm de diamètre correspond à une longévité de 125 à 150 ans, cette dernière est d'ordre de 250 ans [8].

Le bois a des caractéristiques chimiques particulières, il est riche en saponines [25].

#### 1.1.5.2. Racines

L'arganier possède des racines assez profondes de 30 ou 40 mètres de profondeur. Ces arbres se caractérisent par un investissement considérable dans le système racinaire (faible rapport parties aériennes / parties racinaires) (**Figure1.4 B**) [26].

**NOUAIM et al., (1991)** ont pu mettre en évidence pour la première fois une symbiose entre l'arganier et des champignons endophytes spécialisés. Ainsi, 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 (**Figure 1.2**) [9]. L'indice de dépendance mycorhizienne relatif de plants d'arganiers inoculés atteint 80% après 6 mois de croissance dans des conditions contrôlées, en présence d'une nutrition minérale et d'une irrigation convenable [27].



**Figure 1.2** : Comparaison des plants d'arganier [20]

**A** : Plants mycorhisé par *Glomus intraradices*  
**B** : Plants témoins (non mycorhizés)

### 1.1.5.3. Rameaux

Les rameaux sont épineux, d'où le nom d'espèce "*spinosa*"; les épines assurent une certaine défense de l'arbre. (**Figure 1.4 C**). Certaines épines peuvent évoluer en un nouveau rameau, 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 chèvres [28].

#### 1.1.5.4. Feuilles

Les feuilles sont alternées, en forme de spatule ou lancéolées, longues de 2 à 3cm. Elles sont de couleur vert sombre à la face supérieure, plus claire en dessous (**Figure1.4 D**). En période de forte sécheresse, l'arbre perd complètement son feuillage ; cet état peut durer quelques années, les feuilles subpersistantes réapparaissant peu après le retour des pluies **[8]**.

#### 1.1.5.5.Fleurs

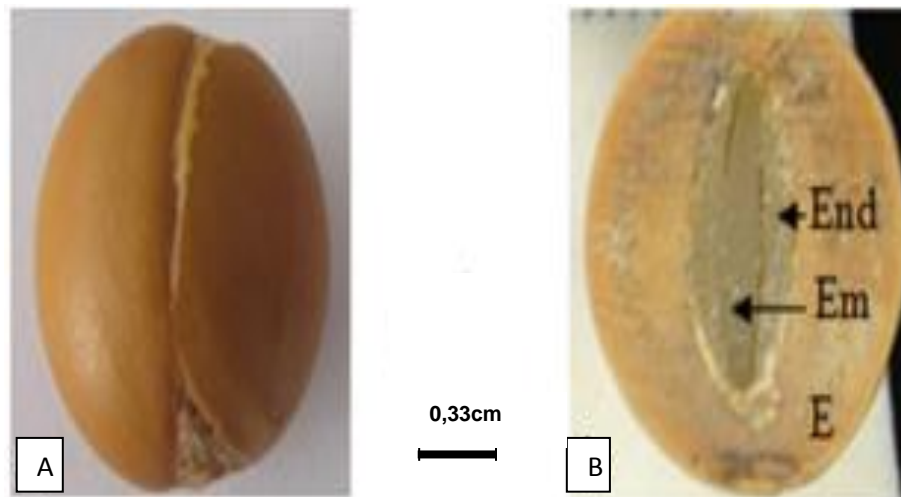
La fleur de l'arganier est minuscule (2 à 4 mm) **[29] [30]**, monoïque, pentamère, constituée en glomérules localisés au niveau des entre-nœuds et à l'aisselle des feuilles et pouvant être composé de 15 fleurs et plus (**Figure1.4 D**) **[29] [31] [32]**.

Chez l'arganier, deux types de floraison sont observées: une floraison pauciflore, peu abondante, sur les rameaux âgés lignifiés ; elle est la première à être observée et une floraison très abondante et plus tardive sur les nouvelles pousses **[31] [33] [34] [32] [35]**.

Les fleurs apparaissent dès la fin du mois de septembre pour les variétés précoces. Pour les variétés tardives, la floraison démarre lentement à partir du mois de décembre. Le pic de la floraison pour les variétés tardives se situe au mois de mars **[36]**.

#### 1.1.5.6.Fruit

Le fruit mûr a la grosseur d'une noix, il est jaune parfois veiné de rouge (**Figure1.4 E, F**). 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 tégument lignifié très épais contenant l'albumen et la plantule (**Figure1.3**) **[8]**. Cette noix représente environ 25 à 50% du poids du fruit frais **[7]**.

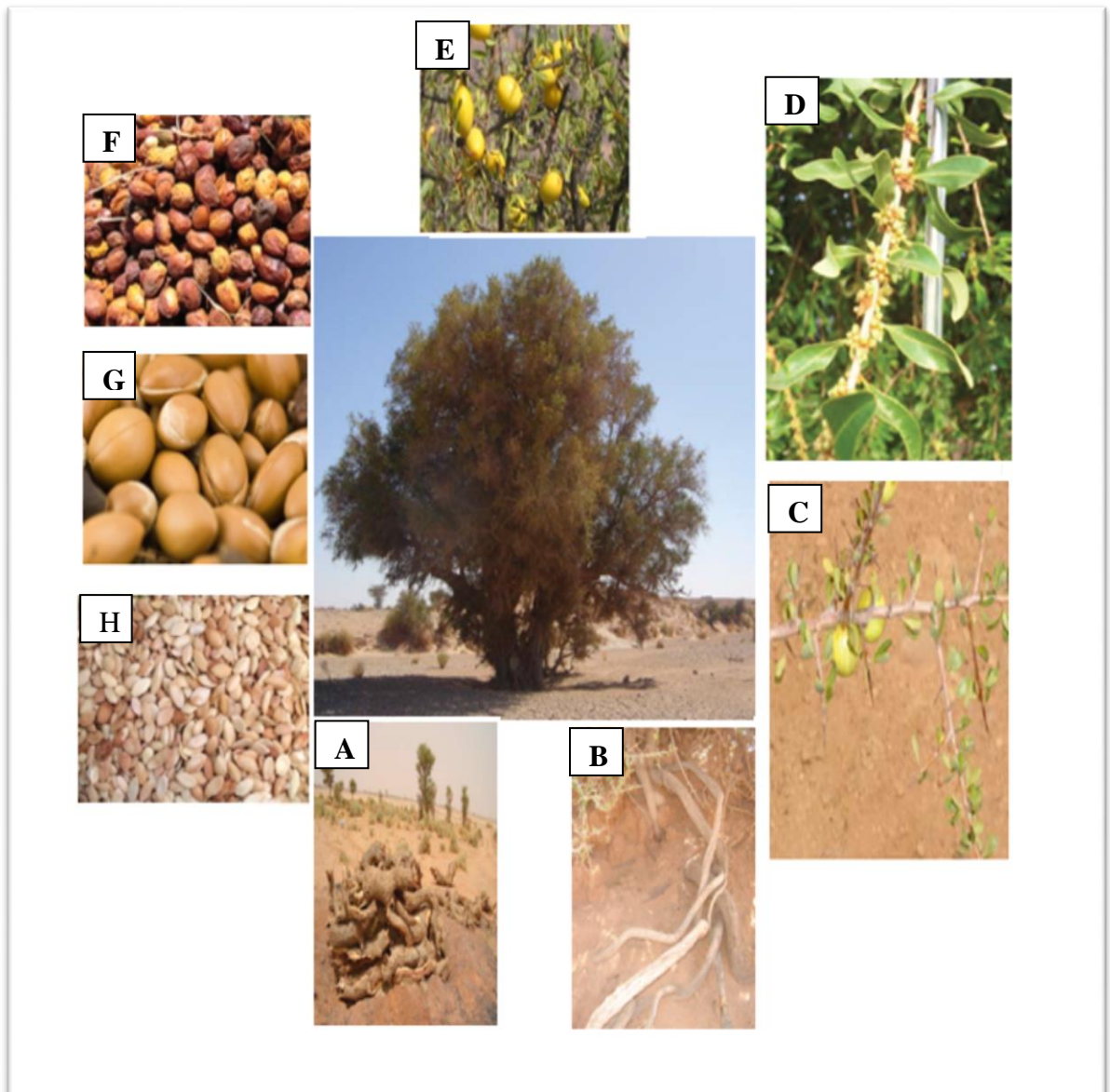


**Figure1.3** :Fruit de l'arganier [37]

**A** : Noix d'argane

**B** :coupe transversale dans la noix montrant un endocarpe (**E**) épais qui entoure l'endosperme (**End**) endosperme abritant l'embryon (**Em**)

La noix (**Figure1.4 G**) contient une à trois amandes albuminées et huileuses (**Figure1.4 H**), et renfermant 50 à 60% de l'huile [7]. Le poids des amandes contenues dans les noix, représente environ 3% du poids du fruit et varie de façon importante [7].



**Figure 1.4** : Vue générale d'un arbre et ses organes

- A** : Bois d'arganier [3]
- B** : Racines magniloïdes de l'arganier [3]
- C** : Rameau d'arganier [3]
- D** : Boutons floraux, fleurs ouvertes, fleurs fécondées [38]
- E**:Fruits d'arganier [39]
- F**:Fruits secs [39]
- G**: Noix d'argane [39]
- H**: Amandes d'arganier [39]



### 1.1.6. Exigences écologiques

#### 1.1.6.1. Température

L'arganier résiste à de grandes amplitudes de température et à l'irrégularité des précipitations, caractéristiques de son aire géographique. L'arganier peut tolérer des températures minimales extrêmes plutôt basses (-2,6°C), tout comme des températures estivales élevées, parfois plus de 50°C. Il réagit aux périodes de sécheresse prolongée en perdant tout ou une partie de son feuillage [7].

#### 1.1.6.2. Sol

**Gentil** (1906) in [9] signale l'indifférence de l'arganier à la nature du sol. En effet, 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, que sur des roches calcaires ou sur des alluvions. Il se développe aussi sur des sols salés. 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.

### 1.1.7. Importances de l'arganier

Le rôle écologique et socio-économique de l'arganier est remarquable dans les milieux subdésertiques. Son importance peut être appréciée sur les plans suivants [3]:

#### 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, dans la région de Tindouf [3].

#### 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 [40].

En effet, le bois est expressément recherché pour sa solidité aussi bien comme bois d'œuvre que comme source d'énergie. Les feuilles sont utilisées comme pâturage pour les chèvres qui, du fait de la morphologie de l'arbre, arrivent à

grimper au niveau des branches supérieures. Ses fruits sont également consommés par les chèvres. La graine est oléagineuse dont l'huile occupe une place soit dans l'alimentation, soit pour les soins en phytothérapie ou encore comme une ressource complémentaire à l'économie des populations qui s'installent [3].

#### 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 bon nombre d'espèces des zones arides de créer leur refuge [3].

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 [41]. Il joue un rôle irremplaçable dans l'équilibre écologique de la région [7].

#### 1.1.8. Diversité génétique et multiplication de l'arganier

L'arganier a résisté jusqu'à maintenant, grâce à sa grande diversité génétique [42] [43] [44].

La multiplication de génotypes économiquement intéressants passe par la multiplication végétative. **NOUAIM et al.**, [45] ont montré qu'il est possible de multiplier l'arganier par bouturage [45]. Ce dernier a été utilisé pour multiplier de nombreux arganiers. Cependant, le taux d'enracinement et la vitesse de croissance du système racinaire s'avèrent très variables et dépendent avant tout du clone multiplié. Des travaux de recherches se sont orientés vers la culture *in vitro*.

## 1.2. CULTURE *IN VITRO*

La culture *in vitro* constitue une voie prometteuse pour la multiplication en masse, par ailleurs, elle contribuerait à la restauration et la régénération rapide de l'écosystème arganeraie.

En effet, la multiplication par organogenèse 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 [46].

En outre, l'embryogenèse somatique, est un second axe de recherche pour le développement de nouveaux protocoles de régénération et de multiplication en masse, tout en exploitant le potentiel des cals embryogènes à la régénération des plants [46].

### 1.2.1. Fondement de la culture *in vitro*

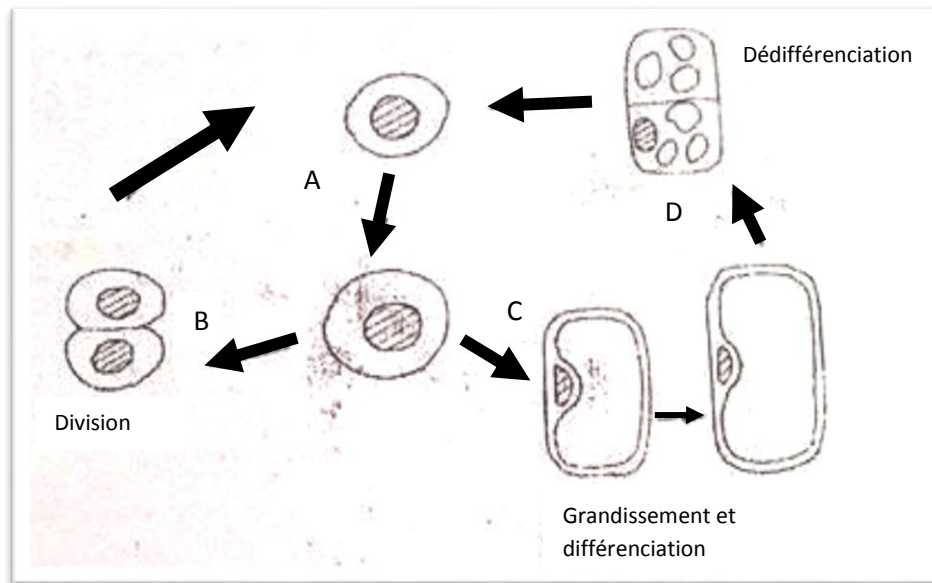
Toute cellule végétale vivante, quelle que soit sa spécialisation, du moment qu'elle est vivante et possède un noyau, est capable de reproduire la plante entière d'où elle provient [47].

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 [47].

- **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 [48] [49].

La (**Figure 1.5**) montre les différentes voies d'évolution cellulaire.



**Figure1.5** : Représentation schématique de différentes voies d'évolution cellulaire  
[50]

**A** : Etat méristématique primaire

**B** : Multiplication et maintien de l'état méristématique, les cellules méristématiques continuent de se diviser. Cette évolution peut être observée *in vivo* au sein des méristèmes ou *in vitro* dans un cal ou de cellules séparées en milieu liquide ;

**C** : Différenciation : les cellules ne se divisent plus. Elles grandissent et se différencient

**D** : Reprise des mitoses et dédifférenciation. Elle peut être observée principalement en culture *in vitro* mais également *in situ* lors de la formation de méristèmes adventifs de racine ou de tige

La dédifférenciation se réalise en étapes successives, l'étape ultime étant le retour à l'état méristématique primaire [50]

### 1.2.2. Callogenèse

Dès les années 1930, Philip White in [51] a montré qu'il était possible d'isoler de petits groupes de cellules végétales et de les garder indéfiniment sous la forme de cals indifférenciés en culture artificielle. Depuis les premières expériences de White, il est devenu possible de cultiver presque tous types de tissus végétaux [51].

Selon **MARGARA**, [50] le cal est un tissu de néoformation issu d'une dédifférenciation de cellules spécialisées (retour à l'état méristématique). Il peut être à croissance active ou lente, homogène ou nodulaire, plus ou moins dissocié ou compact, incolore et plus rarement chlorophyllien ou anthocyané. Sa formation

(la callogenèse) résulte à la fois de la levée de l'inhibition consécutive à la séparation de l'explant et de l'action excitatrice des substances trophiques (milieu minéral, sucres) et des régulateurs de croissance (auxines et cytokinines) du milieu de culture [50].

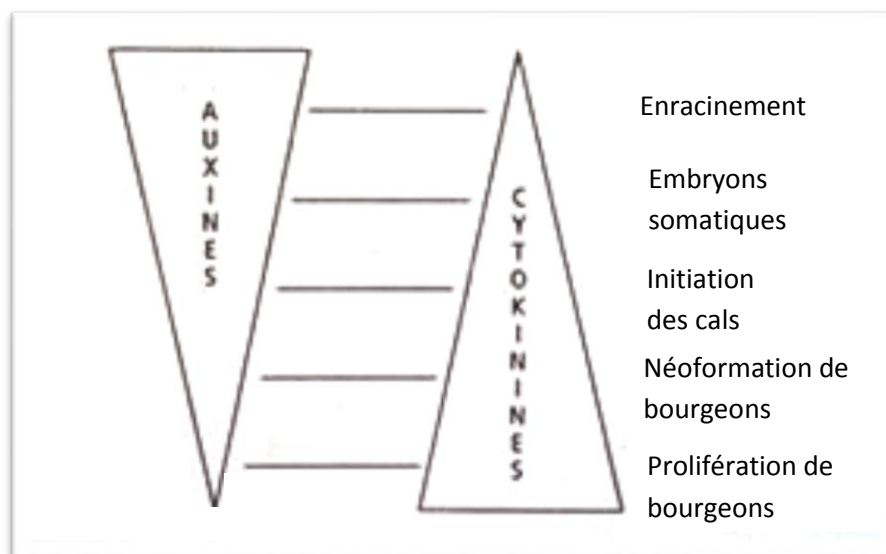
#### 1.2.2.1. Principes fondamentaux de la callogenèse

Pour établir la culture de tissus végétaux, on utilise de petits fragments de tissus et on utilise généralement des milieux semi-solides ou liquides. A partir des fragments transplantés on peut facilement induire la formation de cal dans des conditions d'induction adéquates [52].

#### 1.2.2.2. Balance hormonal

Selon SKOOG et MILLER (1957) in [53], le comportement physiologique d'un explant mis en culture en présence des deux principales hormones de croissance (auxine et cytokinine) (**Figure 1.6**) [53]:

- 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.



**Figure 1.6:** Equilibre entre auxines et cytokinines déterminant l'orientation de l'organogénèse en culture *in vitro* [54]

### 1.2.3. Catégories de la culture *in vitro*

Elles peuvent être regroupées en trois grandes catégories :

#### 1.2.3.1. Culture *in vitro* conforme

Il s'agit d'un mode de multiplication conduisant à des individus pourvus de même stock d'information héréditaire que la plante dont ils sont issus [55]. Les vitro-plants obtenus à partir de néoformation d'organe sur des explants organisés (tiges, bourgeon, feuilles, etc.) sont conformes [53].

#### 1.2.3.2. Culture *in vitro* non conforme

Les vitro-plants sont produits à partir de néoformation d'organe sur explant inorganisés (cals ou colonies cellulaires). Cette technique est une source de variabilité génétique. Des individus non conformes à la plante de départ sont obtenus [56] [53].

#### 1.2.3.3. Culture des protoplastes

Le protoplaste est une cellule isolée dépourvue de paroi [57]. Cette dernière peut être éliminée assez facilement grâce à des enzymes qui hydrolysent les composants de la paroi à savoir la cellulose, les hémicelluloses et les pectines. Lors de la libération des protoplastes la pression osmotique doit être contrôlée pour éviter la rupture du plasmalème [54].

La fusion de deux protoplastes donne naissance à une cellule tétraploïde (4n). L'organisme qui en est issu par régénération, sauf en cas d'intervention de processus de régulation, l'est également [54].

### 1.2.4. Voies de la culture *in vitro*

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

#### 1.2.4.1. Multiplification par bourgeonnement

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 [53].

Les différentes étapes de la multiplication par débourrement axillaires [53]:

- L'explant initial peut être soit un méristème isolé, soit un bourgeon terminal ou axillaire, soit 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 ou le bourgeon débourre, et se développe en une tige feuillée.
- Cette tige peut être découpée en fragments (nœuds et extrémités 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<sup>ème</sup> ou 4<sup>ème</sup> 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 des plantes normales.

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 ou pourra développer le clone comme ci-dessus [53].

#### 1.2.4.2. 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 [58].

Les voies suivies de multiplication par bourgeonnement adventif [53] sont:

- 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 auxine qui va provoquer leur enracinement.

La conformité des plantes issues de cals n'est jamais garantie [59]. Dans la pratique industrielle, la variabilité parmi les plantes issues par micropropagation semble pouvoir être minimisée par l'écartement systématique des plantules les plus petites [53].

#### 1.2.4.3. 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 ceux-ci provenant d'un tissu non constitué de cellules zygotiques sont appelés « embryons somatiques » [53].

L'embryogenèse somatique offre des potentialités et des applications énormes: rapidité, facilité d'utilisation ainsi qu'un taux de multiplication très élevé en comparaison avec l'organogenèse.



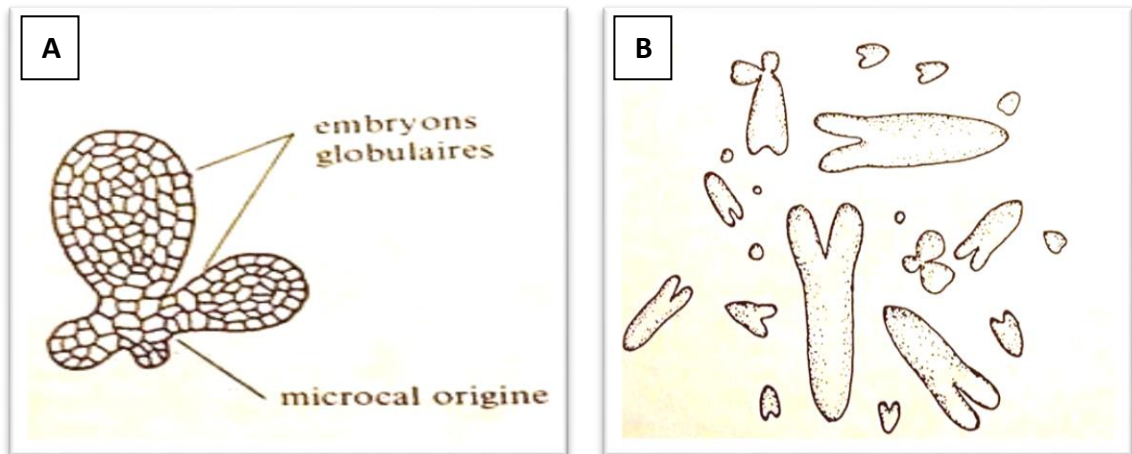
La culture des suspensions cellulaires pour la propagation en masse de plante à progresser à grands pas [60]. Ainsi, la culture industrielle de cellules végétales est réalisée à grande échelle dans des bioréacteurs atteignant un volume de 75 000 litres [61] [62].

Les espèces végétales expérimentées sont nombreuses, il s'agit des espèces ligneuses vivaces et herbacées annuelles [63] [64].

#### 1.2.4.3.1. Origine de l'embryogenèse somatique

Il est certain que la dose d'auxine utilisée au début de la culture joue un rôle prépondérant comme agent inducteur de l'embryogenèse somatique. Ce choc initiateur fait retrouver à la cellule somatique toute sa totipotence [53].

Reinert in [57], a remarqué dès 1958, que beaucoup d'embryons somatiques se forment au sein de la masse parenchymateuse où il est très difficile de suivre les étapes de l'évolution des cellules sur milieu solide et sur milieu liquide où les cellules sont plus accessibles à l'observation. Les embryons somatiques semblent prendre naissance à partir d'un massif cellulaire ou microcal (**Figure1.7**). Cependant des coupes réalisées à différents niveaux dans des amas cellulaires ont permis de mettre en évidence, au microscope électronique, la présence de régions méristématiques, où les cellules se recloisonnent pour former des groupes bien individualisés de cellules [57].



**Figure 1.7 : Origine des embryons somatiques [53]**

**A** : Coupe d'un massif d'embryons obtenu par culture de carotte sauvage en milieu liquide (KONAR et NATARAJA, 1964 in [53]) ;

**B** : Embryons somatiques obtenu par culture de carotte sauvage en milieu liquide

#### 1.2.4.3.2. Induction de l'embryogenèse somatique

L'embryogenèse somatique apparaît le plus souvent dans les suspensions cellulaires, occasionnellement dans les cals, plus rarement directement sur les organes [53].

- L'explant de départ est un fragment d'organe, de tissu(s), ou constitué de cellules isolées.
- Un cal primaire (à partir d'un organe) ou de microcals (à partir des cellules isolées) sont formés.
- Le cal primaire ou des microcals sont subculturés.
- Le cal peut être dissocié et être multiplié sous forme de suspension cellulaire. La suspension cellulaire remise sur un milieu solide peut redonner un cal.
- Sous certaines conditions, les cultures cellulaires en milieu liquide ou solide s'organisent en nombreux petits massifs à structure bipolaire (avec un méristème caulinaire et un méristème racinaire) nommés embryoïdes, embryons asexués ou embryons somatiques.
- Les embryoïdes se développent, comme des embryons zygotiques, directement en plantules enracinées comme des plantules de semis traditionnel [53].

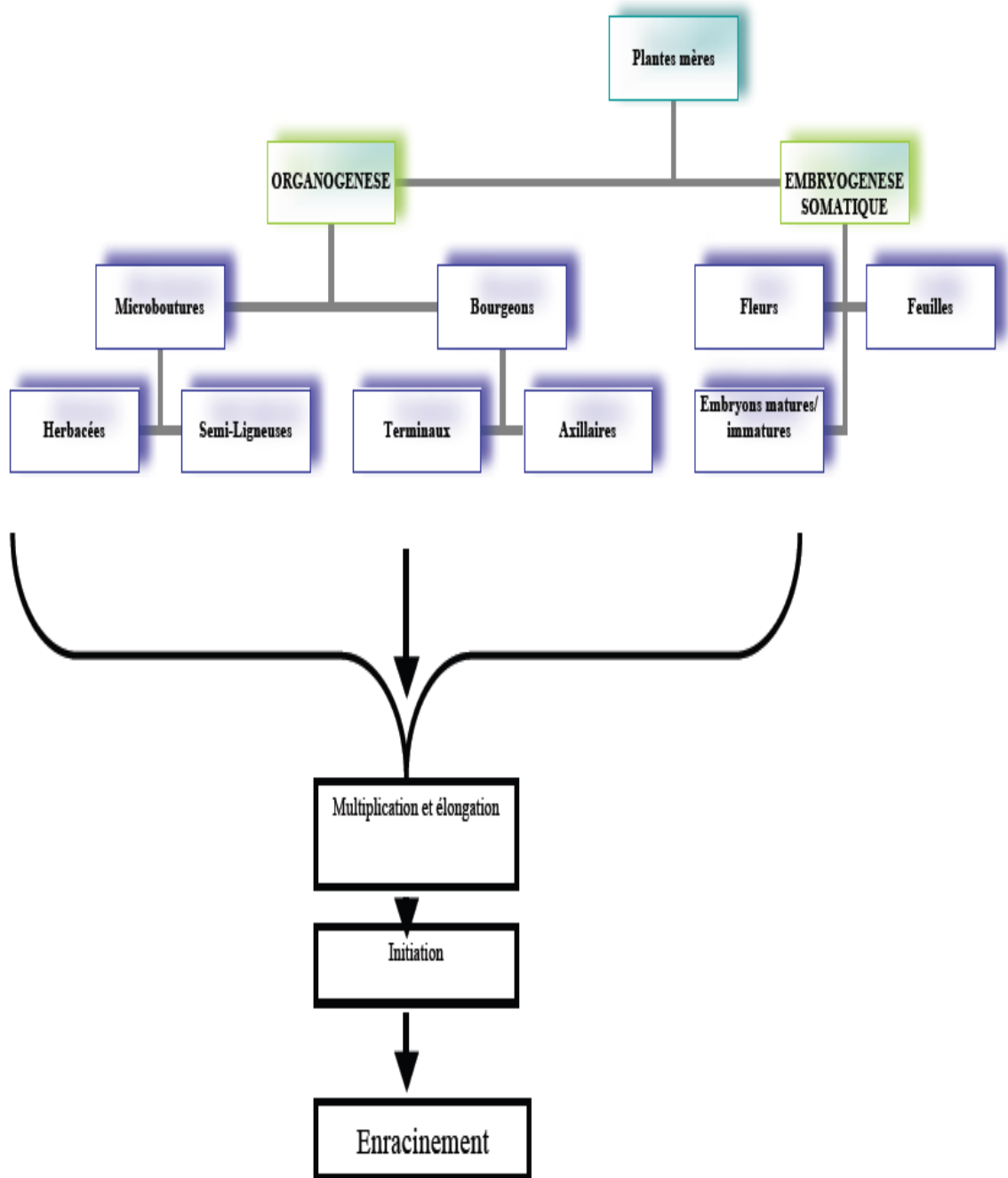
### 1.2.5. Culture *in vitro* d'arganier

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.

La micropropagation *in vitro* permet de produire des plants génétiquement homogènes [65]. Cependant, la variabilité génétique de l'arganier constitue une difficulté majeure et il s'avère impossible de mettre au point un milieu unique permettant la multiplication et l'enracinement de tous les clones. Ce phénomène est fréquent chez les ligneux pour lesquels il faut adapter les milieux en fonction des exigences des différentes variétés ou clones.

**NOUAIM et CHAUSSOD** ont montré que la multiplication *in vitro* permet de sélectionner très précocement des clones sur le rapport parties aériennes / parties racinaires, ainsi que la résistance au stress hydrique ou à la salinité ce qui permettrait de propager les variétés les plus intéressantes et performantes sur le plan agronomiques [27].

Les étapes de culture *in vitro* de *l'Argania spinosa* sont résumées dans la **(Figure 1.8)** [46].



**Figure 1.8 :** Etapes de culture *in vitro* de *l'Argania spinosa* [46]

### 1.2.6. Besoins nutritifs des tissus cultivés en conditions aseptiques

Quelle que soit la technique utilisée, la culture *in vitro* requiert des conditions très précises de milieu et de l'environnement [66].

#### 1.2.6.1. Milieux de culture

Le milieu de culture se définit par ses qualités chimiques et physiques.

En général, lorsque l'explant utilisé a un volume suffisant, de l'ordre de 0,5 cm<sup>3</sup> ou plus, il contient des régulateurs de croissance, des acides aminés, et d'autres substances nutritives en quantité suffisante pour assurer le développement des tissus au début de la culture. Par ailleurs, cet explant a un « pouvoir tampon » qui lui permet de croître sur des milieux différents du milieu optimum [67].

Dans le cas où l'explant est de grande taille, le milieu choisi sera simple ; par contre pour les explants de petite taille, le milieu devra être précis, l'équilibre des substances de croissance doit être bien défini et le nombre de constituants plus important [67].

Nous classons les constituants du milieu de culture en quatre catégories [67]:

- 1-les sels minéraux ;
- 2-les substances organiques ;
- 3-les régulateurs de croissance ;
- 4-les produits naturels complexes.

##### 1.2.6.1.1.Sels minéraux

Parmi les éléments nécessaires à la vie de la plante les macro-éléments et les micro-éléments sont indispensables :

Les 6 macro-éléments indispensables sont : l'azote, le phosphore, le potassium, le soufre, le magnésium et le calcium.

Les trois premiers sont des constituants fondamentaux des tissus végétaux (protéines, acides nucléiques). Les trois derniers interviennent en particulier dans le maintien de l'équilibre entre cations et anions dans la plante.

Les micro-éléments jouent un rôle essentiel dans les mécanismes enzymatiques, comme activateurs ou constituants de coenzymes. Les principaux d'entre eux sont : le fer, le cuivre, le zinc, le manganèse, le molybdène et le bore [50].

Le fer est l'élément essentiel pour la croissance et l'organogenèse, sa carence provoque des chloroses fréquemment observées en culture. Pour éviter sa précipitation, il est souvent incorporé sous la forme chélatée à l'EDTA [53].

#### 1.2.6.1.2. Substances organiques

- Sucres

Les tissus en culture *in vitro* sont largement hétérotrophes en raison de l'absence ou de l'insuffisance de l'assimilation chlorophyllienne. Il est donc généralement indispensable d'ajouter des glucides au milieu de culture [50]. Ils remplissent deux fonctions principales: Source d'énergie et maintien du potentiel osmotique [53]. Les deux sucres le plus généralement utilisés sont le saccharose et le glucose [50].

- Vitamines

Pour obtenir une meilleure croissance des tissus par culture *in vitro*, il est primordial d'ajouter des vitamines au milieu minéral [68]. Les vitamines les plus couramment utilisées sont la thiamine, le myo-inositol, l'acide nicotinique et la pyridoxine [53]. La vitamine B1 ou thiamine-HCl se décompose à l'autoclavage, mais les produits de dégradation sont aussi actifs sur la croissance que la vitamine elle-même [66].

#### 1.2.6.1.3. Régulateurs de croissance

Appelés aussi « phytohormones » ou « hormones végétales », ces régulateurs de croissance appartiennent à trois catégories [66]:

- **Auxines**

-AIA ou acide indole-3-acétique est une auxine naturelle, ou peut être obtenue par synthèse chimique. Elle se dégrade rapidement à la lumière.

-AIB ou acide indolylbutyrique c'est une auxine faible [50].

-ANA ou acide  $\alpha$ -naphtalène-acétique est un produit de synthèse stable en milieu aqueux et à l'autoclave.

-2,4-D ou acide 2,4 dichlorophénoxyacétique est un herbicide de synthèse, à effet auxinique très puissant.

- **Cytokinines**

- Zéatine : cytokinine naturelle, stable en milieu aqueux et à l'autoclave
- 2 iP ou isopentényladénine : cytokinine naturelle.
- BA ou BAP ou benzylaminopurine ou 6-benzyladénine : cytokinine de synthèse.
- Kinétine ou 6-furfurylaminopurine : cytokinine de synthèse, stable à l'autoclave.

- **Gibbérellines**

Seul l'acide gibbérellique A3 est utilisé, c'est un produit naturel. Il se dégrade rapidement en solution aqueuse.

#### 1.2.6.1.4. Produit naturel complexe

- ✓ **Agar**

Pour les milieux solides, l'agar est employé à des concentrations comprises entre 0,5 et 1 %. Les concentrations très élevées durcissent le milieu et empêchent la diffusion des nutriments vers les tissus [68].

#### 1.2.6.2. Facteurs physiques de l'environnement des cultures *in vitro*

Les principaux facteurs physiques de l'environnement climatique des cultures *in vitro* sont : l'état hygrométrique, la température et la lumière.

- ✓ **Etat hygrométrique**

Généralement, l'obturation des récipients de culture assure une humidification suffisante de l'atmosphère ambiante [50].

- ✓ **Température**

La température de la chambre de culture est en général constante, elle est de l'ordre de 22 à 25°C [50].

- ✓ **Lumière**

L'éclairage des chambres à culture est généralement fourni par des tubes fluorescents. L'entretien des souches tissulaires est souvent effectué sous des éclairages relativement faibles (2000 à 5000 Lux) [50].

Des photopériodes en général longues sont utilisées 16/8h [50].

### 1.2.7. Avantages et inconvénients de la culture *in vitro*

La culture *in vitro*, comme toutes les techniques, a des avantages et des inconvénients.

#### 1.2.7.1. Avantages de la culture *in vitro*

La culture *in vitro* offre plusieurs avantages :

- Possibilité de produire rapidement de nombreux plants à partir d'un seul plant mère [69] cette rapidité est due à l'augmentation de division cellulaire par ces techniques [70] [71];
- La sauvegarde des espèces rares, en voie de disparition ou ayant la difficulté à se multiplier naturellement [69];
- Diminution des coûts de production et d'espace [69];
- Les plants cultivés par les méthodes *in vitro* ne dépendent pas des conditions climatiques souvent incertaines [69];
- La possibilité de conservation de ressources végétales et faire une banque de génotypes et réaliser ainsi des plantations hors la période de croissance [72];
- L'amélioration des conditions sanitaires par les techniques de cultures *in vitro* souvent associées à l'éradication des viroses [73].

#### 1.2.7.2. Inconvénients de la culture *in vitro*

- L'exigence de main d'œuvre qualifiée
- Le problème de contamination qui selon **CASSELLE**, [74] est dû soit à l'explant soit à la technique utilisée.
- Goût élevé.



## CHAPITRE 2

### MATERIEL ET METHODES

Toute notre expérimentation s'est déroulée au niveau des laboratoires:

- Culture *in vitro* de l'unité UPEV à l'entreprise EHEV de Bab Ezzouar, (Alger) (germination, callogenèse et microbouturage) ;
- Amélioration des plantes au Département des Biotechnologies (embryogenèse somatique), et laboratoire de Biotechnologie végétale (étude histologique) au Département de Biologie et Physiologie Cellulaire, faculté des Sciences, de la Nature et de la Vie de l'Université de Blida1.

#### 2.1. Matériel végétal utilisé

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

L'arbre atteint environ 8 mètres de hauteur (**Figure 2.1 A**). Les feuilles sont simples, en forme de spatule, de couleur vert sombre à la face supérieure et plus claire sur la face inférieure (**Figure 2.1 B**). Les rameaux sont épineux (**Figure 2.1 B C**).

Le fruit est une baie de 2 ou 3 graines soudées, à téguments lignifiés très épais contenant l'albumen et la plantule. A maturité, le fruit est jaune-marron (**Figure 2.1 D, E et F**).

Les graines d'arganier ayant fait l'objectif de notre expérimentation proviennent de l'arboretum d'INRF. Les arbres sont âgés de 10 ans au moment de la récolte.



**Figure 2.1** : Aspect morphologique de différentes parties de l'arganier d'INRF

- A : Vue générale de l'arbre
- B : Feuilles en forme de spatule
- C : Rameaux avec fruits (Mois de Mars)
- D : Fruits secs
- E : Noix
- F : Amandes

- ❖ Les graines utilisées sont récoltées au mois de Juillet (2013). Elles sont déulpées pour extraire les noix, puis débarrassées de leur endocarpe ligneux afin d'obtenir des amandes intactes.
- ❖ Les jeunes feuilles, les feuilles cotylédonaires, les entre-nœuds et les racines utilisés proviennent des vitro-semis.

## 2.2. Préparation des solutions

Une solution mère est préparée pour chaque milieu de culture et pour chaque régulateur de croissance testé (Annexes 1, 2, 3, 4 et 5).

### 2.2.1. Solutions hormonales

Une solution-mère par régulateur de croissance est préparée à la concentration de 0,1mg/ml.

La majorité des régulateurs de croissance se dissolvent soit dans le NaOH ou l'HCl dilué, soit dans l'eau distillée chauffée [78].

Nous avons pesé 10mg de régulateur de croissance, à l'aide d'une balance de précision, que nous avons dissous dans quelques gouttes de solvant approprié (**Tableau 2.1**), le mélange est porté à 100 ml avec de l'eau distillée. La préparation est conservée dans un flacon brun au réfrigérateur à -4°C.

**Tableau 2.1** : Type de régulateurs de croissance et leur solubilité [79]

Régulateurs de croissance utilisées	Solvants
Auxines (AIA, AIB, ANA et 2,4-D)	NaOH
Cytokinines (BAP, Kin et 2-IP)	HCl
Gibbériline A3 (GA3)	H <sub>2</sub> O+ chauffage

### 2.2.2. Milieux de culture utilisés

Les besoins des cultures des tissus en éléments minéraux ont été étudiés par différents auteurs [66] qui ont mis au point des compositions bien définies. En se basant sur leurs travaux, nous avons utilisé les milieux suivants :

#### ✦ Germination

Nous avons utilisé trois milieux, une eau minérale N'Gaous gélosée (EG), une solution Knop gélosée et le milieu Murashige et Skoog réduit (MS/2). Ce dernier est très concentré, ce qui explique qu'il soit souvent utilisé dilué [53].

#### ✦ Callogenèse

Nous avons testé deux milieux de bases, le milieu Murashige et Skoog (MS) et Gamborg (B5) en se référant aux travaux de **AUGE et al.**, [66].

#### ✦ Microbouturage

Notre choix s'est porté sur le milieu Murashige et Skoog (MS).

### 2.2.3. Milieu de culture final

A partir des solutions mères des milieux (MS, Gamborg et Knop) nous avons préparé les milieux de culture. Le pH est ajusté à  $5,7 \pm 0,1$  avec HCl (10%) ou NaOH (1N). Nous avons ajouté pour les trois milieux, 30g/l de saccharose, 7g/l d'agar et les régulateurs de croissance selon les essais entrepris.

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 100ml par bocal. Ils sont autoclavés, à une température de  $121 \pm 2^\circ\text{C}$  pendant 20 minutes pour éviter la prolifération des micro-organismes.

## 2.3. Germination

### 2.3.1. Pouvoir germinatif

Avant d'entamer notre étude, nous avons réalisé un test de pouvoir germinatif des graines. Cette étape permettra de préciser les conditions optimales (la technique de désinfection et le milieu de culture) de la germination *in vitro*.

Les vitro-semis de l'arganier obtenus seront utilisés pour la callogenèse et le microbouturage.

### 2.3.2. 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 donc n'atteignant pas les vaisseaux. Elle consiste en une série de traitement par immersion complète et pour des durées variables dans différents types de bain.

Les noix et les amandes sont trempées dans une solution fongicide à 1g/l dont la matière active est le thiophanate-méthyl à 70% pendant 20 mn sous agitation.

Elles sont ensuite mises en agitation dans l'éthanol 70% (v/v) pendant une minute, afin d'améliorer l'efficacité des agents désinfectants [80] (Annexe 6).

Les noix et les amandes sont ensuite immergées pendant 5 et 15 mn dans une solution d'hypochlorite de sodium NaClO à 8° et à 16° (**Tableau 2.2**).

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

**Tableau 2.2** : Conditions de désinfection des graines à l'hypochlorite de sodium

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

T : traitement

### 2.3.3. Milieu de germination

Pour optimiser les conditions de germination *in vitro* des graines d'*Argania spinosa*, trois milieux de culture sont testés Murashige et Skoog dilué au demi (MS/2), Une solution Knop gélosée et une eau minérale gélosée (EG) sans apport des régulateurs de croissance.

### 2.3.4. Mise en culture

Deux essais sont entrepris, un sur les noix qui ont subi un prétraitement à l'eau oxygénée (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) à une température de 25 ± 2°C pendant une semaine (scarification chimique), afin de ramollir leur endocarpe ligneux et l'autre sur les amandes où la coque est cassée manuellement (à l'aide d'une pince). Cette scarification mécanique présente l'avantage de trier les amandes avant la mise en

culture en ne gardant que celles qui sont intactes, volumineuses et éventuellement viables. En effet, **NOUAIM, [81]** signale que les meilleurs taux de germination *in vivo* chez l'arganier sont enregistrés en utilisant des graines mûres et volumineuses.

Sous une hotte à flux laminaire et dans des tubes contenant 30ml de milieu de culture stérilisé au préalable, les amandes et les noix désinfectées sont ensemencées à raison d'une amande ou une noix par tube. Nous avons utilisé 20 amandes et 20 noix pour chaque traitement (T1, T2, T3 et T4) et chaque milieu (MS/2, Knop et EG). Au total **480** amandes et noix sont testées.

Les tubes sont fermés, scellés par le parafilm et placés dans la chambre de culture à une température de  $25 \pm 2^\circ\text{C}$  et une photopériode de 16/8 h. L'éclairage est assuré par des Néons Philips, type Gros luxe.

#### 2.3.5. Paramètres mesurés

Nous avons effectué les paramètres suivants :

##### **Taux de germination**

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

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

##### **Taux de contamination**

Un comptage des amandes contaminées par rapport au nombre total des amandes mises en germination est effectué.

##### **Croissance des pousses**

La hauteur est mesurée, après 45 jours de culture, en couchant les vitro-semis sur du papier millimétré.

##### **Nombre de jeunes feuilles par plantule**

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

## 2.4. Induction de la callogenèse

### 2.4.1. Milieu de callogenèse

Les milieux Murashige et Skoog (MS) et Gamborg sont testés pour l'induction des cals d'*Argania spinosa*. Dix concentrations des régulateurs de croissance sont préparées pour chaque milieu en comparaison avec le témoin (sans hormones).

Par manque de données sur l'induction de callogenèse d'arganier, les combinaisons suivantes sont choisies aléatoirement (**Tableau2.3**).

**Tableau 2.3** : Equilibres hormonaux testés pour l'induction de callogenèse

Milieux		Kin	2,4-D	ANA	BAP
Murashige et Skoog (MS)	Gamborg (G)				
MS0	G0	0mg/l	0mg/l	0mg/l	0mg/l
MS1	G1	0,5mg/l	0,5mg/l	-	-
MS2	G2	0,5mg/l	0,75mg/l	-	-
MS3	G3	0,5mg/l	-	0,5mg/l	-
MS4	G4	-	-	0,5mg/l	0,5mg/l
MS5	G5	-	-	-	2mg/l
MS6	G6	-	0,5mg/l	-	0,5mg/l
MS7	G7	-	1mg/l	-	1mg/l
MS8	G8	-	1mg/l	-	3mg/l
MS9	G9	-	1mg/l	-	6mg/l
MS10	G10	-	1mg/l	-	9mg/l

### 2.4.2. Mise en culture

Pour initier le processus d'induction de la callogenèse, nous avons utilisé comme source d'explants les vitro-semis issus de la germination dans des conditions optimales.

Les vitro-semis âgés de 28 jours sont retirés aseptiquement de leurs tubes, les feuilles, feuilles cotylédonaire, tiges et racines sont segmentés, sous hotte, en fragments d'environ 0,5 cm. Ils sont débarrassés de leurs bourgeons pour obtenir des explants qui sont introduit à plat sur le milieu de culture MS et Gamborg avec et sans hormones de croissance, à raison de 5 explants par boîte de Petri et un explant par tube à essai.

Les boîtes de Petri et les tubes sont maintenus dans la chambre de culture à  $25 \pm 2^\circ\text{C}$  à l'obscurité.

Pour chaque explant, milieu et chaque combinaison hormonale, 30 explants sont préparés (30 x 4 types d'explant x 2 milieux x 11 combinaisons hormonales). Au total **2640** explants sont testés (**Tableau 2.4**).

**Tableau 2.4** : Nombre d'explants par traitement et par milieu de culture testé

Traitements hormonaux/ Milieux (MS/ Gamborg)	Type d'explant
0,1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9,10	30 feuilles
	30 feuilles cotylédonaire
	30 entre-nœuds
	30 racines
<b>Total</b>	<b>2640 explants</b>

#### 2.4.3. Repiquage et entretien de la masse callogène

Chaque deux mois, les cals obtenus sont repiqués sur un milieu frais de même composition hormonale que leur induction, et sont soumis aux mêmes conditions environnementales (température de  $25 \pm 2^\circ\text{C}$  et à l'obscurité). Les cals nécrosés et/ou contaminés sont écartés à chaque repiquage.

#### 2.4.4. Paramètres mesurés

Dans le but de suivre l'effet du milieu, du régulateur de croissance et le type d'explant, sur l'induction de callogenèse et la reprise de division cellulaire après chaque repiquage, nous avons mesuré certains paramètres dont:



### **Taux de contamination et de brunissement**

Le taux des explants contaminés et nécrosés sur les 2640 explants testés est calculé.

### **Taux de la callogénèse**

Calcul des explants ayant présentés une callogénèse par rapport à ceux mis en culture.

### **Reprise de la division après chaque repiquage**

Dénombrement d'explants ayant repris une croissance après chaque repiquage.

### **Aspect des cals**

Une description macroscopique est effectuée sur l'ensemble des cals obtenus (aspect général des cals, texture, couleur).

### **Coupes histologiques**

Des coupes histologiques sont effectuées au niveau des cals, pour mettre en évidence le tissu qui est à l'origine de la prolifération cellulaire des cals (Annexe7).

### **Croissance relative de la masse callogène**

Une mesure de poids frais des cals est réalisée à l'aide d'une balance de précision après 4 et 6 mois de culture. Les cals sont numérotés et pesés en utilisant des flacons stériles, pour éviter les contaminations.

#### **2.4.5. Optimisation de callogénèse**

Après avoir procédé à la détermination du milieu, de l'explant et de l'équilibre hormonal favorable à l'induction de la callogénèse et à la croissance de la masse callogène. Nous avons mis en culture 30 explants d'entre-nœuds, sur milieu optimal à l'obscurité et à  $25 \pm 2^\circ\text{C}$ . Nous avons ajouté au milieu de culture **0.1** g/l d'acide ascorbique et **0,5** g/l du charbon actif, afin d'atténuer le brunissement des cals qui influence la croissance de la masse callogène. Le poids frais des cals est pris après 4 et 6 mois de culture.

## 2.4.6. Essai d'induction de l'embryogenèse somatique

### 2.4.6.1. Principe

L'embryogenèse somatique désigne l'ensemble des événements provoqués *in vitro* et conduisant à la formation d'un embryon à partir de cellules somatiques sans passer par la fusion gamétique [85]. Ce procédé permet d'obtenir des clones d'embryons et de régénérer des plantes à partir de ceux-ci [86].

Nous avons essayé d'induire une embryogenèse somatique sur les cals obtenus.

### 2.4.6.2. Milieu de culture liquide

Afin d'induire l'embryogenèse somatique, nous avons utilisé les milieux de culture qui ont assuré la meilleure formation de cal, et ayant permis l'entretien du matériel tissulaire, en ajoutant du charbon actif sans l'apport de l'agar.

Les meilleurs cals présentant une texture friable sont repiqués dans les milieux de culture liquide avec ou sans charbon actif (**Tableau 2.5**).

**Tableau 2.5** : Milieu liquide d'induction de l'embryogenèse somatique

Provenance des cals	Milieux avec charbon actif	Milieux sans charbon actif
Entre-nœud	MS0 (MS sans hormones de croissance)	
Feuille	G0 (Gamborg sans hormones de croissance)	
Feuille cotylédonaire	MS0	--
Racine		
Entre-nœud	MS6 (0,5mg/l 2,4-D ; 0,5mg/l BAP)	
Feuille	G6 (0,5mg/l 2,4-D ; 0,5mg/l BAP)	

### 2.4.6.3. Techniques et conditions de culture

Les suspensions cellulaires sont initiées par transfert de 0,5 g de cals friables de 4 mois, légèrement fragmentés dans des boîtes de Petri stériles à l'aide d'un scalpel. Ils sont mis dans des flacons horizontaux stériles de 650 ml destinés

aux cultures cellulaires (Annexe 8), contenant 150 ml de milieu liquide. Nous signalons que pour chaque milieu trois répétitions sont effectuées.

Ils sont ensuite placés sous un agitateur orbital à une vitesse de 100 rotations par minute, sous une photopériode de 16/8 heures et une température de  $25 \pm 2^\circ\text{C}$ .

#### 2.4.6.4. Renouveaulement de milieu de culture

Le renouvellement des milieux liquides est effectué, chaque 15 jours, par l'alimentation par milieux frais (100 ml). Quand le volume de milieu dépasse 450 ml dans un flacon, il sera réparti sur un autre flacon vide pour assurer une meilleure aération. Pour suivre l'état sanitaire de la suspension, à chaque renouvellement, quelques gouttes des suspensions sont étalées sur le milieu gélose nutritive (GN) préalablement coulé dans des boites de Petri, puis incubées à  $25 \pm 2^\circ\text{C}$ .

#### 2.4.6.5. Maturation des embryons somatiques en milieu gélosé

Après deux mois de culture sous agitation en milieu liquide, les structures obtenues à partir des cals, sont étalés sur milieu semi-solide (3,5 g/l d'agar) dans des boites de Petri contenant 20 ml de milieu de culture (MS et Gamborg) sans régulateurs de croissance. Cette phase permet le développement des embryons et la différenciation de l'apex caulinaire. Elle se déroule dans les mêmes conditions environnementales (photopériode 16/8h et température  $25 \pm 2^\circ\text{C}$ ), afin de poursuivre leur développement.

#### 2.4.6.6. Paramètres mesurés

Les observations au cours de cette étape ont porté sur :

- Aspect morphologique et microscopique de la suspension cellulaire ;
- Développement des embryons somatiques en milieux gélosés dépourvus d'hormones de croissance ;
- Taux de germination des embryons somatiques.

## 2.5. Multiplication par microbouturage

La micropropagation se déroule en quatre étapes successives : établissement de la culture aseptique, multiplication, enracinement, développement de la plantule et acclimatation [87].

### 2.5.1. Milieu de culture

Pour optimiser les conditions de culture, le milieu testé est le milieu Murashige et Skoog (MS) :

- Sans hormones de croissance
- Avec hormones de croissance en variant les concentrations.

#### 2.5.1.1. Milieu d'initiation

Afin de sélectionner le milieu le plus performant pour le débourrement des bourgeons des microboutures d'arganier, dix milieux à concentrations hormonales différentes sont testés (**Tableau2.6**).

**Tableau 2.6:** Balance hormonale du milieu d'initiation à la micropropagation/MS

Milieux	BAP	Auxines	Kin
Mi0	0mg/l	0mg/l	0mg/l
Mi1	1mg/l	0,5mg/l AIA	-
Mi2	1mg/l	0,5mg/l AIB	-
Mi3	1mg/l	0,5mg/l ANA	-
Mi4	1,5mg/l	0,5mg/l ANA	-
Mi5	2mg/l	0,1mg/l ANA	-
Mi6	-	0,5mg/l AIA	1mg/l
Mi7	-	0,5mg/l AIB	1mg/l
Mi8	-	0,5mg/l ANA	1mg/l
Mi9	-	0,5mg/l AIA	1mg/l

### 2.5.1.2. Milieu d'allongement

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 des vitro-plants obtenus (**Tableau 2.7**).

**Tableau 2.7** : Concentrations testées pour le milieu d'allongement

Milieux	Concentrations de GA3
Ma0	0 mg/l
Ma1	0,5mg/l
Ma2	1 mg/l
Ma3	1,5mg/l

### 2.5.1.3. Milieu rhizogène

Les vitro-plants vigoureux sélectionnés sur les différents milieux de culture utilisés sont transférés sur un milieu rhizogène composé du milieu de base de Murashige et Skoog réduit (MS/2) additionné de différentes concentrations de régulateurs de croissance (**Tableau 2.8**). Durant cette étape nous avons réduit la quantité d'agar à moitié (3,5 g/l) et nous avons ajouté 0,5 g du charbon actif.

Exception faite pour le milieu **Mr0<sub>1</sub>** d'enracinement où les vitro-plants proviennent du milieu MS4 de callogenèse (0,5mg/l d'ANA et 0,5mg/l de BAP) et pour le milieu **Mr0<sub>2</sub>** où nous avons rajouté les filaments de maïs qui peuvent faciliter l'émission des racines. Cette observation a été signalée par **BOUSSELMAME et al., [88]** qui ont utilisé les fibres de coco et ont obtenus une prolifération et un meilleur allongement racinaire.

**Tableau 2.8** : Concentrations hormonales testées pour le milieu rhizogène

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

### 2.5.2. Mise en culture

Les vitro-semis âgés de 28 jours ont servi pour l'initiation de microbouturage, à l'aide d'un scalpel nous avons fragmenté les vitro-semis en explants contenant des bourgeons axillaires ou apicaux de 1 cm de longueur.

Ces explants mono ou bi-nodaux sont immédiatement introduits verticalement dans des bocaux contenant 100 ml de milieu de culture à raison de 10 microboutures par bocal. Ces derniers sont scellés avec du parafilm pour éviter leur dessiccation et pour réduire les contaminations [89]. 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 mois, pendant 3 mois, les vitro-plants sont fragmentés et remis sur le même milieu frais.

### 2.5.3. Paramètres mesurés

A chaque subculture, les mesures suivantes sont effectuées sur les microboutures :

- Taux de reprise des microboutures ;
- Hauteur de pousses par pousse ;
- Nombre de feuilles par pousse ;
- Nombre de bourgeons par pousse ;
- Etude tissulaire : Des coupes histologiques sont effectuées sur les différentes parties des plantules obtenues (Tige, feuilles et racines), pour identifier et observer l'organisation des différents tissus (Annexe 7).

### 2.5.4. Acclimatation

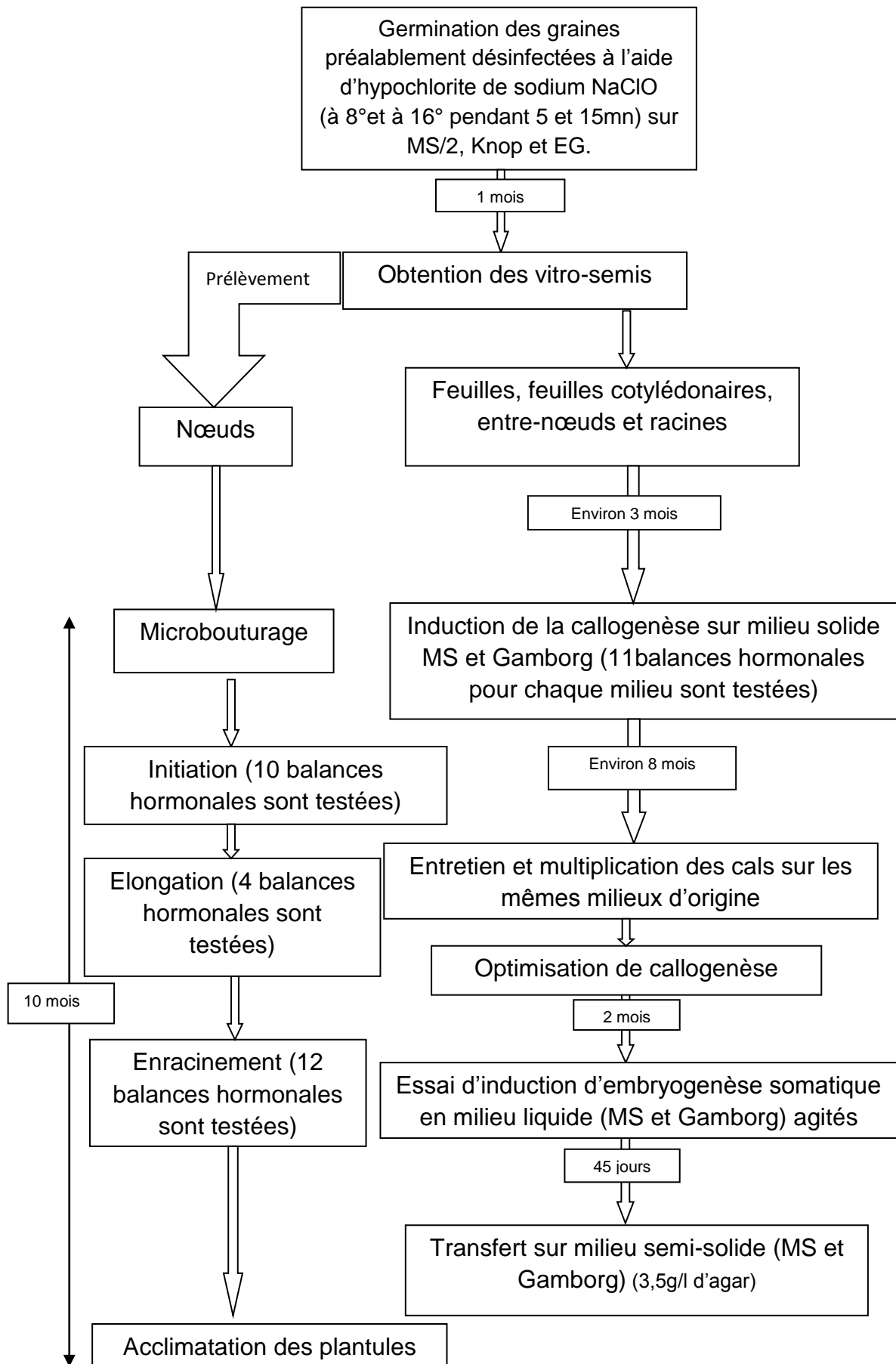
Nous avons sorti les vitro-plants des tubes à essais et éliminé la gélose par un rinçage des racines à l'eau de robinet.

Les vitro-plants sont repiqués sur un substrat naturel composé de tourbe et de perlite à raison de (1:3 ; v/v) préalablement autoclavé à  $120 \pm 2^\circ\text{C}$  pendant 20 mn.

Les vitro-plants ainsi repiqués dans des gobelets sont recouverts par un film plastique afin d'éviter leur déshydratation.

Ces gobelets sont conduits en mini serre puis en serre d'acclimatation contrôlée.

La figure 2.2 regroupe l'ensemble des étapes successives de notre expérimentation.



**Figure 2.2:** Protocole expérimental adopté lors de l'expérimentation



## 2.6. Analyse statistique des résultats

L'analyse statistique a porté sur la comparaison des différents traitements à l'aide d'une analyse de variance (ANOVA) au seuil de 5%. Cette analyse permet de déceler l'existence ou pas des effets significatifs des traitements appliqués, suivie d'une comparaison des moyennes (Test de Newman et Keuls) quand elles existent. Concernant l'étude de l'effet des milieux de base Murashige et Skoog (MS) et Gamborg, le test de Student est appliqué, à l'aide du logiciel STATISTICA version 8.0.

## CHAPITRE 3

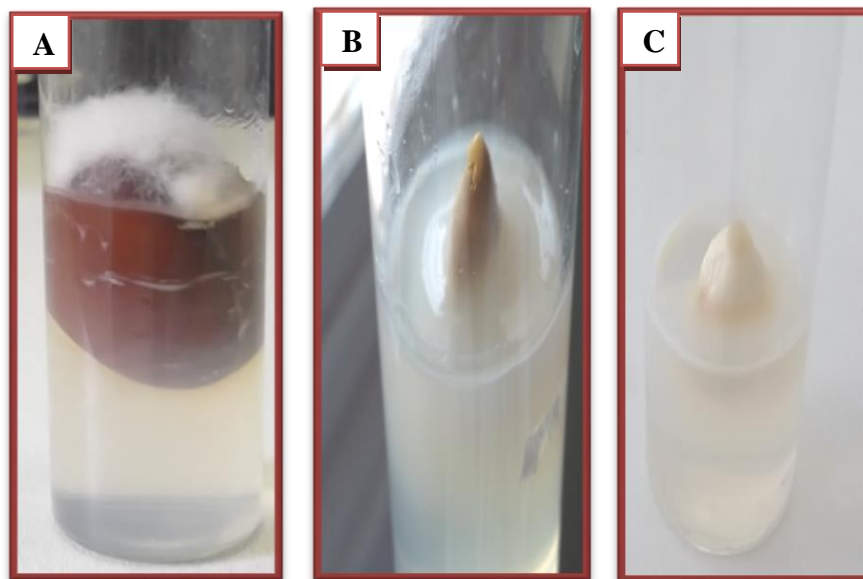
### RESULTATS

#### 3.1. Germination

##### 3.1.1. Taux de contamination

Après une semaine de mise en culture des amandes et des noix, deux types de contamination sont observés :

- Un développement de mycélium à texture feutrée, souvent blanchâtre (**Figure 3.1 A**) ou grisâtre concernant les champignons, confirmé par **AUGE** [66].
- Un voile d'aspect laiteux à la surface et à l'intérieur du milieu concernant les bactéries (**Figure 3.1 B C**) confirmé par **AUGE** [66].



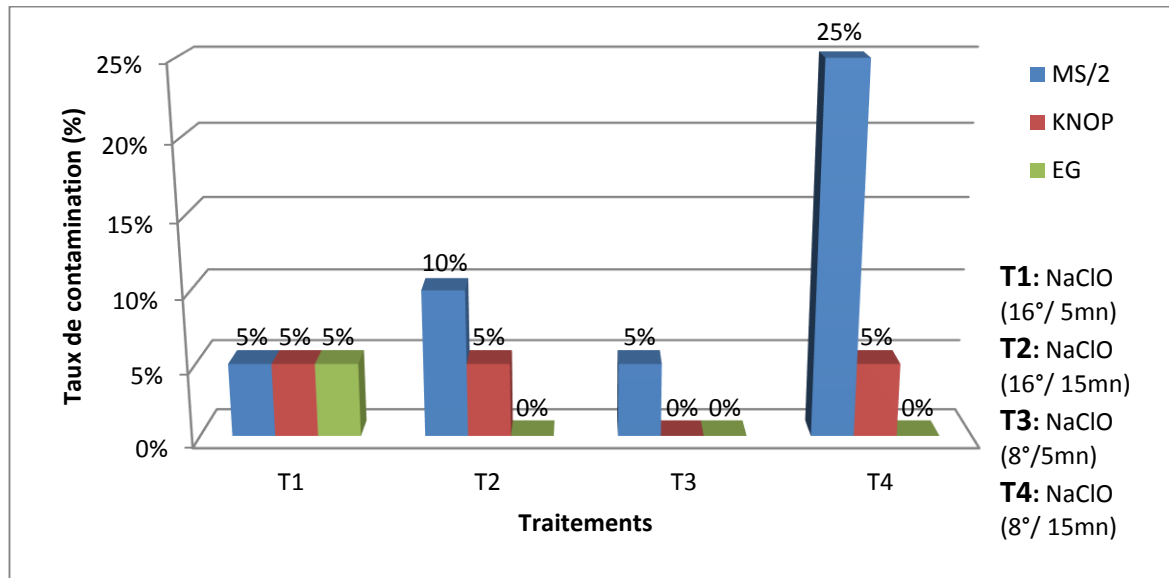
**Figure 3.1** : Développement de contaminations

**A** : Développement de mycélium blanc

**B** et **C**: Anneau laiteux blanc

En analysant les résultats obtenus, nous constatons que le taux de contamination des amandes d'arganier, mises en germination sur milieu **MS/2** et traitement **T4** (NaClO : 8°/15 mn), est très important, il atteint **25%**. Il est suivi par

les traitements **T2** (16°/15 mn), **T1** (16°/5 mn) et **T3** (8°/5 mn) avec respectivement **10%**, **5%** et **5%** (**Figure 3.2**).



**Figure 3.2 :** Taux de contamination des amandes

Le taux de contamination est plus faible sur le milieu eau gélosée (**EG**), il atteint **5%** pour le traitement **T1**. Les traitements **T2**, **T3** et **T4** sont très efficaces pour la désinfection des amandes d'arganier et nous n'avons enregistré aucune contamination (0%).

Lors de l'utilisation du milieu **Knop**, la contamination est aussi faible, elle atteint **5%** pour les trois types de traitement **T1**, **T2** et **T4**. Aucune contamination (0%) n'est observée pour le traitement **T3** (8°/5mn).

La meilleure combinaison (traitement / milieu) obtenu de cet essai est (**T3 / EG**) où nous avons enregistré un taux de contamination nul (**Figure 3.2**). Nous pouvons déduire que l'utilisation de NaClO à 8° pendant 5 mn s'est révélée efficace pour la désinfection des amandes d'arganier.

En ce qui concerne les noix, le taux de contamination enregistré est très faible, nous avons enregistré quelques contaminations d'origine fongiques

seulement, pour cela il n'a pas été pris en considération, vu qu'aucune noix n'a germé et ce quelque soit le milieu et les traitements utilisés.

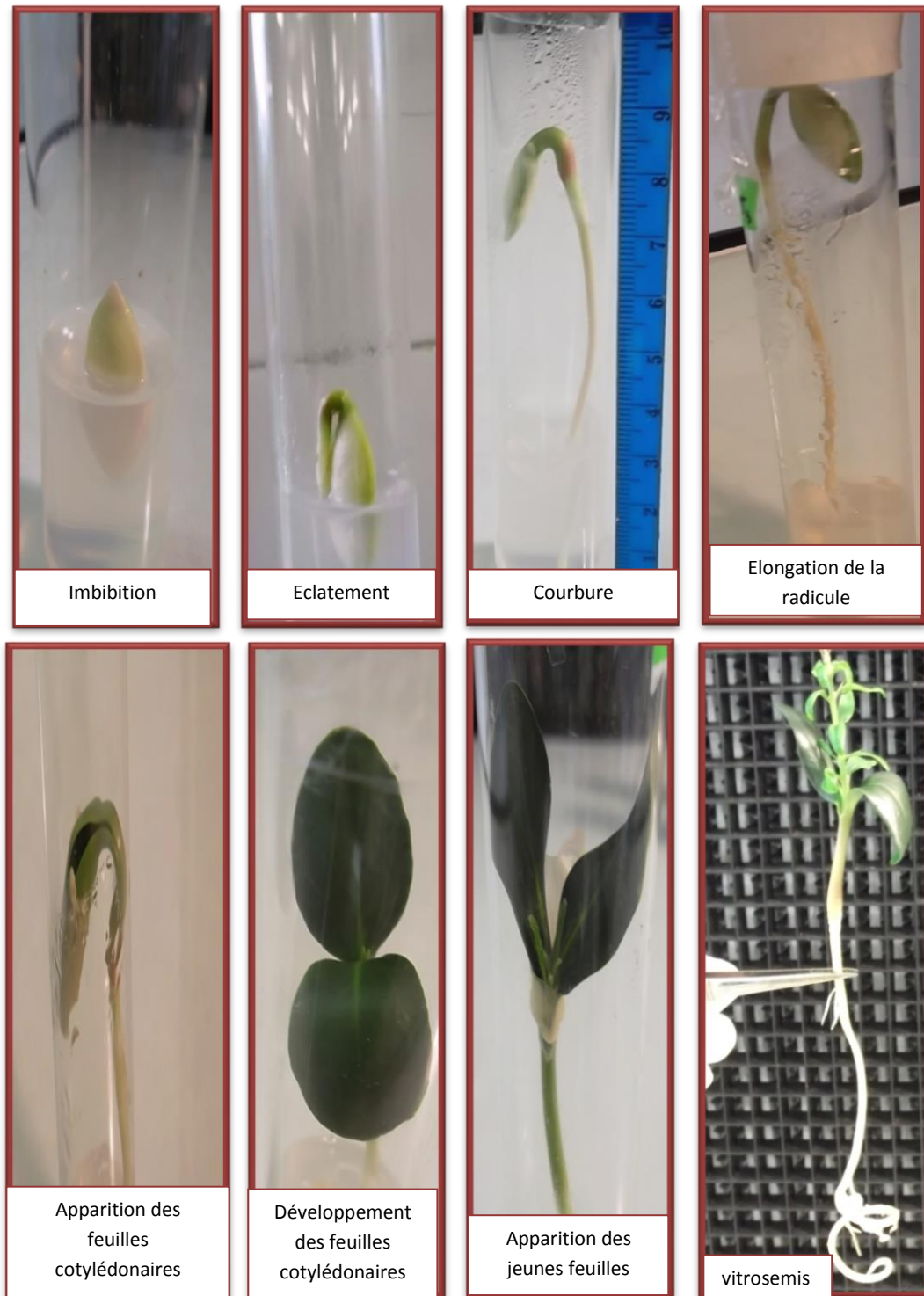
### 3.1.2. Taux de germination des amandes

La germination étant un phénomène biologique très complexe, **EVENARI, [90]** définit le phénomène comme étant un processus résultant de l'hydratation de la semence et l'apparition de la radicule.

La germination des amandes a débuté le 7<sup>ème</sup> jour par l'imbibition de l'eau et le gonflement de l'amande. Elle a donné naissance à la radicule qui a continué de s'allonger (**Figure 3.3**).

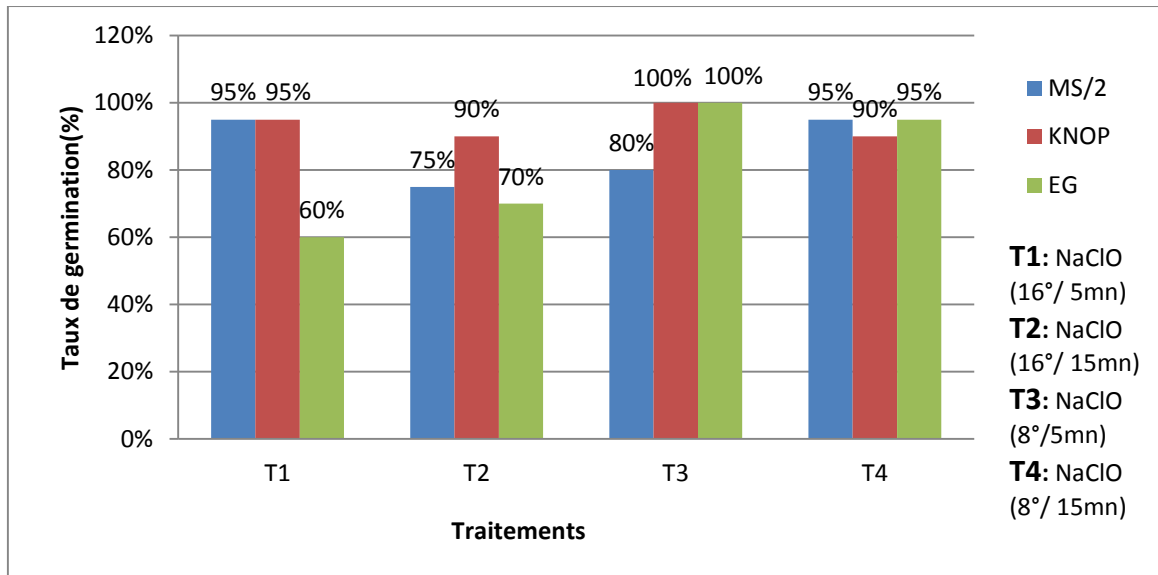
La germination passe par trois phases : l'imbibition correspondant à la réhydratation de la graine, puis l'activation de la physiologie de la graine et enfin la germination morphologique marquant la perforation de l'enveloppe par la radicule due à un allongement cellulaire **[91] [92]**.

**BINET et BRUNEL, [91]** et **COME, [92]** considèrent qu'une graine a germé dès que la radicule aura percé l'enveloppe alors que la suite du processus physiologique ne concerne que la croissance. D'autres auteurs comme **HARRINGTON, [93]** **ISTAMBOULI, [94]** **DOUAY, [95]** et **AISSA, [96]** considèrent qu'il y a germination quand la pointe de la radicule s'allonge, devient visible à l'œil nu pour devenir ensuite légèrement recourbée vers le bas.



**Figure 3.3 :** Etapes chronologiques de la germination des amandes de l'arganier

Un taux de germination important est observé, en particulier à la fin du premier mois de mise en culture, pour tout type de traitement et de milieu, il varie entre **60** et **100%** (**Figure3.4**).



**Figure 3.4** : Taux de germination des amandes d'arganier

Le milieu **Knop** et le traitement **T3** ont montré le plus fort taux de germination atteignant **100%**. Il est suivi par le traitement, **T1**, **T2** et **T4** sur le même milieu avec respectivement **95%** et **90%** (**Figure3.4**).

La germination dans le milieu eau gélosée (**EG**) avec le traitement **T3** a montré aussi un meilleur taux de germination atteignant **100%**, ce dernier a connu une diminution relative pour les autres traitements avec respectivement **95**, **70** et **60%** pour **T4**, **T2** et **T1**.

Ce taux de germination a connu une légère diminution pour le milieu **MS/2** où il est estimé à **95%** pour le traitement **T1** et **T4** et **80%** et **75 %** respectivement pour **T3** et **T2**.

Nous déduisons que la mise en culture des amandes d'arganier sur milieu **EG** préalablement trempées pendant 5 mn dans NaClO à 8° (**T3**, **EG**) donne les meilleurs résultats de la germination.

### 3.1.3. Effet du traitement et du milieu sur le développement des pousses

Les vitro-semis obtenus sont influencés par le mode désinfection et le milieu dans lequel ils sont mis en culture.

#### 3.1.3.1. Effet du traitement sur la hauteur des pousses et le nombre de feuilles

L'analyse de la variance (ANOVA) effectuée sur la hauteur des pousses, après 45 jours de culture, révèle un effet significatif de traitement sur la longueur des pousses avec **P=0,035 ; P<0,05 (Figure3.5)**.



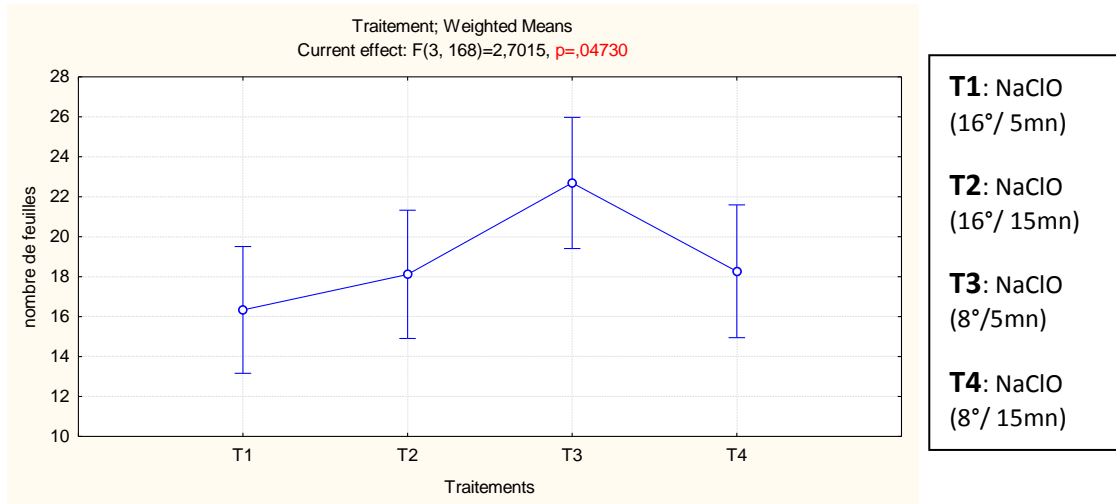
**Figure 3.5** : Effet des traitements testés sur la hauteur des pousses

Le test de Newman et Keuls montre que le traitement **T3** (trempage des amandes 5 mn dans NaClO à 8°) est favorable pour le développement en hauteur des pousses obtenues (**P=0,023 ; P<0,05**) (**Tableau 3.1**). La hauteur moyenne des pousses atteint **32,38 cm**, après 45 jours de culture (Annexe 9).

**Tableau 3.1** : Test Newman et Keuls : Hauteur des pousses/traitement

Newman-Keuls test; variable Hauteur de pousse (cm) (Spreadsheet20)					
Approximate Probabilities for Post Hoc Tests					
Error: Between MS = 116,88, df = 168,00					
Cell No.	Traitement	{1}	{2}	{3}	{4}
		25,756	28,216	32,381	30,073
1	T1		0,291655	<b>0,023410</b>	0,153374
2	T2	0,291655		0,174552	0,426029
3	T3	<b>0,023410</b>	0,174552		0,322611
4	T4	0,153374	0,426029	0,322611	

L'analyse de la variance effectuée sur le nombre de feuilles, après 45 jours de culture, révèle un effet significatif du traitement sur le développement de feuilles avec  $P=0,04$  ;  $P<0,05$  (Figure 3.6).



**Figure 3.6:** Effet des traitements testés sur le nombre des feuilles

Le Test de Newman et Keuls effectué montre que le traitement **T3** est le plus favorable pour le développement des feuilles ( $P=0,031$ ,  $P<0,05$ ) (Tableau 3.2). En effet, le nombre moyen avoisine les **22** feuilles par pousse, après 45 jours de culture (Annexe 10).

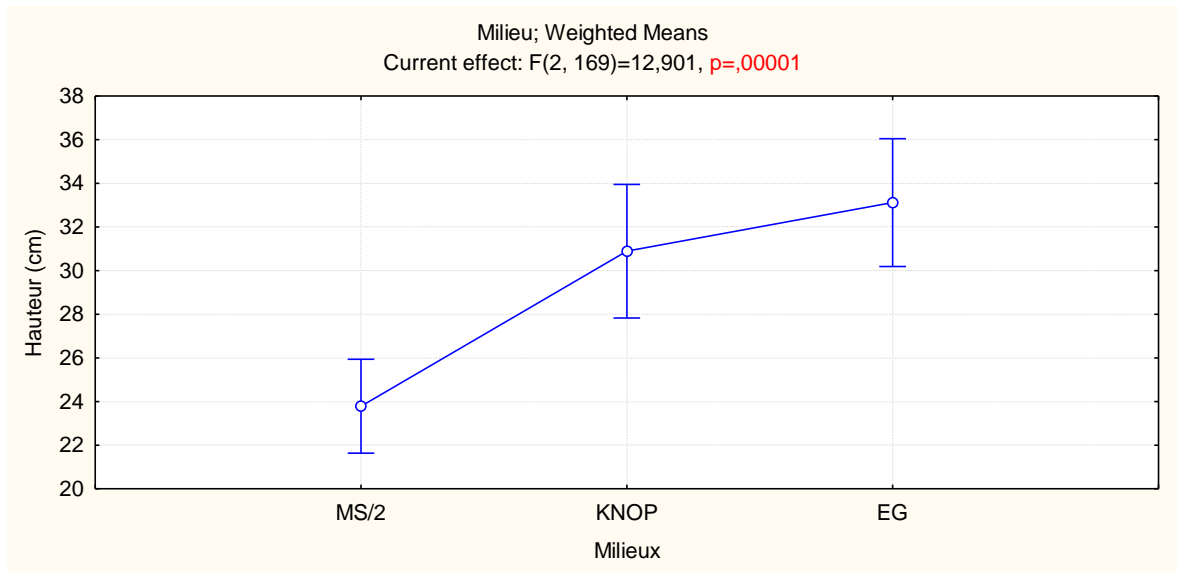
**Tableau 3.2 :** Test Newman et Keuls : Nombre de feuilles/traitement

Newman-Keuls test; variable nombre de feuilles (Spreadsheet2) Approximate Probabilities for Post Hoc Tests Error: Between MS = 116,21, df = 168,00					
Cell No.	Traitement	{1}	{2}	{3}	{4}
		16,333	18,114	22,690	18,268
1	T1		0,444139	<b>0,031921</b>	0,683302
2	T2	0,444139		0,120383	0,947004
3	T3	<b>0,031921</b>	0,120383		0,057331
4	T4	0,683302	0,947004	0,057331	

### 3.1.3.2. Effet du milieu sur la hauteur des pousses et le nombre de feuilles

L'analyse de la variance effectuée sur la hauteur des pousses, après 45 jours de culture, indique une différence très hautement significative des milieux sur la longueur des pousses avec  $P=0,00001$  ;  $P<0,05$  (Figures 3.7).





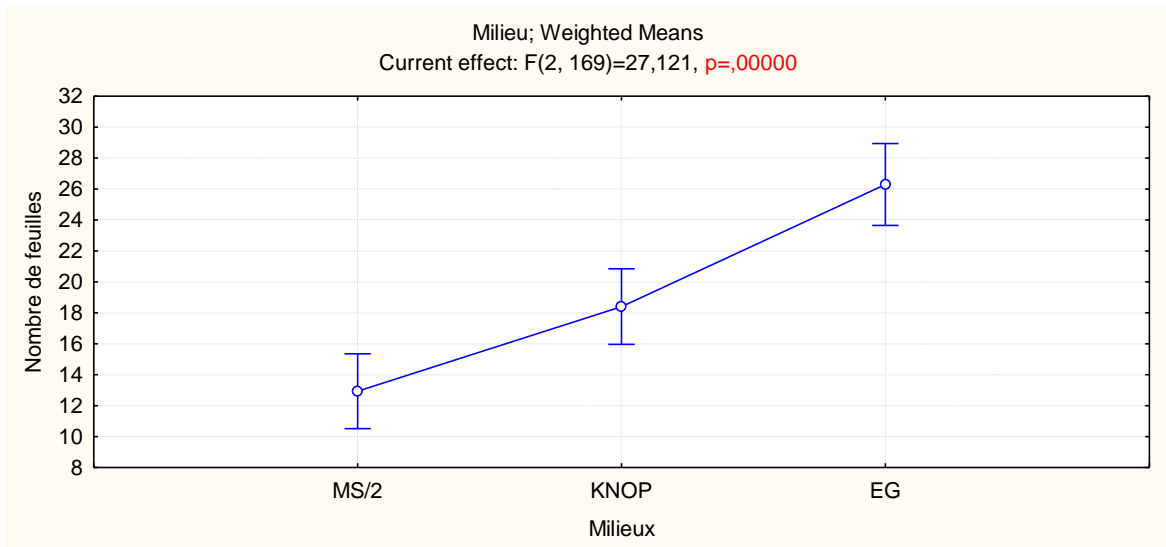
**Figure 3.7** : Effet du milieu sur la hauteur des pousses

Le Test de Newman et Keuls montre une différence au niveau des milieux EG et Knop (**P=000025 ; P<0,05** et **P=0,00023 ; P<0,05**) (Tableau 3.3). Ces deux milieux sont favorables pour le développement des pousses en hauteur. La longueur moyenne est de **33,11 cm** et **30,89 cm** pour le milieu EG et Knop respectivement (Annexe 11).

**Tableau 3.3** : Test Newman et Keuls : Hauteur des pousses/milieu

Newman-Keuls test; variable Hauteur (cm) (Spreadsheet12)				
Approximate Probabilities for Post Hoc Tests				
Error: Between MS = 106,08, df = 169,00				
Cell No.	Milieu	{1}	{2}	{3}
		23,787	30,892	33,118
1	MS/2		0,000238	0,000025
2	KNOP	0,000238		0,248747
3	EG	0,000025	0,248747	

L'analyse de la variance effectuée sur le nombre de feuilles, après 45 jours de culture, indique une différence très hautement significative des milieux sur le développement de feuilles avec **P=0,00000 ; P<0,05** (Figure 3.8).



**Figure 3.8** : Effet du milieu sur le nombre de feuilles

Le Test de Newman et Keuls montre que le milieu EG est le plus favorable pour le développement des feuilles ( $P=0,00002$  ;  $P<0,05$ ) (Tableau 3.4), avec un nombre moyen égale à **26**, après 45 jours de culture (Annexe 12).

**Tableau 3.4** : Test Newman et Keuls : Nombre de feuilles/milieu

Newman-Keuls test; variable Nombre de feuilles (Spreadsheet7) Approximate Probabilities for Post Hoc Tests Error: Between MS = 91,673, df = 169,00				
Cell No.	Milieu	{1}	{2}	{3}
		12,934	18,400	26,294
1	MS/2		0,002320	0,000022
2	KNOP	0,002320		0,000019
3	EG	0,000022	0,000019	

Nous pouvons déduire que les milieux et les traitements testés ont un effet sur la hauteur des pousses et sur le nombre de feuilles par pousse de l'arganier.

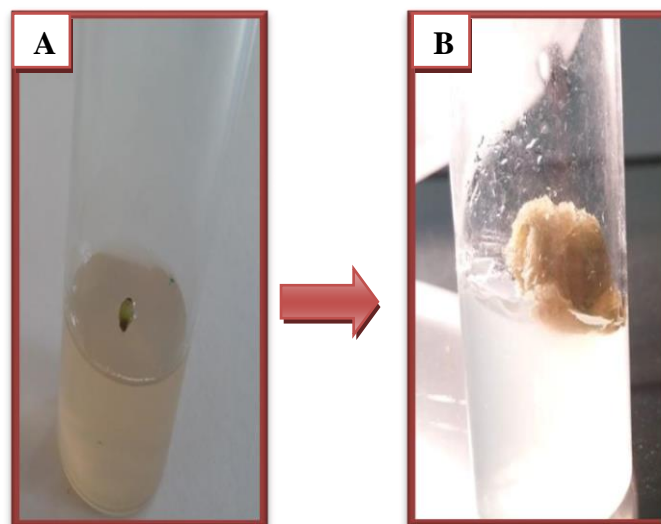
### 3.2. Induction de la callogenèse

L'initiation de la callogenèse est réalisée à partir d'explants, prélevés aseptiquement des vitro-semis issus de germination *in vitro* des graines d'arganier.

#### 3.2.1. Réactivité des explants en cal

La réactivité des explants s'est manifestée dès le 20<sup>ème</sup> jour de culture et s'est traduite par un gonflement des explants.

A partir du 40<sup>ème</sup> jour, de petits amas cellulaires apparaissent au centre de l'explant, indiquant l'initiation de la dédifférenciation cellulaire. Ce phénomène se propage et atteint les sections de l'explant. Des structures de couleur blanchâtre ou verdâtre au niveau des explants, évoluent par la suite en cal (**Figure 3.9**).



**Figure 3.9** : Développement d'un cal

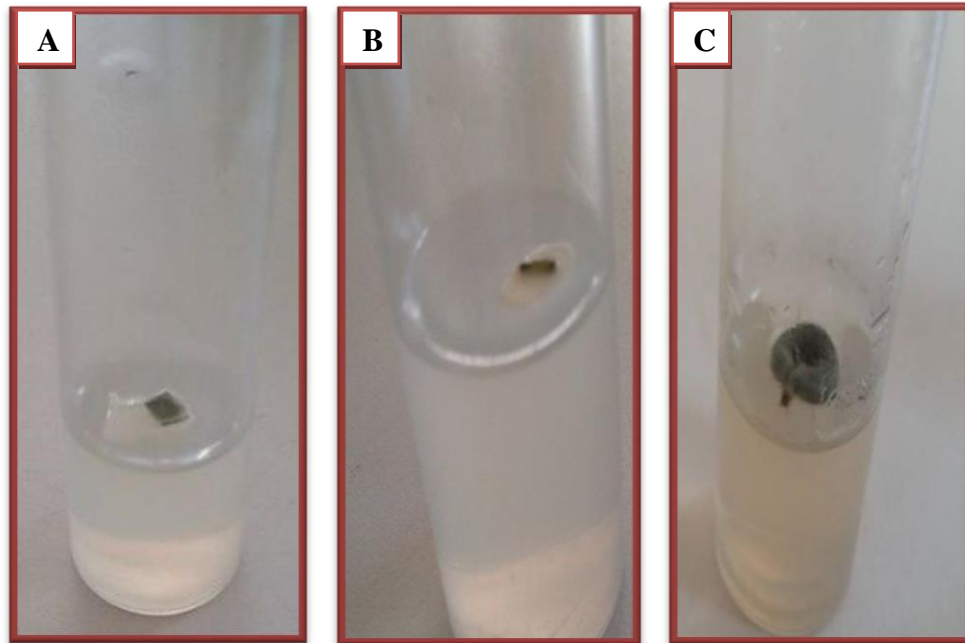
A : Cal de 45 jours  
B : Cal de 120 jours

#### 3.2.2. Contamination

Au bout des trois premiers mois de culture, l'apparition de quelques contaminations est relevée. Ces dernières sont souvent d'origine bactérienne, tous milieux et traitements confondus (**Figure 3.11 A et B**). En effet, sur les **2640** explants mis en culture, **198** contaminations sont enregistrées. Les explants

contaminés sont écartés et notre étude s'est poursuivie sur les **2442** explants restants.

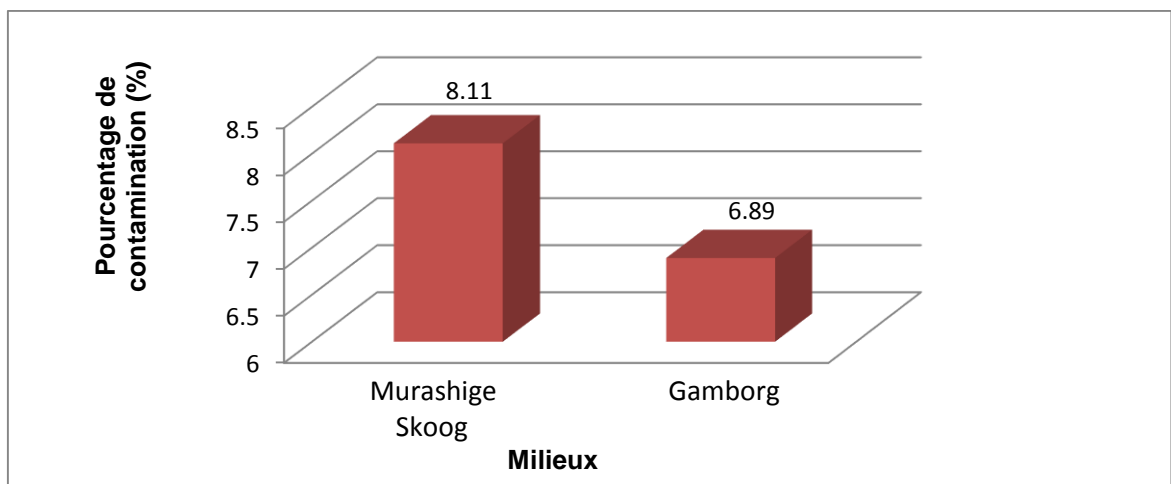
Au-delà de cette période, l'apparition des contaminations est limitée aux contaminations d'origine fongique englobant tout l'explant (**Figure 3.10 C**).



**Figure 3.10** : Contamination des explants

**A et B** : Contaminations bactériennes  
**C** : Contamination fongique

Au terme de trois mois de culture, un très faible pourcentage de contamination est enregistré. Il est estimé à **8,11%** pour le milieu **MS** et **6,89%** pour le milieu Gamborg (**Figure 3.11**).



**Figure 3.11** : Pourcentage de contamination

### 3.2.3. Brunissement

Les premières manifestations de brunissement sont perceptibles sur les explants, 40 jours après la mise en culture sur milieu d'induction, engendrant un ralentissement, puis un arrêt de la réactivité avec parfois apparition d'une nécrose entraînant la mort de l'explant (**Figure 3.12**).



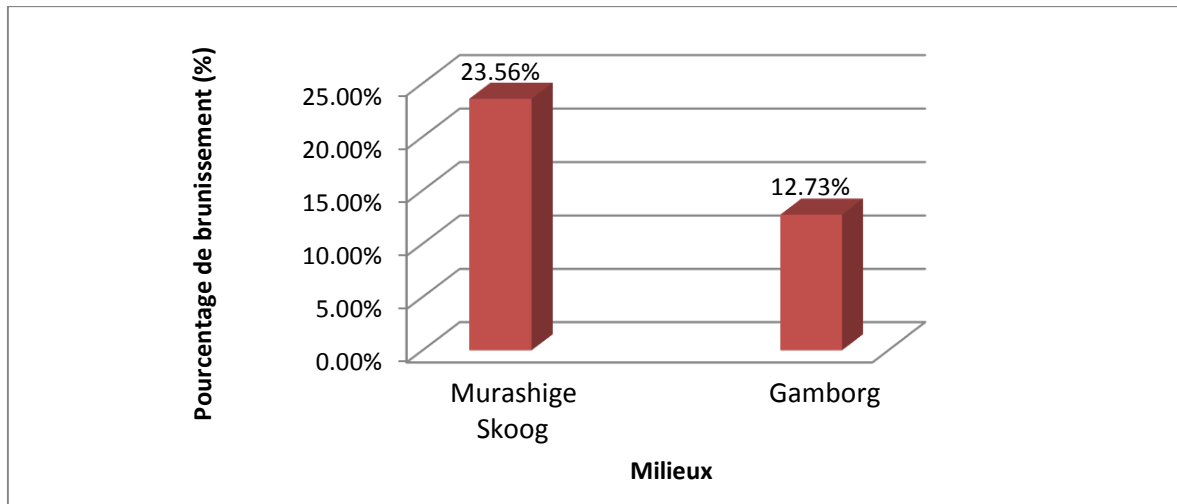
**Figure 3.12** : Brunissement des cals issus de feuilles cotylédonaire sur milieu MS

Le brunissement des explants est estimé en fonction de trois paramètres :

- La composition des milieux de culture ;
- Le type d'explant ;
- Les équilibres hormonaux.

#### 3.2.3.1.Effet du phénomène de brunissement sur le milieu de culture

En analysant les résultats, nous constatons que le milieu MS est le plus atteint par le phénomène de brunissement avec un taux de **23,56%** comparé au milieu Gamborg avec seulement **12,73%** (**Figure 3.13**).



**Figure 3.13** : Pourcentage du brunissement sur les milieux de base

Cette différence pourrait être expliquée par l'hétérogénéité des réponses des explants à l'intérieur de chaque milieu et non pas à l'effet de brunissement lui-même. En effet, l'analyse statistique (Test de Student) effectuée après deux mois de culture montre une différence non significative entre les deux milieux utilisés (**MS et Gamborg**) ( $P=0,11$  ;  $P>0,05$ ) (**Tableau 3.5**).

**Tableau3.5** : Effet de milieu de base sur le nombre moyen des cals affectés

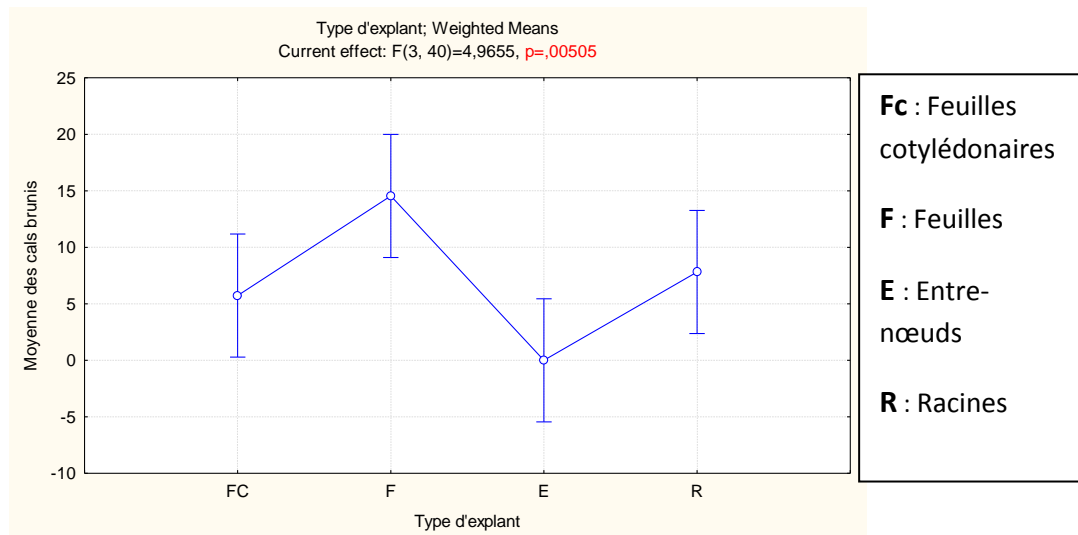
Variable	T-tests; Grouping: Milieu (Spreadsheet2)								
	Mean MS	Mean G	t-value	df	p	Valid N MS	Valid N G	Std.Dev. MS	Std.Dev. G
cals brunis	7,068182	3,818182	1,600924	86	0,113061	44	44	10,07737	8,931972

### 3.2.3.2.Effet du phénomène de brunissement sur le type d'explant

Ce phénomène est étudié sur les deux milieux testés Murashige et Skoog et Gamborg.

#### 3.2.3.2.1. Effet du brunissement sur le type d'explant mis sur milieu MS

L'analyse statistique (ANOVA simple) effectuée après deux mois de culture, révèle une différence significative entre les différents types d'explants utilisés avec  $P=0,005$  ;  $P<0,05$  (**Figure 3.14**).



**Figure 3.14** : Effet de brunissement sur le type d'explant (Milieu MS)

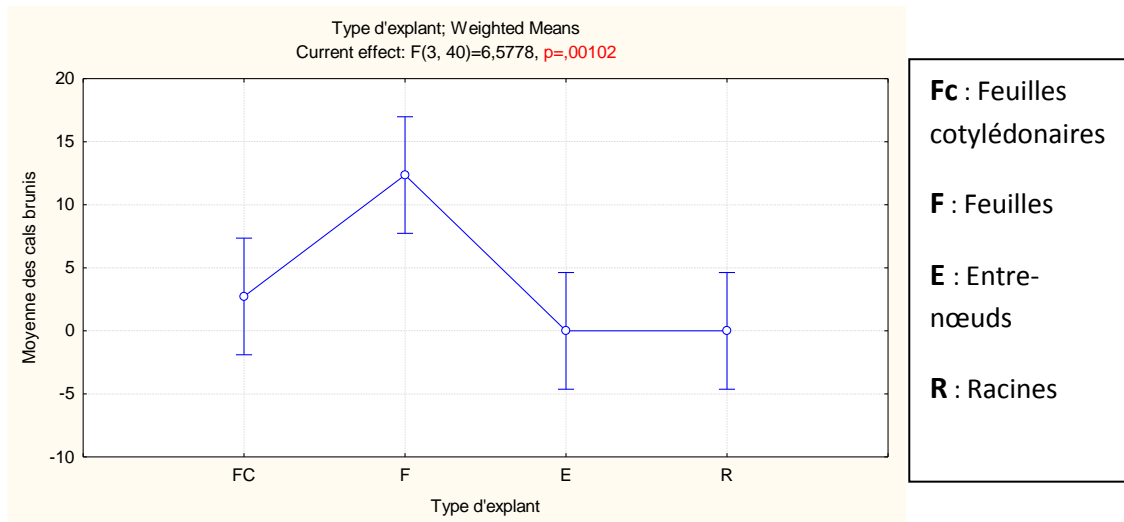
Le test de Newman-Keuls, effectué après deux mois de culture, montre que le phénomène de brunissement est inexistant chez les explants des entre nœuds. Les explants des racines sont moins touchés par ce phénomène avec **19,09%** de brunissement seulement, comparé aux feuilles et feuilles cotylédonaire avec respectivement **48,38%** et **26,06%** d'explants atteints (**Tableau 3.6**) (Annexe 13).

**Tableau 3.6** : Test Newman-Keuls: Effet de brunissement sur le type d'explant/MS

Newman-Keuls test; variable Moyenne des cals brunis (Spreadsheet1)					
Approximate Probabilities for Post Hoc Tests					
Error: Between MS = 79,914, df = 40,000					
Cell No.	Type d'explant	{1}	{2}	{3}	{4}
1	FC	5,7273	14,545	0,0000	7,8182
2	F	0,065498	0,065498	0,140930	0,586491
3	E	0,140930	0,002605		0,113372
4	R	0,586491	0,085337	0,113372	

### 3.2.3.2.2. Effet du brunissement sur le type d'explant mis sur milieu Gamborg

L'analyse statistique effectuée après deux mois de culture, révèle une différence significative entre les différents types d'explants testés, sur le phénomène de brunissement avec **P=0,001** ; **P<0,05** (**Figure 3.15**).



**Figure 3.15** : Effet de brunissement sur le type d'explant (Milieu Gamborg)

Le test de Newman-Keuls indique que les explants des entre-nœuds et des racines mis en culture sur le milieu Gamborg ne sont pas touchés par le phénomène de brunissement (**Tableau 3.7**).

Les explants de feuilles ont montré les plus forts taux de brunissement comparés aux explants de feuilles cotylédonaire avec respectivement **41,21%** et **9,09%** (Annexe 14).

**Tableau 3.7** : Test Newman-Keuls: Effet de brunissement sur le type d'explant/G

Newman-Keuls test; variable Moyenne des cals brunis (Spreadsheet12)					
Approximate Probabilities for Post Hoc Tests					
Error: Between MS = 57,618, df = 40,000					
Cell No.	Type d'explant	{1}	{2}	{3}	{4}
		2,7273	12,364	0,0000	0,0000
1	FC		0,005059	0,404603	0,679117
2	F	0,005059		0,001395	0,002577
3	E	0,404603	0,001395		1,000000
4	R	0,679117	0,002577	1,000000	

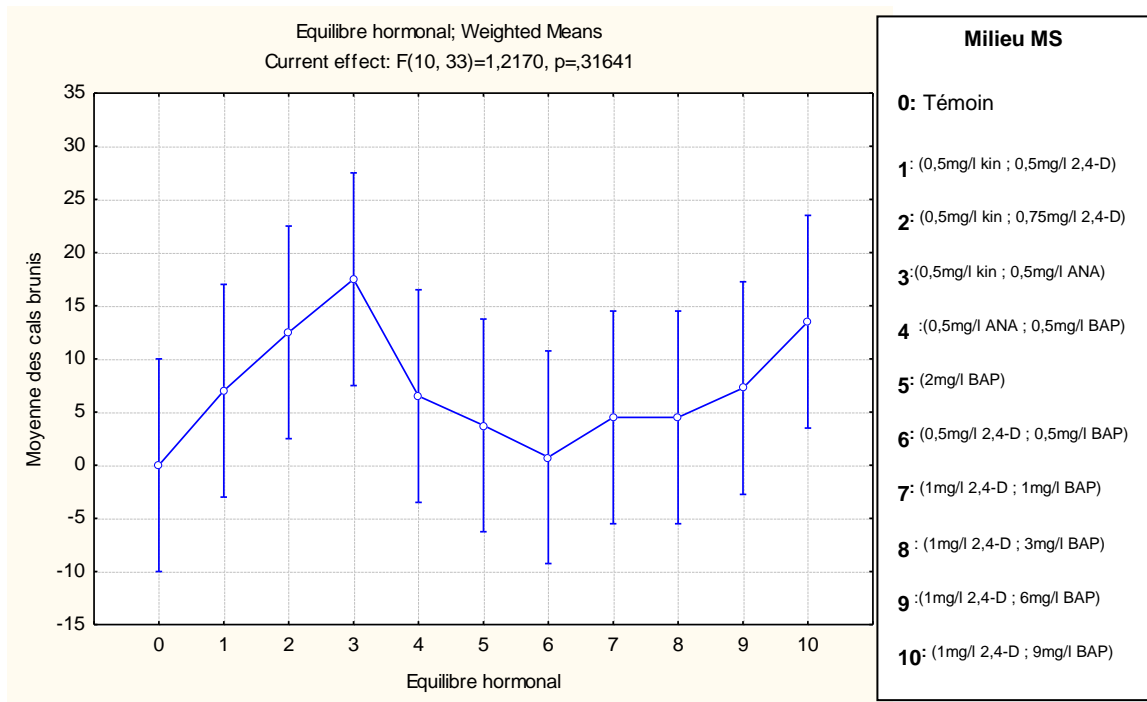
### 3.2.3.3.Effet de l'équilibre hormonal sur le phénomène de brunissement

L'étude est réalisée sur les deux milieux Murashige et Skoog et Gamborg.

#### 3.2.3.3.1. Phénomène de brunissement sur le milieu MS

L'analyse statistique effectuée après deux mois de culture, ne montre pas une différence significative entre les balances hormonales testées sur le phénomène de brunissement des explants mis en culture sur le milieu **MS** avec **P=0,31 ; P>0,05 (Figure 3.16)** (Annexe 15).

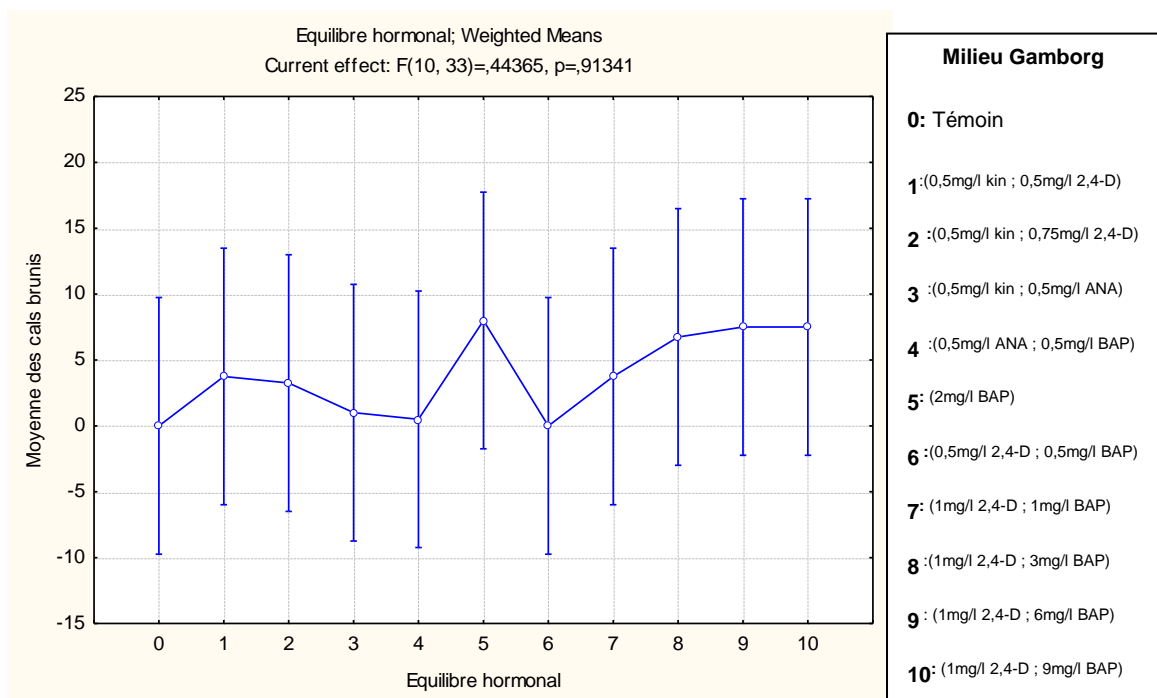




**Figure 3.16** : Effet de l'équilibre hormonal sur le brunissement (Milieu MS)

### 3.2.3.3.2. Phénomène de brunissement sur le milieu Gamborg

L'analyse statistique effectuée après deux mois de culture, ne révèle pas une différence significative entre les balances hormonales testées sur le phénomène de brunissement des explants mis en culture sur le milieu Gamborg avec  $P=0,91$  ;  $P>0,05$  (Figure 3.17) (Annexe 16).



**Figure 3.17** : Effet de l'équilibre hormonal sur le brunissement (Milieu Gamborg)

### 3.2.4. Aptitude à la callogenèse

La callogenèse au niveau des explants mis en culture s'est toujours manifestée sous forme de cals friables ou compacts. Elle varie cependant, en fonction de trois paramètres:

- Milieu de culture ;
- Type d'explants ;
- Equilibre hormonal.

#### 3.2.4.1. Effet des milieux de culture sur l'induction de callogenèse

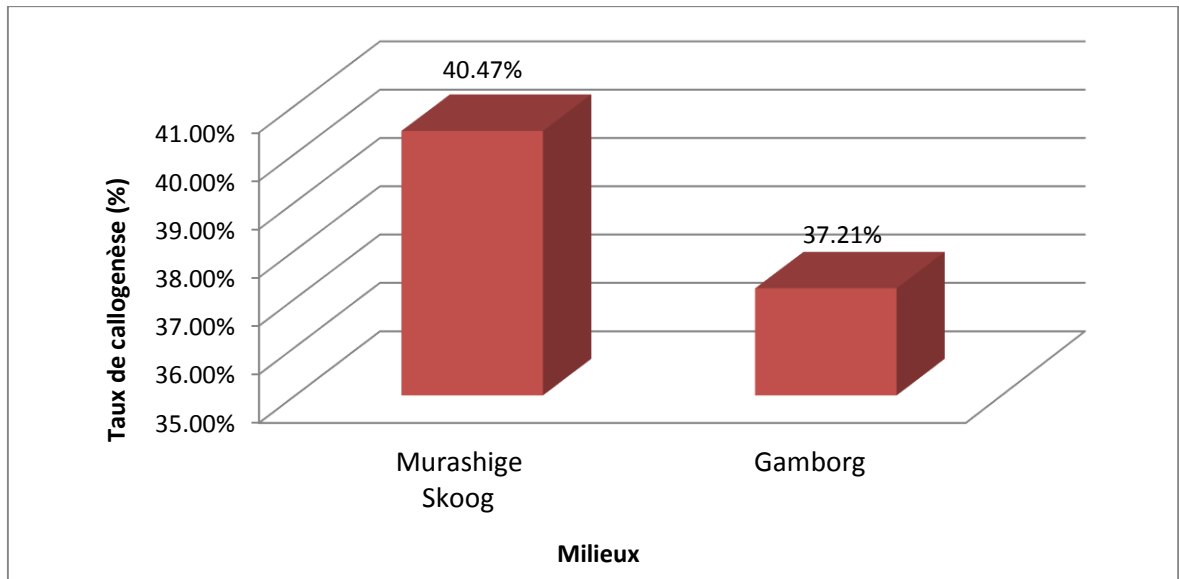
L'analyse statistique (Test de Student) effectuée à la fin de deux mois de culture ne révèle aucune différence significative entre les deux milieux testés (MS et Gamborg) sur l'induction des cals d'arganier avec **P=0,76 ; P>0,05 (Tableau 3.8)**.

**Tableau 3.8** : Effet de milieu sur l'induction de callogenèse

Variable	T-tests; Grouping: Milieu (Spreadsheet9)									
	Group 1: MS		Group 2: Gamborg (G)		t-value	df	p	Valid N MS	Valid N G	Std.Dev. MS
Mean MS	Mean G									
Nombre des cals	9,022727	8,409091	0,297461	86	0,766832	44	44	10,25600	9,058770	

Les deux milieux de culture **MS** et **Gamborg** ont permis, tous les deux, d'aboutir à la réactivité des explants mis en culture.

Cependant, des différences sont constatées par rapport à l'époque de l'apparition des cals. En effet, les explants mis en culture sur le milieu **MS** sont les premiers à montrer une callogenèse et ont présenté à la fin des deux premiers mois de culture un taux de callogenèse important estimé à **40,47 %** comparé aux explants mis en culture sur le milieu **Gamborg** avec **37,21 %** d'induction de la callogenèse (**Figure 3.18**).

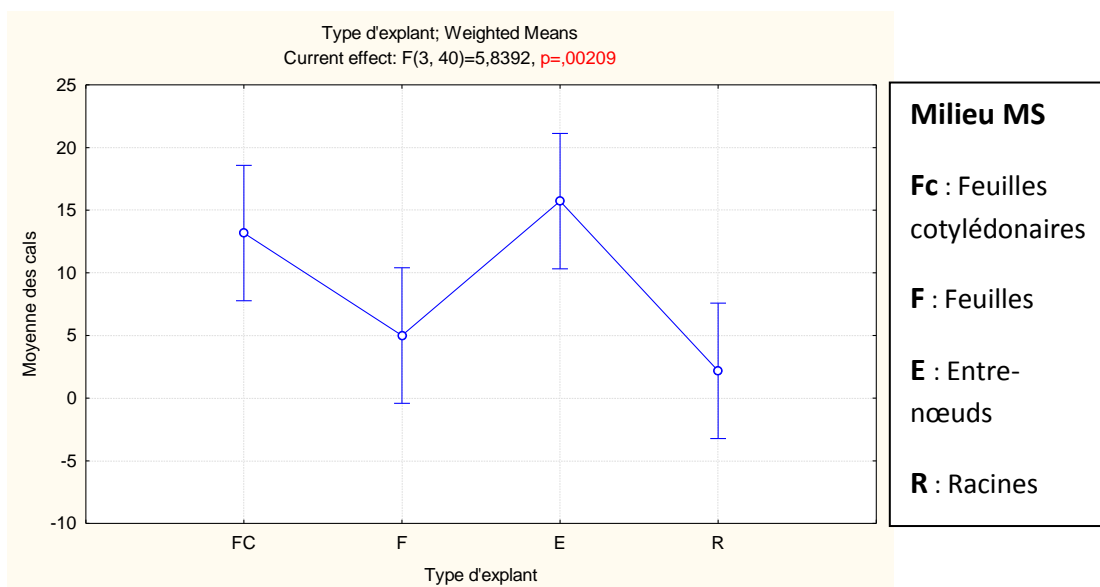


**Figure 3.18** : Pourcentage de callogenèse sur les deux milieux

### 3.2.4.2. Effet de type d'explant sur l'induction de callogenèse

#### 3.2.4.2.1. Callogenèse sur le milieu MS

L'analyse statistique effectuée après deux mois de culture sur milieu **MS**, indique que les différents types d'explants testés sont significativement différents par leurs réactivité avec **P=0,002** ; **P<0,05** (**Figure 3.19**).



**Figure 3.19** : Effet de type d'explant sur l'induction de callogenèse (Milieu MS)

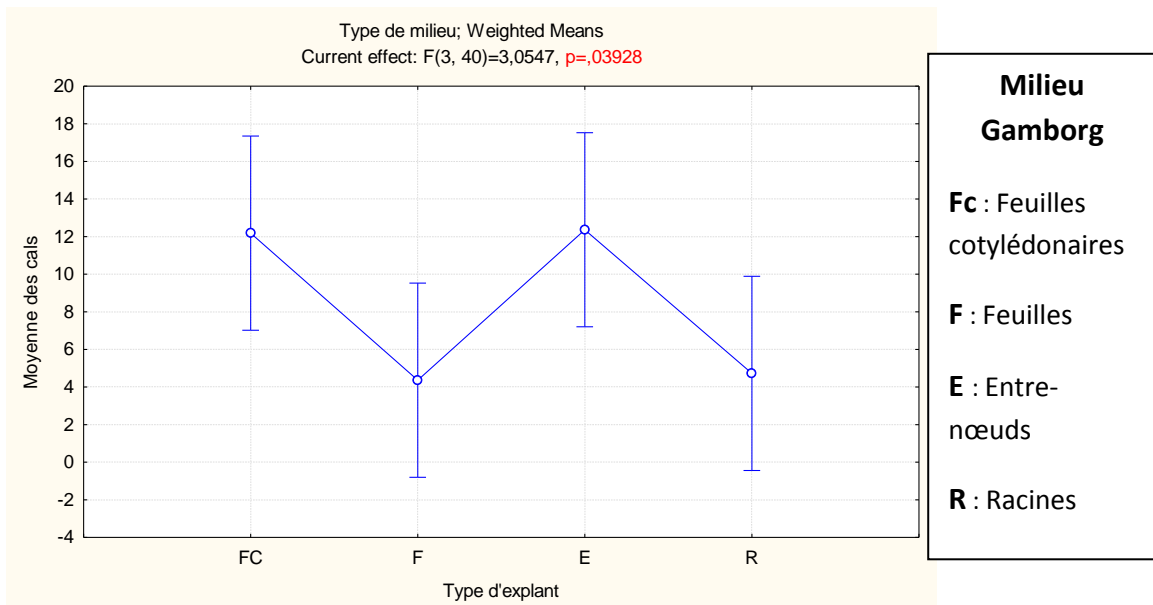
Le test de Newman-Keuls (**Tableau 3.9**) montre que les explants d'entre-nœuds (**E**) mis sur milieu **MS** présentent un taux de callogenèse très important, atteignant **52,42%** comparativement aux autres types d'explants, fluctuants et plus faibles à la fin des deux premiers mois de culture avec **43,94**; **16,66** et **7,27%** respectivement pour feuilles cotylédonaire (**FC**), feuilles (**F**) et racines (**R**) (Annexe 17).

**Tableau 3.9** : Test Newman-Keuls : Effet de type d'explant sur l'induction/MS

Newman-Keuls test; variable Moyenne des cals (Spreadsheet8) Approximate Probabilities for Post Hoc Tests Error: Between MS = 78,636, df = 40,000					
Cell No.	Type d'explant	{1} 13,182	{2} 5,0000	{3} 15,727	{4} 2,1818
1	FC		0,036610	0,504841	0,015995
2	F	0,036610		0,019178	0,460577
3	E	0,504841	0,019178		0,004966
4	R	0,015995	0,460577	0,004966	

#### 3.2.4.2.2. Callogenèse sur le milieu Gamborg

L'analyse statistique effectuée après deux mois de culture sur milieu **Gamborg**, indique que les types d'explants testés sont significativement différents par rapport à leurs réactivité en cals avec **P=0,03** ; **P<0,05** (**Figure 3.20**).



**Figure 3.20** : Effet de type d'explant sur l'induction de callogenèse (Milieu Gamborg)

Le test de Newman-Keuls (**Tableau 3.10**) indique que les explants de type entre-nœuds (**E**) mis en culture sur le milieu Gamborg présentent un taux de callogenèse important atteignant **41,21%**, ce dernier est presque similaire à celui de feuilles cotylédonaire (**FC**) avec **40,61%**.

Par contre, les explants de feuilles (**F**) et de racines (**R**) ont présenté un taux de callogenèse analogue et très faible avec respectivement **15,76**; **15,55%** (Annexe 18).

**Tableau 3.10** : Test Newman-Keuls : Effet de type d'explant sur l'induction /G

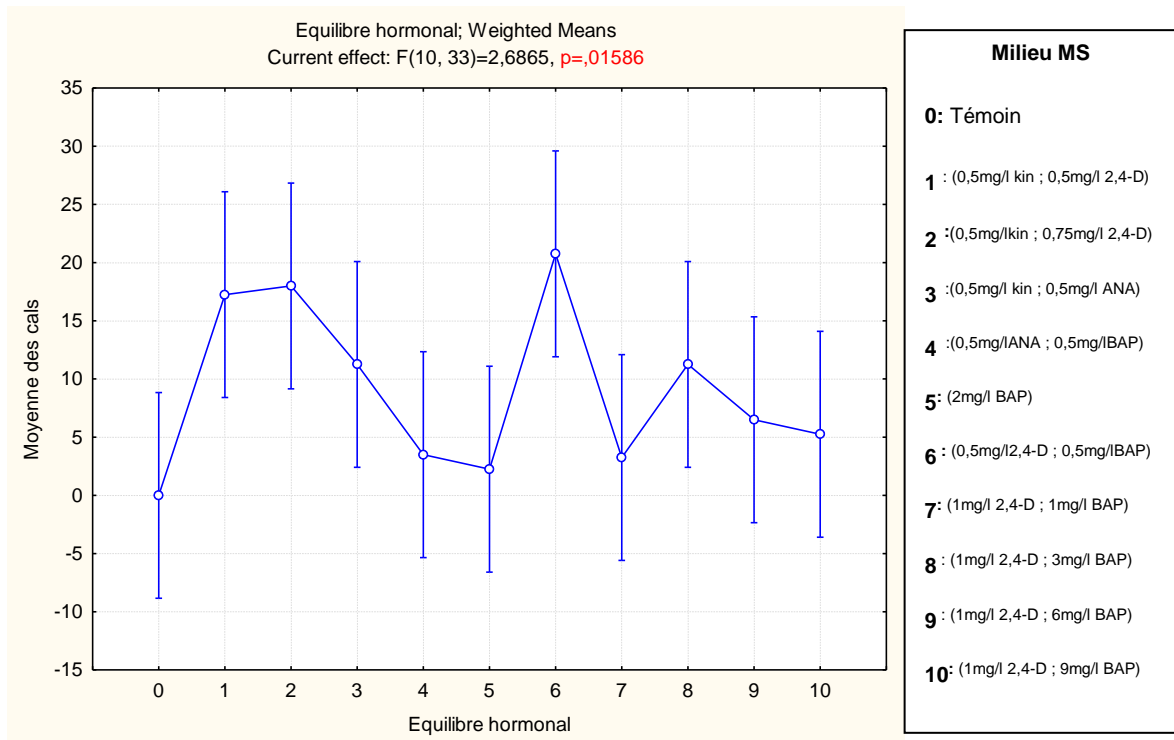
Newman-Keuls test; variable Moyenne des cals (Spreadsheet18) Approximate Probabilities for Post Hoc Tests Error: Between MS = 71,773, df = 40,000					
Cell No.	Type de milieu	{1}	{2}	{3}	{4}
		12,182	4,3636	12,364	4,7273
1	FC2		0,090002	0,960224	<b>0,045683</b>
2	F2	0,090002		0,136790	0,920426
3	E2	0,960224	0,136790		0,099837
4	R2	<b>0,045683</b>	0,920426	0,099837	

### 3.2.4.3. Effet de l'équilibre hormonal sur l'induction de callogenèse

En général, tous les équilibres hormonaux ont induit une réactivité des explants mis en culture sur les milieux MS et Gamborg, exception faite sur les milieux dépourvus de régulateur de croissance où aucun explant n'a formé un cal. Cependant, des différences ont été enregistrées par rapport à l'époque d'apparition des cals et au taux de callogenèse après les deux premiers mois de culture.

#### 3.2.4.3.1. Effet de l'équilibre hormonal sur l'induction de callogenèse sur milieu MS

L'analyse statistique effectuée à la fin de deux mois de culture révèle une différence significative entre les différents traitements hormonaux appliqués sur le milieu **MS** avec **P=0,01** ; **P<0,5** (**Figure 3.21**).



**Figure 3.21 :** Effet de l'équilibre hormonal sur la callogenèse (Milieu MS)

Le traitement **MS6** contenant la combinaison hormonal (0,5mg/l 2,4-D ; 0,5mg/l BAP) est le premier à montrer une callogenèse avec un taux plus élevé de **69,16%** suivi par les milieux **MS2** (0,5 mg/l Kin ; 0,75mg/l 2,4D), **MS1** (0,5 mg/l Kin ; 0,5mg/l , 2,4-D), **MS3** (0,5mg/l Kin ;0,5mg/l ANA) et **MS8** (1mg/l 2,4-D ; 3mg/l BAP) dont les taux sont moins élevés, atteignant respectivement **60 ; 57,5; 37,50** et **37,50 %** (Annexe 19). Ces cinq traitements hormonaux se retrouvent dans le groupe 4 (**Tableau 3.11**).

Le groupe 1 comporte les milieux qui présentent les plus faibles taux et qui sont estimés à **21,66 ; 17,5; 11,66; 10,83** et **7,5%** enregistrés respectivement pour les milieux **MS9** (1mg/l 2,4-D, 6mg/l BAP), **MS10** (1mg/l 2,4-D, 9mg/l BAP), **MS4** (0,5mg/l ANA, 0,5mg/l BAP), **MS7** (1mg/l 2,4-D, 1mg/l BAP) et **MS5** (2mg/l BAP) (**Tableau 3.11**).

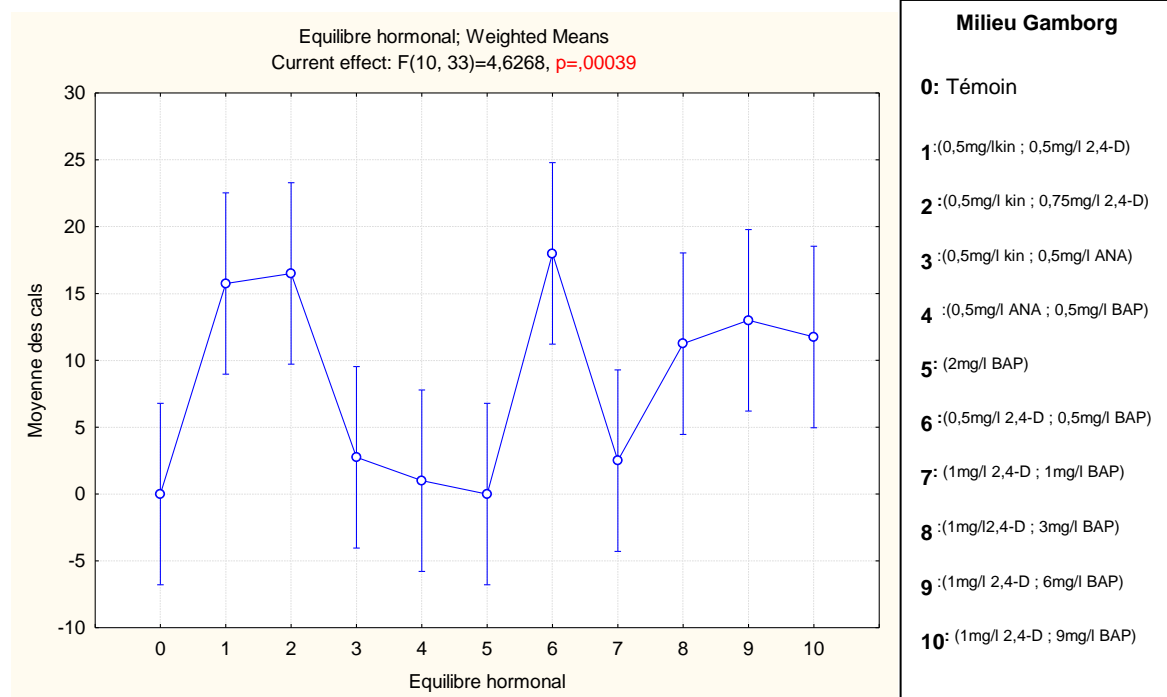
Aucun explant n'a présenté une callogenèse sur le milieu témoin, dépourvu de régulateurs de croissance.

**Tableau 3.11** : Test Newman et Keuls : Effet de l'équilibre hormonal/ MS

Newman-Keuls test; variable Moyenne des cals Homogenous Groups, alpha = ,05000 Error: Between MS = 75,553, df = 33,000						
Cell No.	Equilibre hormonal	Moyenne des cals Mean	1	2	3	4
1	0	0,00000	****			
6	5	2,25000	****			
8	7	3,25000	****			
5	4	3,50000	****			
11	10	5,25000	****	****		
10	9	6,50000	****	****	****	
9	8	11,25000	****	****	****	****
4	3	11,25000	****	****	****	****
2	1	17,25000		****	****	****
3	2	18,00000			****	****
7	6	20,75000				****

### 3.2.4.3.2.Effet de l'équilibre hormonal sur l'induction sur milieu Gamborg

L'analyse statistique effectuée à la fin de deux mois de culture montre une différence très significative entre les différents traitements hormonaux appliqués sur milieu **Gamborg** avec **P=0,00039** ; **P<0,5** (**Figure 3.22**).

**Figure 3.22** : Effet de l'équilibre hormonal sur la callogenèse / Gamborg

Le milieu **G6** contenant la combinaison hormonale (0,5mg/l 2,4-D, 0,5mg/l BAP) est le premier à montrer une callogenèse avec un taux plus élevé de **60%** suivi par les milieux **G2** (0,5 mg/l Kin; 0,75 mg/l 2,4D), **G1** (0,5 mg/l Kin ; 0,5mg/l 2,4D), **G9** (1mg/l 2,4-D, 6mg/l BAP), **G10** (1mg/l 2,4-D, 9mg/l BAP) et **G8** (1mg/l 2,4-D, 3mg/l BAP), dont les taux de callogenèse sont moins élevés atteignant respectivement **55; 52,5; 43,33; 39,16** et **37,5%** (Annexe 20). Ces milieux se retrouvent dans le groupe 4 (**Tableau 3.12**).

Le groupe 1 contient les milieux qui présentent les plus faibles taux de callogenèse, ils sont estimés à **9,16, 8,33** et **3,33%** respectivement pour les milieux **G3** (0,5mg/l ANA, 0,5mg/l Kin), **G7** (1mg/l 2,4-D, 1mg/l BAP) et **G4** (0,5mg/l ANA, 0,5mg/l BAP) (**Tableau 3.12**).

Les explants mis en culture sur les milieux **G5** (2mg/l BAP) et le témoin (**G0**:sans régulateurs de croissance), n'ont pas présenté de callogenèse.

**Tableau 3.12** : Test de Newman et Keuls : Effet d'équilibre hormonal / Gamborg

Newman-Keuls test; variable Moyenne des cals Homogenous Groups, alpha = ,05000 Error: Between MS = 44,515, df = 33,000						
Cell No.	Equilibre hormonal	Moyenne des cals Mean	1	2	3	4
1	0	0,00000	****			
6	5	0,00000	****			
5	4	1,00000	****	****		
8	7	2,50000	****	****	****	
4	3	2,75000	****	****	****	
9	8	11,25000	****	****	****	****
11	10	11,75000	****	****	****	****
10	9	13,00000	****	****	****	****
2	1	15,75000		****	****	****
3	2	16,50000			****	****
7	6	18,00000				****



### 3.2.5. Aspect morphologique des cals

L'aspect des cals varie énormément d'un traitement hormonal à un autre (**Tableau 3.13**).

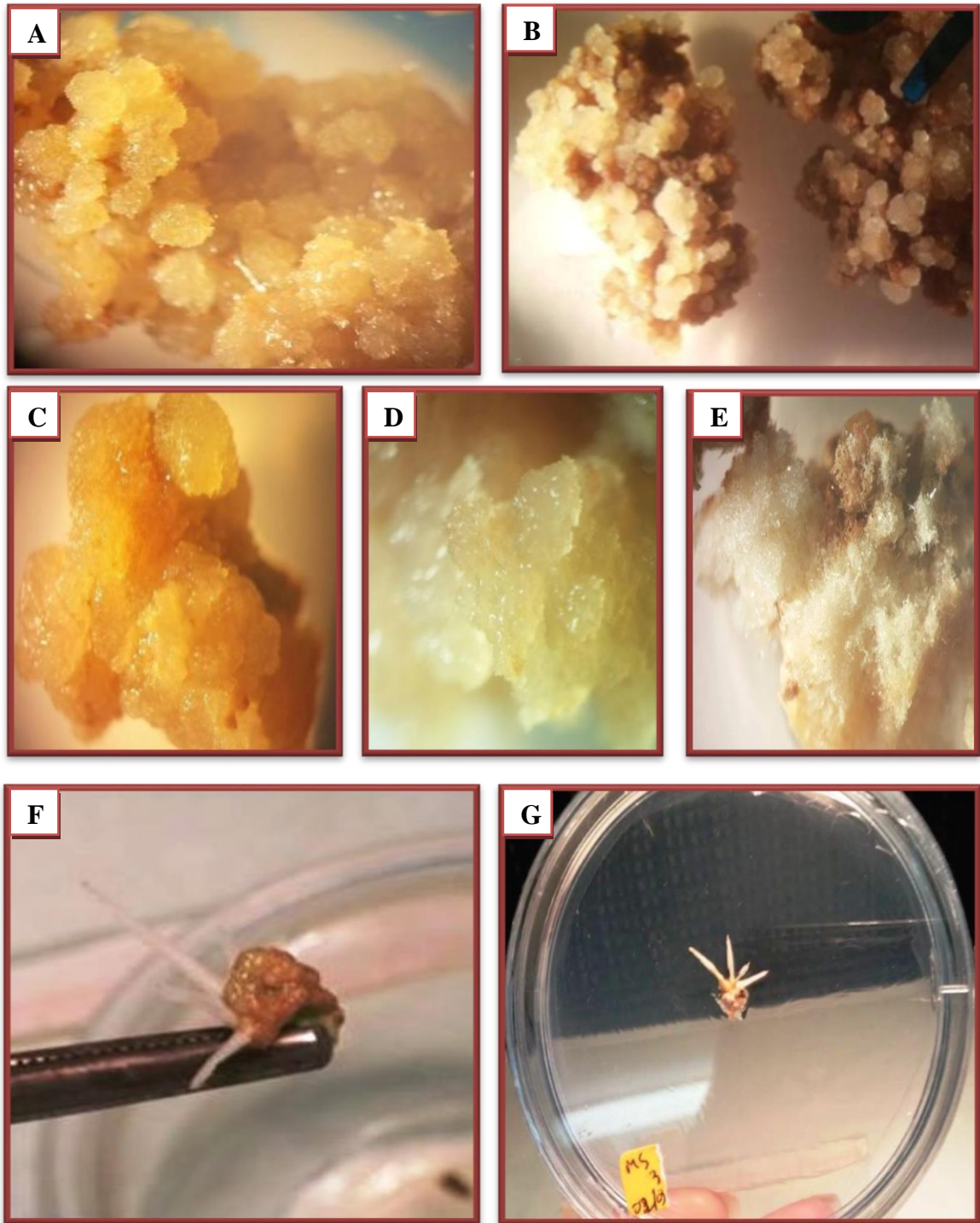
**Tableau 3.13** : Aspect des cals en fonction du traitement hormonal

<b>Combinaison de régulateur de croissance sur milieux MS et Gamborg</b>	<b>Couleur</b>	<b>Volume / Texture</b>
<b>1</b> :(0,5mg/l kin ; 0,5mg/l 2,4-D)	Transparent/beige	Très petit, friable
<b>2</b> :(0,5mg/lkin ; 0,75mg/l 2,4-D)	Beige/Brun	Volumineux, friable
<b>3</b> :(0,5mg/l kin ; 0,5mg/l ANA)	Beige/Brun	Moyen, nodulaire
<b>4</b> :(0,5mg/l ANA ; 0,5mg/lBAP)	Blanc/beige	Minuscule, très dur, fibreux
<b>5</b> :(2 mg/l BAP)	Pas de cals	Pas de cals
<b>6</b> :(0,5mg/l 2,4-D ; 0,5mg/lBAP)	Beige/brun	Très volumineux, nodulaire et friable
<b>7</b> :(1mg/l 2,4-D ; 1mg/l BAP)	beige	Moyen, friable
<b>8</b> :(1mg/l 2,4-D ; 3mg/l BAP)	beige	Moyen, spongieux
<b>9</b> :(1mg/l 2,4-D ; 6mg/l BAP)	Brun/marron	Moyen, friable
<b>10</b> :(1mg/l 2,4-D ; 9mg/l BAP)	Brun/marron	Moyen, friable

La combinaison de 2,4-D et de BAP avec 0,5 mg/l chacune, engendre des cals nodulaires, friables, très volumineux et cela pour les deux milieux MS et Gamborg (**Figure 3.23 A et B**).

Pour les autres combinaisons hormonales, les cals prennent une texture friable de couleur beige,transparent ou brun (**Figure 3.23 C et D**).

L'association Kin/ANA ou BAP/ANA à 0,5 mg/l pour chaque auxine et cytokinine, montre que les explants d'entre-nœuds, de racines et de feuilles cotylédonaires engendrent des cals blanc spongieux (**Figure 3.23 E**). Quant aux explants de feuilles, ils donnent naissance à des cals avec des racines de couleur blanc (**Figure 3.23 F et G**). Ces derniers sont écartés, vu l'aspect des cals qui est dur limitant leur développement ultérieur.



**Figure 3.23** : Aspect, des cals obtenus

-Observation sous loupe binoculaire (A, B, C, D et E)

**A, B** : Cals nodulaires et friables (A : x25 ; B : x16)

**C, D** : Cals lisses et friables (C : x16 ; D:x25)

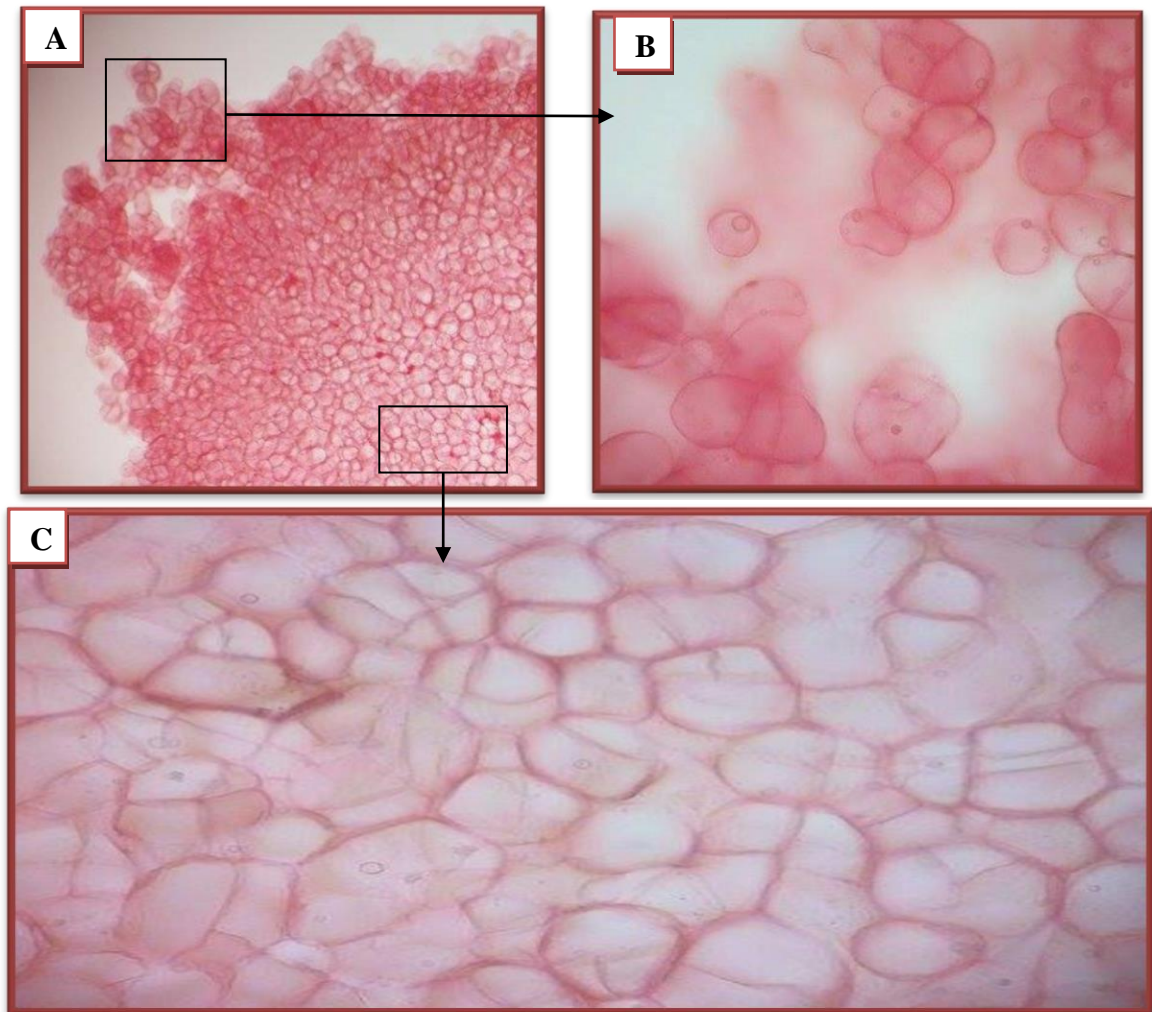
**E** : Cal spongieux (x16)

-Observation à l'œil nu (F et G)

**F, G** : Cal dur avec des racines

### 3.2.6. Coupes histologiques des cals

Vu la texture friable des cals, il est difficile de réaliser une coupe histologique au niveau d'un cal primaire (cal avec l'explant). Lors de réalisation des coupes la masse callogène s'est détachée de son explant, nous avons, alors, effectué des coupes au niveau d'un cal secondaire (sans explant) pour montrer l'aspect des cellules (**Figure 3.24**).



**Figure 3.24** : Coupes histologiques au niveau d'un cal secondaire  
(3<sup>ème</sup> subculture) d'*Argania spinosa*

**A, B,**: Foyer de division (x100)

**C** : Cellules en voie de division (x400)

Au niveau de foyer de division, les cellules sont arrondies et sont en plein stade de division, elles sont à l'origine d'une future néoformation, vers l'intérieur du cal (**Figure 3.24 C**) les cellules sont plus âgées et volumineuses.

### 3.2.7. Entretien de la masse callogène

#### 3.2.7.1. Reprise de la croissance

A la fin du deuxième repiquage un bilan est établi. L'unité de mesure est l'explant (présentant une callogenèse) et les cals ayant repris leur croissance après le deuxième repiquage (Annexe 21).

A l'issue des subcultures successives, trois types d'explants en fonction de leur réponse sont identifiés:

- ✦ **Type 1** : Caractérisé par la présence de callogenèse
- ✦ **Type 2** : Caractérisé par la présence de callogenèse et arrêt de développement après le deuxième repiquage
- ✦ **Type 3** : Caractérisé par l'absence de callogenèse

#### 3.2.7.2. Croissance de la masse callogène

La prise du poids frais des cals est effectuée au 4<sup>ème</sup> et au 6<sup>ème</sup> mois seulement, ce choix est retenu vu le nombre important de cals à peser à chaque repiquage.

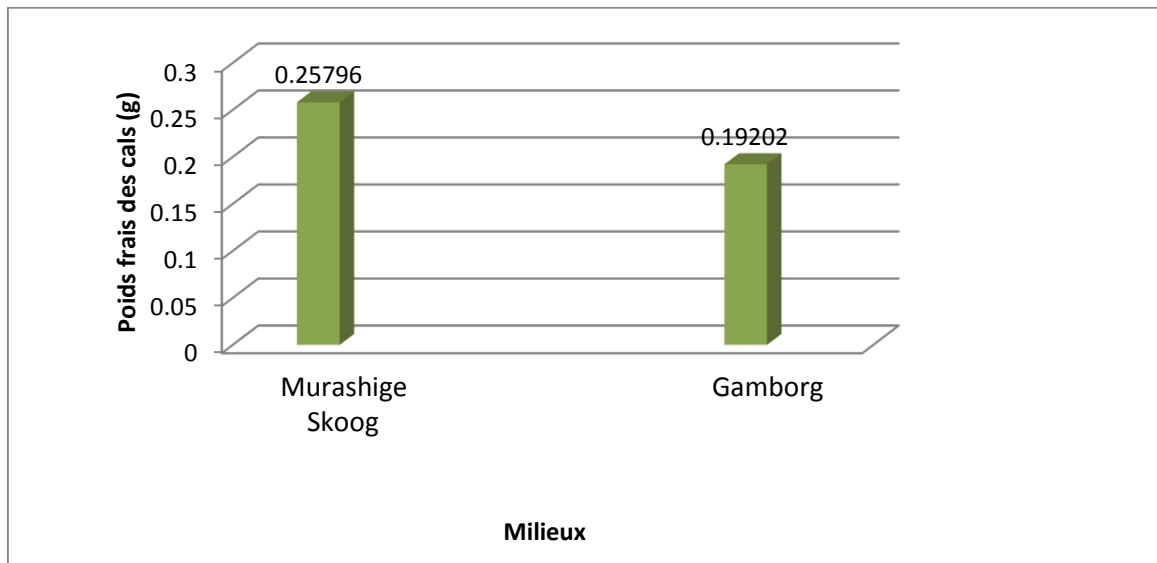
##### 3.2.7.2.1. Effet de milieu de culture sur la croissance de cal

L'analyse statistique (Test de Student), effectuée après 4 mois de culture, révèle une différence significative (**P=0,0043 ; <0,05 ;**) entre les deux types de milieu utilisés (MS et Gamborg) concernant la croissance de masse callogène.

**Tableau 3.14** : Effet de milieu de base sur la croissance des cals

Variable	T-tests; Grouping: Milieu (Spreadsheet16)								
	Mean MS	Mean G	t-value	df	p	Valid N MS	Valid N G	Std.Dev. MS	Std.Dev. G
Poids frais des cals (g)	0,257961	0,192019	2,862794	614	0,004342	285	331	0,321408	0,249552

Le milieu MS donne les meilleurs poids dont la moyenne est estimée à **257,96 mg** comparé au milieu Gamborg ayant donné une moyenne de **192,02 mg** de cals frais (Tous traitements et milieux confondus) (**Figure 3.25**).



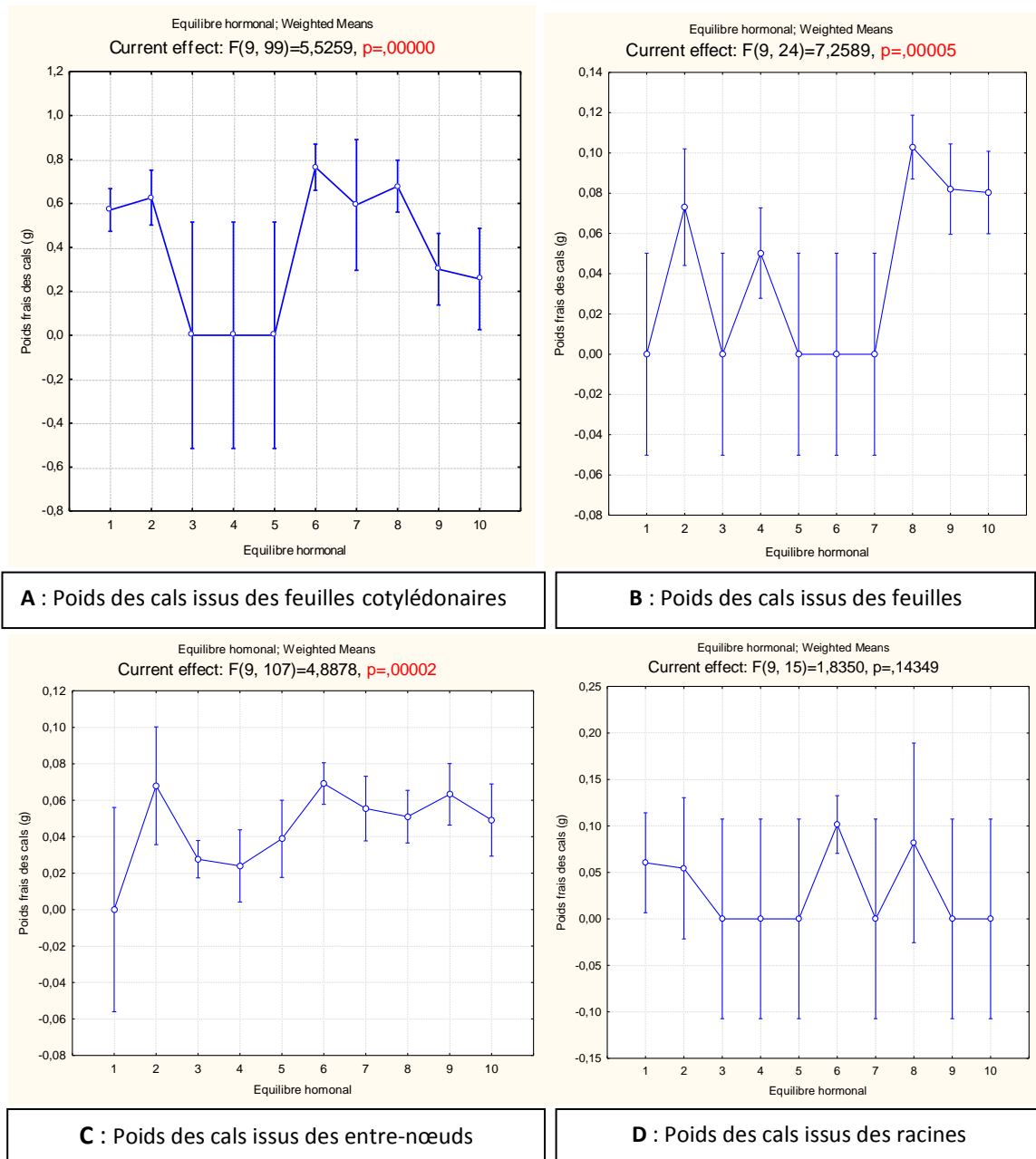
**Figure 3 .25** : Poids frais des cals en fonction des milieux de base

#### 3.2.7.2.2.Effet de l'équilibre hormonal sur la croissance des cals

La croissance de la masse callogène est influencée aussi par le traitement hormonal.

##### 3.2.7.2.2.1. Milieu MS au 4<sup>ème</sup> mois

L'analyse statistique effectuée au quatrième mois de culture révèle une différence très hautement significative du poids des cals provenant des feuilles cotylédonaire (**Figure 3.26 A**), des feuilles (**Figure 3.26 B**) et des entre-nœuds entre les concentrations hormonales (**Figure 3.26 C**) (**P=0,00000, P=0,00005, P=0,00002, P<0,05**). Par ailleurs, elle est non significative entre les concentrations hormonales, pour le poids des cals provenant des racines (**P= 0,14 ; P>0,05**) (**Figure 3.26 D**). Le poids frais des cals issus des feuilles cotylédonaire, des racines et des entre-nœuds atteint respectivement **764,75 ; 101,53 ; 69,13 mg**, après 4 mois de mise en culture sur le milieu **MS6** (0,5mg/l 2,4-D et 0,5mg/l BAP) (Annexes 22 au 25).



**Figure 3.26** : poids des cals en fonction d'équilibre hormonal

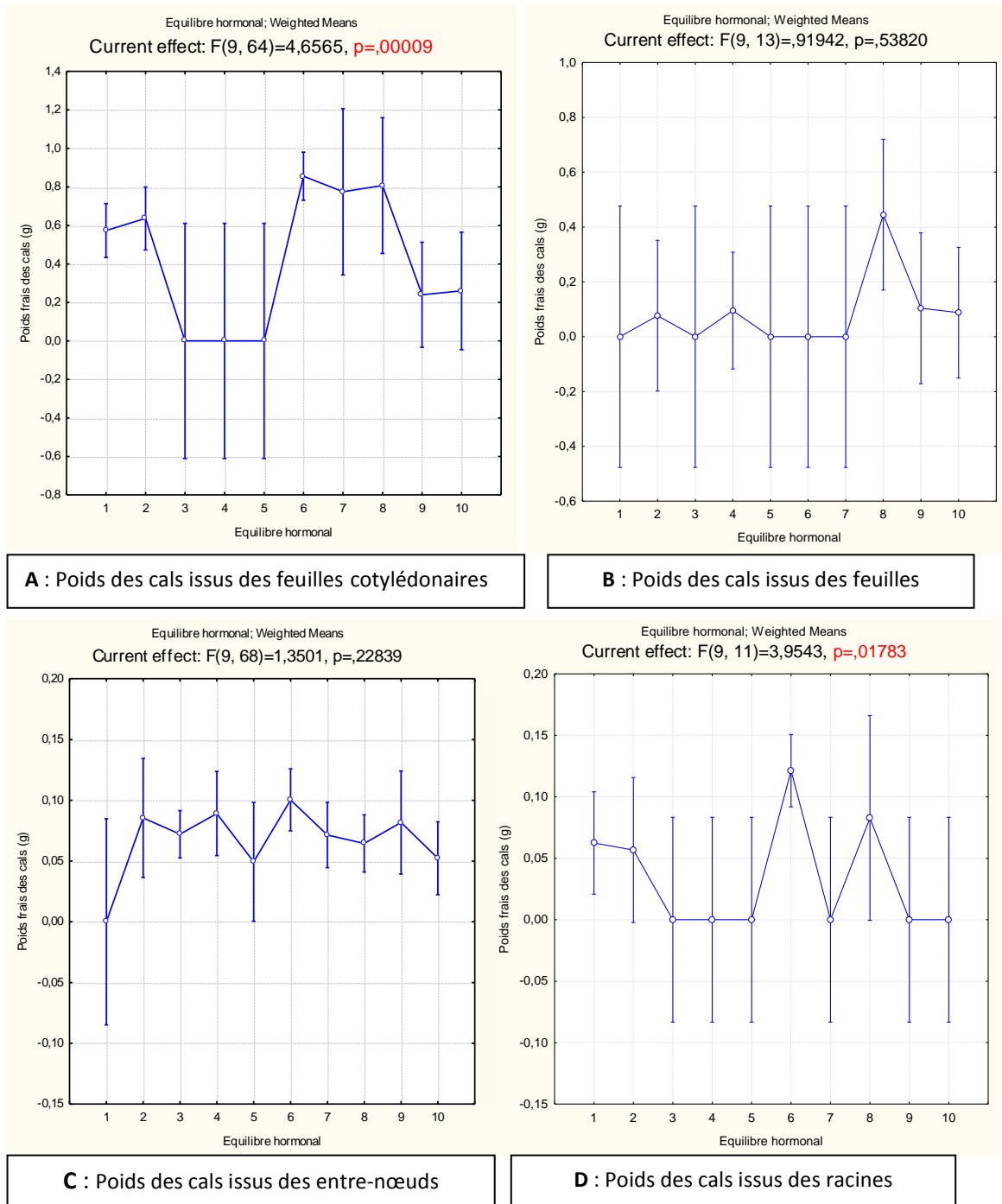
(Milieu MS/ 4<sup>ème</sup> mois)

1:(0,5mg/l kin ; 0,5mg/l 2,4-D) 2:(0,5mg/l kin ; 0,75mg/l 2,4-D) 3 :(0,5mg/l kin ; 0,5mg/l ANA)  
 4 :(0,5mg/l ANA ; 0,5mg/l BAP) 5: (2 mg/l BAP) 6: (0,5mg/l 2,4-D ; 0,5mg/l BAP) 7: (1mg/l 2,4-D ; 1mg/l BAP)  
 8 :(1mg/l 2,4-D ; 3mg/l BAP) 9 :(1mg/l 2,4-D ; 6mg/l BAP) 10: (1mg/l 2,4-D ; 9mg/l BAP)

### 3.2.7.2.2.2. Milieu MS au 6<sup>ème</sup> mois

Au terme de six mois de culture la différence est hautement significative du poids des cals provenant des feuilles cotylédonaire et des racines entre les concentrations hormonales ( $P=0,00009$  ;  $P=0,01 P<0,05$ ) (Figure 3.27 A et D).

Elle est non significative pour le poids des cals provenant des feuilles et des entre-nœuds ( $P=0,53$   $P=0,22$  ;  $P>0,05$ ) (Figure 3.27 B et C).



**Figure 3.27** : Poids des cals en fonction d'équilibre hormonal

(Milieu MS/6<sup>ème</sup> mois)

1:(0,5mg/l kin ; 0,5mg/l 2,4-D) 2:(0,5mg/l kin ; 0,75mg/l 2,4-D) 3:(0,5mg/l kin ; 0,5mg/l ANA)  
 4:(0,5mg/l ANA ; 0,5mg/l BAP) 5: (2 mg/l BAP) 6: (0,5mg/l 2,4-D ; 0,5mg/l BAP) 7: (1mg/l 2,4-D ; 1mg/l BAP)  
 8:(1mg/l 2,4-D ; 3mg/l BAP) 9:(1mg/l 2,4-D ; 6mg/l BAP) 10: (1mg/l 2,4-D ; 9mg/l BAP)

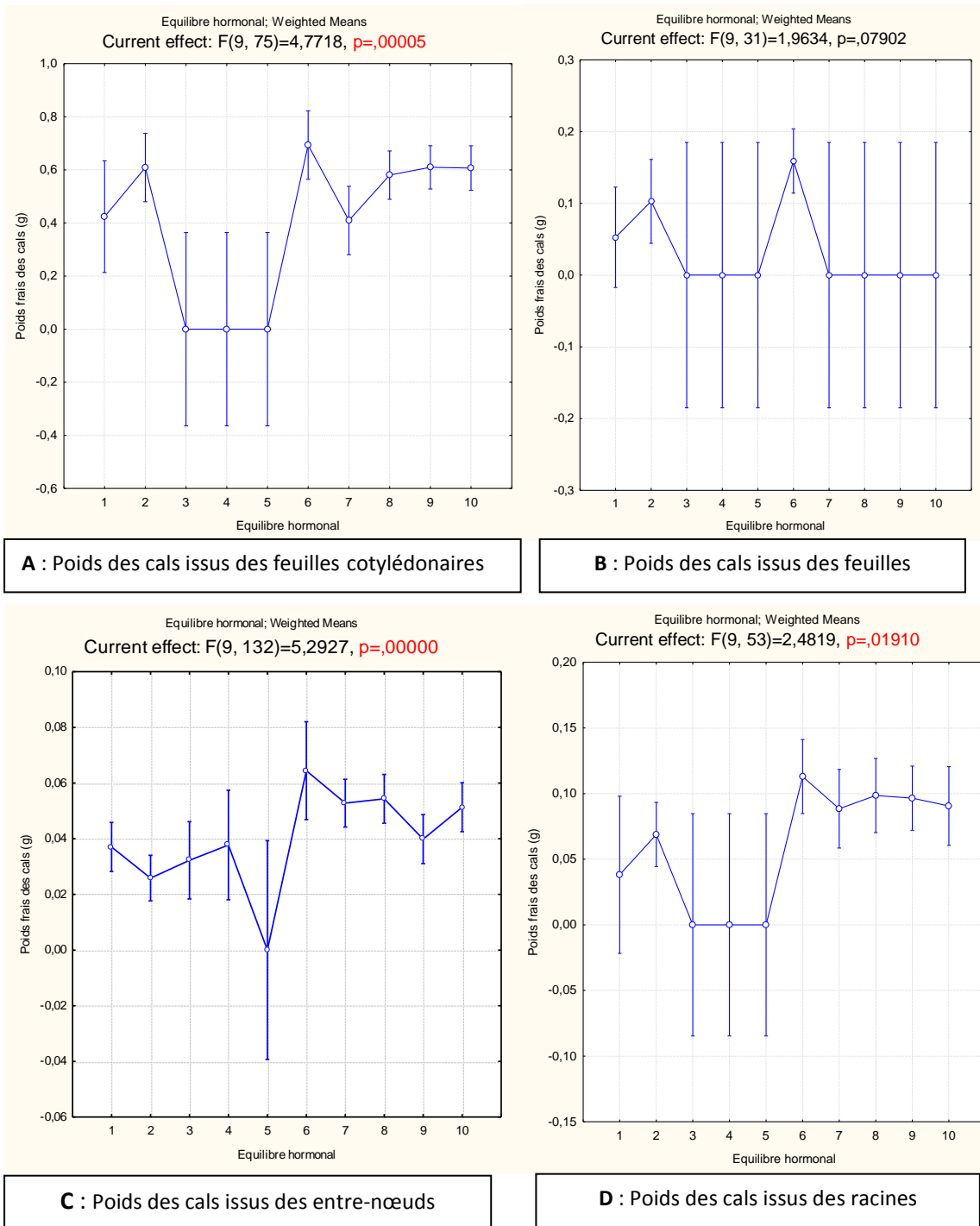
Le poids frais des cals issus des feuilles cotylédonaire, des racines et des entre-nœuds atteint respectivement **855,49 ; 121,28 ; 100,30 mg**, sur le milieu **MS6** (0,5mg/l 2,4-D et 0,5mg/l BAP) (Annexes 26 au 29).

#### 3.2.7.2.2.3. Milieu Gamborg au 4<sup>ème</sup> mois

L'analyse statistique effectuée au quatrième mois de culture indique une différence très hautement significative du poids des cals provenant des feuilles cotylédonaire, et des entre-nœuds entre les concentrations hormonales (**P=0,00005, P=0,00000, P<0,05**) (**Figure 3.28 A et C**). Elle est significative pour le poids des cals provenant des racines et feuilles (**0,019 ; P= 0,85, P=0,20 ; P<0,05**) (**Figure 3.28 B et D**).

Le poids frais des cals issus de feuilles cotylédonaire, de feuilles, de racines et d'entre-nœuds atteint respectivement **693,21 ; 159,15 ; 121,98 et 64,44 mg** après 4 mois de mise en culture sur le milieu **G6** (0,5mg/l 2,4-D et 0,5 mg/l BAP) (Annexes 30 au 33).





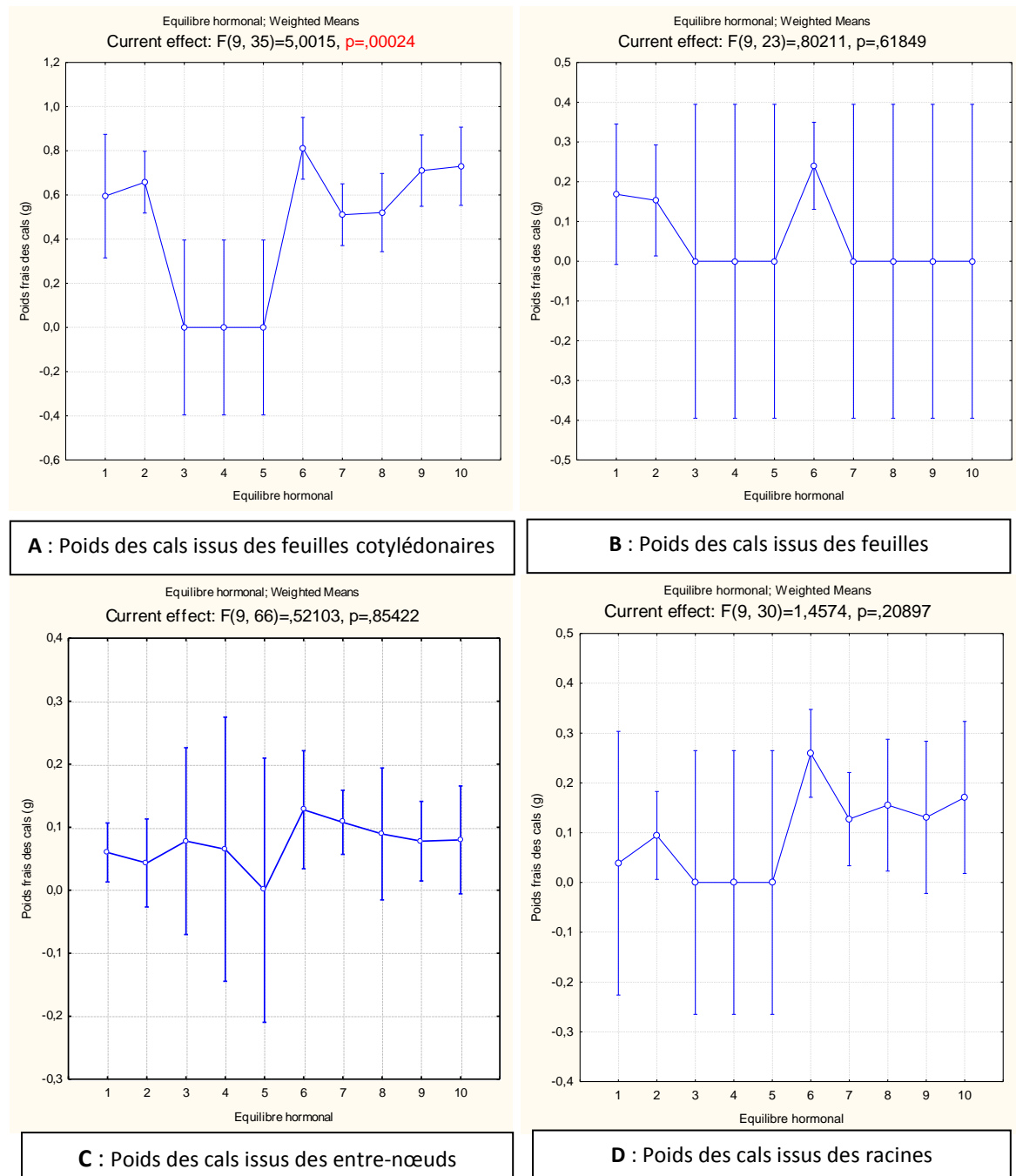
**Figure 3.28** : Poids des cals en fonction d'équilibre hormonal (Milieu G/4<sup>ème</sup> mois)

1:(0,5mg/l kin ; 0,5mg/l 2,4-D) 2:(0,5mg/l kin ; 0,75mg/l 2,4-D) 3 :(0,5mg/l kin ; 0,5mg/l ANA)  
 4 :(0,5mg/l ANA ; 0,5mg/l BAP) 5: (2 mg/l BAP) 6: (0,5mg/l 2,4-D ; 0,5mg/l BAP) 7: (1mg/l 2,4-D ; 1mg/l BAP)  
 8 :(1mg/l 2,4-D ; 3mg/l BAP) 9 :(1mg/l 2,4-D ; 6mg/l BAP) 10: (1mg/l 2,4-D ; 9mg/l BAP)

### 3.2.7.2.2.4. Milieu Gamborg au 6<sup>ème</sup> mois

Au terme de six mois de culture, la différence est hautement significative du poids des cals provenant des feuilles cotylédonaire (**0,00024 ;  $P<0,05$** ) (**Figure 3.29 A**) et non significative pour le poids des cals provenant des feuilles, des

entre-nœuds et des racines entre les concentrations hormonales (**P= 0,61 ; P=0,85 ; P=0,20 ; P>0,05**) (Figure 3.29 B, C et D).



**Figure 3.29** : Poids des cals en fonction d'équilibre hormonal (Milieu B5/6<sup>ème</sup> mois)

1:(0,5mg/l kin ; 0,5mg/l 2,4-D) 2:(0,5mg/l kin ; 0,75mg/l 2,4-D) 3 :(0,5mg/l kin ; 0,5mg/l ANA)  
 4 :(0,5mg/l ANA ; 0,5mg/l BAP) 5: (2 mg/l BAP) 6: (0,5mg/l 2,4-D ; 0,5mg/l BAP) 7: (1mg/l 2,4-D ; 1mg/l BAP)  
 8 :(1mg/l 2,4-D ; 3mg/l BAP) 9 :(1mg/l 2,4-D ; 6mg/l BAP) 10: (1mg/l 2,4-D ; 9mg/l BAP)

Le poids frais des cals issus de feuilles cotylédonaires, de feuilles, de racines et d'entre-nœuds atteint respectivement **811,65 ; 240,10 ; 259,27** et **127,74 mg**,

après le 6<sup>ème</sup> mois de mise en culture sur le milieu **G6** (0,5mg/l 2,4-D et 0,5 mg/l BAP) (Annexes 34 au 37).

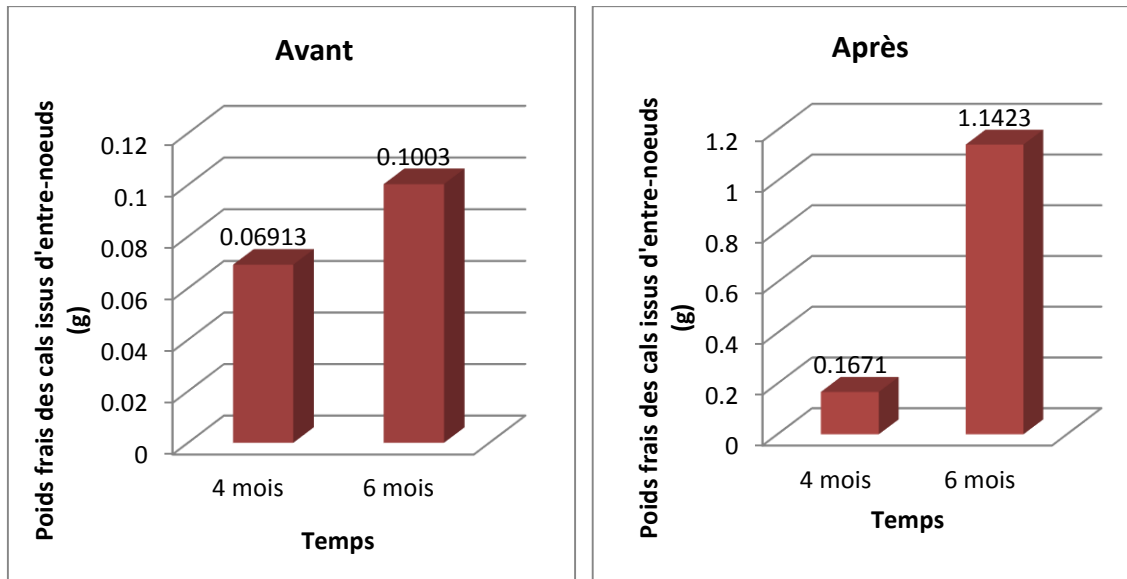
Nous remarquons une certaine augmentation du poids frais des cals du 4<sup>ème</sup> au 6<sup>ème</sup> mois en combinant 0,5mg/l de 2,4-D et 0,5 mg/l de BAP.

### 3.2.8. Optimisation de la callogenèse

L'explant d'entre-nœuds mis en culture sur le milieu MS contenant la combinaison hormonal (0,5mg/l de 2,4-D et 0,5mg/l de BAP) a fourni des meilleurs résultats d'induction de cals d'*Argania spinosa* qui sont volumineux, nodulaires et friables. Nous avons noté l'apparition de phénomène du brunissement influençant la croissance de la masse callogène avec réduction du poids après le 4<sup>ème</sup> mois. Cette constatation nous a amené à modifier le milieu de culture.

En effet, l'utilisation des deux antioxydants (l'acide ascorbique et le charbon actif) dans le milieu de culture s'est révélée très efficace contre le phénomène de brunissement. Nous avons enregistré un taux de brunissement nul (**0%**) et un taux de callogenèse très important atteignant **86,66%**.

La diminution de brunissement influence positivement la croissance des cals ce qui est justifié par l'augmentation de poids frais des cals, Il passe de **69,13** à **167,10 mg** après le 4<sup>ème</sup> mois et de **100,3 mg** à **1142,3 mg** après le 6<sup>ème</sup> mois de mise en culture sur le milieu **MS6** (MS + 0,5mg/l de 2,4-D et 0,5 mg/l de BAP) et **MS6 optimisé** (MS + 0,5mg/l de 2,4-D et 0,5 mg/l de BAP + les antioxydants) respectivement (**Figure 3.30**).



**Figure 3.30** : Evolution du poids frais des cals avant et après l'optimisation

**Avant** : Milieu MS6 (MS+0,5mg/l 2,4-D+0,5mg/l BAP)

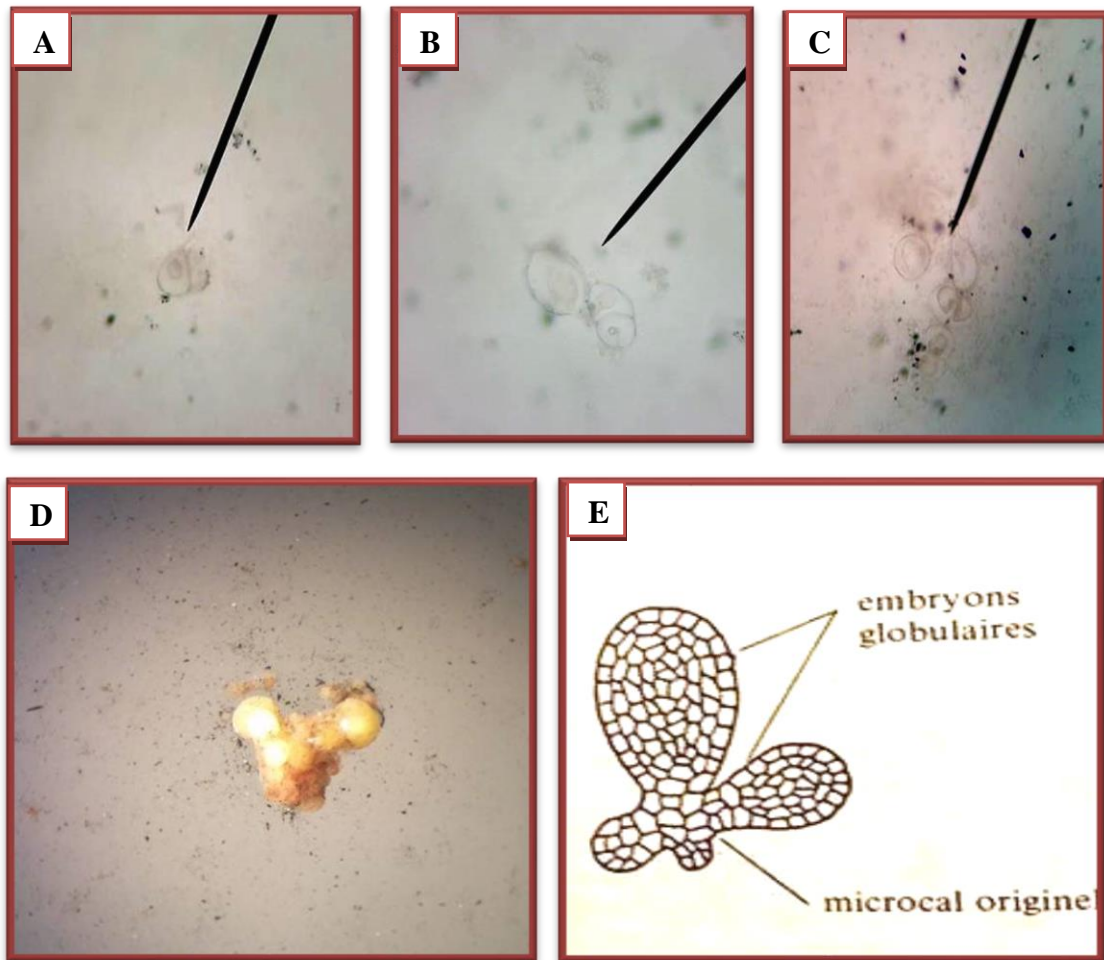
**Après** : Milieu MS6 optimisé : MS6 (MS+0,5mg/l 2,4-D+0,5mg/l BAP)+anti-oxydants

### 3.2.9. Embryogenèse somatique

Aucune contamination n'est observée, nous avons remarqué l'absence totale de développement des microorganismes sur le milieu gélose nutritive (GN).

#### 3.2.9.1. Aspect morphologique de la suspension cellulaire

Une étude morphologique effectuée au microscope photonique et sous loupe binoculaire de la suspension cellulaire établie, montre une division cellulaire ainsi qu'un développement de différentes structures aboutissant éventuellement à des embryons somatiques (**Figure 3.31**).



**Figure 3.31:** Aspect morphologique de différentes formes issues de la suspension cellulaire

- A :** Deux cellules en voie de division, après 3 semaines de mise en culture (×100)  
**B :** Trois cellules résultantes de division cellulaire après 3 semaines de mise en culture (×400)  
**C :** Amas cellulaire après 4 semaines de mise en culture (×100)  
**D :** Structures obtenues après 2 mois de culture en milieu liquide (MS sans régulateurs) sous loupe binoculaire (×16)  
**E :** Coupe d'un massif d'embryons obtenu par culture de carotte sauvage en milieu liquide (KONAR et NATARAJA, 1964 *in* : [53])

Les colonies sont représentées par des cellules de type arrondi, au début de la culture dont le rapport nucléocytoplasmique est très élevé. Ces cellules se divisent activement (**Figure 3.31 A, B et C**). Après cinq semaines de culture, nous avons remarqué l'apparition des structures allongées. Ces dernières continuent à croître pour donner les formes bipolaires après avoir été transférées sur milieu MS semi-solide sans régulateurs de croissance (**Figure 3.31 D**). Ces structures globulaires prennent naissance des cals issus d'entre-nœuds en milieu MS liquide avec ajout du charbon actif.

Les structures obtenues sont similaires aux embryons obtenues par culture de carotte sauvage en milieu liquide [53] (Figure 3.31 E).

### 3.2.9.2. Développement des embryons somatiques

Le passage des embryons somatiques à l'état de plantules représente une étape délicate. Il se fait par le transfert des embryons, sur MS et Gamborg, (semi-solide sans régulateurs de croissance), afin d'achever leur développement, qui aboutira à la formation d'une tige possédant des feuilles vertes et des racines.

Durant notre expérimentation, le transfert des embryons obtenus dans les milieux MS et Gamborg, semi-solide sans régulateurs de croissance, n'a provoqué aucune germination des embryons somatiques. Notre essai s'est achevé au stade globulaire.

### 3.3. Multiplication par microbouturage

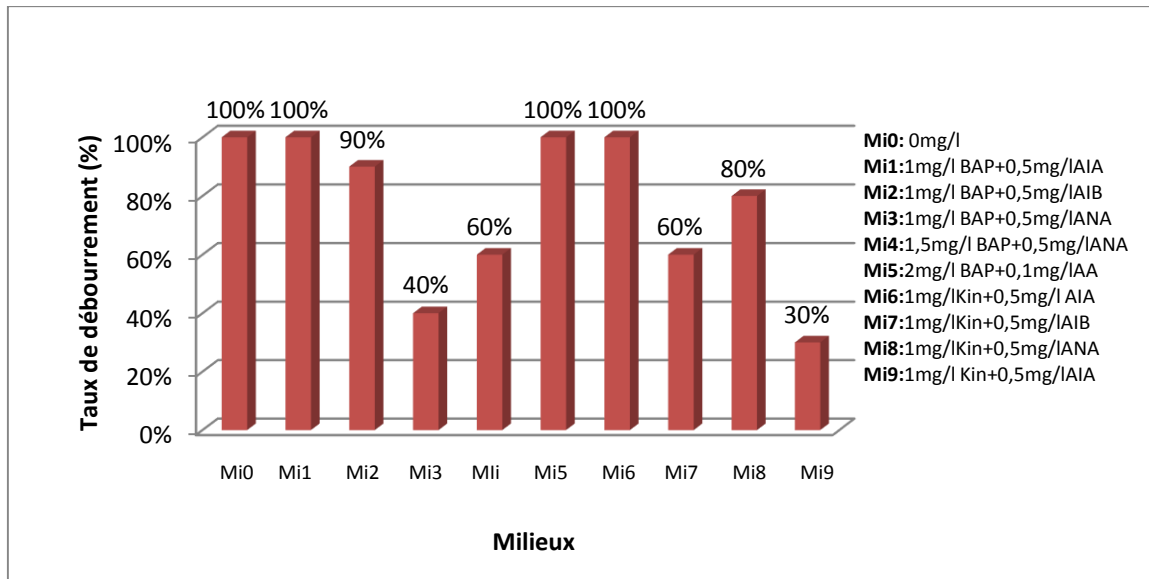
La micropropagation par microbouturage comporte quatre phases :

#### 3.3.1. Phase d'initiation

Le débourrement des bourgeons et le développement des vitro-plants est influencé par le type de régulateurs de croissance auxquelles ils sont exposés pendant 80 jours.

#### 3.3.1.1. Taux de débourrement

Les résultats obtenus après 80 jours de mise en culture, montrent que les milieux **Mi0** (sans régulateurs de croissance), **Mi1** (1mg/l BAP ; 0,5mg/l AIA), **Mi5** (2mg/l BAP ; 0,1mg/l ANA) et **Mi6** (1mg/l Kin ; 0,5mg/l AIA) donnent les meilleurs taux de débourrement des bourgeons (**100%**) suivi par les milieux **Mi2** (1mg/l BAP ; 0,5mg/l AIB), **Mi8** (1mg/l Kin ; 0,5mg/l ANA) et **Mi7** (1mg/l Kin ; 0,5mg/l AIB) dont le taux de débourrement des bourgeons est relativement important atteignant **90, 80 et 60%** respectivement. Les milieux **Mi3** (1mg/l BAP ; 0,5mg/l ANA) et **Mi9** (1mg/l Kin ; 0,5mg/l AIA) présentent les faibles taux de débourrement estimé à **40 et 30%** respectivement (Figure 3.32).



**Figure 3.32** : Taux de débourrement des bourgeons chez *Argania spinosa* (L.) en fonction du traitement hormonal

### 3.3.1.2. Développement des vitro-plants

Concernant l'aspect morphologique des vitro-plants, le milieu **Mi6** contenant MS + (Kin/AIA) à (1mg/l/0,5mg/l) a permis d'avoir des vitro-plants de bonne qualité (feuilles larges de couleur vert vif, avec présence des épines et absence de vitrification et des cals à leur base (**Figure 3.36**).

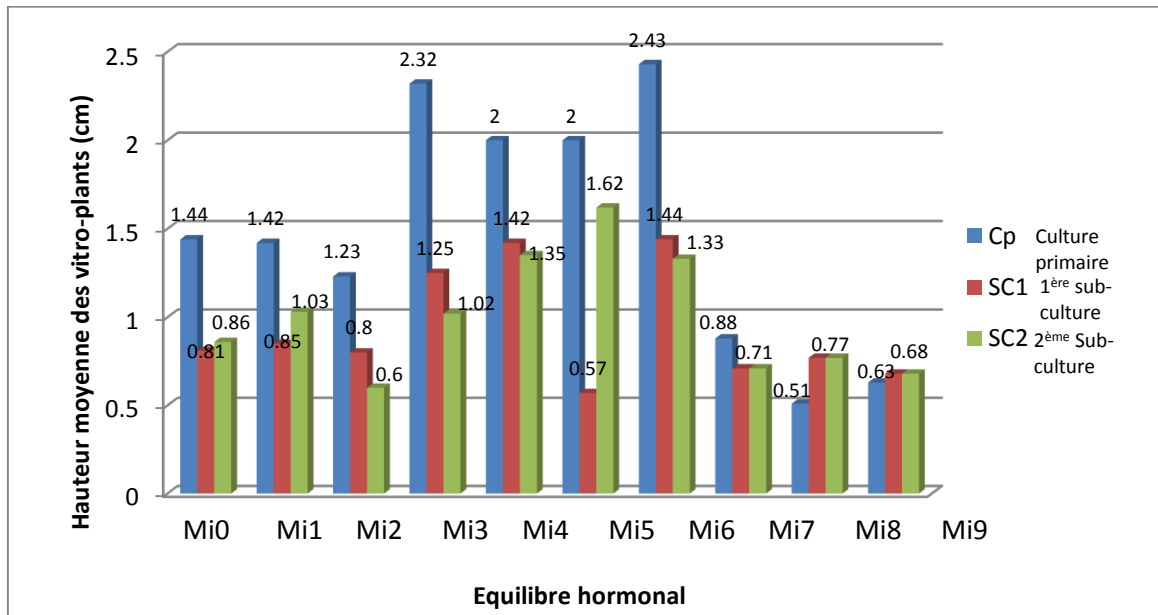
#### 3.3.1.2.1. Longueur

Le milieu **Mi6** a un effet considérable sur l'élongation des vitro-plants. En effet, nous avons remarqué, qu'à la culture primaire (Cp) la hauteur moyenne des vitro-plants est très importante comparé aux autres milieux. Elle est d'ordre de **2,43 cm** et diminue sensiblement d'une subculture à une autre avec **1,44** et **1,33 cm** respectivement à la 1<sup>ère</sup> et à la 2<sup>ème</sup> subculture (SC1 et SC2), cette diminution est due au fragmentation des vitro-plants à chaque subculture (**Figure3.33**).

Le milieu **Mi3** (1mg/l BAP ; 0,5mg/l ANA) présente aussi un effet positif. La hauteur moyenne des vitro-plants est importante elle atteint **2,32; 1,25 et 1,02 cm** respectivement à la culture primaire (Cp), 1<sup>ème</sup> et 2<sup>ème</sup> subculture (**Figure 3.33**).

Les milieux **Mi4**, **Mi5**, **Mi1** et **Mi2** fournissent des vitro-plants dont la hauteur moyenne est similaire à ceux fournis par **Mi0** avec respectivement **2**; **1,42**; **1,23** et **1,44 cm** à la culture primaire (**Figure 3.33**).

Les milieux **Mi7**, **Mi9** et **Mi8** enregistrent de très faibles valeurs de longueur des vitro-plants avec **0,88**; **0,63** et **0,51cm** respectivement à la culture primaire comparé au témoin **Mi0** avec **1,44cm** (**Figure 3.33**).

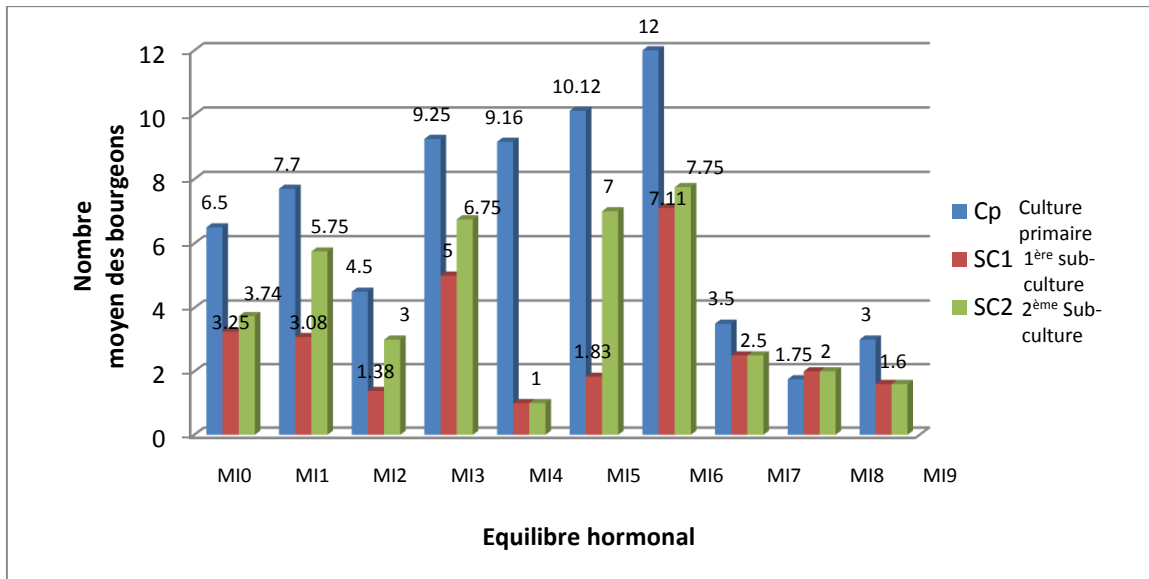


**Figure 3.33** : Effet de l'équilibre hormonal sur la hauteur moyenne des vitro-plants

### 3.3.1.2.2. Nombre de bourgeons

Le milieu **Mi6** (1mg/l BAP ; 0,5mg/l ANA) a un effet très remarquable sur le développement des bourgeons des vitro-plants. A la culture primaire (Cp), nous avons remarqué un nombre moyen des bourgeons très important, il est d'ordre de **12 bourgeons**, il diminue d'une subculture à une autre, cette diminution est due aux fragmentations effectuées des vitro-plants à chaque sub-culture (**Figure 3.34**).

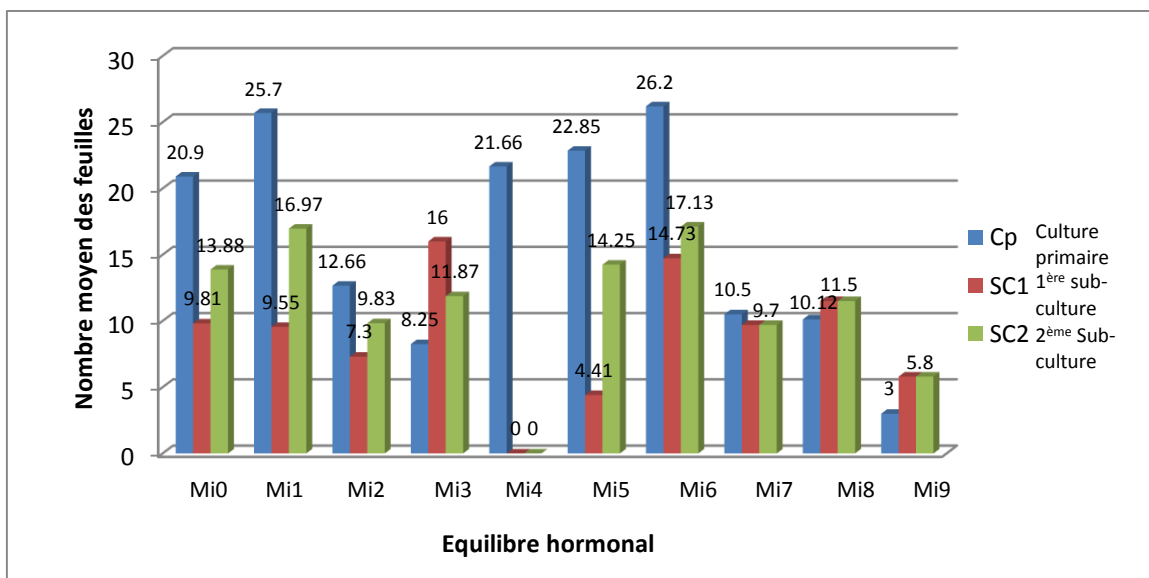




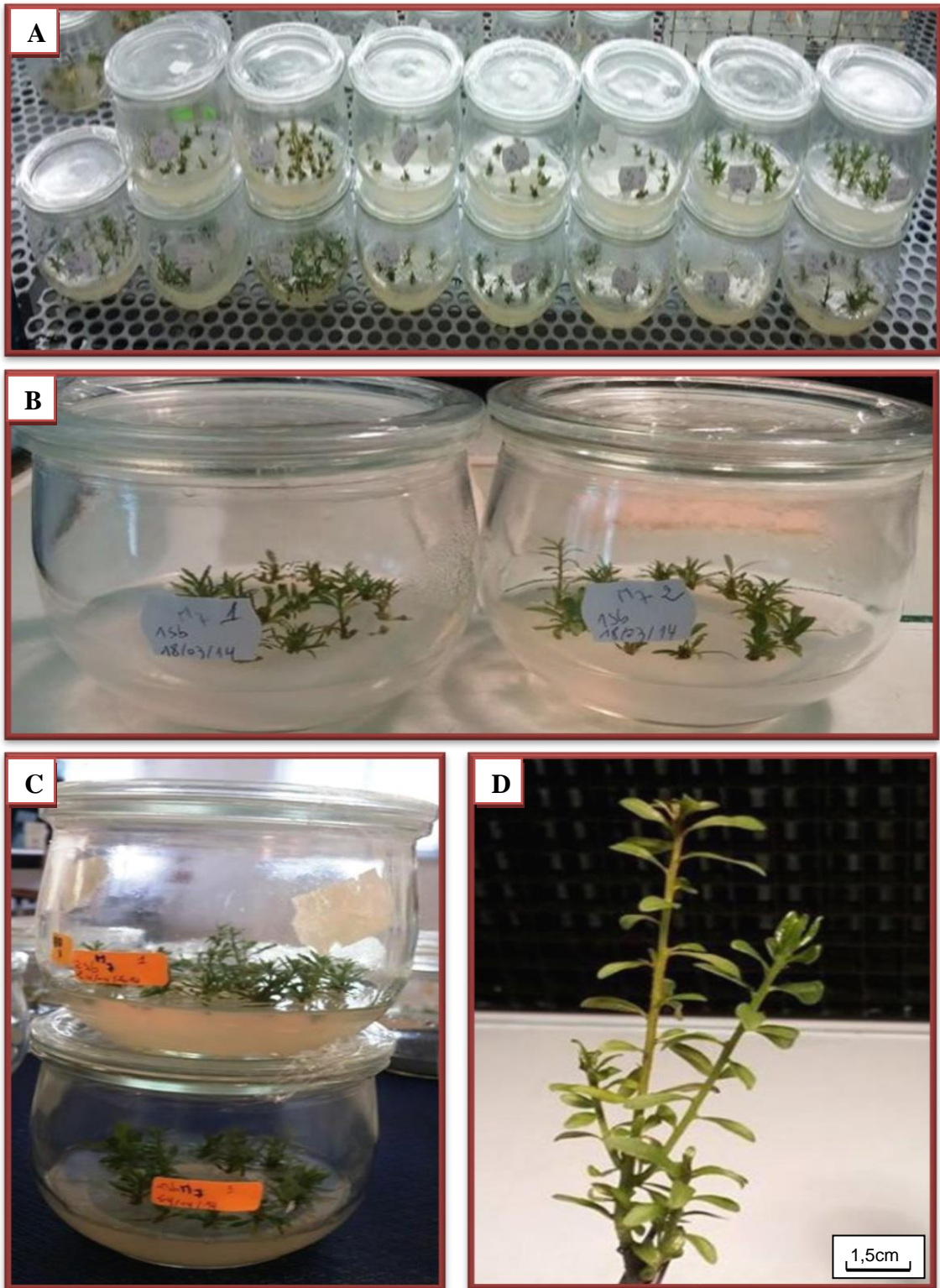
**Figure 3.34:** Effet de l'équilibre hormonal sur le nombre moyen des bourgeons

### 3.3.1.2.3. Nombre de feuilles

Le milieu **Mi6** (1mg/l BAP ; 0,5mg/l ANA) a un effet très important sur le développement des jeunes feuilles (**Figure 3.36 D**). A la culture primaire (Cp), nous avons enregistré un nombre moyen des feuilles de l'ordre de **26**, ce dernier diminue d'une subculture à une autre (**Figure 3.35**).



**Figure 3.35 :** Effet de l'équilibre hormonal sur le nombre moyen des feuilles



**Figure 3.36:** Aspect des vitro-plants d'*Argania spinosa* (L.)

**A :** Aspect des vitro-plants sous différentes conditions hormonales

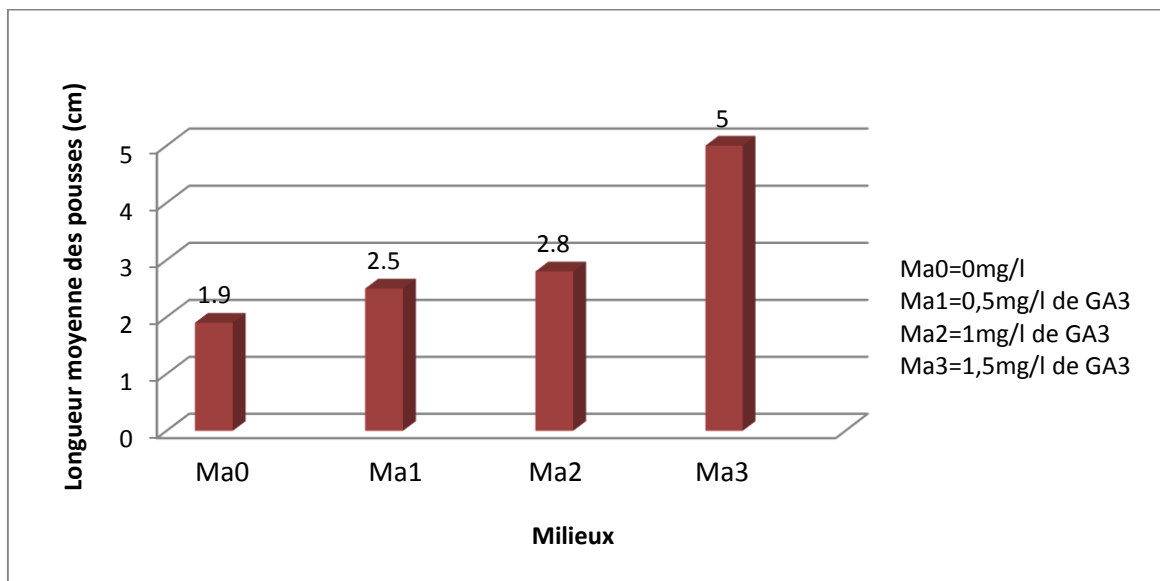
**B :** Aspect des vitro-plants mis en culture sur milieu Mi6 à la 1<sup>ère</sup> subculture

**C :** Aspect des vitro-plants mis en culture sur milieu Mi6 à la 2<sup>ème</sup> subculture

**D :** Aspect général d'un vitro-plant issu de Mi6

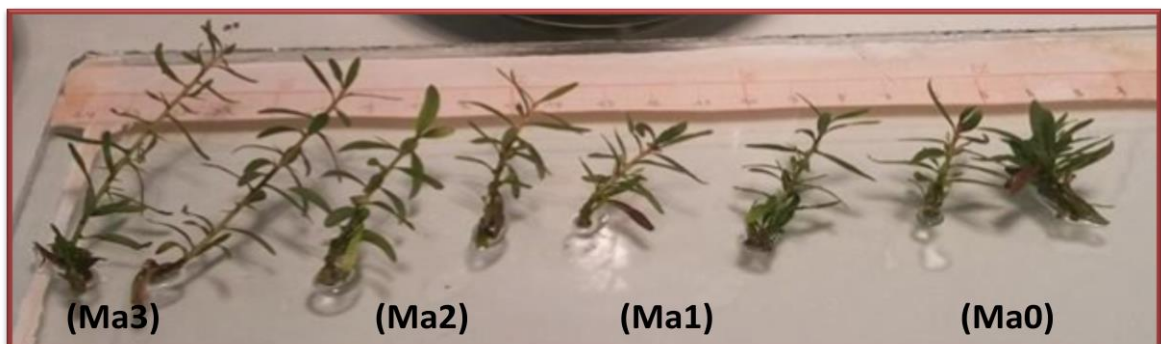
### 3.3.2. Phase d'allongement

Le milieu **Ma3** (1,5mg/l GA3) a permis aux vitro-plants de développer un meilleur allongement caulinaire, avec une longueur moyenne de **5 cm**, suivi par le milieu **Ma2** (1mg/l GA3) et **Ma1** (0,5mg/l GA3) avec une longueur moyenne des vitro-plants de l'ordre de **2,8** et **2,5 cm** respectivement. Le témoin **Ma0** (0mg/l GA3) a fourni des vitro-plants de longueur moyenne très faible estimé à **1,9 cm** (**Figure 3.37**).



**Figure 3.37** : Effet de GA3 sur la longueur des vitro-plants d'*Argania spinosa* (L.)

La (**Figure 3. 38**) montre clairement, la différence entre la longueur des vitro-plants subissant différentes concentrations de GA3 dans les quatre milieux testés.



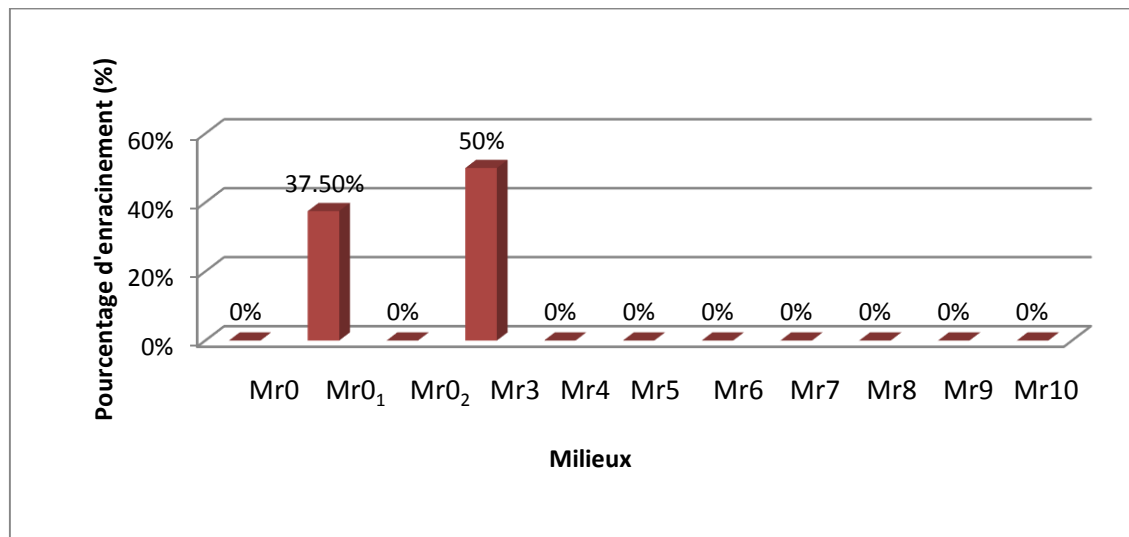
**Figure 3.38** : Aspect des vitro-plants d'*Argania spinosa* (L.) après l'ajout de GA3

### 3.3.3. Phase de rhizogenèse

#### 3.3.3.1. Taux d'enracinement

Au terme de 2 mois de culture, le meilleur pourcentage d'enracinement des vitro-plants est obtenu sur le milieu **Mr3** (1mg/l AIB, 1mg/l ANA) où la moitié (**50%**) des vitro-plants a pu initier la rhizogenèse. Dans le milieu **Mr0<sub>1</sub>** (MS sans hormones de croissance où les vitro-plants proviennent du milieu MS4 de callogenèse « 0,5mg/l d'ANA et 0,5mg/l de BAP ») ces derniers se sont enracinés avec un taux de **37,5 %**.

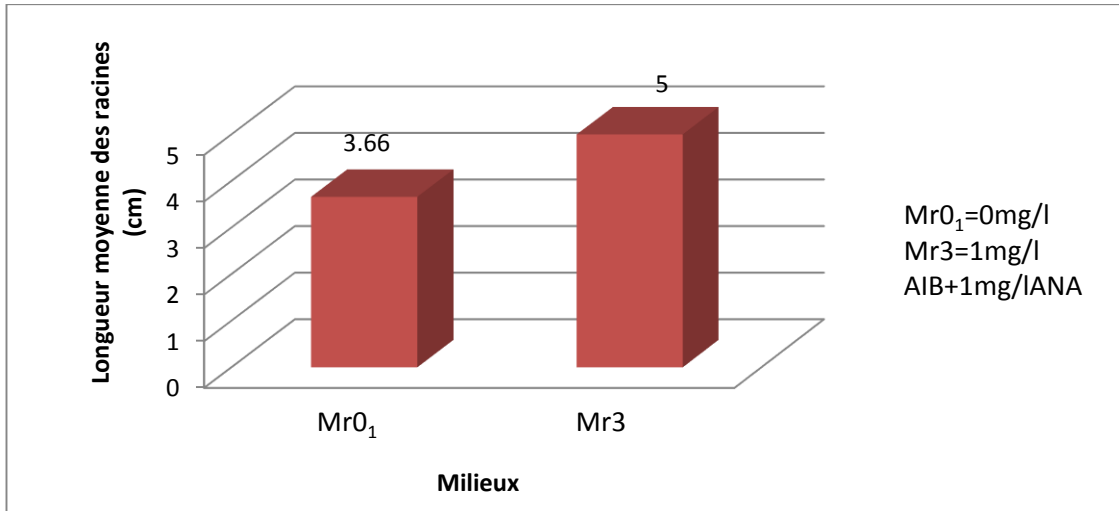
Par ailleurs les vitro-plants mis en culture sur les autres milieux n'ont manifesté aucune aptitude rhizogène (**Figure 3.39**).



**Figure 3.39** : Effet de l'équilibre hormonal sur l'enracinement des vitro-plants

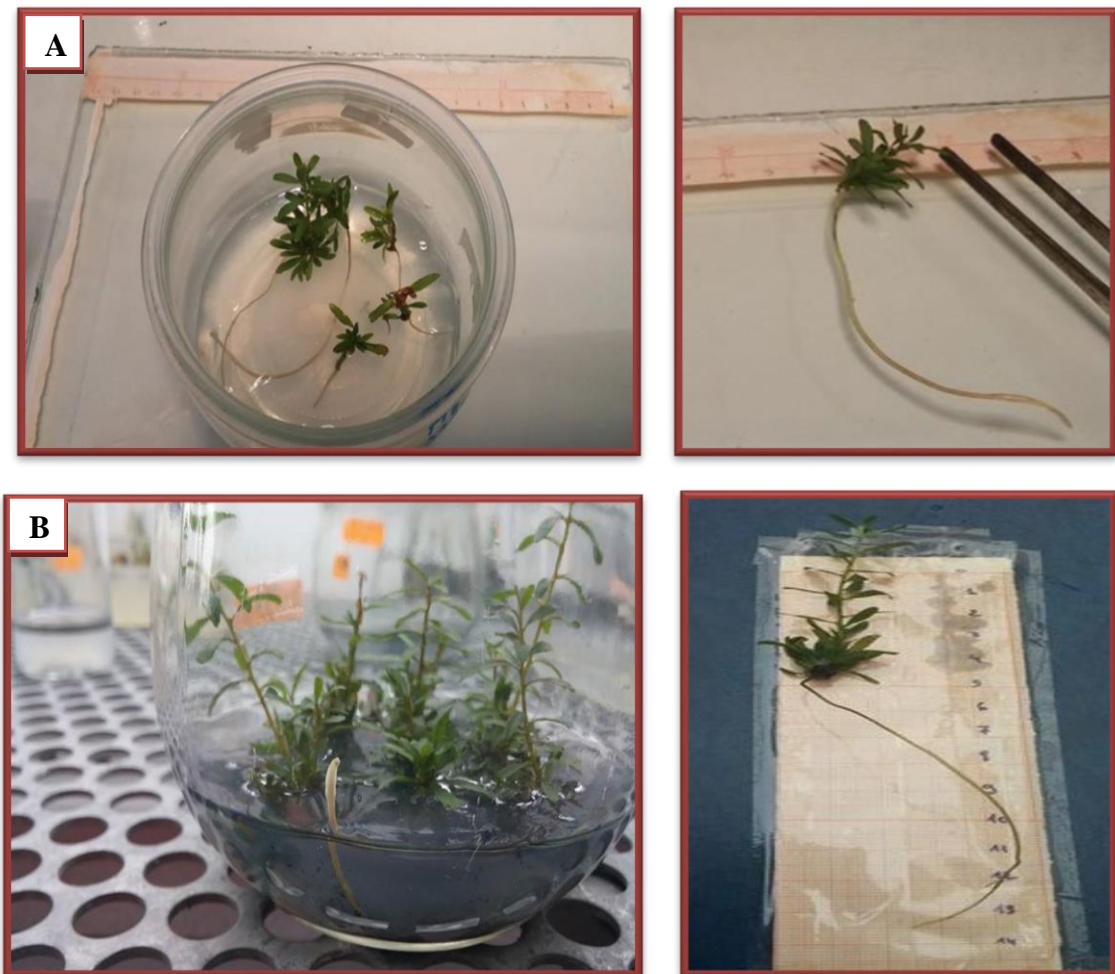
#### 3.3.3.2. Longueur des racines

Les résultats obtenus montrent que les milieux **Mr3** et **Mr0<sub>1</sub>** ont permis de développer les racines dont la longueur moyenne, après 2 mois de culture, est de **4,3 et 3,66 cm** respectivement (**Figure 3.40**).



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

Les racines émises sur les deux milieux testés sont filamenteuses fines, sans radicelles (**Figure 3.41**).



**Figure 3.41:** Aspect morphologique des vitro-plants enracinés

**A :** Vitro-plants enracinés sur milieu Mr0<sub>1</sub>

**B :** Vitro-plants enracinés sur milieu Mr3

### 3.3.4. Acclimatation

Les plantules obtenues sont mises dans une serre en vu de leurs acclimatations pour être plantés ultérieurement en plein champs (**Figure 3.42**).



**Figure 3.42** Vue de haut des plantules acclimatées

### 3.3.5. Coupes histologiques des plantules

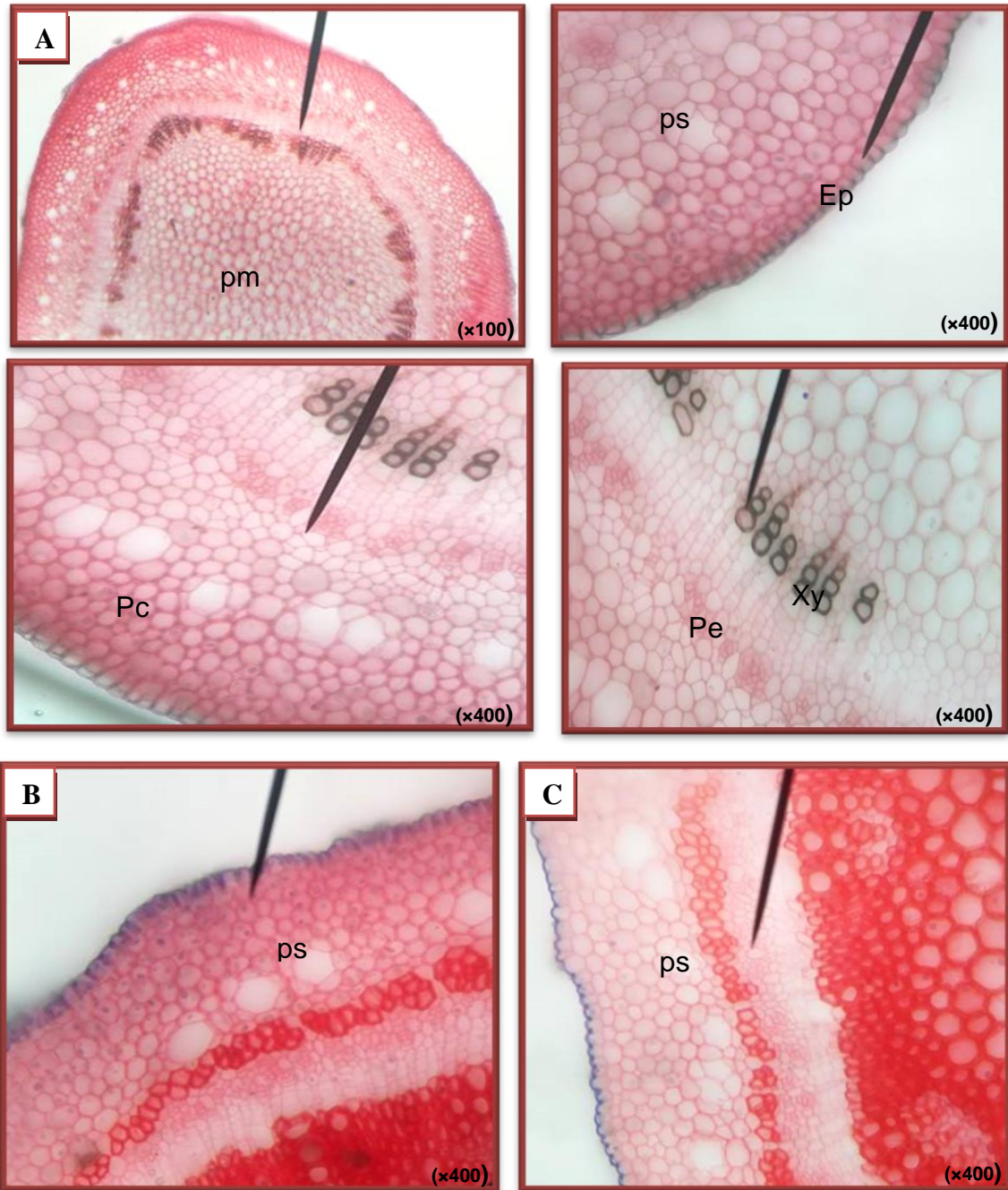
L'organisation des tissus de différents organes est représentée par les figures suivantes : (**Figures 3.43 ; 3.44 et 3.45**).

#### 3.3.5.1. Entre-nœuds

Nous avons pu identifier les tissus des entre nœuds d'*Argania spinosa*, de l'extérieur vers l'intérieur nous retrouvons :

L'épiderme qui entoure le parenchyme cortical. Ce dernier présente des cellules arrondies isodiamétriques à méats et des poches entourées par des petites cellules, ce sont éventuellement des cellules sécrétrices en forme d'étoiles (même constatations pour les entre-nœuds obtenus *in vitro* que ceux obtenus *in vivo*).

Le phloème puis le xylème et enfin le parenchyme médullaire se trouvent vers l'intérieur de la coupe (**Figure 3.43**).

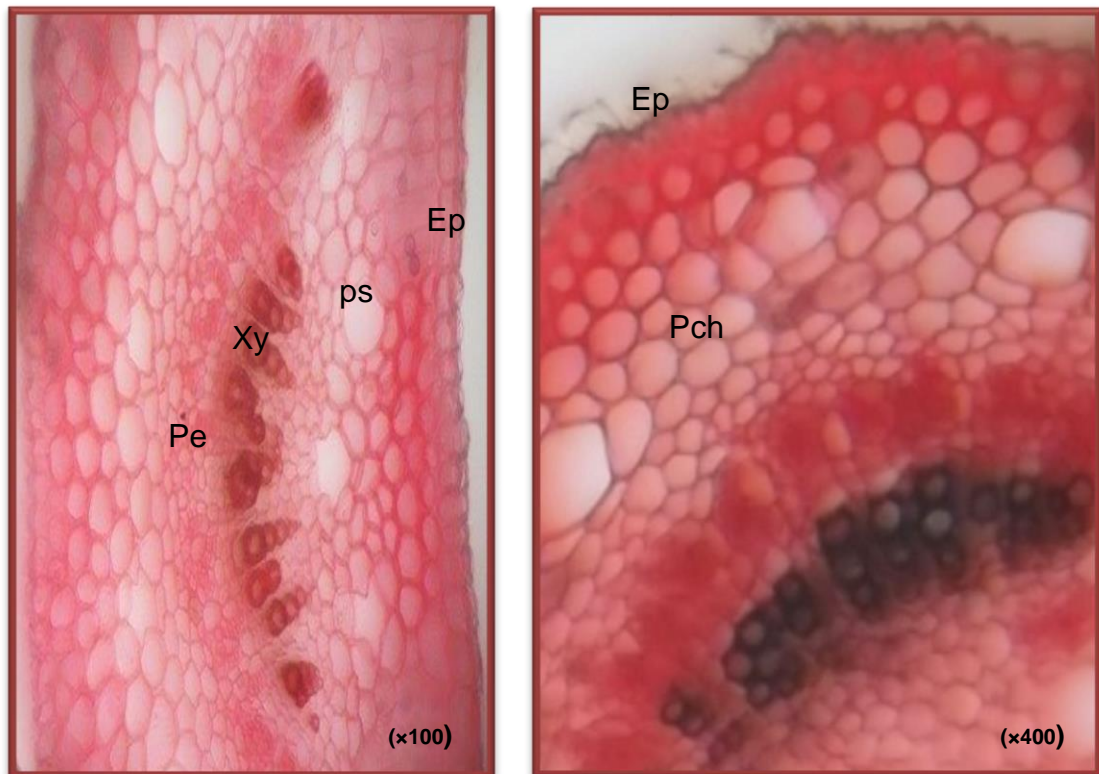


**Figure 3.43** : Coupe transversale d'entre-nœuds

**A** : Aspect d'une coupe transversale au niveau d'entre nœud *in vitro*  
 Pm : parenchyme médullaire Ep : épiderme, Pc : parenchyme cortical,  
 Pe : phloème, Xy : Xylème, Ps : poches sécrétrices  
**B et C** : Aspect d'une coupe transversale au niveau d'entre nœud *in vivo*

### 3.3.5.2. Feuilles

Les coupes histologiques montrent l'existence de deux épidermes. Entre ces deux derniers nous avons une organisation de différents tissus notamment la présence du parenchyme chlorophyllien, des tissus conducteurs au milieu de la coupe, formés de xylème et de phloème. Nous avons remarqué, également, la présence de poches avec des cellules sécrétrices (**Figure 3.44**).



**Figure 3.44** : Coupe transversale au niveau de feuille *in vitro* de l'arganier

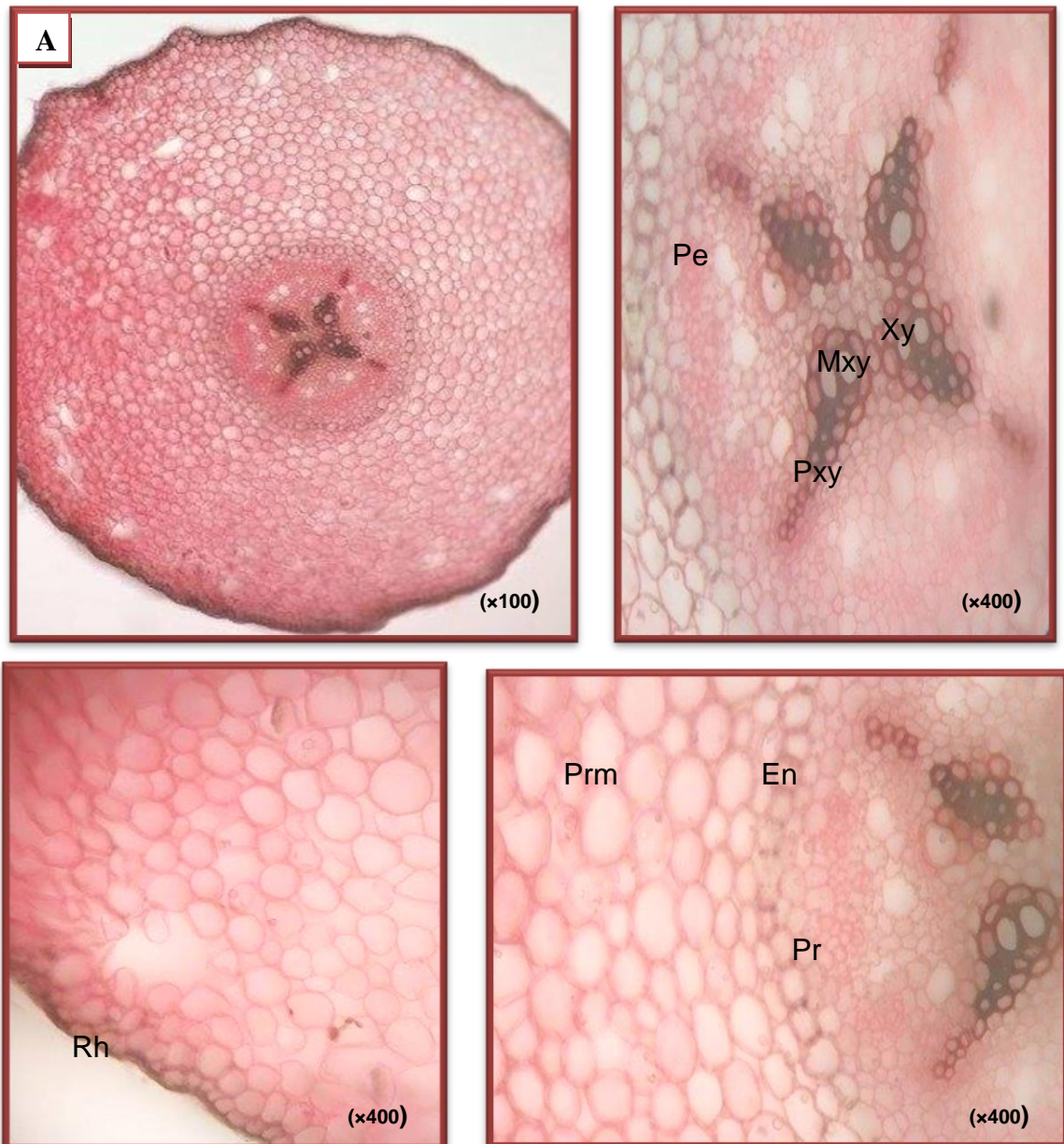
Ep : épiderme, Ps : poches sécrétrices, Pe : phloème,  
Xy : Xylème, Pch : parenchyme chlorophyllien



### 3.3.5.3. Racines

Les coupes histologiques mettent en évidence de l'extérieur vers l'intérieur, un rhizoderme entourant un parenchyme cortical formé de cellules isodiamétriques à méats.

Dans le cercle central, nous avons observé la présence de l'endoderme, couche de cellules épaisses entourant le péricycle. Puis les tissus conducteurs formés de de xylème et de phloème (**Figure 3.45**).



**Figure 3.45** : Coupe transversale au niveau d'une racine *in vitro* de l'arganier

**A** : Aspect d'une coupe histologique au niveau d'une racine *in vitro*

Pe : phloème, Xy : Xylème, Mxy : Métaxylème, Pxy : Protoxylème, Rh : rhizoderme, Prm : parenchyme cortical à méats, En : endoderme, Pr : Péricycle

## CHAPITRE 4

### DISCUSSION

#### 4.1. Germination

Les graines d'arganier *Argania spinosa* (L.) sont désinfectées et débarrassées de tout agent pathogène qui inhibe la germination et le bon développement des plantules.

La stérilisation du matériel végétal avant la mise en culture est délicate [67]. Le degré d'infection des tissus en surface est très variable selon le type et l'origine du matériel végétal.

Le traitement **T3** (trempage 5 mn dans NaClO à 8°) semble efficace pour la désinfection, nous avons enregistré à la fin du deuxième mois de mise en culture, un très faible taux de contamination avec **5%** seulement pour les amandes mises en germination sur le milieu **MS/2**. Un taux de contamination nul (**0%**) pour les amandes mises en germination sur milieu eau gélosée (**EG**) et **Knop**.

Ce faible taux de contamination révèle l'efficacité du NaClO comme produit désinfectant des graines d'arganier.

En effet, pour le même type de traitement T3, ce faible taux de contamination (5%) est observé exclusivement sur le milieu **MS/2** serait dû probablement à la composition de milieu MS qui est riche en sels minéraux et en composés organiques comparée aux milieux **Knop** et milieu eau gélosée (**EG**). Ces derniers n'en contiennent qu'une quantité infinitésimale (Annexes 1 et 2).

Pour les noix, quelques contaminations fongiques seulement, sont observées, elles peuvent provenir des erreurs de manipulation. L'absence de contamination bactérienne pourrait être expliquée par le prétraitement à l'eau oxygénée effectué sur les noix pendant une semaine.

Concernant la germination des noix, le prétraitement à l'eau oxygénée à une température de 25°C pendant une semaine était inefficace sur la dureté de l'endocarpe, une absence totale de germination est enregistrée.

Ce résultat négatif est dû à la nature du tégument lignifié empêchant la pénétration de l'eau et son ramollissement [97].

Le taux de germination des amandes après scarification des téguments, est très important, avec un optimum de **100%** obtenu sur le milieu EG et Knop avec le traitement T3 (NaClO à 8°/5mn). Les résultats obtenus concordent avec ceux de **KHELIFI et al., [98]** sur le milieu (Knop).

Pour le milieu MS/2, le taux de germination obtenu est aussi important, et ce quelque soit le type de traitement utilisé. Ce taux oscille entre **75** et **95%**.

Concernant le développement de l'appareil végétatif des vitro-semis obtenus, les mesures de la longueur et le nombre de feuilles ont montré que les amandes dans le milieu eau gélosée (EG) fournissent les meilleurs résultats. Elles entrent rapidement en germination après 7 jours avec élongation rapide de la tige atteignant une hauteur moyenne de **33,12** cm au 45<sup>ème</sup> jour. Le nombre de feuilles par vitro-semis est aussi important avec une moyenne de **26**. Une certaine homogénéité des vitro-semis est constatée, elle s'explique par la présence des réserves dans l'embryon de la graine. En effet, **LAFON et al., [99]** signalent que les réserves sont activement métabolisées pour assurer la croissance de la plante. Une eau minérale gélosée (EG) est suffisante pour déclencher la germination et la croissance des vitro-semis.

#### 4.2. Induction de la callogenèse

Les explants utilisés, feuilles, feuilles cotylédonaires, entre-nœuds et racines, pour l'induction de la callogenèse ont pour origine des vitro-semis issus de la germination. Ils sont mis en culture sur deux milieux de composition différente MS et Gamborg avec dix concentrations de régulateurs de croissances pour chaque milieu comparé à un milieu témoin (sans hormones).

Le faible taux de contamination estimé à **7,5 %**, pour tous les milieux et les traitements testés, obtenu les trois premiers mois peut être dû à l'origine des explants qui sont prélevés aseptiquement des vitro-semis.

Le faible taux de contamination enregistré est attribué probablement aux infections endogènes qui sont dues selon **ZRYD, [53]** à la présence latente de bactéries et de champignons endophytes.

Au-delà de cette période, l'apparition des contaminations était limitée, d'origine fongique, elle due à des erreurs de manipulation.

Dès le 20<sup>ème</sup> jour de culture, les explants commencent à réagir par un gonflement total ou partiel, à partir du 40<sup>ème</sup> jour. De petits amas cellulaires prennent naissance au centre de l'explant réactif, indiquant l'initiation de la dédifférenciation cellulaire des explants. Au bout de 28 jours cet amas s'étend peu à peu pour couvrir l'ensemble de l'explant évoluant en un cal.

La réactivité des explants diffère d'une condition de culture à une autre, certains explants ont manifesté, en plus des contaminations, un phénomène de brunissement. Ce dernier a entraîné l'inhibition de la croissance des explants et leur dégénérescence.

L'apparition de brunissement s'explique par la sécrétion des inhibiteurs de croissance au niveau des sections des explants. **AUGE, [66]** signale qu'il y a de très nombreuses substances qui ont une action inhibitrice, parmi elles de nombreux composés phénoliques qui se trouvent surtout chez les végétaux ligneux. Ces composés interviennent dans de nombreux processus soit comme antagonistes de substances de croissance soit comme inhibiteurs des réactions métaboliques. Ces dernières, peuvent aussi annuler les échanges entre l'explant et le milieu de culture **[50]**.

En culture *in vitro* ces composés sont quelquefois libérés dans le milieu et s'oxydent, ce qui provoque un brunissement et conduit souvent à la mort de l'explant **[66]**.

Dans notre étude les explants de feuilles et feuilles cotylédonaires sont atteints par le phénomène de brunissement comparés aux explants de racines et

entre nœuds où ce phénomène n'apparaît pas. Nous pouvons déduire que les feuilles sont plus fragiles que les entre-nœuds et les racines qui sont ligneux.

L'induction de la callogenèse est influencée par plusieurs paramètres, notamment le milieu de culture, le type d'explant et l'apport hormonal.

**SMIRNOV et SMIRNOV, [100]** signalent que la capacité de formation des cals est exprimée sur un milieu spécifique pour chaque taxon et qu'elle est aussi déterminée génétiquement.

Dans notre étude, nous avons remarqué que le milieu MS est plus callogène avec un taux de 40,47% comparé au milieu Gamborg où nous enregistrons 37,21%.

La réactivité des tissus chez l'arganier dépend, en plus du milieu de culture, du type d'explant. En effet, l'explant d'entre-nœuds possède un pouvoir callogène très important par rapport aux autres explants (feuilles, feuilles cotylédonaire et racines) et cela pour les deux milieux testés.

Les cals obtenus chez l'espèce étudiée se forment surtout lorsque le 2,4-D est associé à la BAP dans les milieux de culture. Cette association a un effet synergique et/ou complémentaire des auxines et des cytokinines sur la callogenèse.

Cet effet complémentaire sur la callogenèse a déjà été démontré, chez nombreuses essences végétales notamment l'arganier (*Argania spinosa*). Le résultat obtenu est confirmé par **MORSLI, [101]** et **HADDAR, [102]** qui ont obtenu une meilleure aptitude callogène et une croissance des cals en utilisant le 2,4-D (1mg/l) associé à la BAP (9mg/l). Mêmes résultats sont obtenus pour les espèces ligneuses telles que *Quercus suber* [103], *Mangifera indica* [104] et *Citrus grandis* [105].

L'importance de la callogenèse ne dépend pas seulement de la nature du régulateur de croissance, mais aussi de sa concentration. La meilleure combinaison hormonale d'induction de la callogenèse et la croissance des cals est

obtenue en associant **BAP/2,4-D** à 0,5mg/l, cette combinaison a permis d'avoir un pourcentage de callogenèse plus élevé avec respectivement **69,16 et 60%**.

Les résultats obtenus rejoignent ceux de **NDOUMOU** et **TCHINDA**, [106] qui ont obtenu un taux de **75,2 %** des explants formant des cals, lors des travaux effectués sur la callogenèse de l'espèce *Baillonella toxisperma* appartenant à la famille des sapotaceae. Ces résultats concordent aussi avec ceux obtenus par **OUMAR et al.**, [107] chez *Irvingia gabonensis* et *Irvingia wombulu*, à partir des fragments de feuilles mis en culture sur MS contenant la combinaison BAP/2,4-D.

En effet, une légère augmentation dans la concentration de 2,4-D (0,75mg/l) combinée à la Kin (0,5mg/l) donne, aussi, un taux d'induction relativement important avec respectivement **60 et 55%**.

Ces observations viennent confirmer celles constatées par **STEWART et al.**, [108] lors des travaux menés sur la culture *in vitro* de cellules dédifférenciées d'*Argania spinosa*. Ils ont obtenu une dédifférenciation rapide et une prolifération poussée des tissus sous forme de cals friables en utilisant la même combinaison hormonale (2,4-D/Kin).

En revanche, l'augmentation dans la concentration de la cytokinine (BAP 1mg/l à 9 mg/l associé à 1mg/l de (2,4-D) n'a pas abouti à des résultats satisfaisants. Cependant nos résultats sont en accord avec les travaux de **DURAN-VILA et al.**, [109] et **ROCHDI**, [110] qui soulignent que pour avoir une induction de la callogenèse, la concentration en BAP doit être plus faible que l'auxine 2,4-D.

Lors de notre essai, l'utilisation de BAP seule à 2 mg/l a donné un taux quasi nul de callogenèse. Ce résultat est en contradiction avec les travaux de **ACHAIRI et al.**, [111] qui ont obtenu l'optimum de callogenèse d'*Argania spinosa* avec **100%**. Néanmoins, les travaux réalisés par **EL YACOUBI et al.**, [112], sur la callogenèse d'agrumes viennent confirmer nos résultats. En effet, la cytokinine BAP seule ne permet pas d'induire la callogenèse cependant, l'ajout de BAP renforce l'effet callogène du 2,4-D et favorise la prolifération cellulaire.

En outre, la substitution de la cytokinine BAP par la kinitine donne un taux de callogenèse appréciable de 57,5% pour le milieu MS et 52,5% pour le milieu Gamborg. Par contre la substitution d'auxine 2,4-D par d'autres auxines (ANA) n'avait qu'un faible effet sur l'induction de callogenèse, ce résultat est confirmé par **EL YACOUBI et al., [112]**, où ils précisent que l'auxine 2,4-D est indispensable à la callogenèse.

Le type et la couleur des cals dépendent de la balance hormonale utilisée. Les cals obtenus sont pour certains spongieux, pour d'autres nodulaires friables, lisses friables ou durs. Les cals friables prolifèrent plus rapidement que les autres. Cette constatation est confirmée par **VOGT et al., [113]**, qui soulignent qu'un cal friable a une croissance plus rapide qu'un cal dur.

L'auxine ANA utilisée à toutes les concentrations, induit la formation et le développement de racines *in vitro* à partir des fragments foliaires d'*Argania spinosa*. Cette phytohormone est capable de réorienter les cellules foliaires vers la formation d'ébauches racinaires en obscurité. Ce résultat est en accord avec celui de **HAMMERSCHLAG et al., (1987) in [114]**, rapportant qu'une période d'obscurité précédant ou en début d'induction stimule la rhizogenèse.

Chaque deux mois, les cals obtenus sont repiqués sur un milieu frais de même composition hormonale que leur induction, et sont soumis aux mêmes conditions environnementales. Le poids frais est pesé après quatre et six mois de culture.

La croissance, estimée par la masse moyenne des cals frais, (toutes combinaisons confondues), est relativement importante pour les cals mis en culture sur le milieu MS que ceux mis en culture sur le milieu Gamborg, cela est dû au fait que les conditions trophiques fournis par le milieu MS sont requises à la croissance des cals.

L'ajout du charbon actif et de l'acide ascorbique ont permis d'optimiser les conditions d'induction de callogenèse et d'éviter le brunissement.

**ROSELL et VILLALOBOS, [52]** précisent que le charbon actif absorbe les inhibiteurs de croissance ou l'excès d'auxines du milieu de culture, les

concentrations recommandées sont comprises entre 0,5 à 2 %. Dans notre cas 0,5 g de charbon actif est suffisant pour atténuer ce phénomène.

Après avoir optimisé les conditions de callogenèse nous avons obtenu un taux très important de callogenèse atteignant 86,66% et un taux de brunissement nul (0%). Le poids frais des cals est dédoublé après 4 mois de mise en culture il passe de **69,13** à **167,10 mg**. Il est 10 fois plus important après 6 mois de culture où il passe de **100,3** à **1142 ,3 mg**.

La production d'embryons somatiques *in vitro* a été rapportée sur environ 150 espèces ligneuses [115].

Dans notre expérimentation, nous notons que l'initiation à l'embryogenèse somatique chez l'*Argania spinosa* est possible, elle dépend, à la fois du type de milieu utilisé et de sa composition hormonale.

Nous avons obtenus des structures globulaires, en utilisant le milieu MS liquide contenant 0,5 mg/l de 2,4-D et 0,5mg/l BAP suivi d'un transfert dans le milieu MS semi-solide sans régulateurs de croissances ce qui est confirmé par **ZRYD, [53]** et **BOXUS et al., [116]** qui signalent que l'utilisation d'auxine exogène au début de la culture induit la formation d'amas globulaires ou pro-embryons. Le transfert de ces derniers dans un milieu dépourvu d'auxines, permet le développement des embryons [53].

Les essais réalisés sur les embryons somatiques obtenus, en vue de la mise au point d'un milieu de culture adéquat, n'assure pas le développement des embryons somatiques (germination). Plusieurs facteurs seraient à l'origine de cet échec à la germination.

**FKI et al., [117]** signalent que l'hyperhydricité d'une proportion souvent importante des embryons somatiques formés en milieu liquide constitue un obstacle majeur au processus de la germination. Egalement, cet incompetence à la germination serait également due à des anomalies physiologiques de l'embryon qui empêchent la germination d'avoir lieu tel que, l'absence totale de toute structure de type méristématique, le méristème mal formé non fonctionnel sur le plan



physiologique, ou bien le méristème formé est typique mais soumis à des inhibitions dont les causes restent à déterminer [117].

#### 4.3. Microbouturage

La première phase de développement des vitro-plants se manifestent par le gonflement des bourgeons.

Les vitro-plants repiqués dans chacun des milieux **Mi0** (témoin), **Mi1** (1mg/l BAP ; 0,5mg/l AIA), **Mi5** (2mg/l BAP ; 0,1mg/l ANA) et **Mi6** (1mg/l Kin ; 0,5mg/l AIA) ont présenté un taux de débourrement des bourgeons très important (**100%**) avec des taux légèrement plus faible pour les autres milieux testés (**Mi2, Mi3, Mi4, Mi7, Mi8 et Mi9**) qui ont fournis un taux de débourrement plus faible compris entre 30 et 90%.

En revanche, la combinaison (1mg/l Kin ; 0,5mg/l AIA) du milieu **Mi6** a fourni des vitro-plants de très bonne qualité.

Selon **MARGARA**, [118], les cytokinines associées aux auxines, favorisent généralement la prolifération *in vitro* des méristèmes préexistés ce qui explique le meilleur taux de débourrement des bourgeons, obtenu lors d'utilisation de cytokinines (Kin ou BAP) associées aux auxines (AIA/ANA) (**Mi1, Mi5 et Mi6**).

Par contre le meilleur taux (100%) obtenu lors d'utilisation de milieu **Mi0** (témoin) pourrait s'expliquer par l'existante de l'apport interne des régulateurs de croissance qui sont utilisé par l'explant, pour se développer sur le milieu MS qui est aussi caractérisé principalement par une très forte teneur en azote dont le tiers est apporté sous forme réduite (ions  $\text{NH}_4^+$ ) et une concentration élevée en potassium ( $\text{K}^+$ ). 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 [118].

Le meilleur allongement caulinaire avec une moyenne de 5 cm est obtenu sur le milieu **Ma3** avec 1,5mg/l de GA3.

**CHLYAH et DEMARLY**, [119] 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*.

Selon **BOULAY**, [120] **TSOGAS** et **BOURIQUET**, [121] **DUMANOIS** et *al.*, [122] **ALTAMURA**, [123], **DRUART**, [124] la rhizogenèse *in vitro* des ligneux est souvent difficile à réaliser.

Chez l'arganier, le faible taux d'enracinement et le dysfonctionnement des racines régénérées, sont responsables des pertes importantes de plantules enracinées *in vitro* au cours de la phase d'acclimatation [125].

Au terme de la phase d'induction des racines, qui a duré deux mois, l'apport combiné de l'AIB et l'ANA, à concentrations égales (1 mg/l) dans le milieu **Mr3** a donné le meilleur pourcentage de plants enracinés.

Les résultats obtenus, avec un taux estimé à 50%, ne concordent pas avec ceux de **BOUSSELMAME** et *al.*, [88] qui obtiennent un taux plus élevé de 85%, avec la même combinaison (AIB/AIA), mais à une concentration plus élevée de 5mg/l.

L'utilisation de l'AIB combiné à l'ANA s'est révélée efficace pour stimuler la rhizogenèse chez l'arganier. 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* [126], *Gmelina arborea* [127], *Quercus sp.* [128] et *Fraxinus excelsior* [129] [130]. Certaines espèces comme *Artocarpus heterophyllus*, l'utilisation de combinaison hormonale englobant trois auxines en même temps (AIA+AIB+ANA) à concentrations égales donne une meilleure rhizogenèse [131].

En outre, **SANE** et *al.*, [132] trouvent que, l'apport de l'ANA et l'AIB sont donc nécessaires, pour induire la formation des primordiums racinaires chez *Acacia raddiana*.

Le transfert des vitro-semis d'un milieu contenant des régulateurs de croissance à un autre milieu neutre Mr0<sub>1</sub> (sans hormones, et les vitro-plants proviennent du milieu MS4 de callogenèse « 0,5mg/l d'ANA et 0,5mg/l de BAP ») a permis d'obtenir 37,5% de pousses enracinées. D'après **ZRYD**, [53] la rhizogenèse 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.).

Concernant la longueur moyenne des racines mesurées, le milieu **Mr3** est favorable et stimule considérablement cette élongation avec 4,3 cm comparé au milieu Mr01 avec 3,66 cm. Ces résultats sont en concordance avec les travaux de **ZIANI, [133]** qui a obtenu une longueur moyenne des racines de 2 à 3 cm en utilisant 10 et 20 mg/l d'AIB lors des travaux menés sur la régénération de l'arganier *in vitro*.

En revanche, les résultats obtenus par **BOUSSELMAME et al., [88]** sur l'arganier sont plus élevés, avec une longueur moyenne des racines de 10,5 cm.

**DAIKH et DEMARLY, [134]** et **ROGUET, [135]** trouvent que, l'embryogenèse somatique permet en un temps très court de produire des plantules entières sans passer par les contraintes que connaît habituellement l'organogenèse (phase de caulogenèse et de rhizogenèse). Nous n'avons pas atteint les objectifs tracé concernant la comparaison de temps de régénération d'arganier par l'embryogenèse somatique et par microbouturage, vu le problème rencontré lors de la germination des embryons somatiques obtenus.

## CONCLUSION

L'activité pastorale, sous forme de transhumance et semi nomadisme en Algérie et notamment à Tindouf, a conduit à une dégradation et une régression dramatique et souvent irréversible de l'arganeraie, ceci à travers la persistance du phénomène des coupes de bois de feu et le surpâturage.

Pour cela, la maîtrise des techniques de multiplication d'arganier est nécessaire pour préserver cette espèce endémique en voie de disparition.

L'optimisation des conditions de germination *in vitro* des graines d'*Argania spinosa* (L.) est l'un des principaux résultats. La désinfection des amandes d'arganier par l'hypochlorite de sodium NaClO (8°/5mn) s'avère efficace, le meilleur pourcentage de germination avec un taux de **100%** et développement des vitro-semis est obtenu sur le milieu eau gélosée.

L'optimisation des conditions de callogenèse montre que le milieu Murashige et Skoog est plus callogène que le milieu Gamborg avec respectivement un taux de **40,47%** comparé à **37,21%**.

Parmi les explants testés, l'explant d'entre-nœud fourni des cals volumineux et friables. L'utilisation de la combinaison hormonale (0,5mg/l **BAP** ; 0,5mg/l **2,4-D**) donne le meilleur taux d'induction des cals avec respectivement **69,16 et 60%** pour les milieux MS et Gamborg.

L'adjonction d'acide ascorbique et de charbon actif améliore le taux de callogenèse de **69,16 à 86,66%** et la croissance de la masse callogène sur le milieu optimal estimée par le poids frais des cals où il passe de **69,13 mg** à **167,10 mg** après 4 mois et de **100,3 mg** à **1142,3 mg** après 6 mois de mise en culture sur milieu **MS6** (0,5mg/l **BAP** 0,5mg/l **2,4-D**) et **MS6 optimisé** (MS6+anti-oxydants) respectivement.

Les embryons somatiques obtenus après 2 mois de culture en suspensions cellulaires ont stoppé leur croissance au stade globulaire, après le transfert sur un milieu semi-solide.

La multiplication par microbouturage expérimentée montre que la combinaison hormonale (1mg/l **Kin** ; 0,5mg/l **AIA**) donne les meilleurs taux avec **100%** de débourrement des bourgeons.

Le meilleur allongement caulinaire est obtenu après ajout de gibbérelline **GA3**, à 1,5mg/l, où la longueur moyenne de la tige atteint **5 cm**.

La combinaison hormonale (1mg/l AIB, 1mg/l ANA) a permis l'enracinement des vitro-plants à **50 %**.

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

- Optimisation des paramètres physico-chimiques (T° de chambre de culture et pH de milieu de culture) lors d'induction de la callogenèse ;
- Détermination des conditions optimales pour la germination des embryons somatiques ;
- Réalisation des coupes histologiques des différentes étapes de formation des embryons somatiques ;
- La mise au point de techniques de mycorhization des jeunes plants acclimatés, lors de la transplantation.

## ANNEXES

**Annexe 1** : Composition minérale de l'eau N'Gaous utilisée dans la germination, citée sur l'emballage

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** : Constituants du milieu Knop [75]

Composés	Concentrations (g/l)
<b>Ca (NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub></b>	1
<b>KNO<sub>3</sub></b>	0.25
<b>MgSO<sub>4</sub></b>	0.25
<b>KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub></b>	0.25
<b>FeCl<sub>3</sub></b>	Traces

**Annexe 3: Constituants du milieu MS [76]**

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

**Annexe 4: Constituants du milieu de Gamborg [77]**

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

**Annexe 5 : Préparation des solutions mères de milieu MS et Gamborg**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 Na<sub>2</sub> EDTA et mélanger jusqu'à dissolution ;
- Ajouter FeSO<sub>4</sub>-7 H<sub>2</sub>O;
- 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 les 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.

## Annexe 6 : Table 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 7: Etude histologique

### ▪ Préparation des coupes histologique de différent organe

Selon **COUJARD et al.**, [82] 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 [83].

#### - 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 [82].

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 [84].

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 [82].

### **-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 maintien 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.

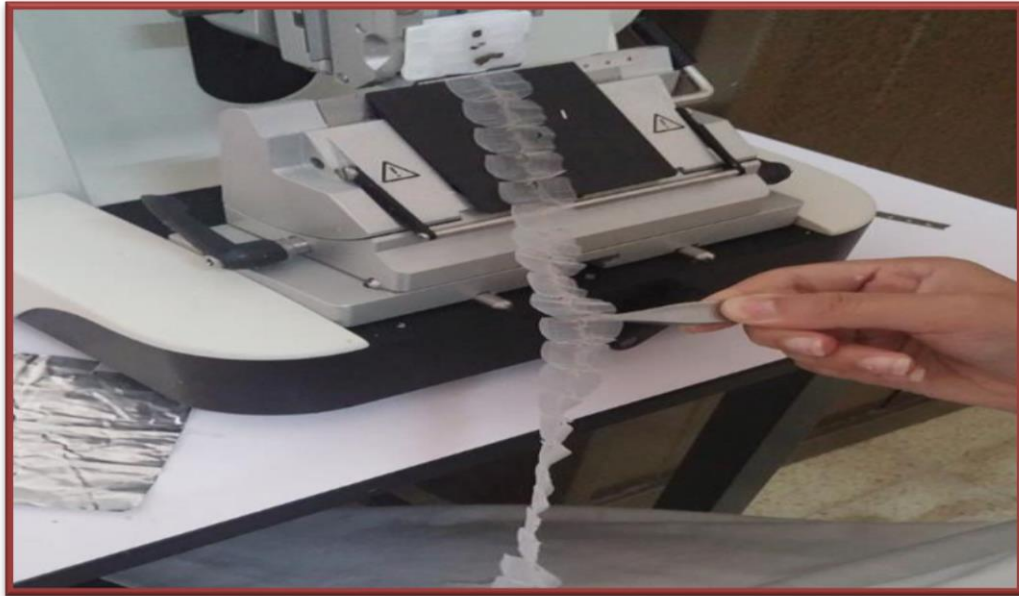
#### ***-Confection et étalement des coupes***

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 gélatineuse 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 7** : 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/1 volume) pendant 5 minutes
- ✦ Rinçage à l'eau courante.

#### - **La coloration**

La coloration topographique permet, par leurs affinités différentielles, de colorer les tissus avec des couleurs différentes [57].

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) [57].

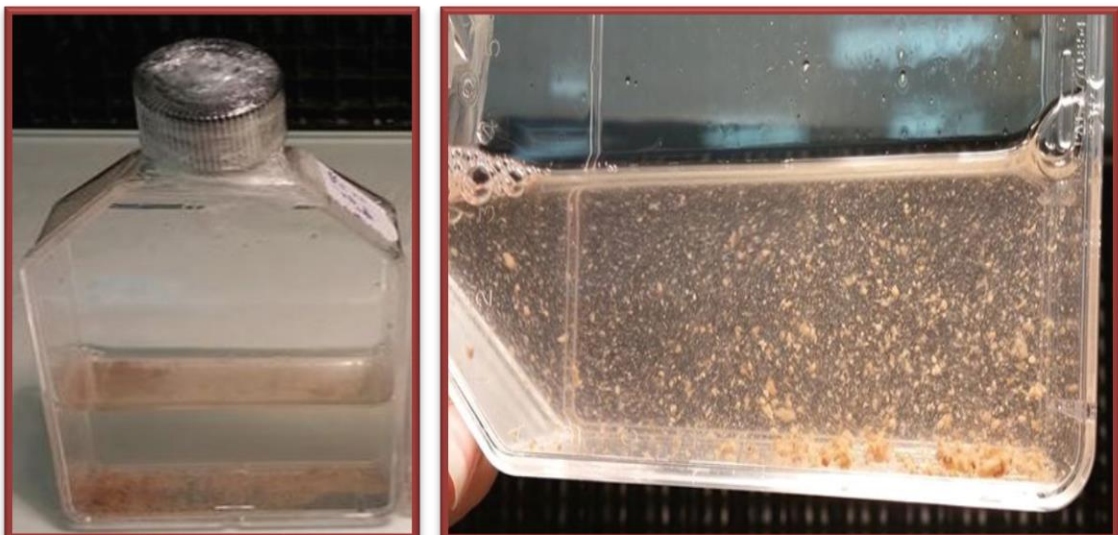
Nous avons utilisé le protocole développé au sein du laboratoire de biotechnologie végétale.

Cette méthode permet la coloration des parois végétales :

- ✦ Bain de l'eau de Javel pendant 10 à 15 mn ;
- ✦ Rinçage à l'eau pendant 10 à 20mn ;
- ✦ Bain d'acide acétique pendant 1mn ;
- ✦ Rinçage à l'eau pendant 10 à 20mn ;
- ✦ Bain de vert de méthyle pendant 5 à 10mn ;
- ✦ Rinçage à l'eau pendant 10 à 20mn ;
- ✦ Bain de rouge Congo pendant 10mn ;
- ✦ Rinçage à l'eau courante.

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

#### **Annexe 8 : Suspensions cellulaires**



**Annexe 9 : Moyenne de la longueur des pousses en fonction de traitement**

Traitement; Weighted Means (Spreadsheet20) Current effect: F(3, 168)=2,9314, p=,03516 Effective hypothesis decomposition						
Cell No.	Traitement	Hauteur de pousse (cm)	Hauteur de pousse (cm)	Hauteur de pousse (cm)	Hauteur de pousse (cm)	N
1	T1	25,75556	1,620156	22,49035	29,02076	45
2	T2	28,21591	1,846401	24,49229	31,93953	44
3	T3	32,38095	1,046510	30,26748	34,49442	42
4	T4	30,07317	1,929043	26,17443	33,97191	41

**Annexe 10 : Moyenne des feuilles en fonction de traitement**

Traitement; Weighted Means (Spreadsheet2) Current effect: F(3, 168)=2,7015, p=,04730 Effective hypothesis decomposition						
Cell No.	Traitement	nombre de feuille Mean	nombre de feuille Std.Err.	nombre de feuille -95,00%	nombre de feuille +95,00%	N
1	T1	16,333333	1,594498	13,11983	19,54683	45
2	T2	18,11364	1,694169	14,69702	21,53025	44
3	T3	22,69048	1,943597	18,76530	26,61565	42
4	T4	18,26829	1,247937	15,74612	20,79047	41

**Annexe 11 : Moyenne de la longueur des pousses en fonction de milieu**

Milieu; Weighted Means (Spreadsheet12) Current effect: F(2, 169)=12,901, p=,00001 Effective hypothesis decomposition						
Cell No.	Milieu	Hauteur (cm) Mean	Hauteur (cm) Std.Err.	Hauteur (cm) -95,00%	Hauteur (cm) +95,00%	N
1	MS/2	23,78689	1,075590	21,63539	25,93839	61
2	KNOP	30,89167	1,529424	27,83130	33,95204	60
3	EG	33,11765	1,456869	30,19144	36,04386	51

**Annexe 12 : Moyenne des feuilles en fonction de milieu**

Milieu; Weighted Means (Spreadsheet7) Current effect: F(2, 169)=27,121, p=,00000 Effective hypothesis decomposition						
Cell No.	Milieu	Nombre de feuille Mean	Nombre de feuille Std.Err.	Nombre de feuille -95,00%	Nombre de feuille +95,00%	N
1	MS/2	12,93443	0,948933	11,03628	14,83258	61
2	KNOP	18,40000	1,126266	16,14635	20,65365	60
3	EG	26,29412	1,738445	22,80235	29,78589	51

**Annexe 13 : Moyenne des calcs brunis sur milieu MS**

Type d'explant; Weighted Means (Spreadsheet1) Current effect: F(3, 40)=4,9655, p=,00505 Effective hypothesis decomposition						
Cell No.	Type d'explant	Moyenne des calcs brunis Mean	Moyenne des calcs brunis Std.Err.	Moyenne des calcs brunis -95,00%	Moyenne des calcs brunis +95,00%	N
1	FC	5,72727	2,408662	0,360439	11,09411	11
2	F	14,54545	3,353055	7,074383	22,01653	11
3	E	0,00000				11
4	R	7,81818	3,466248	0,094900	15,54146	11

**Annexe 14 : Moyenne des des calcs brunis sur milieu Gamborg**

Type d'explant; Weighted Means (Spreadsheet12) Current effect: F(3, 40)=6,5778, p=,00102 Effective hypothesis decomposition						
Cell No.	Type d'explant	Moyenne des calcs brunis Mean	Moyenne des calcs brunis Std.Err.	Moyenne des calcs brunis -95,00%	Moyenne des calcs brunis +95,00%	N
1	FC	2,72727	1,695400	-1,05031	6,50486	11
2	F	12,36364	4,251786	2,89007	21,83721	11
3	E	0,00000				11
4	R	0,00000				11

**Annexe 15 : Moyennes des calcs brunis sur MS en fonction d'équilibre hormonal**

Equilibre hormonal; Weighted Means (Spreadsheet23) Current effect: F(10, 33)=1,2170, p=,31641 Effective hypothesis decomposition						
Cell No.	Equilibre hormonal	Moyenne des calcs brunis Mean	Moyenne des calcs brunis Std.Err.	Moyenne des calcs brunis -95,00%	Moyenne des calcs brunis +95,00%	N
1	0	0,00000				4
2	1	7,00000	7,000000	-15,2771	29,27712	4
3	2	12,50000	7,320064	-10,7957	35,79571	4
4	3	17,50000	6,614378	-3,5499	38,54990	4
5	4	6,50000	6,500000	-14,1859	27,18590	4
6	5	3,75000	3,750000	-8,1842	15,68417	4
7	6	0,75000	0,750000	-1,6368	3,13683	4
8	7	4,50000	4,500000	-9,8210	18,82101	4
9	8	4,50000	2,872281	-4,6409	13,64088	4
10	9	7,25000	3,065262	-2,5050	17,00503	4
11	10	13,50000	4,974937	-2,3325	29,33247	4



**Annexe 16 : Moyennes des cals brunis sur Gammbooren fonction d'équilibre hormonal**

Equilibre hormonal; Weighted Means (Spreadsheet29) Current effect: F(10, 33)=,44365, p=,91341 Effective hypothesis decomposition						
Cell No.	Equilibre hormonal	Moyenne des cals brunis Mean	Moyenne des cals brunis Std.Err.	Moyenne des cals brunis -95,00%	Moyenne des cals brunis +95,00%	N
1	0	0,000000				4
2	1	3,750000	3,750000	-8,1842	15,68417	4
3	2	3,250000	3,250000	-7,0930	13,59295	4
4	3	1,000000	1,000000	-2,1824	4,18245	4
5	4	0,500000	0,500000	-1,0912	2,09122	4
6	5	8,000000	7,348469	-15,3861	31,38611	4
7	6	0,000000				4
8	7	3,750000	3,750000	-8,1842	15,68417	4
9	8	6,750000	6,750000	-14,7315	28,23151	4
10	9	7,500000	7,500000	-16,3683	31,36835	4
11	10	7,500000	7,500000	-16,3683	31,36835	4

**Annexe 17 : Moyenne des cals en fonction de type d'explant sur MS**

Type d'explant; Weighted Means (Spreadsheet8) Current effect: F(3, 40)=5,8392, p=,00209 Effective hypothesis decomposition						
Cell No.	Type d'explant	Moyenne des cals Mean	Moyenne des cals Std.Err.	Moyenne des cals -95,00%	Moyenne des cals +95,00%	N
1	FC	13,18182	3,709492	4,916555	21,44708	11
2	F	5,00000	1,662419	1,295900	8,70410	11
3	E	15,72727	3,272727	8,435182	23,01936	11
4	R	2,18182	1,166332	-0,416932	4,78057	11

**Annexe 18 : Moyenne des cals en fonction de type d'explant sur Gamborg**

Type de milieu; Weighted Means (Spreadsheet18) Current effect: F(3, 40)=3,0547, p=,03928 Effective hypothesis decomposition						
Cell No.	Type de milieu	Moyenne des cals Mean	Moyenne des cals Std.Err.	Moyenne des cals -95,00%	Moyenne des cals +95,00%	N
1	FC	12,18182	3,210262	5,028908	19,33473	11
2	F	4,36364	2,175369	-0,483388	9,21066	11
3	E	12,36364	2,930320	5,834476	18,89280	11
4	R	4,72727	1,573016	1,222374	8,23217	11

**Annexe19:** Moyenne des cals, en fonction d'équilibre hormonal sur milieu MS

Equilibre hormonal; Weighted Means (Spreadsheet30)						
Current effect: F(10, 33)=2,6865, p=,01586						
Effective hypothesis decomposition						
Cell No.	Equilibre hormonal	Moyenne des cals Mean	Moyenne des cals Std.Err.	Moyenne des cals -95,00%	Moyenne des cals +95,00%	N
1	0	0,00000				4
2	1	17,25000	7,431633	-6,4008	40,90077	4
3	2	18,00000	7,118052	-4,6528	40,65282	4
4	3	11,25000	7,180703	-11,6022	34,10220	4
5	4	3,50000	1,848423	-2,3825	9,38251	4
6	5	2,25000	1,652019	-3,0075	7,50746	4
7	6	20,75000	3,944933	8,1955	33,30454	4
8	7	3,25000	2,358495	-4,2558	10,75578	4
9	8	11,25000	3,881044	-1,1012	23,60121	4
10	9	6,50000	2,533114	-1,5615	14,56150	4
11	10	5,25000	1,250000	1,2719	9,22806	4

**Annexe 20 :** Moyenne des cals en fonction d'équilibre hormonal sur milieu Gamborg

Equilibre hormonal; Weighted Means (Spreadsheet42)						
Current effect: F(10, 33)=4,6268, p=,00039						
Effective hypothesis decomposition						
Cell No.	Equilibre hormonal	Moyenne des cals Mean	Moyenne des cals Std.Err.	Moyenne des cals -95,00%	Moyenne des cals +95,00%	N
1	0	0,00000				4
2	1	15,75000	5,513242	-1,79560	33,29560	4
3	2	16,50000	2,397916	8,86876	24,13124	4
4	3	2,75000	2,136001	-4,04771	9,54771	4
5	4	1,00000	1,000000	-2,18245	4,18245	4
6	5	0,00000				4
7	6	18,00000	3,188521	7,85270	28,14730	4
8	7	2,50000	2,500000	-5,45612	10,45612	4
9	8	11,25000	4,385107	-2,70537	25,20537	4
10	9	13,00000	4,725816	-2,03965	28,03965	4
11	10	11,75000	4,767512	-3,42235	26,92235	4

**Annexe 21 :** Bilan des cals ayant repris leur croissance

Milieu/type d'explant		Traitements	Nombre de cals au premier repiquage	Nombre de cals au deuxième repiquage	Pourcentage de reprise (%)
MS	E	1 : (0,5mg/lkin ; 0,5mg/l 2,4-D)	0	0	0
	F		0	0	0
	FC		28	19	67,86
	R		4	4	100
	E	2:(0,5mg/l kin ; 0,75mg/l 2,4-D)	3	3	100
	F		3	3	100
	FC		17	14	82,35
	R		2	2	100
	E	3:(0,5mg/l kin ; 0,5mg/l ANA)	30	19	63,33
	F		0	0	0
	FC		0	0	0
	R		0	0	0
	E	4:(0,5mg/l ANA ; 0,5mg/l BAP)	8	6	75
	F		5	5	100
	FC		0	0	0
	R		0	0	0
	E	5: (2mg/l BAP)	7	3	42,86
	F		0	0	0
	FC		0	0	0
	R		0	0	0
	E	6 : (0,5mg/l 2,4-D ; 0,5mg/l BAP)	24	12	50
	F		0	0	0
	FC		24	24	100
	R		12	8	66,67
	E	7: (1mg/l 2,4-D ; 1mg/l BAP)	10	10	100
	F		0	0	0
	FC		3	2	66,67
	R		0	0	0
	E	8:(1mg/l2,4-D ; 3mg/l BAP)	15	13	86,67
	F		10	3	30
	FC		19	3	15,77
	R		1	0	0
	E	9:(1mg/l 2,4-D ; 6mg/l BAP)	11	4	36,36
	F		5	3	60
	FC		10	5	50
	R		0	0	0
	E	10: (1mg/l 2,4-D ; 9mg/l BAP)	8	8	100
	F		6	4	66,67
	FC		5	4	80
	R		2	2	100
<b>Milieu</b>	<b>Type d'explant</b>	<b>Traitements</b>	<b>Nombre de cals au</b>	<b>Nombre de cals au</b>	<b>Pourcentage de reprise</b>

			<b>premier repiquage</b>	<b>deuxième repiquage</b>	<b>(%)</b>
<b>B5</b>	<b>E</b>	<b>1</b> : (0,5mg/lkin ; 0,5mg/l 2,4-D)	<b>20</b>	<b>20</b>	<b>100</b>
	<b>F</b>		<b>7</b>	<b>5</b>	<b>71,43</b>
	<b>FC</b>		<b>3</b>	<b>2</b>	<b>66,67</b>
	<b>R</b>		<b>2</b>	<b>2</b>	<b>100</b>
	<b>E</b>	<b>2</b> :(0,5mg/l kin ; 0,75mg/l 2,4-D)	<b>23</b>	<b>9</b>	<b>39,13</b>
	<b>F</b>		<b>10</b>	<b>8</b>	<b>80</b>
	<b>FC</b>		<b>8</b>	<b>8</b>	<b>100</b>
	<b>R</b>		<b>12</b>	<b>9</b>	<b>75</b>
	<b>E</b>	<b>3</b> :(0,5mg/l kin ; 0,5mg/l ANA)	<b>8</b>	<b>2</b>	<b>25</b>
	<b>F</b>		<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>
	<b>FC</b>		<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>
	<b>R</b>		<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>
	<b>E</b>	<b>4</b> :(0,5mg/l ANA ; 0,5mg/l BAP)	<b>4</b>	<b>1</b>	<b>25</b>
	<b>F</b>		<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>
	<b>FC</b>		<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>
	<b>R</b>		<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>
	<b>E</b>	<b>5</b> : (2mg/l BAP)	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>
	<b>F</b>		<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>
	<b>FC</b>		<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>
	<b>R</b>		<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>
	<b>E</b>	<b>6</b> :(0,5mg/l 2,4-D ; 0,5mg/l BAP)	<b>5</b>	<b>5</b>	<b>100</b>
	<b>F</b>		<b>17</b>	<b>13</b>	<b>76,47</b>
	<b>FC</b>		<b>8</b>	<b>8</b>	<b>100</b>
	<b>R</b>		<b>9</b>	<b>9</b>	<b>100</b>
	<b>E</b>	<b>7</b> : (1mg/l 2,4-D ; 1mg/l BAP)	<b>21</b>	<b>17</b>	<b>80,95</b>
	<b>F</b>		<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>
	<b>FC</b>		<b>8</b>	<b>8</b>	<b>100</b>
	<b>R</b>		<b>8</b>	<b>8</b>	<b>100</b>
	<b>E</b>	<b>8</b> :(1mg/l2,4-D ; 3mg/l BAP)	<b>20</b>	<b>4</b>	<b>20</b>
	<b>F</b>		<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>
	<b>FC</b>		<b>16</b>	<b>10</b>	<b>62,5</b>
	<b>R</b>		<b>9</b>	<b>4</b>	<b>44,44</b>
	<b>E</b>	<b>9</b> :(1mg/l 2,4-D ; 6mg/l BAP)	<b>20</b>	<b>11</b>	<b>55</b>
	<b>F</b>		<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>
	<b>FC</b>		<b>20</b>	<b>7</b>	<b>35</b>
	<b>R</b>		<b>12</b>	<b>3</b>	<b>25</b>
	<b>E</b>	<b>10</b> : (1mg/l 2,4-D ; 9mg/l BAP)	<b>20</b>	<b>6</b>	<b>30</b>
	<b>F</b>		<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>
	<b>FC</b>		<b>19</b>	<b>11</b>	<b>57,89</b>
	<b>R</b>		<b>8</b>	<b>3</b>	<b>37,5</b>

**Annexe 22** : Moyenne des cals frais en fonction d'équilibre hormonal des feuilles cotylédonaire/MS 4<sup>ème</sup> mois

Equilibre hormonal; Weighted Means (Spreadsheet32) Current effect: F(9, 99)=5,5259, p=,00000 Effective hypothesis decomposition						
Cell No.	Equilibre hormonal	Poids frais des cals (g) Mean	Poids frais des cals (g) Std.Err.	Poids frais des cals (g) -95,00%	Poids frais des cals (g) +95,00%	N
1	1FC	0,570082	0,041339	0,485262	0,654902	28
2	2FC	0,626118	0,064963	0,488402	0,763833	17
3	3FC	0,000000				1
4	4FC	0,000000				1
5	5FC	0,000000				1
6	6FC	0,764750	0,077713	0,603988	0,925512	24
7	7FC	0,593233	0,116007	0,094096	1,092370	3
8	8FC	0,678426	0,046137	0,581497	0,775356	19
9	9FC	0,300380	0,030819	0,230664	0,370096	10
10	10FC	0,256040	0,021231	0,197094	0,314986	5

**Annexe 23** : Moyenne des cals frais en fonction d'équilibre hormonal des feuilles/MS 4<sup>ème</sup> mois

Equilibre hormonal; Weighted Means (Spreadsheet43) Current effect: F(9, 24)=7,2589, p=,00005 Effective hypothesis decomposition						
Cell No.	Equilibre hormonal	Poids frais des cals (g) Mean	Poids frais des cals (g) Std.Err.	Poids frais des cals (g) -95,00%	Poids frais des cals (g) +95,00%	N
1	1F	0,000000				1
2	2F	0,073067	0,017230	-0,001067	0,147200	3
3	3F	0,000000				1
4	4F	0,050260	0,013756	0,012067	0,088453	5
5	5F	0,000000				1
6	6F	0,000000				1
7	7F	0,000000				1
8	8F	0,102900	0,006650	0,087857	0,117943	10
9	9F	0,082020	0,004783	0,068741	0,095299	5
10	10F	0,080317	0,011830	0,049907	0,110726	6

**Annexe 24** : Moyenne des cals frais en fonction d'équilibre hormonal des entre-nœuds/MS 4<sup>ème</sup> mois

Equilibre hormonal; Weighted Means (Spreadsheet62) Current effect: F(9, 107)=4,8878, p=,00002 Effective hypothesis decomposition						
Cell No.	Equilibre hormonal	Poids frais des cals (g) Mean	Poids frais des cals (g) Std.Err.	Poids frais des cals (g) -95,00%	Poids frais des cals (g) +95,00%	N
1	1E	0,000000				1
2	2E	0,067933	0,014578	0,005210	0,130657	3
3	3E	0,027620	0,002149	0,023226	0,032014	30
4	4E	0,023963	0,001654	0,020051	0,027874	8
5	5E	0,038843	0,002381	0,033018	0,044668	7
6	6E	0,069137	0,009904	0,048649	0,089626	24
7	7E	0,055420	0,005136	0,043801	0,067039	10
8	8E	0,050987	0,004573	0,041179	0,060795	15
9	9E	0,063236	0,012733	0,034866	0,091606	11
10	10E	0,049113	0,004182	0,039225	0,059000	8

**Annexe 25**: Moyenne des cals frais en fonction d'équilibre hormonal des racines/MS 4<sup>ème</sup> mois

Equilibre hormonal; Weighted Means (Spreadsheet40) Current effect: F(9, 15)=1,8350, p=,14349 Effective hypothesis decomposition						
Cell No.	Equilibre hormonal	Poids frais des cals (g) Mean	Poids frais des cals (g) Std.Err.	Poids frais des cals (g) -95,00%	Poids frais des cals (g) +95,00%	N
1	1R	0,060375	0,011418	0,024036	0,096714	4
2	2R	0,054400	0,014500	-0,129840	0,238640	2
3	3R	0,000000				1
4	4R	0,000000				1
5	5R	0,000000				1
6	6R	0,101533	0,016538	0,065134	0,137933	12
7	7R	0,000000				1
8	8R	0,081800				1
9	9R	0,000000				1
10	10R	0,000000				1

**Annexe 26 : Moyenne des cals frais en fonction d'équilibre hormonal des feuilles cotylédonaire/MS 6<sup>ème</sup> mois**

Equilibre hormonal; Weighted Means (Spreadsheet5) Current effect: F(9, 64)=4,6565, p=,00009 Effective hypothesis decomposition						
Cell No.	Equilibre hormonal	Poids frais des cals (g) Mean	Poids frais des cals (g) Std.Err.	Poids frais des cals (g) -95,00%	Poids frais des cals (g) +95,00%	N
1	1FC	0,573216	0,051942	0,464090	0,682341	19
2	2FC	0,636100	0,078393	0,466742	0,805458	14
3	3FC	0,000000				1
4	4FC	0,000000				1
5	5FC	0,000000				1
6	6FC	0,855492	0,083470	0,682821	1,028163	24
7	7FC	0,775050	0,074950	-0,177280	1,727380	2
8	8FC	0,807033	0,104239	0,358530	1,255537	3
9	9FC	0,239640	0,024262	0,172277	0,307003	5
10	10FC	0,259800	0,028050	0,170533	0,349067	4

**Annexe 27: Moyenne des cals frais en fonction d'équilibre hormonal des feuilles/MS 6<sup>ème</sup> mois**

Equilibre hormonal; Weighted Means (Spreadsheet23) Current effect: F(9, 13)=,91942, p=,53820 Effective hypothesis decomposition						
Cell No.	Equilibre hormonal	Poids frais des cals (g) Mean	Poids frais des cals (g) Std.Err.	Poids frais des cals (g) -95,00%	Poids frais des cals (g) +95,00%	N
1	1F	0,000000				1
2	2F	0,076533	0,015320	0,010617	0,142449	3
3	3F	0,000000				1
4	4F	0,095220	0,010732	0,065423	0,125017	5
5	5F	0,000000				1
6	6F	0,000000				1
7	7F	0,000000				1
8	8F	0,445133	0,322446	-0,942241	1,832508	3
9	9F	0,103833	0,018477	0,024335	0,183331	3
10	10F	0,087775	0,015883	0,037228	0,138322	4

**Annexe 28** : Moyenne des cals frais en fonction d'équilibre hormonal des entre-nœuds/MS 6<sup>ème</sup> mois

Equilibre hormonal; Weighted Means (Spreadsheet33) Current effect: F(9, 68)=1,3501, p=,22839 Effective hypothesis decomposition						
Cell No.	Equilibre hormonal	Poids frais des cals (g) Mean	Poids frais des cals (g) Std.Err.	Poids frais des cals (g) -95,00%	Poids frais des cals (g) +95,00%	N
1	1E	0,000000				1
2	2E	0,085367	0,018802	0,004469	0,166264	3
3	3E	0,072037	0,009569	0,051933	0,092140	19
4	4E	0,089050	0,035956	-0,003379	0,181479	6
5	5E	0,049333	0,013017	-0,006675	0,105342	3
6	6E	0,100300	0,018770	0,058477	0,142123	11
7	7E	0,071410	0,005442	0,059100	0,083720	10
8	8E	0,064454	0,004832	0,053927	0,074981	13
9	9E	0,081675	0,017174	0,027020	0,136330	4
10	10E	0,052250	0,004193	0,042335	0,062165	8

**Annexe 29** : Moyenne des cals frais en fonction d'équilibre hormonal des racines/MS 6<sup>ème</sup> mois

Equilibre hormonal; Weighted Means (Spreadsheet47) Current effect: F(9, 11)=3,9543, p=,01783 Effective hypothesis decomposition						
Cell No.	Equilibre hormonal	Poids frais des cals (g) Mean	Poids frais des cals (g) Std.Err.	Poids frais des cals (g) -95,00%	Poids frais des cals (g) +95,00%	N
1	1R	0,062450	0,011104	0,027113	0,097787	4
2	2R	0,056750	0,014150	-0,123043	0,236543	2
3	3R	0,000000				1
4	4R	0,000000				1
5	5R	0,000000				1
6	6R	0,121287	0,015754	0,084035	0,158540	8
7	7R	0,000000				1
8	8R	0,082800				1
9	9R	0,000000				1
10	10R	0,000000				1



**Annexe 30:** Moyenne des cals frais en fonction d'équilibre hormonal des feuilles cotylédonaire/Gamborg 4<sup>ème</sup> mois

Equilibre hormonal; Weighted Means (Spreadsheet9) Current effect: F(9, 75)=4,7718, p=,00005 Effective hypothesis decomposition						
Cell No.	Equilibre hormonal	Poids frais des cals (g) Mean	Poids frais des cals (g) Std.Err.	Poids frais des cals (g) -95,00%	Poids frais des cals (g) +95,00%	N
1	1FC	0,423767	0,052189	0,199214	0,648320	3
2	2FC	0,608663	0,049973	0,490496	0,726829	8
3	3FC	0,000000				1
4	4FC	0,000000				1
5	5FC	0,000000				1
6	6FC	0,693213	0,082088	0,499105	0,887320	8
7	7FC	0,409375	0,056682	0,275343	0,543407	8
8	8FC	0,580231	0,057004	0,458730	0,701732	16
9	9FC	0,609695	0,040258	0,525435	0,693955	20
10	10FC	0,607032	0,034082	0,535427	0,678636	19

**Annexe 31 :** Moyenne des cals frais en fonction d'équilibre hormonal des feuilles/Gamborg 4<sup>ème</sup> mois

Equilibre hormonal; Weighted Means (Spreadsheet77) Current effect: F(9, 31)=1,9634, p=,07902 Effective hypothesis decomposition						
Cell No.	Equilibre hormonal	Poids frais des cals (g) Mean	Poids frais des cals (g) Std.Err.	Poids frais des cals (g) -95,00%	Poids frais des cals (g) +95,00%	N
1	1F	0,052686	0,008164	0,032710	0,072662	7
2	2F	0,102860	0,016561	0,065396	0,140324	10
3	3F	0,000000				1
4	4F	0,000000				1
5	5F	0,000000				1
6	6F	0,159153	0,028909	0,097870	0,220436	17
7	7F	0,000000				1
8	8F	0,000000				1
9	9F	0,000000				1
10	10F	0,000000				1

**Annexe 32 : Moyenne des cals frais en fonction d'équilibre hormonal des entre-nœuds/Gamborg 4<sup>ème</sup> mois**

Equilibre hormonal; Weighted Means (Spreadsheet1) Current effect: F(9, 132)=5,2927, p=,00000 Effective hypothesis decomposition						
Cell No.	Equilibre hormonal	Poids frais des cals (g) Mean	Poids frais des cals (g) Std.Err.	Poids frais des cals (g) -95,00%	Poids frais des cals (g) +95,00%	N
1	1E	0,037050	0,006292	0,023880	0,050220	20
2	2E	0,025865	0,004442	0,016654	0,035077	23
3	3E	0,032250	0,005752	0,018649	0,045851	8
4	4E	0,037725	0,003109	0,027831	0,047619	4
5	5E	0,000000				1
6	6E	0,064440	0,015761	0,020681	0,108199	5
7	7E	0,052781	0,003119	0,046275	0,059287	21
8	8E	0,054330	0,003092	0,047859	0,060801	20
9	9E	0,039865	0,002275	0,035103	0,044627	20
10	10E	0,051320	0,005242	0,040347	0,062293	20

**Annexe 33 : Moyenne des cals frais en fonction d'équilibre hormonal des racines/Gamborg 4<sup>ème</sup> mois**

Equilibre hormonal; Weighted Means (Spreadsheet19) Current effect: F(9, 53)=2,4819, p=,01910 Effective hypothesis decomposition						
Cell No.	Equilibre hormonal	Poids frais des cals (g) Mean	Poids frais des cals (g) Std.Err.	Poids frais des cals (g) -95,00%	Poids frais des cals (g) +95,00%	N
1	1R	0,038150	0,000350	0,033703	0,042597	2
2	2R	0,068825	0,004533	0,058848	0,078802	12
3	3R	0,000000				1
4	4R	0,000000				1
5	5R	0,000000				1
6	6R	0,112989	0,026892	0,050975	0,175003	9
7	7R	0,088488	0,013220	0,057228	0,119747	8
8	8R	0,098530	0,006600	0,083311	0,113749	9
9	9R	0,096533	0,014210	0,065257	0,127810	12
10	10R	0,090613	0,001481	0,087112	0,094113	8

**Annexe 34** : Moyenne des cals frais en fonction d'équilibre hormonal des feuilles cotylédonaire/Gamborg 6<sup>ème</sup> mois

Equilibre hormonal; Weighted Means (Spreadsheet1)						
Current effect: F(9, 35)=5,0015, p=,00024						
Effective hypothesis decomposition						
Cell No.	Equilibre hormonal	Poids frais des cals (g) Mean	Poids frais des cals (g) Std.Err.	Poids frais des cals (g) -95,00%	Poids frais des cals (g) +95,00%	N
1	1FC	0,594950	0,139450	-1,17693	2,366830	2
2	2FC	0,658163	0,061265	0,51329	0,803031	8
3	3FC	0,000000				1
4	4FC	0,000000				1
5	5FC	0,000000				1
6	6FC	0,811650	0,084918	0,61085	1,012448	8
7	7FC	0,510738	0,060949	0,36662	0,654859	8
8	8FC	0,520500	0,097712	0,24921	0,791793	5
9	9FC	0,710450	0,068217	0,53509	0,885808	6
10	10FC	0,730060	0,083536	0,49813	0,961994	5

**Annexe 35** : Moyenne des cals frais en fonction d'équilibre hormonal des feuilles/Gamborg 6<sup>ème</sup> mois

Equilibre hormonal; Weighted Means (Spreadsheet14)						
Current effect: F(9, 23)=,80211, p=,61849						
Effective hypothesis decomposition						
Cell No.	Equilibre hormonal	Poids frais des cals (g) Mean	Poids frais des cals (g) Std.Err.	Poids frais des cals (g) -95,00%	Poids frais des cals (g) +95,00%	N
1	1F	0,168620	0,103977	-0,120067	0,457307	5
2	2F	0,153025	0,033358	0,074146	0,231904	8
3	3F	0,000000				1
4	4F	0,000000				1
5	5F	0,000000				1
6	6F	0,240108	0,059904	0,109587	0,370628	13
7	7F	0,000000				1
8	8F	0,000000				1
9	9F	0,000000				1
10	10F	0,000000				1

**Annexe 36** : Moyenne des cals frais en fonction d'équilibre hormonal des entre-nœuds/Gamborg 6<sup>ème</sup> mois

Equilibre hormonal; Weighted Means (Spreadsheet20)						
Current effect: F(9, 66)=,52103, p=,85422						
Effective hypothesis decomposition						
Cell No.	Equilibre hormonal	Poids frais des cals (g) Mean	Poids frais des cals (g) Std.Err.	Poids frais des cals (g) -95,00%	Poids frais des cals (g) +95,00%	N
1	1E	0,059890	0,011316	0,036205	0,083575	20
2	2E	0,043189	0,012046	0,015411	0,070967	9
3	3E	0,078000	0,001300	0,061482	0,094518	2
4	4E	0,065000				1
5	5E	0,000000				1
6	6E	0,127740	0,011416	0,096045	0,159435	5
7	7E	0,107771	0,043608	0,015326	0,200215	17
8	8E	0,089275	0,008034	0,063709	0,114841	4
9	9E	0,077873	0,034383	0,001262	0,154483	11
10	10E	0,079883	0,024043	0,018078	0,141689	6

**Annexe 37** : Moyenne des cals frais en fonction d'équilibre hormonal des racines/Gamborg 6<sup>ème</sup> mois

Equilibre hormonal; Weighted Means (Spreadsheet25)						
Current effect: F(9, 30)=1,4574, p=,20897						
Effective hypothesis decomposition						
Cell No.	Equilibre hormonal	Poids frais des cals (g) Mean	Poids frais des cals (g) Std.Err.	Poids frais des cals (g) -95,00%	Poids frais des cals (g) +95,00%	N
1	1R	0,038700				1
2	2R	0,094389	0,009580	0,072297	0,116481	9
3	3R	0,000000				1
4	4R	0,000000				1
5	5R	0,000000				1
6	6R	0,259278	0,077225	0,081196	0,437360	9
7	7R	0,127375	0,026520	0,064664	0,190086	8
8	8R	0,155350	0,033270	0,049470	0,261230	4
9	9R	0,130733	0,044815	-0,062091	0,323558	3
10	10R	0,170800	0,024179	0,066768	0,274832	3

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. Feliachi, K., " Commission Nationale AnGR", Rapport National sur les Ressources Génétiques Animales: Algérie (Octobre 2003), 3-4.
2. Kechebar, M.S.A., Karoune, S., Belhamra, M. et Rahmoune, C., " Etude structurale des peuplements d'Arganier (*Argania spinosa*) en Algérie" : Journal Algérien des Régions Arides spécial, n° 12 (2013), 46-47.
3. 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), 15p.
4. Mokhtari, M. et Zakri, B., "Limites phytotechniques et physiologiques au bouturage, marcottage et greffage de l'Arganier (*Argania spinosa* L Skeels)". Colloque International sur la diversité végétale. Faculté des Sciences, Université Ibn Zohr Agadir, (23-25 Avril 1998), 124-131.
5. Harrouni, M.C., Elkherrak, H., Mokhtari, M., El Yazidi A. et Abdellah. K., "Multiplication de l'Arganier (*Argania spinosa* L. Skeels) par bouturage". *Proceedings of The International Conference on Biodiversity and Natural Ressources Preservation. Ifran University, Morocco*, (May 13-15, 1999), 274-277.
6. Mokhtari, M. et Kerbernes. I., " Bouturage de l'arganier ". Rapport du Projet Projet MEDA, (2008).
7. Nouaim, R., " L'arganier au Maroc : entre mythes et réalités ", une civilisation née d'un arbre, Harmattan France, (2005), 217p.
8. 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.

9. 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), 373-388.
  
10. Marie Breton, J., " Espaces et aires protégés : gestion intégrée et gouvernance participative". *Etudes Carébéennes n°12. Science humaines et Sociales géographie*. Editions publibook, (2010), 197p.
  
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), 77688.
  
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. Milagh, M., " L'arbre vert du désert menacé ". *El Watan*. (Jeudi 23 août 2007) p21.
  
16. Kechairi, R ., "Contribution à l'étude écologique de l'Arganier *Argania spinosa* (L.) Skeels, dans la région de Tindouf (Algérie) ". Mémoire de magister, université des sciences et de la technologie «houari boumediene» 2009, 76p.
  
17. Ayad, A., " Présentation générale de l'arganier ". *In : Formation Forestière Continue ; Thème « l'Arganier »*. Station de Recherche Forestière Rabat.13-17 (Mars1989), 9-18.

18. 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).
19. 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.
20. 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. Groupe d'Etude de l'Arbre, Editions. Paris, (1991), 373-388.
21. Nouaim, R. et Chaussod R., " Des vergers d'arganier : une agriculture innovante pour une production durable de l'huile d'argane ". Actes du Premier Congrès International de l'Arganier, Agadir, V.70 (15 - 17 Décembre 2011), 1-10.
22. 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.
23. Boudy, P., " Les forêts du Maroc ". Exposition Coloniale Internationale, Paris, (1931), 14p.
24. Khay, M., " Traitements sylvicoles et aménagement ". Formation Forestière Continue.thème « l'Arganier ». Station de Recherche Forestière. Rabat, (13-17 Mars, 1989). 59-65.
25. Guillaume, D. et Charrouf, Z., " Saponines et métabolites secondaires de l'arganier (*Argania spinosa*) ". Cahiers Agricultures vol. 14, n° 6, (novembre-décembre 2005).

26. 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.
27. 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.
28. Challot, J.P., " Observation sur la régénération naturelle des forêts d'arganier ". Maroc, V.2, (1948), 3-15.
29. 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.
30. Bani-Aameur F. " *Argania spinosa* (L.) Skeels flowering phenology ". Genetic Resources and Crop Evolution, V.49, (2002), 11-19.
31. 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.
32. Bani-Aameur F, " Phenological phases of *Argania spinosa* (L.) Skeels flower ". Forest Genetics V.7, (2000 a), 333-338.
33. 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.



34. 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.
35. Bani-Aameur, F., " *Argania spinosa* (L.) Skeels flowering phenology". Genetic Resources and Crop Evolution. In press. (2000 b).
36. Bani-Aameur, F., Floraison et production de fruits de l'arganier : " Des modèles biologiques à l'amélioration des plantes ", IRD Editions, (2001), 893p.
37. Sebaa, H.S. et Kaid Harche, M., "Anatomical structure and ultrastructure of the endocarp cell walls of *Argania spinosa* (L.) Skeels (Sapotaceae) " *Micron* (2014) 100-106.
38. Bellefontaine, R., Bouzoubâa, Z. et Mathez, J., " Le fruit de l'arganier est-il une drupe ou une baie" ? *In* : Actes du Premier Congrès International de l'Arganier, Agadir, 15 - 17 Décembre, V.389, (2011), 1-10.
39. Faouzi, H. et Martin, J., " Soutenabilité de l'arganeraie marocaine, entre valorisation de l'huile d'argan et non régénération de l'arganier". n°20, (2014), 14.
40. 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).
41. Lakhdari, A. et Khechairi, R., " La faune de l'arganier de Tindouf (Algérie) " Actes du Séminaire International sur la Biodiversité Faunistique en Zones Arides et Semi-arides, (2011), 207-211.

42. 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.
43. Msanda, F., El Aboudi A. et Peltier J.P. " Biodiversité et biogéographie de l'arganeraie marocaine". Cahiers Agriculture, V.14, (2005), 357-364.
44. 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.
45. 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.
46. 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.
47. Beauchesne, G., L'historique et les fondements de la culture *in vitro* " La culture in vitro et ses applications horticoles ", 3<sup>ème</sup> Edition, Tec et Doc, Paris, (1989), 225p.
48. Neil, A.C. et Jane, B.R., " Biologie", Edition, Boeck Université, (2006).1606p.
49. Raven. P.H., Evert, R.F. et Eichhorn S.E., " Biologie végétale", De Boeck Diffusion, (2003), 968p.

50. Margara, J., " Bases de la multiplication végétative, Les méristèmes et l'organogenèse" INRA, Paris, (1989), 262 p.
51. Hopkins, W.G., " Physiologie végétale", 1<sup>ère</sup> Edition, édition De Boeck Université, Paris, (2003), 515 p.
52. Rosell, C.H. et Villalobos, V.M., " Fondements théoriques et pratiques de la culture de tissus végétaux ". FAO. Rome, (1992), 164p.
53. Zryd, J.P., "Cultures de cellules, tissus et organes végétaux", fondements théoriques et utilisations pratiques. Presses polytechniques Romandes. (1988), 308p.
54. Tourte, Y., "Génie génétique et biotechnologie", concepts, méthodes et application agronomique, 2<sup>ème</sup> Edition Dunod, Paris, (2002), 241p.
55. Nozeran, R. et Bancilhon, L., "Les cultures *in vitro* en tant que technique pour l'approche de problèmes posés par l'amélioration des plantes". *Ann. Amélior. Plant* V.22 n°2, (1972), 167-185.
56. Demarly, Y., "L'épigénétique ". *Bull. Soc. Bot. Fr.*132. *Actual. Bot* V.314, (1985), 79- 94.
57. Prat, R., "Expérimentation en biologie et physiologie végétales", Hermann, Quæ Editions. Paris, (2007), 302p.
58. 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.
59. Kar, D.K., Sen, S., " Effect of hormone on chromosoms behavior in callus cultures of *Asparagus racemosus* ", *Biol. Plant.* V.27, (1985), 6-9.

60. 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.
61. 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.
62. 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. VHth IAPTC Congress, Kluwer Acad. Pubi., The Netherlands. (1990).
63. Preil, W., " Application of bioreactors in plant propagation". In : Debergh PC, Zimmerman RH, eds. *Micropropagation*. Kluwer Acad. Pubi., The Netherlands. (1991), 425-445.
64. 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.
65. 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.
66. 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<sup>ème</sup> Edition, Tec et Doc, Paris, (1989), 225p.

67. Boccon-Gibod, J., la culture *in vitro* et ses applications horticoles, La technique de la culture *in vitro* 3<sup>ème</sup> Edition, Tec et Doc, Paris, (1989), 225p.
68. Bhojwani, S.S. et Razdan, M.K., "Plant tissue culture" : Theory and Practice. Amsterdam : Elsevier, (1983), 767p.
69. Giguère, R., "Botanique et horticulture dans les jardins de Québec ", Editions MultiMondes Québec, V.2, (2003), 174p.
70. Smith, R.H., Bhaskaran, S. et Miller, F.R., "Screening for drought tolerance in Sorghum activity": localization using cell culture. In Vitro Cell .Dev. Biol V.21 (1985), 541-545.
71. Collet, G .F. et Lê, C. L., " Micro propagation de porte-greffes de pommier et de poirier ". Enracinement in vitro de *Pyrus malus* L. (M25,26,27,MM106 ,M9 type jork ) et *Cydonia oblonga* Mill.(A) .Revue suisse Vitic .Arboric ,Hortic .V.20, n°2, (1988), 131-138.
72. Lê, C. L., Thomas, D. et Nowbuth, L., "Conservation des pommes de terre in vitro et caractérisation des variétés cultivées en suisse ". Suisse Agric V.34, n°3, (2002), 133-136.
73. Sibi, M., " Hérité de variants épi géniques obtenus par culture des tissus in vitro chez les végétaux supérieurs ". Thèse Doct ès Sci ; Univ Paris RSud, Orsay, (1981), 280 p.
74. Casselle, A.C., " In vitro induction of free-virus potatoes by chemotherapy " In biotechnology and forestry, (1987). 40-50.
75. Asdrubal M., "La photosynthèse", éducaagri, 3<sup>ème</sup> Edition, (2011), 132p.
76. Murashige. T. et Skoog. F., "A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures", physiol. Plant V.15, (1962), 473-497.

77. 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.
78. Ng S.Y., Culture des tissus *in* : "Le manioc en Afrique tropicale"; un manuel de référence Par International Institute of Tropical Agriculture. Ibadan, Nigéria, (1990), 190p.
79. Anonyme., "Cahier technique. Micropropagation pour l'entreprise d'EHEV", (Entreprise Horticole et Espaces Verts).
80. Monter, A.V., "Méthodes aseptique". Fondements théoriques et pratiques de la culture de tissus végétaux. FAO. Rome, (1992), 164p.
81. Nouaim, R., "Biologie de l'arganier ": Acte des journées d'étude sur l'arganier ESSAOUIRA 29-30 septembre (1995).
82. Coujard, R., Poirier J., et Racadot J., "Précis d'histologie humaine", Editions, Masson, Paris, (1980), 756 p.
83. Gabe, M., " Techniques histologiques ", Editions, Masson, Paris, (1968).1113p.
84. Coujard, R J., Techniques histologiques. "Précis d'histologie humaine", Editions, Masson, Paris, (1980), 756 p.
85. Monnier M. "Embryogenèse zygotique et somatique". Chapitre X : culture de cellules, tissus et organes végétaux. Fondements théoriques et pratiques. Zryd J.P Editions. Presses polytechniques Romandes, Lausanne. Suisse, (1995), 119-126.
86. Pâques M. et Bercetche J. " L'embryogenèse somatique chez les conifères" : limites et perspectives. Ilème partie. *In* : multiplication

végétative : Micropropagation et Emryogenèse somatique. In : Biotechnologies végétale. Demarly Y. & E. Picard Editions. UNOSAT, CNED/AUPELF-UREF, BV 93, Fascicule U: (1995), 117-181.

87. Bouterin, D. et Bron, G., "Multiplication des plantes horticoles" 3<sup>ème</sup> Editions Tec & Doc Lavoisier Paris, (2013), 276p.
88. Boussemame, 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.
89. 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.
90. Evenari, M. " Les problèmes physiologiques de la germination". Bull. Soc. France. Physiologie végétale, (1957), 3 -124.
91. Binet, P. et Brunnel, J. P., "Physiologie végétale", Tome 1. Editions Doin, Paris. (1968), 469p.
92. Come, D., " Les obstacles de la germination des graines ". Editions. Masson et Cie, Paris, (1970) 162 p.
93. Harrington, J.F., "The effect of temperature on the germination of several kinds of vegetable seeds ": 16 th. Inter. Hort. Cong. Bruxelles 2, (1962), 435 -441.
94. Istambouli, A., "Etude expérimentale sur la nature des périodes de repos des semences et des bourgeons de l'Olivier (*Olea europea* L.) ". Mise au point d'une technique de production rapide de jeunes plants. Thèse d'état, Université d'Aix – Marseille III. (1976), 135p.

95. Douay, F., " Etude expérimentale de la germination et plus particulièrement de l'activation des semences de l'olivier ". Université Aix – Marseille III – Faculté de Saint Jérôme. Thèse de doctorat ès – Sciences. (1980).
96. Aissa, D., Etude expérimentale de la germination du Chêne vert (*Quercus ilex* L) Thèse de Doctorat de 3ème Cycle, Université d'Aix–Marseille III, (1981).1 - 61.
97. 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.
98. Khelifi, L., Morsli. A. et Khelifi-Salaoui, M., "Premiers résultats sur l'obtention *in vitro* de germination d'arganier (*Argania spinosa* L. Skeels) ". Annales de ENSA El-harrach, V.17 ,n° 1 et 2, (1996), 120-126.
99. Lafon, J-P., Tharaud-Prayer, C. et Lévy, G., "Biologie des plantes cultivées": physiologie du développement génétique et amélioration Tome2, 2<sup>ème</sup> Edition, Lavoisier. Technique & Documentation Paris, (1998), 150p.
100. Smirnov, V.A. and Smirnova, V.V., "Genetic determination of callus formation in tomatoes". *Plant Genet. Breed.* V.19, n°2, (1985), 36-40.
101. Morsli, A., "Essai de vitropropagation de l'arganier : *Argania spinosa* (L.) Skeels à partir de vitrosemis". Thèse de magister, protection de la nature, INA, (1999), 89 p.
102. Haddar, T., "Etude de quelques facteurs d'induction de la callogenèse chez l'arganier *Argania spinosa* Skeels". Mémoire d'ingénieur en foresterie et protection de la nature l'INA El Harrach-Alger, (2008), 57p.



103. Noronha, C., Romano. and Martin-Laução, M.A., "Influence of growth regulators on shoot proliferation in *Quercus suber* L. " *Ann. Bot.*, V.70, (1992), 513-536.
104. Ndoumou, F.S.D.O. et Tchinda, N.D., "Comparaison des premières étapes de l'embryogenèse somatique chez *Baillonella toxisperma* et *Vitellaria paradoxa* (Sapotacées), V.12, n° 2, (2008).
105. Oumar, F. and Omokolo, N.D., "Données préliminaires sur la morphogenèse *in vitro* chez *Irvingia gabonensis* et *Irvingia wombulu*". In : *Actes du VIII<sup>e</sup> séminaire international sur les biosciences et amélioration de la production végétale, 17- 19 décembre 2001, Yaoundé, Cameroun*. Yaoundé : Presse universitaire UYI, (2001), 173-177.
106. Steward, N., Mandeau, A. et Castex-Rizzi, N., "Preparation issue d'une culture *in vitro* de cellules dédifférenciées non élicitées d'arganier, leur utilisation pour le traitement du vieillissement cutané, de l'inflammation et de la cicatrisation, et leur obtention". WO 2011121051 A2. (2010).
107. Duran-Vila, N., Ortega, V. et Navarro, L., "Morphogenesis and tissue culture of three Citrus species". *Plant Cell, Tissue Organ Cult.*, V.16, n°2, (1989),123-133.
108. Rochdi, A., " Morphogenèse et régénération en culture *in vitro* du pin des Canaries (*Pinus canariensis*) ". Thèse Doct. Univ. Mohammed V, Fac. Sci. Rabat, (1995), 175 p.
109. Achairi, Nouaim, R., et Serghini, Ma., "Contribution à la culture *in vitro* de l'arganier": des modèles biologiques à l'amélioration des plantes IRD Editions, (2001), 689. 200.

110. El Yacoubi, H., Zidane, L., Douira, A. et Rochdi, A., "Effet de deux phytohormones et de l'hydrolysate de caséine sur la callogenèse de trois porte-greffes d'agrumes" Bull. Soc. Pharm. Bordeaux, V.149, (2010), 7-16.
111. Vogt, G.F., Louesse, S., Hohmann, V. et Laurent, C., "Culture *in vitro* de tissus et de cellules d'Acacia senegal (L.) Willd., en vue de la production de métabolites secondaires". In: Physiologie des arbres et arbustes en zones arides et semi arides. Groupe d'Etude de l'Arbre. Paris-France, (1991), 289-302.
112. Halfaoui, Y., Valorisation des deux espèces d'Atriplex (*Atriplex halimus* L. et *Atriplex canescens* Purch Nutt) par la culture des tissus *in vitro* ; Mémoire de magister en écophysiologie végétale, Oran (2010), 102p.
113. Dunstan, D. I., Tautorius, T.F. et Thorpe, T.A., "Somatic embryogenesis in woody plants". In: *In vitro* Embryogenesis in Plants, Thorpe T.A éd., Kluwer Academic Pub, Dordrecht, Boston, London, V.1, n° 2 : (1995), 471 -538.
114. Boxus, P., Bercetche, J., Bollon, H., Ducos, J. P., Jemmali, A., Pâques, M., Petiard, V., Pieron, S., Multiplication végétative :micropropagation et embryogenèse somatique in Biotechnologies végétales. BV 93, ED CNED. AUPELF-UREF. (1995) 191p.
115. Fki, L., Bahloul, M., Masmoudi, R. et Drira, N., " Etude des capacités germinatives des embryons somatiques chez le palmier dattier" Dessiccation, corrélations morphogénétiques et investigations biochimiques *in*: Des modèles biologiques à l'amélioration des plantes. Collection colloques et séminaires. IRD Editions. Paris, (2001), 256-269.

116. Margara, J. "Bases de la multiplication végétative : les méristèmes et l'organogénèse". Edition INRA. Paris, (1982), 262p.
117. 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.
118. Boulay, M., "Multiplication et clonage rapide du Sequoia sempervirens par la culture *in vitro*". Etu.et Rech. A.F.O.C.E.L. V.6, n°12 , (1979), 49-55.
119. Tsogas, M., Bouriquet, R., "Propagation de l'épicea par culture *in vitro* d'embryons et de plantules". Etu. et Rech. A.F.O.C.E.L. V.9, n°22, (1982), 346-367.
120. Dumanois, C., F.Braut- Boucher , L. Cosson and M. Multiplication végétative *in vitro* du chanvre (*Canabis sativa* L). Application à la conservation des clones sélectionnés. Revue d'agronomie. Paris, V.5, (1986), 487-495.
121. Altamura, M.M., "Root histogenesis in herbaceous and woody explants cultured *in vitro*". A critical review. Agronomie. V.16, (1996), 589-602.
122. Druart, P.H., "Optimisation of culture media for *in vitro* rooting of *Malus domestica* "Borck. Cv. Compact spartan *Biologia plantarum*. V.38, n°10, (1996), 30.
123. Kenny, L ., "Application de la culture *in vitro* à la multiplication des arbres et arbustes de zones arides", Colloque international sur les ressources végétales « l'arganier et les plantes des zones arides et semi-arides», Agadir 23, 24 et 25 avril, (1998).

124. Lewandowski, V.T., "Rooting and acclimatization of micropropagated *Vitis labrusca* « Delaware »", HortScience V.26, (1991) 586-589.
125. 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.
126. Ostrolucka, M.G. et Bezo, M., "Utilisation of meristem cultures in propagation of oak (*Quercus* sp.) ", Genetica Polonica V.35 (1994) 161-169.
127. 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.
128. Silveira, C.E. et Nougarede, A., "Microbouturage de *Fraxinus excelsior* L. " : la phase de multiplication plaque tournante pour l'engagement dans diverses voies morphogénétiques, C. R. Acad. Sci., Sér. D 313 (1995) 199-207.
129. 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.
130. 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.
131. Ziania, S., "Multiplication de l'arganier (*Argania spinosa* L.) par vitrosemis, microbouturage, microgreffage, organogenèse et ou embryogenèse somatique". Mémoire de magister en Agronomie, Université Hassiba Benbouali Chlef, (2014).

132. Daikh, H. et Demarly, Y., "Résultats préliminaires sur l'obtention d'embryons et la réalisation de semences artificielles de palmier dattier (*Phoenix dactylifera L*) ". Fruit V.42, n°10, (1987), 593 - 596.
  
133. Rouget, Y., " Embryogenèse somatique de la laitue *Lactuca sativum L*". Thèse doctorat d'Université d'Orsay, (1989), 147p.