



République Algérienne Démocratique et Populaire
Ministère de l'Enseignement Supérieur
et de la Recherche Scientifique
Université Blida-1-



Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie
Département de Biologie des Populations des Organismes

Mémoire de fin d'études en vue de l'obtention
du Diplôme de Master en Biologie

Option : Biodiversité et Physiologie Végétale

Thème :

CONTRIBUTION A LA PROPAGATION PAR CULTURE *IN VITRO* DU SAPIN DE NUMIDIE (*Abies numidica* L.) PAR EMBRYOGENESE SOMATIQUE ET ORGANOGENESE A PARTIR DE SEMIS

Présenté par :

- ✓ BOUSSADA Brahim Lokmane
- ✓ AISSA Daoud

Date de soutenance

27/09/2020

Devant le jury composé de :

| | | |
|------------------------------|-----------------|---------------|
| M ^{me} BENASSEL N. | MAA/BPO UB-1- | Présidente |
| M ^{me} TOUAIBIA M. | MCA/BPO UB-1- | Examinatrice |
| M ^{me} LEBTAHI F. | MCB/INRF BAINEM | Promotrice |
| M ^{me} AMEDJKOUH H. | MAA/BPO UB-1- | CO-Promotrice |

Année universitaire : 2019-2020

Remerciements

La présente étude s'inscrit dans le cadre d'un projet de recherche de l'Institut National de Recherche Forestière, sur la conservation et préservation des espèces forestières rares et menacées de disparition.

Nous remercions avant tout Dieu, qui par sa grâce, a permis l'achèvement de ce mémoire.

*L'encadrement scientifique de ce travail a été assuré par Mme **LEBTAHI F**, Docteur et chercheur au niveau de laboratoire de culture *in vitro* à l'INRF de Bainem. Nous tenons vivement à lui exprimer aujourd'hui notre profonde reconnaissance et gratitude d'avoir bien voulu diriger notre travail et d'en être le rapporteur. Nous la remercions pour la contribution qu'elle a apportée dans la réalisation de ce travail, pour les conseils qu'elle n'a jamais cessé de nous donner, pour les documents qu'elle a bien voulu nous procurer, pour son soutien et ses encouragements.*

*Nous tenons à exprimer nos chaleureux remerciements à Mme **AMEDJKOUH H**, Maître de conférence à l'université de Blida -1-, d'avoir accepté de nous encadrer, en nous faisant bénéficier de ses connaissances, de son aide et de ses conseils.*

*On adresse aussi nos vifs remerciements à M^{me} **BENASSEL N**, Professeur à l'université de Blida-1-, qui nous fait l'honneur de*

présider ce jury et d'examiner ce travail. Qu'elle veuille bien trouver ici, l'expression de notre profonde gratitude.

Nos remerciements vont également à M^{me} TOUAIBIA M, Maître de conférence à l'université de Blida-1-, d'avoir accepté d'être notre examinatrice de ce mémoire et de juger ce travail. Nous lui adressons notre chaleureuse et respectueuse reconnaissance.

Nous tenons également à remercier Mme CHETTAH et Mme HASSINI qui nous ont aidés à accomplir ce travail au niveau du laboratoire de culture in vitro à l'INRF.

Nous ne saurions remercier Monsieur HIMRANE, pour sa contribution dans l'analyse statistique.

Nos remerciements vont également à Mme Abdelatif K. chercheur à l'INRF pour nous avoir procuré la documentation, sans oublier la direction générale des forêts.

Nous saisissons cette opportunité pour associer à ces remerciements le conservateur des forêts de la wilaya de Sétif, Mr. GUESSAS Djamel. Chef de la circonscription des forêts de Ain Lakbira (Les Babors), Mr. BOUGHELLOUM chef de District (Souk Djemâa) (Les Babors), ainsi que Bachir ; Mme BENANI D. Conservatrice des forêts de Blida et Mr Dahane, Directeur du Parc National de Blida, qui de près ou de loin ont contribué à l'élaboration de ce travail.

Dédicace

*A nos très chers parents pour leur soutien et leurs
encouragements*

A tous nos chers frères et sœurs...

A tous nos professeurs

A tous nos amis

À toute la famille BOUSSADA et la famille AISSA

*A tous ceux qui sont proches de nos cœurs
et enfin à tous les étudiants de notre promotion sans
exception.*

DAOUD ET BRAHIM LOKMANE

GLOSSAIRE

Antiscorbutique : Est une substance, un médicament ou une plante, qui lutte contre le scorbut provoqué par un manque d'apport en vitamine C. Les propriétés antiscorbutiques permettent de contrer les effets de cette maladie ou d'en inhiber l'apparition par prévention.

Calcaire-dolomitique : Substrat composé par le calcaire et le dolomite.

Cataplasme : Un cataplasme est une préparation de plante assez pâteuse pour être appliquée sur la peau dans un but thérapeutique.

Dolomite : Un minéral constitué d'un carbonate de calcium et de magnésium de formule chimique $\text{CaMg}(\text{CO}_3)_2$.

Embellissement : Ornementation et décoration.

Fût : Tronc.

Germoplasme : Est l'expression utilisée pour décrire les ressources génétiques, ou plus précisément l'ADN d'un organisme et les collections de ce matériel génétique.

Karstifié : En géologie, relatif au processus de formation d'un karst, relief calcaire au sol très perméable, avec circulation souterraine des eaux.

Récalcitrance : Qui doivent garder une teneur en eau relativement élevée (le plus souvent de 20 à 50 pour cent du poids frais) et ne se conservent pas pendant de longues périodes.

Sillonné : Creuse par des lignes tracées.

Sylvicole : Relatif à la gestion de la forêt.

LISTE DES ABREVIATIONS

2,4-D : Acide 2,4-dichlorophénoxyacétique.

BAP : 6-Benzyl-aminopurine.

AIB : Acide-3-indole butyrique.

ANA : Acide naphtalène acétique.

AIA : Acide indole -3-acétique.

pH : Potentiel Hydrogène.

EDTA : Ethylène Diamine Tétra-Acétate.

NaOH : Hydroxyde de sodium.

MS : Murashige et Skoog (1962).

LISTE DES FIGURES

- Figure 1 :** Carte de répartition du sapin de Numidie en Algérie (Google Earth). 4
- Figure 2 :** Sapin de Numidie observée au Babors (original). 5
- Figure 3 :** Les voies de régénération *in vitro*.
<https://slideplayer.fr/slide/514777/2/images/micropropagation.jpg> 11
- Figure 4 :** Schéma représentant l'équilibre auxines/cytokinines déterminant l'organogénèse en culture *in vitro*. 16
<https://tp-svt.pagesperso-orange.fr/phytohorm.htm>
- Figure 5 :** Matériel végétale **A-** Embryon zygotique immature X1. **B-** Plantule issue de la germination de la graine. **C-** Etapes de désarticulation du cône de sapin. **D-** Tamis contenant les graines. 20
- Figure 6 :** Graines destinées à la germination. 21
- Figure 7 :** **A-** Explant issu de graine germée cultivé sur milieu MS pour l'organogénèse. **B-** Différents organes issus de la plantule âgée de 3 à 4 semaines. 27
- Figure 8 :** Graines de sapin. **A-** Graine de sapin munie d'une aile bien développée. **B-** Face ventrale d'écailles du cône de sapin portant deux graines côte à côte. **C-** Graine fertile. **D-** Graines vaine. 31
- Figure 9 :** Les catégories des graines vides. 33
- Figure 10 :** Larves (parasites des graines de sapin). 34
- Figure 11 :** Coupe longitudinale au niveau de la graine montrant les différentes parties qui constituent la semence X1. 35
- Figure 12 :** Effet de la durée du prétraitement au froid humide sur la germination des graines de sapin. 36
- Figure 13 :** **A-** Germination hétérogène des graines de sapin. **B-** Germination homogène après traitement au froid humide à 4°C. 37

| | |
|---|----|
| Figure 14 : A-Germination des graines en pot. B- Racines attaquée par la fonte de semis. | 39 |
| Figure 15 : A-Différentes étapes de développement de la graine. B- La germination des graines de sapin et de type épigée. | 40 |
| Figure 16 : A- Eclatement du bourgeon apical.B- Développement du bourgeon apical en une touffe de feuilles. C-Etalement de feuilles de couleur jaune verte. D- Développement du bourgeon axillaire à l'aisselle de la feuille cotylédonnaire. | 43 |
| Figure 17 : A- Développement de cal sur les deux extrémités du fragment de la tige sur milieu MS additionné de 2 mg/l de 2.4-D X1. B- Formation de cal au niveau de la partie sectionnée du cotylédon sur milieu MS additionné de 2 mg/l de 2.4-D X1. | 45 |
| Figure 18 : A- Embryons cultivés sur milieu MS sans hormone. B- Embryons cultivés sur milieu MS + 2.4-D. C- Envahissement progressif de la tige et du cotylédon par le cal. D- Croissance de la tige avec épaissement et éclatement de l'hypocotyle et enroulement des cotylédons. E- Gonflement de la tige suivi de son éclatement et apparition d'un amas de cellules indifférencié (cal). | 47 |
| Figure 19 : A- Cal vitreux X1. B-Embryons cultivés sur milieu MS + 3mg/lAIB : Développement de cals volumineux | 47 |
| Figure 20 : Action des différentes concentrations du 2.4-D seul (M5, M6, M7) et d'AIB seule (M8, M9, M10) sur la réactivité des embryons zygotiques immatures. | 48 |
| Figure 21 : Effet des différentes concentrations du 2.4-D seul (M5, M6, M7) et d'AIB seul (M8, M9, M10) sur la prolifération cellulaire. | 49 |
| Figure 22 : A-Cellules globulaires rondes blanc nacré X5. B- Cellules rondes translucides cal vitreux non embryogène X8. C- Cal nodulaire X5. D- Développement d'une racine, cal organogène X1.7. | 50 |

LISTE DES TABLEAUX

| | |
|---|----------|
| Tableau I : Confection du milieu de culture (MS). | 24 |
| Tableau II : Concentration des régulateurs de croissance pour l'induction du bourgeonnement axillaires et adventifs. | 25 |
| Tableau III : Concentration des régulateurs de croissance pour l'induction de cals et de l'embryogenèse somatique. | 25 |
| Tableau IV : Moyennes des caractères mesurés chez les arbres 1, 2, 3. | 29 |
| Tableau V : Longueur moyenne et intervalle de variation des cônes de chaque pied. | 29 |
| Tableau VI : Diamètre moyen et intervalle de variation des cônes de chaque pied. | 30 |
| Tableau VII : Poids moyens et intervalle de variation des cônes de chaque pied. | 30 |
| Tableau VIII : Action de l'hypochlorite de sodium à 12° sur la stérilisation des plantules de 3 à 4 semaines. | 40 |
| Tableau IX : Effet d' H_2O_2 à 110v et l'Hypochlorite de sodium à 12° sur la stérilisation des graines immature. | 41 |
| Tableau X : Influence de la concentration de la BAP sur le bourgeonnement des explants. | 42 |
| Tableau XI : Action de la BAP seule sur le développement de bourgeons adventif chez les segments de tiges et de racines. | 44 |
| Tableau XII : Composition du milieu de culture MS en (mg/l). | Annexe 1 |
| Tableau XIII : Balance hormonale utilisée pour l'organogénèse et l'embryogenèse somatique. | Annexe 2 |
| Tableau XIV : Caractères morphologiques comparatifs entre 3 pieds de sapin de Numidie. | Annexe 3 |

Résumé

L'objectif recherché par cette étude, est de déterminer les possibilités de multiplication du sapin de Numidie (*Abies numidica* L.), par l'utilisation des techniques de culture *in vitro*.

Les essais de germination ont montré que la graine de sapin est affectée par le phénomène de dormance d'origine embryonnaire. Le prétraitement au froid humide à 4°C pendant 5 à 6 semaines se révèle particulièrement bénéfique pour lever la dormance et stimuler la germination des semences.

Par ailleurs, les graines germent dans une gamme de température comprise entre 17 et 23°C. La température la plus favorable est celle de 23°C.

Concernant la micropropagation, les résultats ont montré que la BAP favorise le développement de bourgeons axillaires à l'aisselle des feuilles cotylédonaire et stimule le débourrement du bourgeon apical.

Les essais consacrés à l'embryogenèse somatique, ont montré que l'emploi d'une auxine seule (AIB ou 2.4-D) se révèle favorable pour l'induction de la callogenèse. La croissance des cals dépend de la concentration et de la nature de l'auxine utilisée.

Mots clés : *Abies numidica*, germination, dormance, micropropagation, embryogenèse somatique, callogenèse.

Abstract

The objective of this study is to determine the possibilities of multiplication of the Numidian fir (*Abies numidica* L.), using *in vitro* culture techniques.

Germination tests have shown that the fir seed is affected by the phenomenon of embryonic dormancy. Pre-treatment with moist cold at 4°C for 5 to 6 weeks is particularly beneficial in lifting the dormancy and stimulating seed germination.

Moreover, seeds germinate in a temperature range between 17 and 23°C. The most favourable temperature is 23°C.

Concerning micropropagation, results have shown that BAP promotes the development of axillary buds in the axils of cotyledonary leaves and stimulates the bud break of the apical bud.

Tests devoted to somatic embryogenesis have shown that the use of auxin alone (AIB or 2,4-D) is favourable for the induction of callogenesis. Callus growth depends on the concentration and nature of the auxin used.

Key words: *Abies numidica*, germination, dormancy, micropropagation, somatic embryogenesis, callogenesis.

ملخص

تهدف هذه الدراسة إلى تحديد إمكانية تكاثر التتوب النوميدي (*Abies numidica* L.) باستخدام تقنيات الزراعة النسيجية. بينت التجارب بأن بذور التتوب النوميدي مصابة بظاهرة السبات الجنيني غير أن معاملتها بالبرودة الرطبة عند درجة 4°C لمدة 5 إلى 6 أسابيع محسنة وفعالة لإزالة هذا السبات الجنيني. من ناحية أخرى، أثبتت النتائج بأن إنتاش البذور يتم في درجات حرارة تتراوح ما بين 17°C و 23°C . واتضح أن درجة الحرارة الأكثر ملاءمة للإنتاش هي 23°C .

فيما يخص التكاثر الدقيق بينت النتائج أن هرمون السيبتوكينين BAP يحث على تطوير وإنتاج البرعم الجانبي في إبط الأوراق الفلجية ويحفز البرعم القمي إلى الانفتاح.

كما أظهرت كذلك التجارب المخصصة للتكوين الجنيني أن استعمال هرمون الأوكسين وحده (2,4-D أو AIB) محفزا و محرضا لتكوين الكتلة الخلوية , فتمو هذه الكتلة يعتمد أساسا على تركيز و طبيعة هرمون الأوكسين المستعمل.

الكلمات المفتاحية: (التتوب النوميدي) *Abies numidica* ، الإنتاش ، السبات ، التكاثر الدقيق، التكوين الجنيني ، تكوّن الكتلة الخلوية.

TABLE DE MATIERES

| | |
|--|----|
| INTRODUCTION | 1 |
| DONNEES BIBLIOGRAPHIQUES | |
| I. GÉNÉRALITÉS SUR LE SAPIN DE NUMIDIE | 3 |
| I.1. Généralité | 3 |
| I.2. Position Systématique | 3 |
| I.3. Répartition géographique | 3 |
| I.4. Caractéristiques botaniques du sapin | 4 |
| I.5. Exigences de l'arbre | 6 |
| I.6. Importance économique | 7 |
| I.7. Régénération du sapin de Numidie | 7 |
| II. LA CULTURE <i>IN VITRO</i> | 9 |
| II.1. Historique | 9 |
| II.2. Généralités | 10 |
| II.3. Les voies de régénération <i>in vitro</i> | 10 |
| II.4. Les différentes techniques de micropropagation | 11 |
| II.4.1. Culture de méristème | 11 |
| II.4.2. Organogénèse | 12 |
| II.5. Les étapes de la micropropagation | 14 |
| II.6. Les milieux de culture | 14 |
| II.7. Avantages et inconvénients de la culture <i>in vitro</i> | 18 |

PARTIE EXPERIMENTALE

| | |
|--|-----------|
| I.MATERIEL ET METHODES | 19 |
| I.1. Matériel | 19 |
| I.1.1. Matériel végétal | 19 |
| I.1.2. Milieux de culture | 19 |
| I.2. Méthodes | 19 |
| I.2.1. Etude Biométrique des cônes de Sapin | 19 |
| I.2.2. Extraction des graines de sapin | 20 |
| I.2.3. Etude morphologique et anatomique de la graine de sapin | 21 |
| I.2.4. Germination des grains | 21 |
| I.2.5. Techniques de culture <i>in vitro</i> | 22 |
| I.2.5.1. Techniques de stérilisation | 22 |
| I.2.5.2. Préparation du milieu de culture | 24 |
| I.2.5.3. Mise en culture du matériel végétal | 26 |
| I.2.5.4. Critères observés | 27 |
| II. RESULTATS ET DISCUSSION | 29 |
| II.1. Etude morphologique, anatomique et physiologique de la semence du sapin de Numidie | 29 |
| II.1.1. Biométrie des cônes de sapin | 29 |
| II.1.1.1. Analyse des données | 29 |
| II.1.2. Morphologie de la graine | 30 |
| II.1.3. Différents types de graines | 31 |
| II.1.4. Anatomie de la graine | 34 |

| | |
|---|----|
| II.2. Etude de la germination de la graine de sapin | 35 |
| II.2.1. Effet du prétraitement au froid humide et de température sur la germination | 35 |
| II.2.2. Germination en pot | 38 |
| II.2.3. Phénomène morphologique de la germination des graines de sapin de Numidie | 39 |
| II.3. Multiplication par culture <i>in vitro</i> du sapin de Numidie | 40 |
| II.3.1. Stérilisation du matériel végétale | 40 |
| II.3.2. Micropropagation par organogénèse directe | 41 |
| II.3.2.1. Action de la BAP seule sur l'initiation des bourgeons axillaires | 41 |
| II.3.3. Stimulation directe des bourgeons adventifs sur des segments de tiges et de racines issus de semis âgés de 3 à 4 semaines | 44 |
| II.4. Organogénèse indirecte | 45 |
| II.5. Embryogénèse somatique | 45 |
| II.5.1. Effet de la nature de l'auxine seule AIB ou 2.4D sur l'initiation, la croissance des cals et le développement des embryons somatiques | 45 |
| II.5.2. Analyse des données | 48 |
| CONCLUSION | 51 |
| REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES | 53 |
| ANNEXES | |

INTRODUCTION

Abies numidica appelé communément le sapin de Numidie est une espèce endémique du mont Bobors, situé en Kabylie au nord-est d'Alger, où il couvre une superficie restreinte de 300 hectares seulement (KOLAI, 1992). Il appartient à un peuplement naturel à forte valeur patrimoniale (LEBTAHI, 2001). Cette Abiétacée qui figure dans la liste des plantes rares et vulnérable (LUCAS, 1980) a été peu étudiée et ce malgré son importance sylvicole et esthétique.

Elle peut contribuer d'une façon notable à l'équilibre écologique par des reboisements dans des zones de haute montagne, à la colonisation des sols les plus pauvres (KOLAI, 1992), à l'embellissement de l'environnement et à la production des huiles essentielles (TLILI-AIT KAKI *et al.*, 2013).

Malheureusement l'extension du sapin est réellement menacée dans son milieu naturel. Il connaît actuellement une dégradation et une régression considérable. Les sapinières sont constituées de vieux arbres en majeure partie, et la régénération naturelle est rare voire absente (LEBTAHI, 2001) ; (LEBTAHI, 2019).

A signaler que la fructification du sapin est irrégulière est très peu abondante, ceci se traduit par un manque de graines et une répercussion inévitable sur l'approvisionnement, de plus la plupart des graines sont vides (LEBTAHI, 2001).

Traditionnellement la multiplication de cette espèce noble est assurée par graines. Cependant un problème particulièrement important se pose pour les semences de sapin. Celles-ci, stockées sans précaution spéciale, perdent rapidement leur pouvoir germinatif. La fragilité de ces graines serait due à leur richesse en huiles et résines dont les produits d'oxydation seraient toxiques pour l'embryon (MULLER, 1975).

L'état phytosanitaire des sapinières reste préoccupant (dépérissement et défoliation) par un parasite de tordeuse décrite sous le nom de *Dichelia de numidicola* Chambon est signalé par FABRE et KHEMICI (1990) et qui provoque d'importants dégâts sur les sapins.

A cet effet, le recours aux techniques modernes de micropropagation *in vitro* devient indispensable. Ces techniques sont en fait, complémentaires aux méthodes de multiplication classiques et les nombreux avantages qu'elles présentent, dont une conservation fidèle des caractères du pied-mère, nous incite à recourir à ces outils biotechnologiques.

Ainsi, notre travail de recherche consiste à mettre au point une ou plusieurs techniques pour tenter de néoformer des plantules et d'assurer leur multiplication.

Cette étude comprend deux parties :

Dans la première nous nous sommes intéressés à la biométrie des cônes, à une étude morphologique et anatomique de la graine de sapin, suivie d'une étude physiologique de celle-ci et ayant pour objectif la détermination des conditions optimum de germination.

- La deuxième partie traite de l'étude de :

- a) l'organogénèse directe et indirecte à savoir : la caulogénèse directe et la callogénèse indirecte.
- b) l'embryogénèse somatique à savoir : l'initiation de la callogénèse, la multiplication des cals et l'induction des embryons somatiques.

DONNEES BIBLIOGRAPHIQUES

I. Généralités sur le sapin de Numidie

I.1. Généralités

Cette espèce a été découverte en 1861 sur les montagnes des Babors par le capitaine De GUILBERT. Les botanistes LETOURNEUX et COSSON considèrent ce sapin comme une variété des sapins espagnols, il a de ce fait été appelé *Abies pinsapo baborensis*. En 1861, De Lannoy décrit pour la première fois ce sapin d'où l'appellation *Abies numidica* De Lannoy, mais la publication valide était par ÉLIE ABEL CARRIERE en 1866 (BARBEY, 1934).

D'après BARBEY (1934), le sapin des Babors a été désigné sous différents noms par différents botanistes et dendrologues :

Abies numidica Lannoy , *Abies pinsapo baborensis* Cosson, *Abies numidica glauca* Hort, *Abies baborensis* Letourneux, *Abies numidiensis* Alphand, *Abies numidica auréa* Blaringhen, *Picea numidica* Gordon, *Pinus baborensis* Mac nab, *Pinus pinsapo* Parlatore, *Pinus baboriensis* Voss.

La seule appellation actuellement retenue est celle d'*Abies numidica* donnée par De LANNOY en 1886 in BARBEY, (1934). Ce dernier fit de ce sapin, une espèce distincte dont ses affinités botaniques le rapprochent davantage de l'*Abies cilicica* (BARBEY, 1934).

I.2. Position Systématique

Selon (APG III, 2009), le sapin de Numidie est une espèce monoïque classée comme suit :

Règne : Plantae
 Sous-règne : Tracheobionta
 Division : Coniferophyta
 Classe : Pinopsida
 Ordre : Pinales
 Famille : Pinaceae
 Genre : *Abies*
 Espèce : *numidica*

I.3. Répartition géographique

Le sapin de Numidie (*Abies numidica*.L) est une espèce endémique stricte du mont Babors, où il couvre une superficie de 250 ha selon BOUDY (1954), et 300 ha d'après KOLAI (1992).

Le sapin de Numidie a été implanté à titre expérimental en dehors de son aire naturelle dans certains arboreta et semble avoir donné des résultats intéressants (Fig.1) :

-à l'arboretum d'El Meurdja situé à l'Atlas Blidéen.

-à djebel Ouahch à Constantine.

Il se retrouve également en plantation à Hakou faroune (Chréa), dans l'Akfadou (Kabylie) (LEBTAHI, 2001) et à Serraiïdi (Annaba) (TLILI-AIT KAKI, 2013).

Ceci confirme l'adaptation du sapin à de nouvelles situations écologiques (LEBTAHI, 2001).

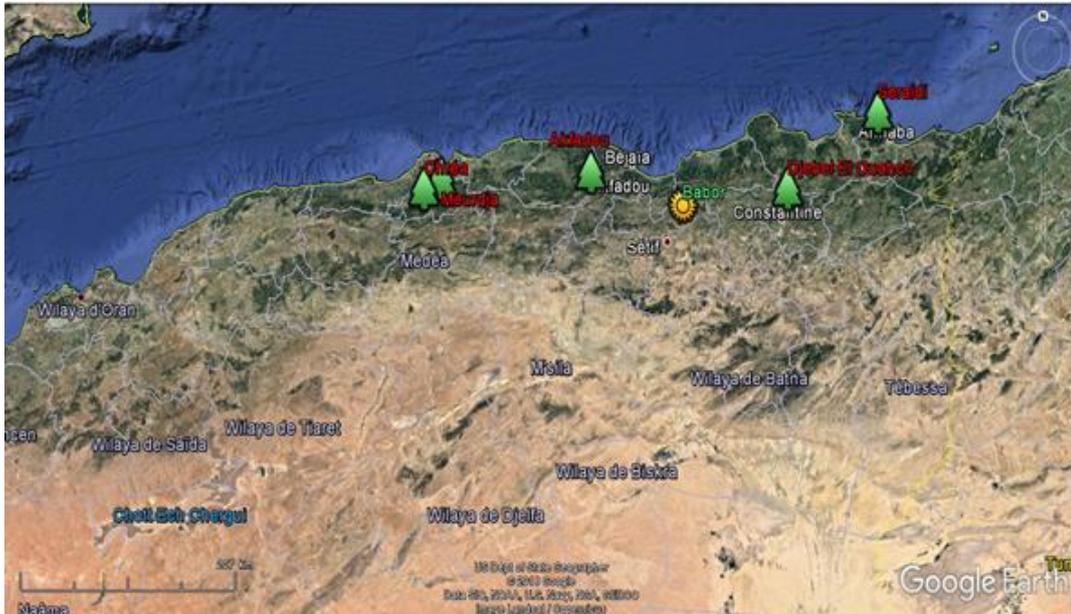


Figure 1 : Carte de répartition du sapin de Numidie en Algérie

(Google Earth)

I.4. Caractéristiques botaniques du sapin

Le sapin est un bel arbre à feuillage persistant et touffu. Il peut atteindre une hauteur de 25 m et développer une circonférence de 6m et parfois plus (KOLAI, 1992). Son port allongé est extrêmement décoratif, particulièrement au printemps lorsqu'il se couvre de jeunes feuilles d'un vert jaunâtre. C'est un arbre à cime pyramidale, régulièrement conique et très compact (LIU, 1971).

I.4.1. Appareil végétatif

Le tronc du sapin est revêtu d'une écorce grise et lisse dans le jeune âge puis prend la couleur brune grisâtre et écailleuse. Les rameaux sont de couleur vert olive ou brun, faiblement sillonné, presque glabre (Fig.2).

Le fût est rectiligne duquel partent des branches étagées disposées à l'horizontale. Les feuilles sont raides toutes tordues à la base. Elle présente à la face inférieure deux lignes blanchâtre.

La feuille est de (12,3 à 16,3) mm de longueur, (1,7 à 2,2) mm de largeur et (0,2 à 0,7) mm d'épaisseur (SATOUR, 1992).

Les aiguilles des rameaux stériles sont droites et épaisses, de (15 à 25) mm de longueur, alors que les aiguilles des rameaux fertiles sont relevées, épaisses et disposées en brosse, les bourgeons sont ovoïdes et pointus, résineux à la base et de couleur brun rouge (TLILI-AIT KAKI *et al.*, 2013).



Figure 2 : Sapin de Numidie observée au Babors (original).

I.4.2. Appareil reproducteur

Le sapin de Numidie est une espèce monoïque (organes reproducteurs mâle et femelle portés par le même individu). La floraison se fait en avril, les fleurs mâles occupent la partie inférieure des rameaux. Les boutons floraux de couleur rouge, deviennent jaunes quand ils s'épanouissent. Les fleurs femelles sont solitaires ou groupées et sont disposées sur le côté supérieure des rameaux les plus hautes. Elles sont cylindriques de couleur brun gris à maturité et elles donnent naissance à des cônes de 15cm de long et de (3 à 4) cm de diamètre (LEBTAHI, 2001).

Les graines sont ailées de (2 à 3) cm de long (TLILI-AIT KAKI ET al., 2013). Les cônes deviennent matures en mi-octobre mi-novembre, les bractées virent alors au brun. La tombée des graines survient à la fin du mois de Novembre.

I.5. Exigences de l'arbre

I.5.1. Exigences climatiques

Cette espèce est exigeante du point de vue hydrique et paraît cantonnée en bioclimat humide à perhumide et exige des précipitations annuelles moyennes supérieures à 1000 mm/an dans leur aire d'origine (QUEZEL, 1985; QUEZEL et BARBERO, 1990; QUEZEL, 1998); DUCKREY (1998) précise qu'*Abies numidica* est bien adapté aux stations bien alimentées en eau mais résiste à la sécheresse.

Selon RAMDANI *et al*, (2014), cet arbre se trouve dans les forêts mixtes des montagnes humides caractérisé par un climat particulièrement humide et froid, avec des précipitations annuelles de 2500 mm, dont la grande partie tombe sous forme de neige pendant l'hiver. Les étés sont secs et le climat est typiquement méditerranéen avec une température moyenne de 18 °C et pendant l'hiver, la température minimale est de -1 °C, avec des gelées extrêmes entre (-8 à -10)°C.

I.5.2. Exigences altitudinales

Abies numidica est une espèce de haute montagne, comme tous les sapins méditerranéens, pour lesquels l'aire naturelle est située dans les zones dépassant les 2000 m d'altitude avec des hivers froids et très froids (DUCKREY, 1998). Il est rencontré à partir de 1650 m et va jusqu'à 2000 m (GHERZOULI et DJELLOULI, 2005). Il est voisin d'*Abies marocana* localisé entre (1600 et 2000 m) (BARBERO et QUEZEL, 1975).

Cette essence disparaît totalement au-dessous de 1650 m d'altitude d'après (DESMET et BOUAZA, 1984) et 1500 m d'après (QUEZEL et BARBERO, 1990). Elle se raréfie au-dessus de 1900 m pour laisser place au cèdre et au chêne zen (BOUAZA, 1982).

Selon KOLAI (1986), le sapin de Numidie peut être nettement utilisé au-dessous de sa limite altitudinale inférieure naturelle quand il est placé aux expositions fraîches (zones de l'Atlas tellien, zones littorales, zones des Aurès).

I.5.3. Exigences édaphiques

Le sapin de Numidie se cantonne sur les substrats calcaire-dolomitiques notamment sur les reliefs karstifiés, les sols sont généralement légers, profonds et bruns (QUEZEL et BARBERO, 1990).

I.6. Importance économique

Le sapin de Numidie peut contribuer d'une façon notable à :

- L'équilibre écologique par des reboisements.
- L'embellissement de l'environnement (parcs et jardin).
- L'économie du pays par une production ligneuse et d'huile essentielle.

La valeur technologique du bois de sapin de Numidie reste encore peu connue, cependant ce serait un bois d'œuvre assez bon et pourrait convenir à la production de pâte à papier (KOLAI, 1986).

DAFIS (1990), rapporte que le bois de sapin peut être utilisé dans des domaines différents (menuiseries, bâtiment, constructions diverses etc...). CABANNE *et al.*, (1998) notent que les sapins méditerranéens présentent des caractéristiques de qualité du bois semblables à celles des sapins du nord et de l'épicéa et conviennent bien à la fabrication des charpentes.

Dans la médecine traditionnelle on retrouve la gomme de sapin, qui est l'un des remèdes essentiels de la médecine populaire, employée comme antiscorbutique, comme antiseptique dans les blessures et en cataplasmes sur les brûlures. En outre, cette plante est utilisée pour le traitement des voies respiratoires (TLILI-AIT KAKI *et al.*, 2013).

Ainsi, des études récentes montrent que l'huile essentielle des aiguilles du sapin de Numidie possède un effet antimicrobien (TLILI-AIT KAKI *et al.*, 2012; RAMDANI *et al.*, 2014).

I.7. Régénération du sapin de Numidie

I.7.1. Régénération par semis

Le sapin de Numidie ne se reproduit pas par la voie végétative (bouturage) mais par la voie générative (par graine). Cette méthode est valable mais paraît fort aléatoire si l'on songe à la quantité de semences que produisent le sapin et le nombre relativement faible de plantules qui survivent jusqu'à maturité dans les conditions naturelles (LEBTAHI, 2001).

I.7.2. La plantation

Pour une conservation de l'espèce, de nouvelles plantations à base de plants de sapin de Numidie ont été effectuées en 2019, dans divers endroits à savoir :

- El Meurdja (Rovigo).
- Tikijda

- Akfadou
- Miliana (Djbel Zakar)
- Tenes (Djbel Bissa)
- Tlemcen.

Et ceci, afin d'évaluer leur capacité de reprise et d'adaptation aux nouvelles conditions.

I.7.3. Régénération par culture *in vitro*

Les travaux relatifs à la multiplication *in vitro* du sapin sont rares, hormis l'étude de LEBTAHI (2001). Les applications de la micropropagation *in vitro* aux arbres forestiers ont été utilisées avec succès dès les années 50 (BONGA et ADERKAS, 1992), tout d'abord, par bourgeonnement axillaire puis avec l'augmentation de l'intérêt par organogénèse et embryogénèse somatique. Cette technique est appliquée à des plantes portant des intérêts particuliers ou difficiles à reproduire naturellement (MENTEUUIS, 2016).

II. La culture *in vitro*

II.1. Historique

Les premières tentatives pour maintenir en survie des organes vivants isolés datent de plus de 130ans ; il s'agissait alors de conserver vivants des fragments de queue de têtards de grenouilles (AUGE *et al.*, 1989).

Les premiers pas de la culture *in vitro* proprement dite sont dus à un allemand, HABERLANDT, au début du siècle (1902). Il obtint ainsi, sur un milieu de KNOP amélioré, de petits amas cellulaires à partir de (poils staminaux ou glanduleux ou de fragments d'épiderme). Leur survie dure plusieurs mois, sans multiplication cellulaire, et finalement, l'équipe d'HABERLANDT resta sur un échec. Ce furent les cultures de tissus animaux qui prirent le relais, et en 1912 CARREL réussissait la culture indéfinie de cellule de cœur d'embryon de poulet par repiquages successifs.

Il a fallu attendre 1922 pour que de nouveaux espoirs apparaissent pour la culture de tissus végétaux.

ROBLINS aux Etats-Unis et KOTT en Allemagne s'adressant aux pointes de racines, réussissent à les maintenir en survie près de six mois et à obtenir des fragments qui passèrent de quelques millimètres, mais cessèrent de croître et les cultures furent perdues. WHITE en 1932 obtint pour la première fois la culture indéfinie de racine, en prélevant des extrémités de racine de tomate, qu'il mit en milieu liquide contenant des sels minéraux, un extrait de levure et du sucre.

Ce succès fut sans doute à l'origine du regain d'effort qui se porta sur la culture de tissus végétaux. Dès 1934 GAUTHERET obtient, à partir de prélèvement de tissus cambiaux d'arbre (tissus méristématiques), des proliférations de tissus qui, malheureusement, ne dépassèrent pas huit mois. Ce n'est qu'en 1939 qu'il publie ses premiers résultats sur la culture indéfinie de tissu de carotte.

NOBECOURT sur le même matériel, et WHITE aux Etats-Unis sur des tissus de tabac tumoral, publient en 1939, des résultats analogues. La culture *in vitro* de tissus végétaux a vraiment vu de jour à partir de ce moment-là.

Une autre étape historique a été la guérison de plantes virosées par le biais de la culture de méristème, *in vitro*.

En 1949, LIMASSET et CORNUET publiaient leurs observations sur l'absence de virus dans les méristèmes de tabac virosé. MOREL et MARTIN mirent à profit ces observations et entreprirent de mettre en culture *in vitro* des méristèmes de Dahlia et de pomme de terre atteints de maladie à virus. A partir de ces méristèmes, ils obtinrent *in vitro* des plantes entières qui furent remises en culture normale et se révélèrent saines au contrôle.

C'est ainsi qu'est née en 1952, cette technique universellement employée actuellement pour assainir toutes sortes de plantes virosées.

II.2. Généralités

La culture *in vitro* est une méthode de multiplication végétative artificielle des plantes. Elle fait intervenir d'une part l'asepsie (stérilisation du matériel, désinfection des explants) et d'autre part, des conditions de culture parfaitement contrôlées (milieux de culture définis pour chaque type de plante, température, lumière, humidité, etc.).

La micropropagation est utilisée dans un but de multiplication en masse, puisqu'elle permet, en partant d'un seul individu (plant) d'arriver à l'obtention d'un nombre considérable de plantes génétiquement identiques à la plante mère (Ferry *et al.*, 1998 ; SEMAL, 1998). Les plants reproduits ne sont pas seulement conformes, mais présentent aussi une grande uniformité. Par ailleurs, l'usage de cette technique nécessite peu d'espace et indépendante des saisons. La technique représente donc un outil puissant aux perspectives industrielles et économiques importantes (MARGARA, 1982 ; BOXUS, 1995 ; SEMAL, 1998 ; SKIRVIN *et al.*, 2000).

II.3. Les voies de régénération *in vitro*

II.3.1. La Voie directe

Elle est fiable pour le maintien de la conformité génétique du matériel végétal multiplié (CHIKH, 1999). Elle utilise des tissus méristématiques (méristème ou apex de tige, bourgeons axillaires) potentiellement capables de donner suite, au développement normal, d'un individu (SAADI, 1991). Cette technique est souvent appelée « multiplication conforme », car elle part de méristèmes préexistants dans lesquels, les cellules sont génétiquement très stables (BOXUS, 1995). L'individu est généralement obtenu en deux étapes successives, d'abord la production de tiges, puis leurs enracinements (**Fig.3**).

II.3.2. La Voie indirecte

Cette voie ne garantit pas la conformité génétique (BOXUS, 1991). Elle utilise toute sorte de tissus différenciés (fragments de tige, de racines, de pétioles, de feuilles, d'embryons matures et immatures, d'hypocotyles, cotylédons, etc.) pour aboutir à la néoformation soit de bourgeons ou de racines ou sur les cals dérivés, c'est l'organogenèse, soit de structures ressemblant aux embryons zygotiques, c'est l'embryogenèse somatique (ZRYD, 1988 ; MARGARA, 1989) (Fig.3).

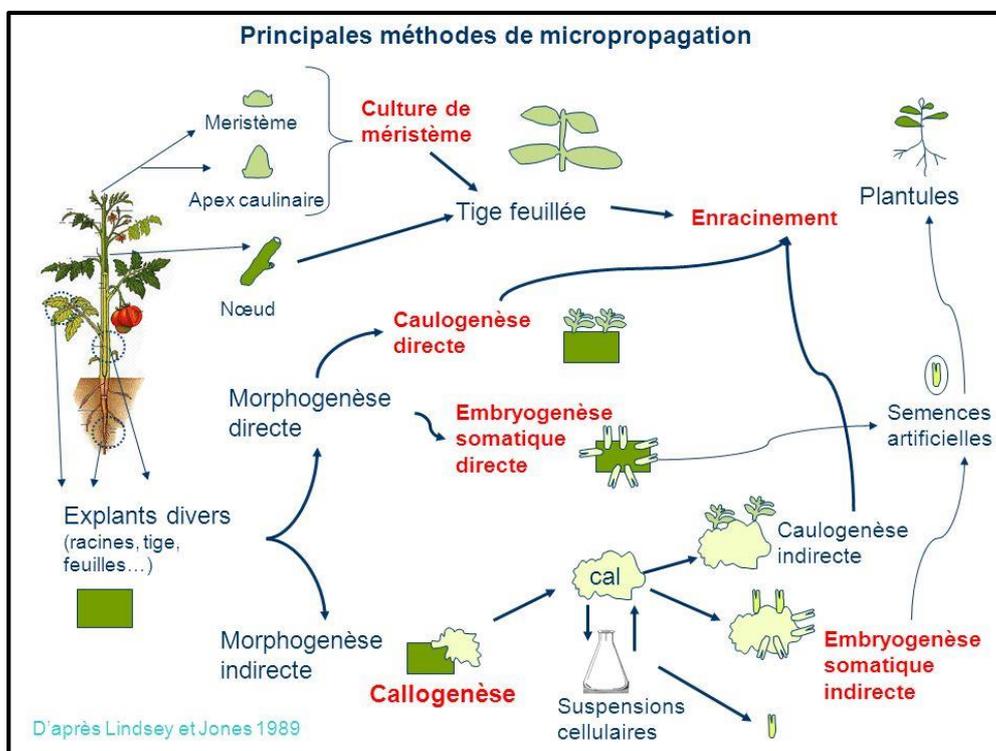


Figure 3 : Les voies de régénération *in vitro*

<https://slideplayer.fr/slide/514777/2/images/micropropagation.jpg>

II.4. Les différentes techniques de micropropagation

II.4.1. Culture de méristème

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

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

La multiplication du méristème prélevé au sommet d'une plante ou dans le bourgeon axillaire, le plus souvent indemne de maladies, permet d'obtenir très rapidement de nombreuses plantes, toutes semblables du point de vue génétique et débarrassées de maladies dont elles étaient affectées (SCHMID et KELLER, 1981 ; SAMA *et al.*, 1998;).

La culture de méristème est la méthode la plus généralisable et la plus sûre pour éviter l'apparition de plantes non conformes à la plante mère ou variants (SAADI, 1991). Elle paraît plus intéressante chez les plantes allogames où il est généralement impossible de conserver des génotypes intacts par reproduction sexuée classique.

II.4.2. Organogénèse

L'organogénèse est la voie de régénération dans laquelle les bourgeons, les tiges (caulogénèse) et les racines (rhizogénèse) sont induit directement à partir d'explants des plantes ou indirectement à partir de cals (DUCLERCQ *et al.*, 2011) :

a) **La caulogénèse** : elle désigne à la fois le développement de la partie aérienne, bourgeons terminaux, axillaires, adventifs ou néoformés sur un cal.

b) **La rhizogénèse** : elle désigne la néoformation et la croissance de racine. C'est un phénomène complexe, il comporte différentes phases : la dédifférenciation, formation d'amas de cellules méristématiques, différenciation et organisation des amas méristématiques en primordium racinaire qui se développeront en jeunes racines (MARGARA, 1989 ; BOXUS, 1995).

c) **La callogénèse** : elle désigne la formation d'un ensemble de cellules non organisées, se divisant plus au moins activement (AUGE *et al.*, 1989). Après le transfert des explants fraîchement coupés dans des conditions de culture favorables, habituellement sur la surface de coupe, une division cellulaire est lancée, une croissance mal organisée se produit et un cal sera formé. Cependant, dans des conditions appropriées, la différenciation, des racines adventives, des pousses, ou même d'embryons peut être lancée (NEUMANN *et al.*, 2009).

La procédure de multiplication des plantes par callogenèse implique deux étapes, l'induction des cals et le développement d'organes à partir de ces derniers. Au cours de chacune des deux étapes, les concentrations hormonales exogènes peuvent être différentes d'une plante à l'autre (KRIKORIAN, 1995). La combinaison hormonale interfère ou influe selon le type d'explant et l'espèce en question (IGHILHARIZ *et al.*, 2008).

d) Embryogenèse somatique : c'est une technique de multiplication végétative, utilisée en culture *in vitro*. Elle permet de produire des embryons somatiques à partir de cellules somatiques, selon un processus ressemblant à l'embryogenèse zygotique (ZIMMERMAN, 1993). Les embryons obtenus sont conformes à la plante mère.

Il existe deux types d'embryogenèse somatique :

- L'embryogenèse somatique directe : les embryons sont induits directement à partir de cellules somatique de l'explant.
- L'embryogenèse somatique indirecte : passe par l'intermédiaire de cals.

Les premiers embryons somatiques ont été décrits en 1985 par HAKMAN et VON ARNOLD sur les embryons zygotiques de *Picea abies*. Ils ont été obtenus à partir de matériel très juvénile (des embryons immatures). Par la suite, des embryons somatiques ont été obtenus à partir de matériel de plus en plus différencié (des cotylédons). A ce jour, plusieurs espèces de gymnospermes sont cultivés avec succès *in vitro* le plus souvent à partir d'embryons zygotiques immatures (HAKMAN, 1985; GUPTA et DURZAN, 1987; BOULAY *et al.*, 1988; FINER *et al.*, 1989 ; LAMBARDI *et al.*, 1995 MARIE *et al.*, 2020).

Cette méthode présente chez les arbres forestiers un intérêt important :

- Voie rapide pour un rajeunissement total.
- Permet une production massive.

Pour la majorité des espèces, la réussite est limitée à l'utilisation du matériel juvénile les embryons matures, immatures et les cotylédons (BOURGFARD, 1986). Selon BIGOT (1980), l'apparition d'un embryon ou d'un bourgeon à partir d'un cal ou d'un fragment est un événement complexe, qui est sous la dépendance :

- des conditions intrinsèques : génome, capacité de synthèse des régulateurs naturels, présence de cellules cibles ou tissus cibles ayant conservé certaines aptitudes organogènes.

- des conditions extrinsèques : nature de l'environnement, milieu de culture, nature et équilibre des régulateurs de croissance.

II.5. Les étapes de la micropropagation

La micropropagation est une technique qui assure une reproduction tout à fait conforme aux pieds-mère. Elle est considérée comme étant la principale méthode utilisée pour produire un matériel physiologiquement juvénile (MARGARA, 1982), homogène et indemne de maladies (BOXUS, 1984) et qui se réalise selon les étapes suivantes :

- **Phase d'initiation** : Elle correspond à l'établissement de la culture aseptique initiale, elle permet de faire exprimer les bourgeons sur l'explant de départ.
- **Phase de multiplication** : Les bourgeons obtenus sont mis sur un milieu de multiplication, pour qu'ils régèrent à leur tour de nouveaux bourgeons.
- **Phase d'allongement** : Les bourgeons formés sont transférés sur un milieu leur permettant de s'allonger en plantule.
- **Phase d'enracinement** : Les pousses vigoureuses provenant de la phase précédente, sont isolées et mises sur un milieu rhizogène.
- **Phase d'acclimatation (sevrage)** : Elle correspond à la phase de croissance qui succède aux conditions *in vitro*.

II.6. Les milieux de culture

Les tissus végétaux mis en culture exigent qu'on leur fournisse tout ce dont ils ont besoin comme sels minéraux pour survivre et se multiplier.

Différents auteurs ont étudié les besoins en éléments minéraux de différentes cultures et ont mis au point des compositions qui portent leur nom : milieu de MURASHIGE et SKOOG (1962), milieu de QUOIRIN et LEPOIVRE (1977).

Le milieu de culture MS est reconnu comme étant un milieu riche en sels minéraux, il convient à un grand nombre de plantes.

Les éléments minéraux nécessaires au développement des végétaux peuvent être divisés en

deux catégories (GAUTHERET, 1959).

a) Les macroéléments : sont utilisés à des concentrations élevées tel que l'azote, le magnésium, le potassium, le phosphore, le calcium.

b) Les microéléments : ou appelés oligo-éléments : sont nécessaire à la plante en faible dose. Les principaux d'entre eux sont : (le cuivre, le zinc, le manganèse, l'iode, le cobalt, le bore, le molybdate, le fer, le Nickel).

D'autres constituants principaux du milieu de culture sont :

c) les éléments organiques :

- Le sucre : les explants mis en culture, sont hétérotrophe vis-à-vis du carbone et donc il est nécessaire d'ajouter du sucre ; le plus souvent le saccharose utilisé à une concentration variable selon la nature de l'explant de 20 à 60 g/l.
- Les vitamines : sont des substances organiques qui stimulent la croissance et le développement des végétaux en culture axénique. Les plus fréquemment utilisées sont : la Thiamine HCl, la pyridoxine, la biotine, le myo-inositol etc.
- Les acides aminés : l'apport d'acides aminés dans le milieu de culture contribuerait certainement à la prolifération cellulaire et à sa croissance.

d) les régulateurs de croissance :

Les régulateurs de croissance, appelés aussi « phytohormones » ou hormones végétales, jouent un rôle important dans la multiplication et prolifération cellulaire. Ce sont des substances naturelles produites par la plante elle-même, ou des substances synthétiques à effet similaire (MARGARA, 1982).

La micropropagation dépend des phytohormones pour la division cellulaire et la dédifférenciation, pour acquérir les compétences d'organogenèse, initier la formation d'organes et le développement des plantes (DEKLERK *et al.*, 1997).

Les principaux régulateurs de croissance sont :

- Les auxines

Dans les plantes, ils sont responsables de l'établissement de la polarité cellulaire, la division et l'élongation cellulaires, la dominance apicale et la formation des racines adventives (DEO

et al., 2010 ; GUTIERREZ-MORA *et al.*, 2012). Elles sont synthétisés dans les jeunes feuilles des bourgeons terminaux.

Dans la culture des tissus végétaux, les auxines sont essentielles pour l'induction de l'embryogenèse somatique, le maintien de l'état dédifférencié (prolifération des cellules embryogéniques). Parmi les auxines synthétiques les plus utilisées en culture *in vitro* sont l'acide indole -3-butyrique (AIB), l'acide naphthalène (ANA), 2,4-acide dichlorophénoxyacétique (2,4-D).

- Les cytokinines

Dans les plantes, elles favorisent la division cellulaire et la différenciation. Elles induisent également la formation de pousses adventives et de pousses axillaires en diminuant la dominance apicale (GUTIERREZ-MORA *et al.*, 2012). Elles sont produites au niveau de l'apex racinaire.

Grâce à la propriété de totipotence de cellules végétales, il est permis aussi d'orienter la morphogenèse en jouant sur la balance hormonale.

Le rapport hormonal auxines/cytokinines conditionne en grande partie, le type de néoformation désiré (**Fig.4**).

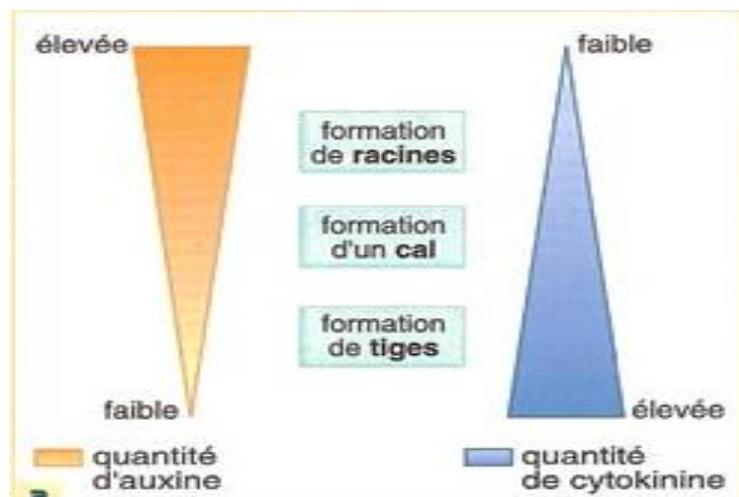


Figure 4 : Schéma représentant l'équilibre auxines/cytokinines déterminant l'organogenèse en culture *in vitro*.

<https://tp-svt.pagesperso-orange.fr/phytohorm.htm>

- Les gibbérellines

Ils favorisent la croissance de plusieurs sortes d'organe végétaux (croissance des entre-nœuds,

croissance des feuilles), accélèrent et régularisent la germination de certaines semences comme le blé et l'orge et lèvent la dormance des bourgeons. En culture *in vitro*, ils assurent l'élongation des tiges.

La synthèse des gibbérellines est localisée dans les jeunes feuilles, les extrémités des tiges et des racines ainsi que dans les embryons des graines en germination (CHAUSSAT et COURDUROUX, 1980).

- L'acide abscissique

C'est un régulateur de croissance naturel. Il favorise l'abscission des feuilles et des fruits, retarde la croissance des rameaux, prolonge la dormance des bourgeons et celle des graines, et fait fermer les stomates en cas de déficit hydrique (BIGOT, 1980 ; CHAUSSAT et COURDUROUX, 1980 ; HELLER, 1982). Cette hormone est synthétisée dans les feuilles matures et véhiculée vers les racines par le phloème et de là peut retourner vers les tiges par le xylème.

En embryogenèse somatique, il peut provoquer et maintenir la dormance à haute concentration et par contre favoriser la germination à faible concentration (BOXUS et *al.*, 1995).

- L'éthylène

C'est un gaz qui agit sur la maturation des fruits, sur la chute des organes caduques. Il inhibe le développement des jeunes pousses et l'élongation des racines. Il est plus intensément produit dans des tissus qui vieillissent, ou mûrissent, ou qui sont blessés (BIGOT, 1980; HELLER, 1982).

e) Milieu liquide ou solide :

En culture *in vitro* les milieux sont liquides ou gélifiés. Le milieu liquide agité convient le mieux pour les cultures de cellules isolées. Cependant, les milieux gélosés sont le plus souvent utilisés. La gélification du milieu est obtenue par addition d'agar-agar en quantité variable (6 à 8 g/l). L'agar-agar est une substance naturelle, extraite d'algues marines.

Le pH du milieu influence aussi la croissance et le développement des tissus cultivés *in vitro* (CHEVRE, 1985). Généralement, il est ajusté à une valeur donnée (5,5- 5,8) avant la stérilisation du milieu.

II.7. Avantages et inconvénients de la culture *in vitro*

II.7.1. Avantages

La micropropagation *in vitro* des arbres ligneux présente de nombreux avantages par rapport aux méthodes de propagation classiques (SASSON, 1993 ; PEREZ-TORNERO *et al.*,2010 ; MARUTANI-HERT *et al.*,2011) :

- ↪ Elle fournit une bonne alternative pour la conservation et la multiplication rapide, dans un espace limité, de nombreux arbres précieux, rares, ou menacés de disparition en utilisant différentes stratégies telles que la culture des bourgeons axillaires.
- ↪ Elle est également utile pour la production en masse d'arbres génétiquement identiques, physiologiquement uniformes, et exempts d'agents pathogènes, afin de répondre plus rapidement aux exigences de production et de restauration du système agro forestier.
- ↪ Cette technique peut fournir également un approvisionnement constant en matériel végétal pour les manipulations et transformations génétiques et pour la conservation *in vitro*.
- ↪ Les techniques *in vitro* sont également utiles pour la conservation des stocks de germoplasms et permettent la multiplication d'arbres sélectionnés indépendamment de la saison et du stade de floraison ou de production de graines ce qui nous aide à contourner les cycles de vie longs, spécifiques aux arbres ligneux.

II.7.2. Inconvénients

- ↪ Cependant, la récalcitrance, la contamination, la croissance lente, et les exsudations des composés phénoliques constituent d'importants obstacles de la multiplication *in vitro* des arbres ligneux (LEBTAHI, 2001 ; RAI *et al.*, 2010 ; MARIE *et al.*, 2020).
- ↪ Le nombre élevé de mitoses peut entraîner l'apparition de mutants spontanés.
- ↪ Le coût de production est élevé.
- ↪ les nombreuses manipulations du matériel végétal et les besoins importants en main d'œuvre qualifiée entraînent également des coûts élevés.

PARTIE EXPERIMENTALE

MATERIEL ET METHODES

L'expérimentation a été réalisée au niveau du laboratoire de culture *in vitro* de l'Institut National de la Recherche Forestière (INRF) Bainem, Algérie. Elle a duré 3 mois à cause du confinement.

I.1. Matériel

I.1.1. Matériel végétal

Le matériel végétal utilisé au cours de notre expérimentation est représenté par une espèce endémique de l'Algérie : le sapin de Numidie (*Abies numidica* L.).

L'étude a porté sur quatre types de matériel végétal en provenance des Babors, (wilaya de sétif):

- les cônes du sapin de Numidie.
- Graines matures, récoltées fin novembre sur des arbres âgés d'environ 70 ans.
- Embryons zygotiques excisés de graines immatures, récoltés début septembre sur des arbres âgés de 70 ans environ (**Fig.5, A**)
- Plantules âgées de 3 à 4 semaines issues de la germination des graines (**Fig.5, B**)

I.1.2. Milieux de culture

Le choix du milieu de culture est l'un des facteurs importants pour la réussite de la culture *in vitro*. Pour notre étude nous avons testé le milieu de base MURASCHIGE et SKOOG (1962), riche en sels minéraux. Il a été utilisé par plusieurs chercheurs lors de leurs travaux sur les résineux (BEKKAOUI et al., 1983 ; WALKER *et al.*, 1985 ; ZAREI *et al.*, 2017 ; HAZUBSKA, 2019).

I.2. Méthodes

I.2.1. Etude Biométrique des cônes de sapin.

Des mesures des cônes matures fraîchement récoltés depuis 3 arbres du sapin de Numidie éloigné ont été faites. Ainsi pour chaque cône nous avons calculé le poids, la longueur, le diamètre, le nombre et le poids des graines.

Ces mesures ont été prises à l'aide :

- d'un pied à coulisse pour les dimensions de la longueur et du diamètre du cône.
- d'une balance pour les pesées des cônes et des graines.

I.2.2. Extraction des graines de sapin

Les cônes récoltés fermés, sont placés dans un local à la température ambiante. Après 10 jours environ, les cônes se désarticulent facilement et les graines sont ensuite séparées des écailles (Fig.5, C).

Avant d'être stockées, les semences sont désaillées par frottement sur un tamis (Fig.5, D). Suite à cette opération, les semences sont mises en conservation dans des bocaux hermétiquement fermés et placés au réfrigérateur à une température de 4°C.

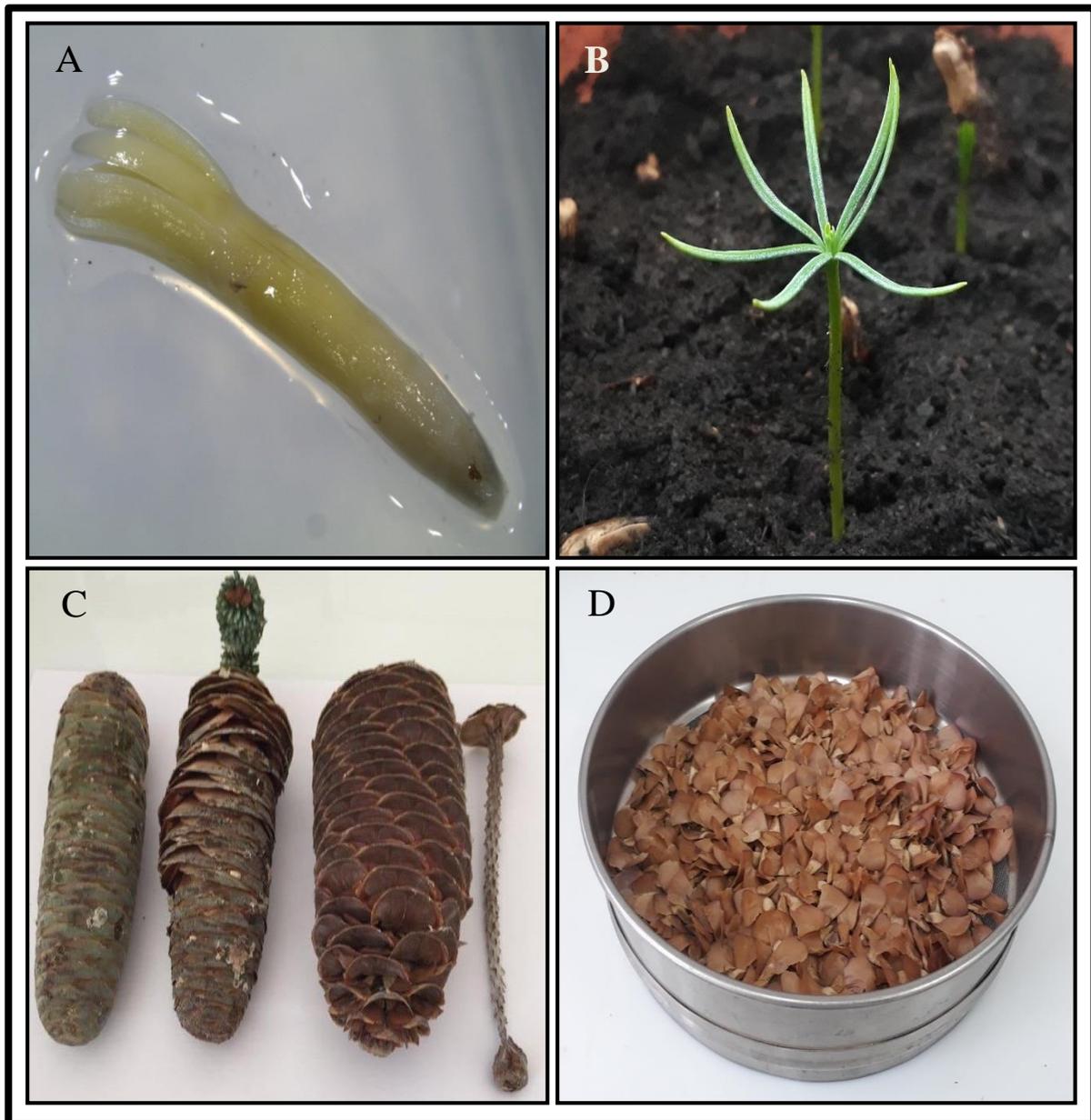


Figure 5 : Matériel végétal : **A-** Embryon zygotique immature X1. **B-**Plantule issue de la germination de la graine. **C-** Etapes de désarticulation du cône de sapin. **D-** Tamis contenant les graines.

I.2.3. Etude morphologique et anatomique de la graine de sapin

Une étude morphologique des graines est réalisée, pour déterminer les différentes catégories de graines que renferme le cône de sapin de Numidie.

De même, afin de mettre en évidence les différentes parties qui constituent la graine, une étude anatomique est réalisée sur les graines ayant séjournées 24h dans de l'eau courante. Des coupes longitudinales sont effectuées à l'aide d'un scalpel, suivi d'observations anatomiques sous loupe binoculaire (Leica) muni d'un appareil photo.

I.2.4. Germination des graines

I.2.4.1. Tri des graines

Afin de séparer les graines pleines des graines vides, un tri densimétrique à l'éther de pétrole est réalisé. C'est une opération qui consiste à tremper les graines dans la solution d'éther de pétrole sous hotte aspirante. Les graines vaines surnagent par contre les graines fertiles restent au fond du bécher.

I.2.4.2. Effet du froid humide et de la température sur la germination

Il nous a fallu tout d'abord entreprendre des essais de levée de dormance des graines de sapin afin de remédier à la contrainte d'hétérogénéité rencontrée lors de nos essais et de déterminer la période idéale de stratification.

Un prétraitement au froid humide, au réfrigérateur à 4°C est donc opéré. Pour ce faire, les graines de sapin sont disposées dans des boîtes de Pétri tapissées de papier filtre imbibé d'eau distillée à raison de 20 graines par boîte et séjournent au réfrigérateur à 4°C (LEBTAHI, 2001), durant une période de 3, 4, 5, 6 semaines (**Fig.6**).



Figure 6 : Graines destinées à la germination.

Suite à cette opération, les semences sont mises à germer à l'obscurité, étant donné que la germination est indifférente à la lumière (LEBTAHI, 2001) ; dans deux étuves, à deux températures différentes, l'une réglée à 17-18°C et l'autre à 22-23°C. Ces traitements ont été comparés à un témoin. La germination du témoin est réalisée dans des boîtes de Pétri tapissées de papier filtre humide et placées à la température ambiante.

Pour tous ces essais, l'arrosage des graines se fait à l'eau distillée dès que le besoin s'en ressent.

L'expérimentation porte sur 3 répétitions de 100 graines par modalité. Le comptage des graines germées a été effectué tous les 3 jours.

Nous considérons qu'une graine germe dès que la radicule perce le tégument et apparaît avec une croissance de 3mm environ. La durée du test est fixée à 30 jours après germination.

Et afin d'éviter tout développement de champignons, les semences, sont parfois arrosées avec une solution de Bénomyl à 1g/l.

I.2.4.3. Germination en pot

Les graines pré-germées sont semées verticalement à une profondeur de 2cm, dans des pots contenant de la tourbe stérilisée, à raison de 40 graines par pot. Elles sont par la suite placées au laboratoire à la température ambiante. L'arrosage est effectué à l'eau de robinet dès que le besoin s'en ressent. Les plantules obtenues sont destinées à la culture *in vitro*.

I.2.5. Techniques de culture *in vitro*

I.2.5.1. Techniques de stérilisation

I.2.5.1.1. Stérilisation du matériel de laboratoire

Le maintien des cultures en conditions aseptiques sous-entend la stérilisation des milieux de culture, d'instruments de dissection, de la verrerie, de l'eau de rinçage etc.

Ainsi, toutes les manipulations se font sous hotte à flux laminaire horizontal.

- La hotte est nettoyée entièrement à l'alcool 70° puis stérilisée à l'aide d'une lampe UV située au plafond de la hotte. L'asepsie continue, est assurée par un flux d'air horizontal.
- L'eau distillée servant au rinçage du matériel végétal est stérilisée à l'autoclave à 120°C pendant 60mn.
- Les pinces, scalpels, bistouris et toute la verrerie sont stérilisés à l'étuve à 200 °C pendant deux heures.

I.2.5.1.2. Stérilisation des milieux de culture

Les milieux de culture distribués dans des tubes sont stérilisés à l'autoclave pendant 20mn à 120°C. Pour les cultures réalisées dans les boîtes de Pétri stériles, le milieu de culture est stérilisé dans un erlenmeyer à 120°C pendant 20mn avant d'être coulé près d'une flamme sous hotte stérile, à raison de 25 ml par boîte.

I.2.5.1.3. Stérilisation du matériel végétal

Le choix d'une technique efficace de stérilisation du matériel végétal est primordial pour réduire au maximum les contaminations et par la même, optimiser le nombre d'explant en réaction.

a) Désinfection des graines immatures destinées à l'extraction des embryons zygotiques

Les graines sont tout d'abord lavé au savon liquide commercial pendant 1mn pour éliminer toute trace de poussière, ensuite elles sont trempées dans de l'alcool 70° pendant 30 sec sous agitation puis elles vont subir une désinfection dans des substances stérilisantes combinées :

- Désinfection au benomyl à 3g/l pendant 30mn
- désinfection dans la solution d'H₂O₂ pendant 30mn, puis transfert dans la solution d'Hypochlorite de sodium à 12° pendant 30mn.
- Suivi de trois rinçages successifs à l'eau distillée stérile pendant 10 mn chacun.
- Enfin les graines séjournent dans l'eau distillée stérile pendant 24h.

b) Stérilisation des plantules de 3 à 4 semaines issues de la germination des graines

Afin de réaliser cette stérilisation, les plantules sont trempées dans plusieurs bains successifs :

- Lavage au savon liquide pendant 2mn.
- Trempage dans l'alcool 70° pendant 30s.
- Désinfection au benomyl à 3g/l pendant 2mn.
- Transfert dans l'hypochlorite de sodium à 12° pendant 4mn.

Les plantules sont ensuite rincées 3 fois à l'eau distillée stérile pendant 5mn chacun pour éliminer toute trace de la solution désinfectante.

I.2.5.2. Préparation du milieu de culture

I.2.5.2.1. Préparation des solutions mères

Le milieu de culture utilisé au cours de nos expérimentations est le Milieu de MURASCHIGE et SKOOG (1962) (**Annexe 1**), il est préparé préalablement sous forme de solution mère :

- Solution mère de macroéléments concentrée X 10.
- Solution mère de microéléments concentrée X 100.
- Solution mère des régulateurs de croissance (AIB, 2.4-D et BAP) X 100.
- Solution mère de vitamine concentrée X 100.
- Solution mère de Fe EDTA.

Des solutions mères des phytohormones (AIB, 2.4-D et BAP) concentré 100X ont été préparées, après dissolution dans du NaOH (0.1N). Toutes les solutions mères sont conservées au réfrigérateur à 4°C.

Lors des manipulations, nous prélevons de chaque solution mère, le volume nécessaire pour confectionner un litre de la solution finale (**Tableau I**).

Tableau I : Confection du milieu de culture (MS).

| Composants | Quantité/litre de milieu |
|-------------------------|--------------------------|
| Macroélément MS | 100ml |
| Microéléments MS | 10ml |
| Vitamines MS | 10ml |
| Fe EDTA | 5ml |

Pour chaque milieu de culture, nous avons ajouté une gamme de concentration en régulateurs de croissance BAP (**Tableau II**), 30g/l de saccharose et 0.1g de myo-inositol et ceci pour les cultures concernant l'organogenèse directe et indirecte.

Tableau II : Concentration des régulateurs de croissance pour l'induction du bourgeonnement axillaires et adventifs.

| Milieu MS | BAP en mg/l |
|--------------------|-------------|
| Mo (témoin) | 0 |
| M1 | 0.1 |
| M2 | 0.6 |
| M3 | 1 |

Pour ce qui est des milieux de culture de l'embryogenèse somatique, ils diffèrent des précédents par la présence dans le milieu de culture, d'auxine seul (AIB seul ou 2.4D seul) ou combinée à une cytokinine (AIB + BAP) (**Tableau III**), la quantité de saccharose doublée à 60g/l, la glutamine rajoutée à 0.4mg/l et le myo-inositol à 1g/l.

Tableau III : Concentration des régulateurs de croissance pour l'induction de cals et de l'embryogenèse somatique.

| Milieu MS | AIB mg/l | 2.4-D mg/l | BAP mg/l |
|------------|----------|------------|----------|
| M4 | - | - | - |
| M5 | - | 1 | - |
| M6 | - | 2 | - |
| M7 | - | 3 | - |
| M8 | 1 | - | - |
| M9 | 2 | - | - |
| M10 | 3 | - | - |
| M11 | 2 | - | 2 |

I.2.5.2.2. Conditions de culture

Tous les milieux sont solidifiés par addition de l'Agar-Agar à raison de 8 g/l après ajustement du pH à 5.7 à l'aide d'une solution de (NaOH à 0.1N) ou du (HCl à 0.1N).

Les milieux de culture sont distribués dans des tubes en verre à raison de 25 ml par tube. Ces derniers sont placés dans des paniers et stérilisés à l'autoclave pendant 20 mn à 120°C.

Les apex, les fragments de tiges et de racines sont placés dans une chambre de culture sous une photopériode de 16h de lumière et de 8h d'obscurité.

Les embryons zygotiques immatures sont soit mis à l'obscurité totale à une température de 24°C, soit soumis à une photopériode de 16h de lumière et de 8h d'obscurité et à la même température. L'éclairage est fourni par des tubes LED ($50 \mu\text{mol s}^{-1} \text{m}^{-2}$).

Les cultures sont entretenues par repiquage régulier toutes les 4 semaines sur un milieu neuf.

I.2.5.3. Mise en culture du matériel végétal

Avant d'entamer toutes manipulations, les mains ainsi que le plan de travail sont fréquemment nettoyés à l'alcool 70° pour ne pas contaminer le matériel déjà stérilisé. Les opérations de mise en culture se font sur du papier filtre stérilisé à proximité d'une flamme qui sert aussi au flambage des instruments de dissection.

I.2.5.3.1. Culture d'apex

L'introduction du matériel végétal en culture primaire s'effectue toujours de façon individuelle (1 explant par tube) afin d'écarter rapidement tout explant infecté (**Fig.7, A**).

I.2.5.3.2. Culture de segments de racines, de tiges et de cotylédons

De même, les fragments de racines, de tiges sont découpés et ensemencés individuellement en tube à essais (**Fig.7, B**).

I.2.5.3.3. Culture des embryons zygotiques immatures

L'embryon est débarrassé de l'endosperme et du tégument à l'aide d'une pince et d'un scalpel et déposé stérilement dans les boîtes de Pétri à raison de 5 embryons par boîte. Après la mise en culture, les boîtes sont scellées à l'aide de parafilm nettoyé préalablement à l'alcool 70°.

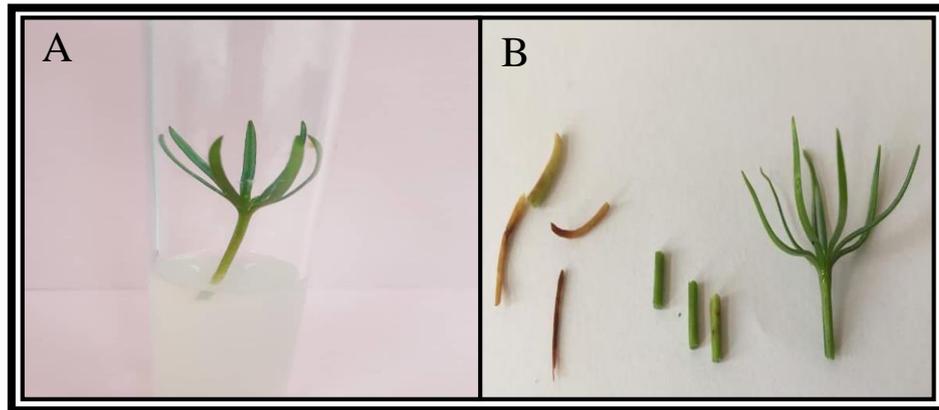


Figure 7 : **A-** Apex issu de graine germée cultivé sur milieu MS. **B-** Différents organes issus de la plantule âgée de 3 à 4 semaines.

I.2.5.4. Critères observés

Les observations tant qualitatives que quantitatives sont réalisées tous les jours pour les premiers temps afin d'isoler les cultures infectées puis tous les 3 à 4 jours, pour suivre le développement des explants.

Pour chaque traitement plusieurs paramètres sont considérés à savoir :

- Pourcentage d'infection.
- Nombre d'explant ayant déboussés.
- Nombre de bourgeons axillaires néoformés par explant chez les apex.
- Nombre de bourgeons adventifs néoformés sur les fragments de (tiges, racines et cotylédons).
- Nombre d'explant ayant développé un cal chez les embryons zygotiques immatures.
- Nature du cal.
- Mesure des cals issues d'embryons zygotiques immatures.

➤ Mesure des cals :

Nous avons mesuré la surface des cals au contact du milieu de culture, après 8 semaines de culture, et ceci en se servant d'un double décimètre.

La croissance des cals, dans les différents traitements est exprimée par la moyenne des mesures de surfaces effectuées sur les cals, selon la formule suivante :

$$s = \pi \left(\frac{D1 + D2}{2} \right)^2$$

S : surface des cals (cm²).

D1 : diamètre horizontale du cal (cm).

D2 : diamètre verticale du cal (cm).

π : 3.14

Le calcul de la surface des cals est basée sur l'équation universelle des surfaces des cercles. Pour notre cas le rayon pris en considération correspond aux moyens des deux rayons perpendiculaires mesurés sur chaque cal.

➤ **Traitement statistique des données.**

Les résultats obtenus sont traitées par Excel.

RESULTATS ET DISCUSSION

II.1. Etude morphologique, anatomique et physiologique de la semence du sapin de Numidie

II.1.1. Biométrie des cônes de sapin

Une étude biométrique a été réalisée sur des cônes de sapins matures. Elle est considérée comme préliminaire en raison de la faible quantité de cônes dont nous disposons.

A noter que, la fructification de l'année 2019 étant mauvaise et ceci s'est répercuté négativement sur la quantité de cônes récoltés.

Les résultats obtenus sont consignés dans le (**Tableau IV**) et (**Annexe 3**).

Tableau IV : Moyennes des caractères mesurés chez les arbres 1, 2, 3.

| | Long (cm) | Larg (cm) | Poids (g) | Nbr G | Poids G (g) |
|----------------|------------------|------------------|------------------|--------------|--------------------|
| Arbre 1 | 17.05 | 4.54 | 156.52 | 295.50 | 23.92 |
| Arbre 2 | 14.88 | 4.53 | 139.47 | 255.83 | 21.93 |
| Arbre 3 | 14.45 | 4.55 | 136.04 | 235.63 | 20.91 |

II.1.1.1. Analyse des données

A. longueur des cônes

La longueur moyenne et intervalle de variation des cônes de chaque pied est cité dans le tableau ci-dessous.

Tableau V : Longueur moyenne et intervalle de variation des cônes de chaque pied.

| Arbres | Longueur moyenne des cônes (cm) | Intervalle de variation (cm) |
|---------------|--|-------------------------------------|
| 1 | 17.05 | 10-20.5 |
| 2 | 14.88 | 11-17 |
| 3 | 14.45 | 8.5-20.4 |

A noter que la longueur moyenne des cônes pour l'ensemble des échantillons est de 15.46 cm avec un intervalle de variation de 8.5 à 20.5 cm. Cet intervalle ne concorde pas tout à fait avec celui donné par GAUSSEN (1964) qui est de 15 à 20 cm et celle relevé par LIU (1971) de 12 à 18 cm. Par contre nos résultats se rapprochent davantage de ceux de SATOUR (1992) qui sont de 8.20 à 18.57 cm.

B. Diamètre des cônes

Les diamètres moyens et intervalles de variation des cônes de chaque pied sont mentionnés dans le tableau VI.

Tableau VI : Diamètre moyen et intervalle de variation des cônes de chaque pied.

| Arbres | Diamètre moyen des cônes (cm) | Intervalle de variation (cm) |
|--------|-------------------------------|------------------------------|
| 1 | 4.54 | 4.1-5 |
| 2 | 4.53 | 4.3-5.2 |
| 3 | 4.55 | 3.5-5.1 |

Selon LUI (1971) le diamètre des cônes d'*Abies numidica* est de 4 à 6 cm, nos mensurations ont révélé un diamètre compris entre 3.5 à 5.2 cm.

C. Poids des cônes

Le tableau VII représente le poids moyen et intervalle de variation des cônes de chaque pied.

Tableau VII : Poids moyen et intervalle de variation des cônes de chaque pied.

| Arbres | poids moyen des cônes (g) | Intervalle de variation (g) |
|--------|---------------------------|-----------------------------|
| 1 | 156.52 | 90.4-251 |
| 2 | 139.47 | 96.8-175.7 |
| 3 | 136.04 | 80.3-254 |

Le poids moyen des cônes des trois arbres de Sapin de Numidie est de 144.01 g avec un minimum de 80.3 g et un maximum de 254 g ; alors que SATOUR (1992) a relevé un poids moyen de 82.43g et un intervalle de 29.32 à 158.92g.

II.1.2. Morphologie de la graine

La graine de sapin comme celle du cèdre, appartient à la classe des graines à tégument mou avec de larges poches résinifères (GAUSSEN, 1955). Elle est de grosseur moyenne, avec une forme triangulaire, allongée et pointue munie d'une aile bien développée. Cette dernière permet un bon accomplissement de la dissémination (GAUSSEN, 1955). Selon le

même auteur, elle est formée par le tégument de l'écaille (**Fig.8, A**).

II.1.3. Différents types de graines

Les graines sont disposées par deux à l'aisselle de chaque écaille ventrale du cône (**Fig.8, B**).

Après décortication du cône de sapin, deux types de graines sont trouvés : les graines fertiles et les graines vaines. Ces deux types de graines ont été signalés par TOTH (1978), DERRIDJ (1990), et KROUCHIT (2011) chez le cèdre ; SATOUR (1992) et LEBTAHI (2001) chez le sapin.

- **Le type 1** : les graines sont fertiles, contenant un embryon et localisées au milieu du cône. Elles sont aptes à germer et à donner un nouvel individu (**Fig.8, C**).

- **Le type 2** : les graines sont vides ou contenant un embryon desséché, localisées pour la plupart aux extrémités du cône (**Fig.8, D**).



Figure 8 : Graines de sapin. **A-** Graine de sapin munie d'une aile bien développée. **B-** Face ventrale d'écailles du cône de sapin portant deux graines côte à côte. **C-** Graine fertile. **D-** Graines vaine.

Nous avons distingué six catégories de graines vaines (**Fig.9**) :

Catégorie 1 : sont des graines similaires et identiques aux graines pleines dans la taille et la forme et qui ont des poches résinifères ; elles se localisent au milieu du cône. Une coupe longitudinale révèle un embryon desséché et aplatie avec un endosperme lignifié.

Catégorie 2 : c'est des graines généralement localisées au-dessus des graines de la catégorie 1 ; elles sont aplaties et plus petites et leur tégument est résinifère. L'endosperme est complètement lignifié et l'embryon est absent.

Catégorie 3 : sont des graines fines et allongées, elles sont dépourvues d'embryon et présentent des poches résinifères et se localisent dans la partie inférieure et supérieure du cône.

Catégorie 4 : sont des graines très petites avec des ailes réduites dépourvues d'embryon et de poches résinifères. On les trouve dans la partie supérieure du cône.

Catégorie 5 : ces graines présentent une taille extrêmement aplatie et lignifiée et sont dépourvues d'embryon et des poches résinifères. Elles se localisent à la base et au sommet du cône.

Catégorie 6 : ces graines sont extrêmement petites et très aplaties, risque de ce confondre avec l'aile, sans poches résinifères. Elles sont localisées aux deux extrémités du cône.



Figure 9 : Catégorie des graines vides.

D'après nos observations nous avons remarqué que les bonnes graines se localisent dans la zone fertile du cône (au milieu), alors que les graines vaines, se retrouvent essentiellement au sommet ou à la base du cône. Selon LEBTAHI, (2001), l'autofécondation pourrait être à l'origine des graines vides ou à l'absence de pollinisation (DERRIDJ, 1990). A noter que les conditions climatiques peuvent jouer également un rôle non négligeable sur la qualité et la quantité des graines produites.

TOTH (1978) in KHANFOUCI (2005), rapporte que les graines sont de bonne qualité quand la fructification est bonne.

Les travaux de KHANFOUCI (2005) sur le cèdre de l'Atlas, ont montré que la production des graines fertiles et des graines vaines dépend de l'année de fructification, du cône lui-

même et de l'influence de la position des cônes sur l'arbre. Selon le même auteur, l'étude de la production qualitative et quantitative des graines, a révélé que les cônes les plus dimensionnés sont les plus productifs et sont situés sur les branches les plus hautes.

Par ailleurs, nous avons trouvé que plusieurs graines hébergent des larves qui vivent au détriment des réserves de la graine. L'embryon est alors endommagé et dévoré. Ce parasite risque de contaminer les graines saines et de réduire la qualité des semences (**Fig.10**).

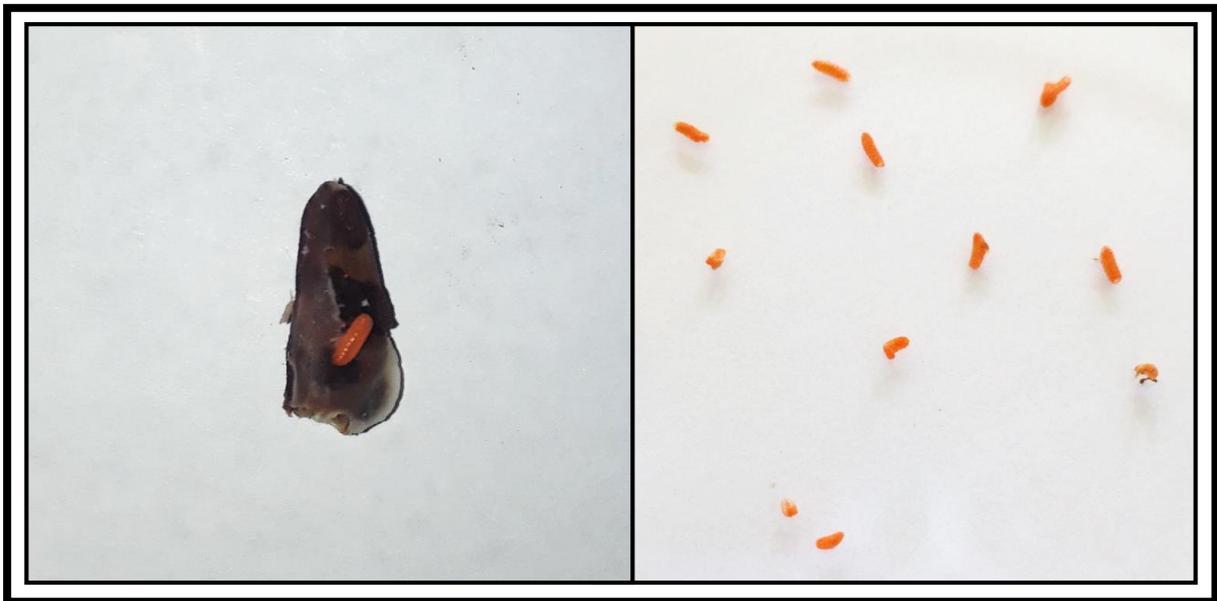


Figure 10 : Larves (parasites des graines de sapin).

II.1.4. Anatomie de la graine

La graine de sapin est constituée de trois parties (**Fig.11**)

- **L'embryon** : plantule en miniature occupant la partie centrale de la graine le long de l'endosperme. Il est composé d'une tigelle, d'une radicule et de cotylédons dont le nombre varie entre 4 et 8 chez le sapin.
- **L'endosperme** : occupe le contenu de la graine, de couleur blanche qui entoure l'embryon. C'est un tissu de réserve nutritif chargé de réserves amylacée, protidiques et lipidiques, que l'embryon exploitera au cours de son développement et lors de la germination (DUCHATRE, 1970).

- **Le tégument** : il constitue l'enveloppe de la graine et protège ainsi l'embryon. Il comprend plusieurs poches résinifères (5 à 7), qui s'éclatent lors de la moindre pression exercée sur elles. La substance dégagée est une résine huileuse et parfumée. La nature résinifère de l'enveloppe séminale assure une barrière aux micro-organismes et rend difficile la perméabilité à l'eau réalisant ainsi son rôle protecteur (LIU, 1971).

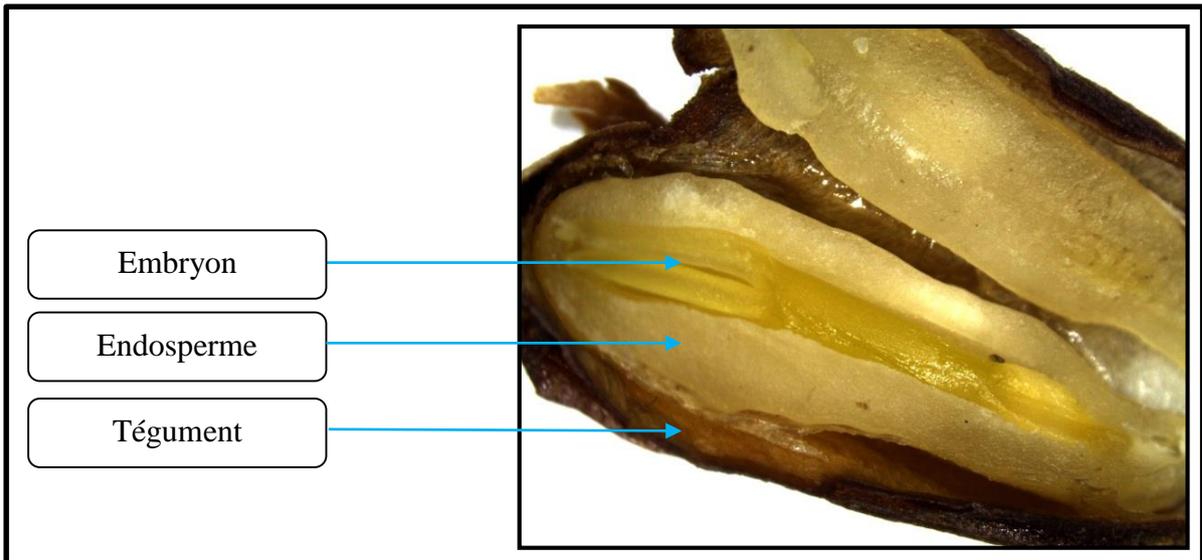


Figure 11 : Coupe longitudinale au niveau de la graine montrant les différentes parties qui constituent la semence X1.

II.2. Etude de la germination de la graine de sapin

La germination est la reprise de l'activité de l'embryon qui se manifeste par l'apparition de la radicule.

TOTH (1978) définit la germination comme étant le passage d'une vie latente (dormante) de la graine à la vie active, sous l'effet des conditions favorables. Ces dernières peuvent être intrinsèques (taille et état physiologique de la graine, âge et condition de développement de la plante), et extrinsèques (hydratation, température, oxygène et quelque fois la lumière).

II.2.1. Effet du prétraitement au froid humide et de température sur la germination.

Dans le but d'améliorer le taux de graines germées, un prétraitement au froid humide est opéré. Les résultats sont représentés dans les figures suivantes :

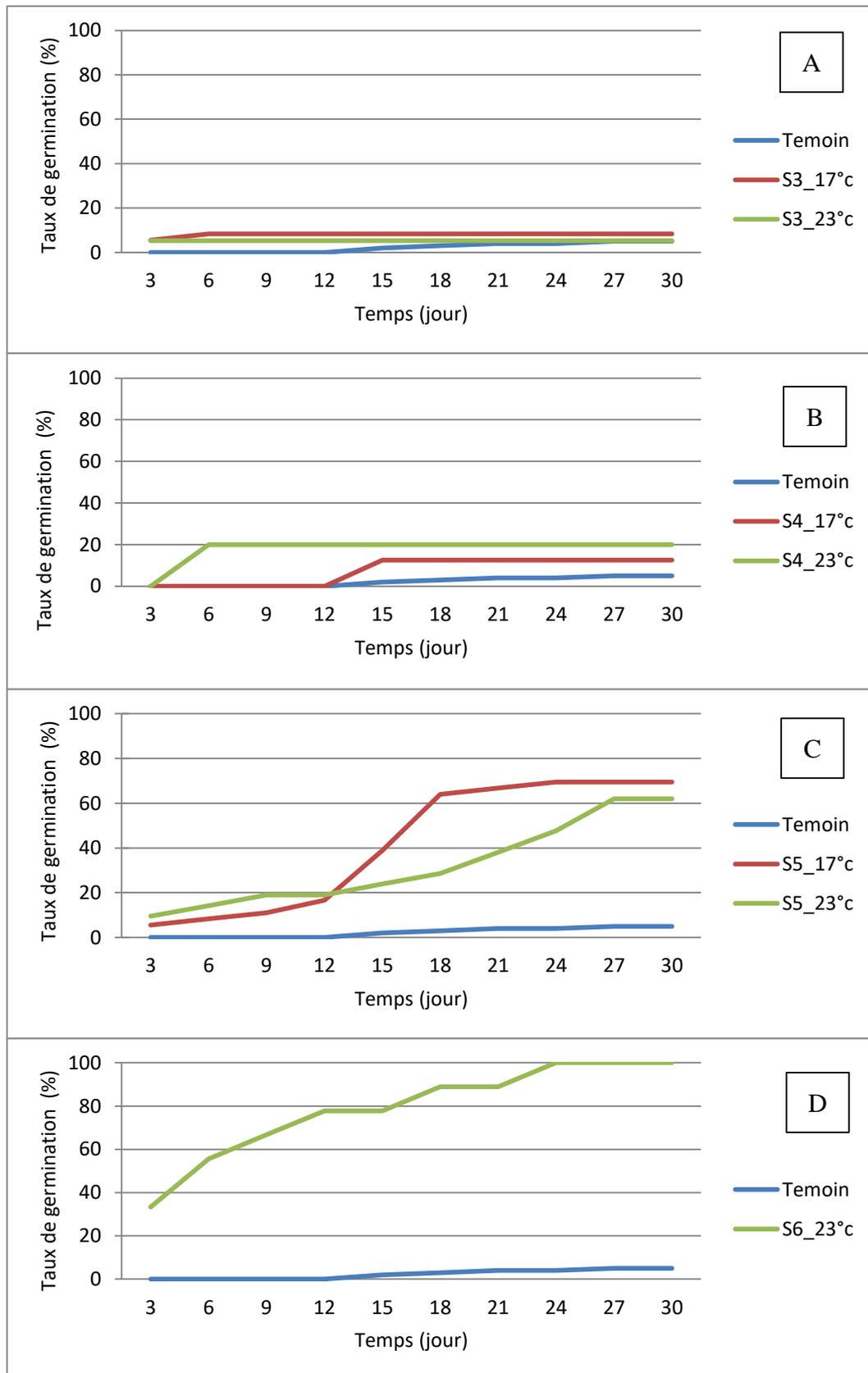


Figure 12 : Effet de la durée du prétraitement au froid humide sur la germination des graines de sapin.

Les résultats obtenus montrent que la période de prétraitement des graines au froid humide (4°C), pendant 3, 4, 5 et 6 semaines influe sur le taux de germination des graines de sapin. Le témoin n'ayant pas subi de prétraitement présente un taux de germination faible de l'ordre de (5 %) (**Fig.13,A**). Cependant, les graines prétraitées au froid humide à 4°C ont présenté un taux de germination plus élevé. Des différences des taux de germination ont été relevées entre les différentes périodes de prétraitements.

Nos résultats ont montré que la température de germination a aussi un effet important sur le taux de germination des graines de sapin. Des variations importantes des taux de germination ont été observées selon la température de germination.

Après 3 semaines de prétraitement des graines au froid humide, le taux de germination des graines est très faible de 5,3% à la température de 17°C et de 8,3% à 23°C (**Fig.12, A**).

La germination des graines traitées durant 4 semaines est toujours faible 12,5% à 17 °C et elle atteint seulement 20% à 23 °C après 30 jours de germination (**Fig.12, B**). Les graines non germées n'ont pas le même état physiologique ce qui explique leur non germination.

Cependant, après une durée de 5 semaines de prétraitement des graines au froid humide, le taux de germination atteint 64 % à la température 17 °C et 38,1% à 23 °C à la fin de l'essai de germination (**Fig.12, C**).

Durant 6 semaines de prétraitements, la germination devient rapide et atteint le taux de 80% aux 18^{ème} jours et un maximum de 100 % après 30 jours de germination à la température de 23 °C (**Fig.12, D**), (**Fig.13,B**).

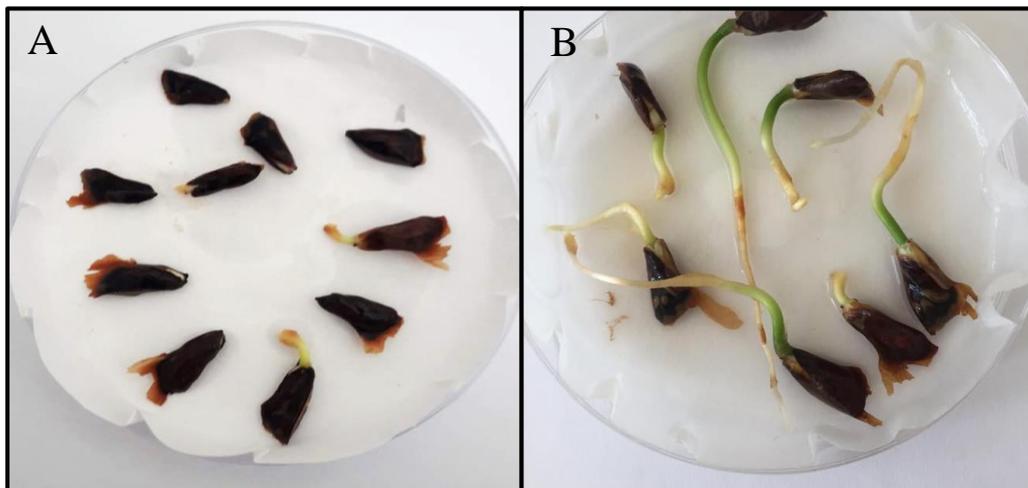


Figure13 : A- Germination hétérogène des graines de sapin. **B-**Germination homogène après traitement au froid humide à 4°C.

Ces essais ont révélé, que la germination d'un lot de graines de sapin dépend énormément des conditions dans lesquelles elles sont placées et que les semences d'un même lot ne germent pas simultanément.

SATTOUR (1992), sur la même espèce a obtenu des taux de germination plus élevés de 94% à la deuxième semaine de prétraitement au froid, alors que LEBTAHI, (2001) a relevé un pourcentage de l'ordre de 84,75% à 22°C après 4 semaines d'incubation au froid. D'après COME (1970), la durée de prétraitement varie fréquemment d'une récolte à l'autre et les semences de chaque récolte ont leurs exigences propres qu'il est difficile de fixer à priori.

Les travaux de SATTOUR (1992), LEBTAHI (2001) et de ILLOUL (2016) indiquent que les graines de sapin sont affectées par le phénomène de dormance primaire, d'origine embryonnaire, tout comme chez les semences de cèdre (DERRIDJ, 1990) et qu'un prétraitement au froid humide rend progressivement les graines capable de germer.

D'autre part, MAZLIAK (1982) rapporte que les graines fournies par les plantes jeunes, germent beaucoup mieux que celles produites par les plantes âgées et que toutes les semences produites par une plante n'ont pas forcément le même comportement. Ces différences de propriétés germinatives peuvent provenir de la taille des semences, de leur position sur la plante, de leur état de maturité.

II.2.2. Germination en pot

Les graines prés- germées en étuve à (17-18°C et 22-23°C), sontensemencées dans un pot contenant de la tourbe, et placées à la température ambiante. Après trois semaines de culture, on assiste à la levée de la totalité des semis (croissance de la tige et étalement des cotylédons) (**Fig.14, A**). Ainsi, les plantules obtenues vont servir d'explants primaires.

A Signaler que plusieurs semis attaqués par la fonte de semis (champignon pathogène), dans la culture en pot ont été constatés (**Fig14, B**). Il s'agit d'un champignon qui attaque principalement la racine des résineux, entraînant ainsi leur dépérissement.

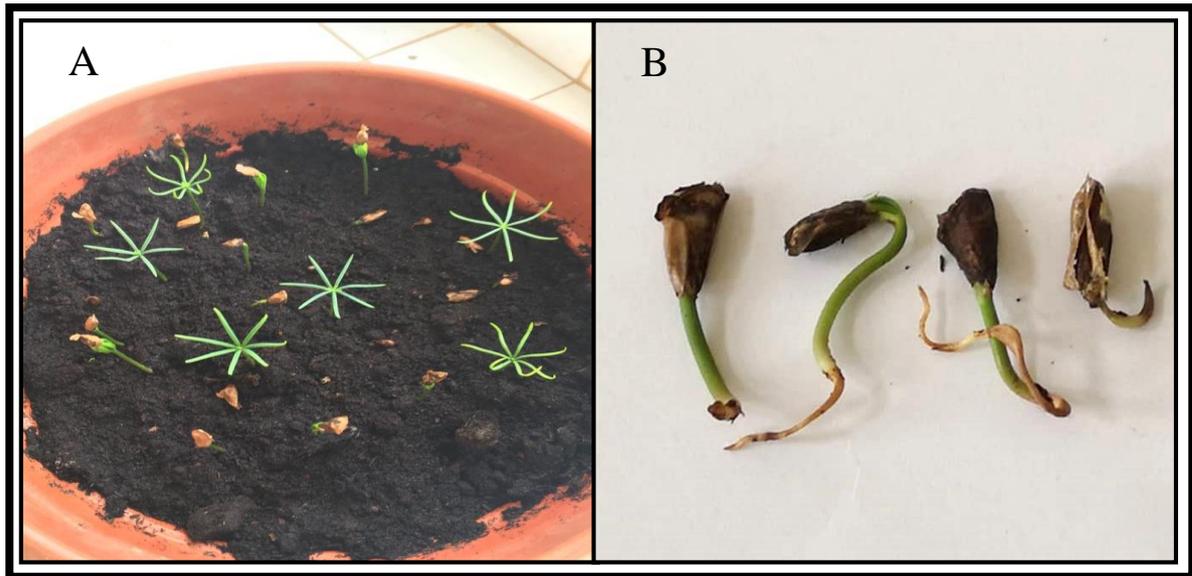


Figure14 : A-Germination des graines en pot. B- Racines attaquée par la fonte de semis.

II.2.3. Phénomène morphologique de la germination des graines de sapin de Numidie.

Au cours de l'expérimentation, nous avons étudié le phénomène de germination, la croissance ainsi que le développement des plantules.

Au moment de la germination, il se produit une percée du tégument, avec apparition et élongation de la radicule. Différentes phases de la germination sont relevées successivement (**Fig.15, A**) :

- Imbibition de la graine.
- Gonflement puis ouverture du micropyle.
- Apparition de la radicule.
- Croissance de la radicule.
- Développement de l'hypocotyle portant l'enveloppe à son extrémité.
- Chute de l'enveloppe et libération des cotylédons.

La germination des graines de sapin est de type épigée (**Fig15, B**).



Figure 15 : A-Différentes étapes de développement de la graine. B- La germination des graines de sapin et de type épigée.

II.3. Multiplication par culture *in vitro* du sapin de Numidie

II.3.1. Stérilisation du matériel végétal

Le traitement phytosanitaire du matériel végétal utilisé est impératif pour l'obtention de cultures stériles. Les résultats obtenus sont consignés dans les tableaux VIII et IX.

Tableau VIII : Action de l'hypochlorite de sodium à 12° sur la stérilisation des plantules de 3 à 4 semaines.

| Désinfectants | Temps de stérilisation | Nature de l'explant | Contamination (%) |
|------------------------------|------------------------|-------------------------|-------------------|
| Alcool à 70° | 30 s | Plantules de 4 semaines | 70 |
| Bénomyl à 3 g/l | 2 mn | | |
| Hypochlorite de sodium à 12° | 4 mn | | |

Tableau IX : Effet d' H_2O_2 à 110v et l'Hypochlorite de sodium à 12° sur la stérilisation des graines immatures.

| Désinfectants | Temps de stérilisation (mn) | Contamination (%) |
|------------------------------|-----------------------------|-------------------|
| Alcool à 70° | 2 | 10.7 |
| Bénomyl à 3 g/l | 30 | |
| H_2O_2 à 110v | 30 | |
| Hypochlorite de sodium à 12° | 30 | |

L'examen du (**tableau VIII**) révèle que l'utilisation de l'hypochlorite de sodium à 12° a enregistré un pourcentage de 70% chez les plantules de 3-4 semaines. Cette solution désinfectante n'a pas permis une bonne stérilisation du matériel végétale. Nos résultats sont comparables à ceux de LEBTAHI, (2001) et KHATER (2018). Le remplacement de l'hypochlorite de sodium par l'hypochlorite de calcium ou autre solution désinfectante est nécessaire.

Quant à la technique de stérilisation des graines immatures pour l'extraction des embryons zygotiques (**tableau IX**), la combinaison de H_2O_2 à 110v et l'Hypochlorite de sodium à 12° , nous a permis d'enregistrer un pourcentage de contamination satisfaisant de l'ordre de 10.77%.

Cette solution stérilisante s'est avérée adéquate dans la réduction du taux de contamination. Elle a été donc retenue pour la désinfection des graines.

De même BENMAHIOUL (2009) ; GHOBINI (2010) et KHATER (2018) ont obtenu des taux de contaminations très faibles des graines de différentes espèces qui sont respectivement le pistachier, palmier dattier et le genévrier par l'utilisation de l'hypochlorite de sodium seul.

A noter que, les contaminants rencontrés lors de la mise en culture sont soit des champignons soit des bactéries.

II.3.2. Micropropagation par organogénèse directe

II.3.2.1. Action de la BAP seule sur l'initiation des bourgeons axillaires

Notre travail a consisté à un essai d'induction de bourgeons axillaires à l'aisselle des feuilles cotylédonaire d'apex mis en culture. La plupart des travaux indiquent que la présence des cytokinines dans le milieu de culture est nécessaire à l'expression du bourgeonnement (FOURET *et al.* 1984, ARNAUD *et al.* 1993 ; DAVID et DAVID 2014; LEBTAHI, 2017).

Pour ce faire, nous avons utilisé le milieu MS additionné d'une gamme de concentration en BAP. Les résultats obtenus sont rapportés dans le **(tableau X)**.

Tableau X : Influence de la concentration de la BAP sur le bourgeonnement des explants.

| Milieu | Concentration de la BAP (mg/l) | % d'explants ayant Débourrés | % d'explants ayant développés des bourgeons axillaires | % d'explants formant un cal basal |
|--------|--------------------------------|------------------------------|--|-----------------------------------|
| M0 | 0 | 16% | - | 0% |
| M1 | 0.1 | 100% | 16.6% | 80% |
| M2 | 0.6 | 100% | - | 50% |
| M3 | 1 | 80% | - | 0% |

Le tableau X révèle qu'après 5 semaines de culture, la réactivité des explants s'exprime par le débourrement du bourgeon apical (**Fig.16, A**). Le maximum de bourgeons apicaux éclaté est de l'ordre de 100% est enregistré avec le milieu M1 et M2.

La concentration la plus élevée 1 mg/l ne semble pas induire une réponse conséquente sur la néoformation des bourgeons. Nous avons relevé un débourrement, de l'ordre de 80%. Le témoin quant à lui a enregistré un pourcentage de réactivité faible, qui est de 16%.

Nous avons pu observer que les explants cultivés sur les différents milieux sont vigoureux et présentent un bon état foliaire (**Fig.16, B**).

Le bourgeon apical une fois éclaté, donne naissance à de petites feuilles, sous forme d'une touffe, de couleur jaune verte (**Fig.16, C**).

Le milieu M1 (0.1mg/l BAP) a permis de relever un taux de bourgeons axillaires de l'ordre de 16.6% à l'aisselle de la feuille cotylédonaire (**Fig.16, D**).

Cependant, les autres concentrations n'ont pas enregistré la néoformation de bourgeons. Nous nous garderons de toute conclusion hâtive quant à l'absence de l'induction de bourgeons axillaires en présence du reste des concentrations testées.

A signaler également que les explants ont tendance à former un cal basal au contact du milieu de culture avec les concentrations de 0.1 et 0.6 mg/l de BAP (**Fig.16, B**) ; à l'exception du témoin et du milieu M3.

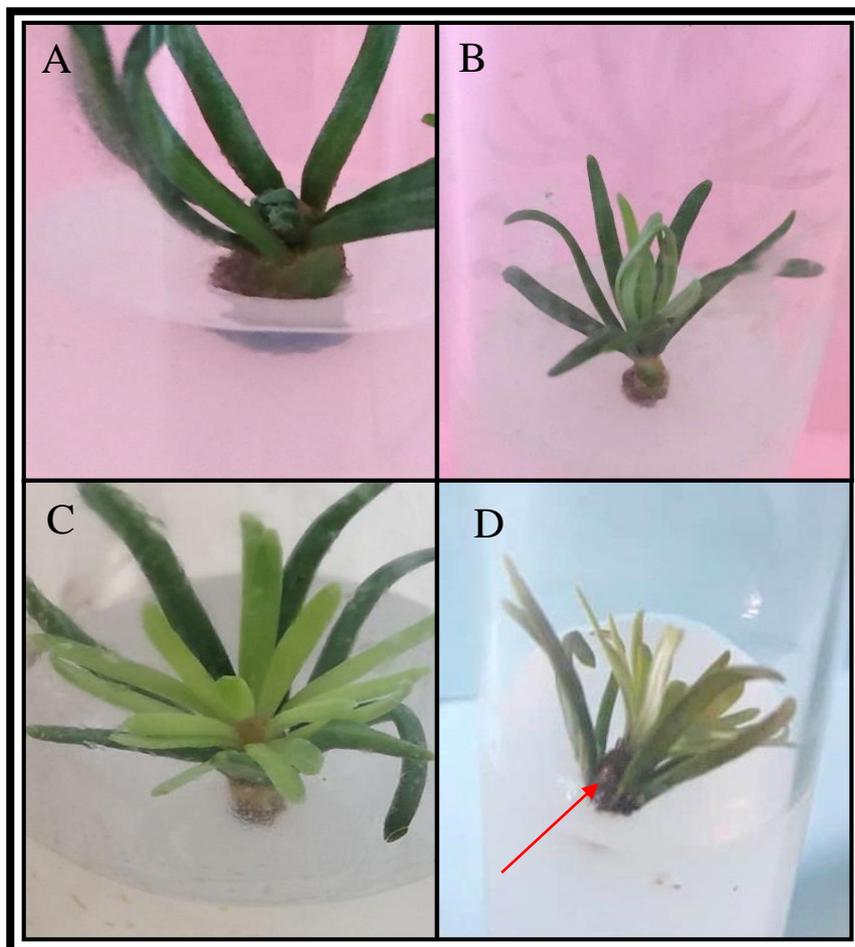


Figure16 :A- Eclatement du bourgeon apical. B- Développement du bourgeon apical en une touffe de feuilles. C-Étalement de feuilles de couleur jaune verte. D-Développement du bourgeon axillaire à l'aisselle de la feuille cotylédonaire.

Ce résultat montre bien que la BAP a permis incontestablement le développement de bourgeons axillaires et le débourrement du bourgeon apical. Les cytokinines sont indispensables pour le débourrement, la multiplication et la croissance des pousses (SKOOG et MILLER, 1957). En effet, la majorité des chercheurs ont également signalé l'efficacité de la BAP dans l'induction et l'obtention de taux de débourrement élevés chez plusieurs arbres ligneux (SAHOO and CHAND, 1998; PANDEY *et al.*, 2006; TRIPATHI et KUMARI, 2010; GERMANA *et al.*, 2011).

MURASCHINGE et SKOOG (1962), indique que la caulogénèse dépendrait d'un rapport optimal des concentrations en cytokinines et en auxines exogènes et endogènes. Les effets souvent variables selon l'espèce et les conditions de l'application de divers régulateurs montrent bien la complexité des interactions mis en jeu (MARGARA, 1982).

D'après DAVID *et al.*, (1977) ; KHELIFI, (1990) l'utilisation d'une cytokinine seule, chez les gymnospermes est généralement suffisante pour induire la néoformation de bourgeons. L'association avec une auxine est non seulement inutile, mais elle favorise souvent la callogénèse au détriment de la caulogénèse induite par la BAP (SCHWARZ *et al.*, 1988).

D'autres essais supplémentaires s'avèrent importantes pour arriver aux résultats escomptés.

II.3.3. Stimulation directe des bourgeons adventifs sur des segments de tiges, de racines et de cotylédons issus de semis âgés de 3 à 4 semaines.

Cette expérience a pour but de stimuler directement le développement des bourgeons sans passer par cal. Des fragments de tiges, de racines et de cotylédons sont ensemencés en tubes à essai en présence de différentes concentrations en BAP (0.1, 0.6 et 1) mg/l. Les résultats sont exprimés dans le (tableau XI).

Tableau XI : Action de la BAP seule sur le développement de bourgeons adventif chez les segments de tiges, racines et de cotylédons.

| Milieu | Concentration de la BAP (mg/l) | % d'explants ayant développés des bourgeons adventifs | | |
|--------|--------------------------------|---|---------|------------|
| | | Tiges | Racines | Cotylédons |
| M0 | 0 | - | - | - |
| M1 | 0.1 | - | - | - |
| M2 | 0.6 | - | - | - |
| M3 | 1 | - | - | - |

Les résultats rapportés dans le tableau XI n'affichent aucune réaction des explants (racines, tiges et cotylédons) sous les différentes concentrations testées après 5 semaines de culture.

II.4. Organogénèse indirecte

Les essais consistent en l'initiation de cals sur des fragments de tiges, racines et cotylédons sous l'action d'une auxine seule.

Les segments de tiges, racines et de cotylédons issus de plantules de 3 à 4 semaines sont ensemencés sur le milieu de culture MS additionné de 2mg/l de 2.4-D.

Les résultats obtenus montrent que les fragments de tiges et les segments de cotylédons réagissent favorablement à la lumière, avec un pourcentage de cal formés de l'ordre de (100% et 80%) respectivement, en développant des cals chlorophylliens (**Fig.17, A et B**).

Les racines quant à elles n'affichent aucune réaction.

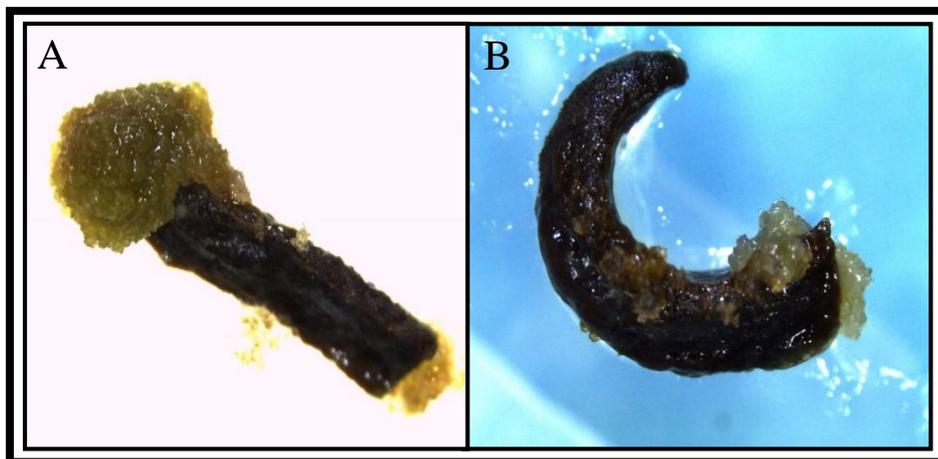


Figure 17 : A- Développement de cal sur les deux extrémités du fragment de la tige sur milieu MS additionné de 2 mg/l de 2.4-D X1. B- Formation de cal au niveau de la partie sectionnée du cotylédon sur milieu MS additionné de 2 mg/l de 2.4-D X1.

II.5. Embryogenèse somatique

L'embryogenèse somatique est aussi une technique efficace de propagation des ligneux, du fait de son taux de multiplication élevé. Cette méthode est déjà utilisée à l'échelle industrielle pour la production en masse de plusieurs espèces forestières (ZAREI, 2017 ; HAZUBSKA, 2019 ; MARIE *et al.*, 2020). Nous l'avons donc utilisé sur le sapin de Numidie.

II.5.1. Effet de la nature de l'auxine seule AIB ou 2.4-D sur l'initiation, la croissance des cals et le développement des embryons somatiques.

De nombreux auteurs signalent l'importance de l'utilisation de l'auxine seule, pour l'obtention des embryons somatiques chez plusieurs espèces, telles que le chêne Willow

(WELLS *et al.*, 2005), *Pinus sylvestris* (HAGGMAN *et al.*, 1999) et le coton (ZHANG *et al.*, 2001). Un essai a été donc réalisé dans ce sens, les expérimentations ont porté sur la détermination de l'action de l'AIB seule en comparaison avec le 2.4-D seul.

Pour ce faire, 6 concentrations sont évaluées pour leur potentiel d'initiation de cals et d'embryons somatiques.

Les milieux testés sont les suivants:

| | |
|--|-----|
| Milieu MS sans hormone | M4 |
| Milieu MS + 1 mg/l de 2.4-D..... | M5 |
| Milieu MS + 2 mg/l de 2.4-D..... | M6 |
| Milieu MS + 3 mg/l de 2.4-D..... | M7 |
| Milieu MS + 1 mg/l de AIB | M8 |
| Milieu MS + 2 mg/l de AIB | M9 |
| Milieu MS + 3 mg/l de AIB | M10 |
| Milieu MS + (2mg/l AIB + 2mg/l BAP)..... | M11 |

Milieu M4 : sur ce milieu de culture les embryons zygotiques immatures ont germé et se sont développés en petites plantules vigoureuses de couleur verte. Aucun cal n'a été relevé (**Fig.18, A**).

Les Milieux M5, M6, M7 : sur ces milieux, les cals produits sont de nature dure et de couleur brune. La prolifération cellulaire est lente sur ces milieux. Les embryons présentent un développement des cotylédons et une croissance très réduite de l'hypocotyle avec formation de cals sur les cotylédons et parfois sur la tigelle. Un gonflement de la racine a été relevé (**Fig.18, B**).

Les milieux M8, M9, M10 : sur ces milieux, les embryons présentent un développement de l'hypocotyle et des cotylédons avec formation de cals aussi bien sur la tige que sur les cotylédons (**Fig.18, C**). Certaines tiges s'épaississent avec enroulement des cotylédons (**Fig.18, D et E**).

La racine gonfle, les cals produits sont de nature friable, mous, compacts et vitreux (**Fig.19, A et B**) de couleur blanchâtre et beige.

A noter que les manifestations callogène débutent à la deuxième semaine de culture.

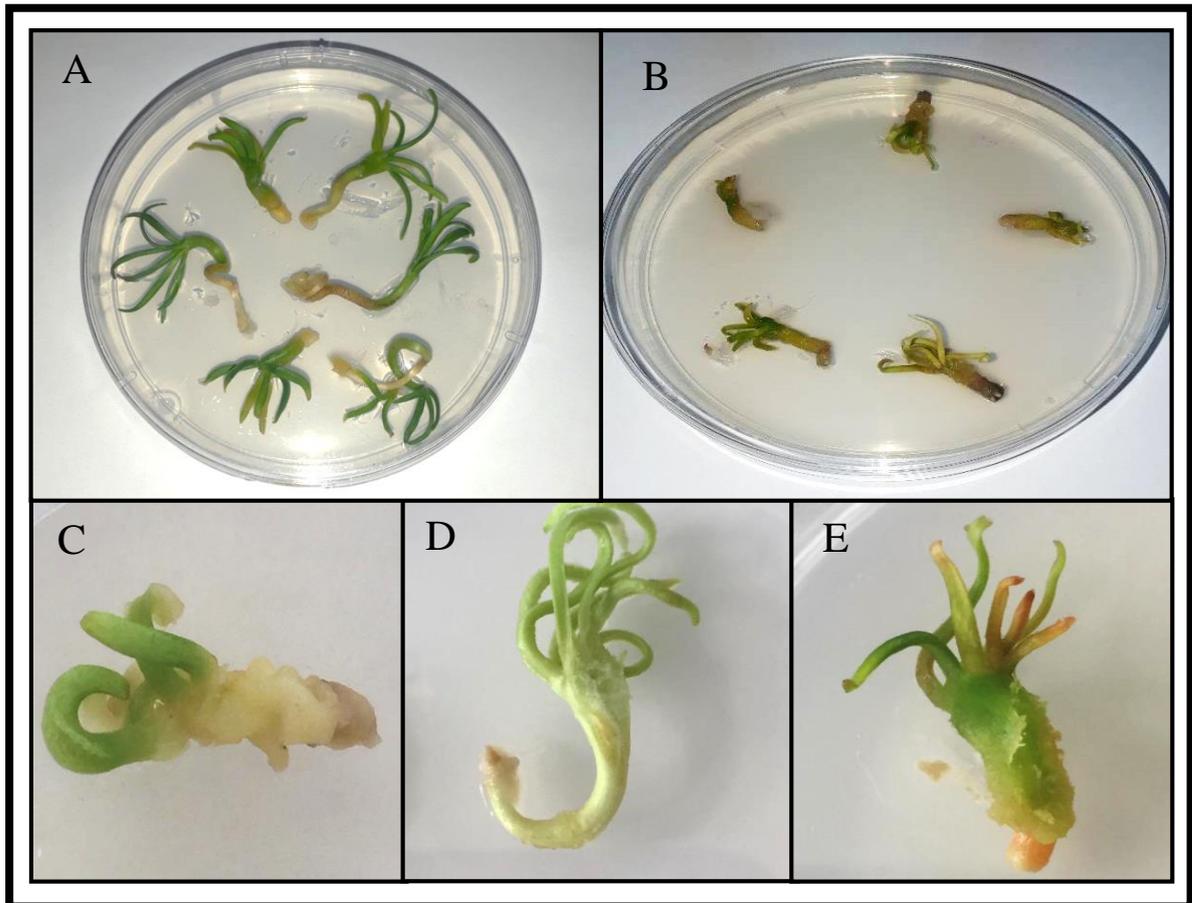


Figure 18 : **A-** Embryons cultivés sur milieu MS sans hormone. **B-** Embryons cultivés sur milieu MS + 2.4-D. **C-** Envahissement progressif de la tige et du cotylédon par le cal. **D-** Croissance de la tige avec épaissement et éclatement de l'hypocotyle et enroulement des cotylédons. **E-** Gonflement de la tige suivi de son éclatement et apparition d'un amas de cellules indifférencié (cal).

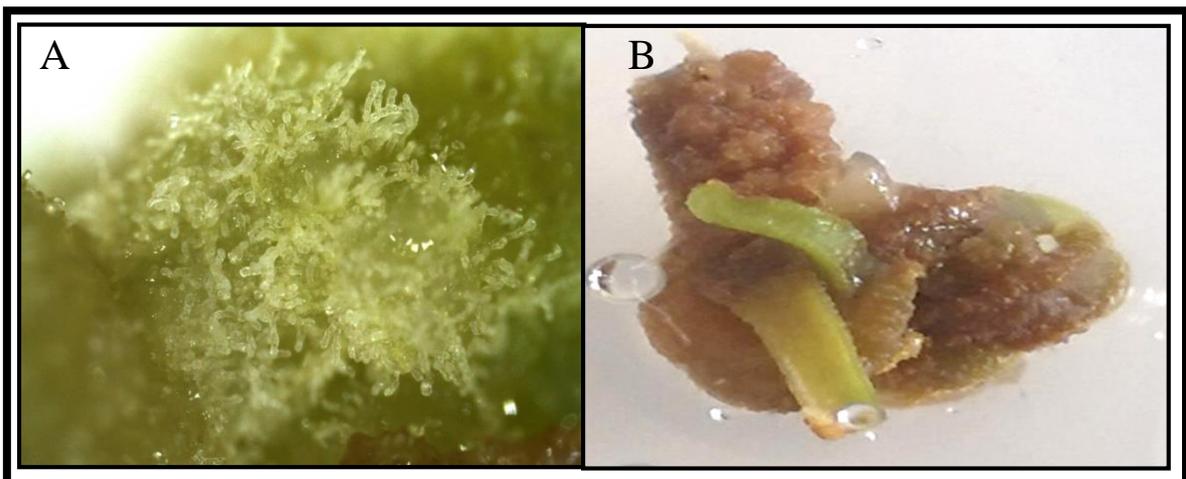


Figure 19 : **A-** Cal vitreux X1. **B-** Embryons cultivés sur milieu MS + 3mg/l AIB : Développement de cals volumineux

II.5.2. Analyse des données

Les résultats de la réactivité des embryons zygotiques immatures ainsi que les mesures de la surface moyenne des cals sont illustrés par les figures 20 et 21 :

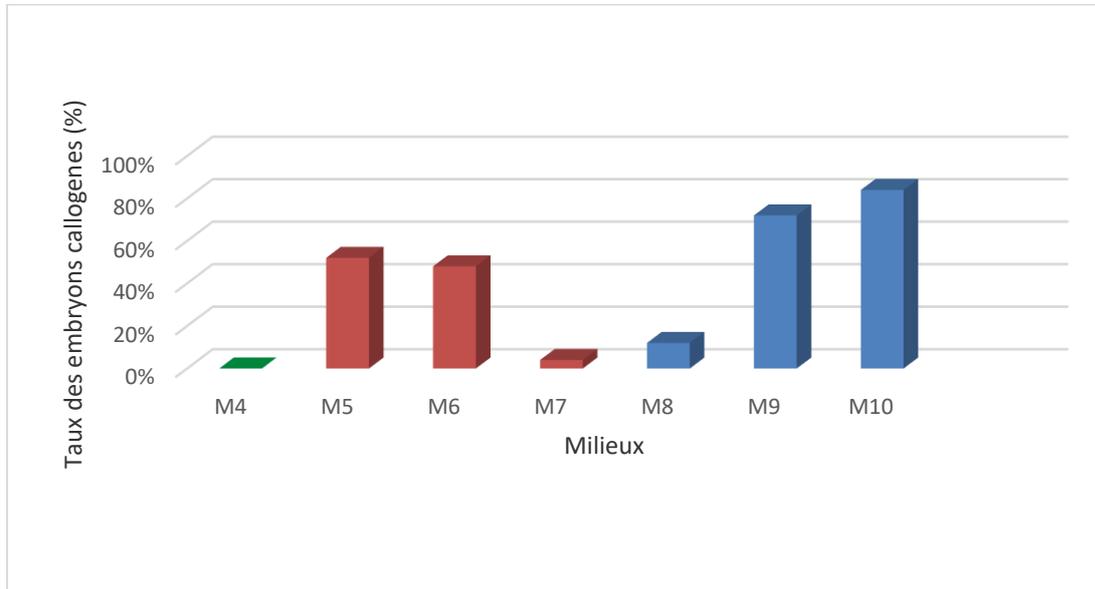


Figure 20 : Action des différentes concentrations du 2.4-D seul (M5, M6, M7) et d'AIB seule (M8, M9, M10) sur la réactivité des embryons zygotiques immatures.

L'examen de la figure 20 révèle que les différents milieux testés ont affectés le pourcentage de la callogénèse.

L'AIB seul ainsi que le 2.4-D seul, à toutes les concentrations utilisées ont induit le développement de cals. Cependant, en présence d'AIB seul, (**M8, M9, M10**) les embryons répondent avec un taux de l'ordre de (12, 72 et 84) % respectivement, alors qu'en présence du 2.4-D seul (**M5, M6, M7**) nous avons relevé un pourcentage de (52, 48 et 4)% respectivement.

Il ressort de cet essai que les embryons zygotiques manifestent une certaine affinité vis-à-vis des régulateurs de croissance.

La figure 21 montre une différence dans la croissance des cals placés dans les différents milieux testés.

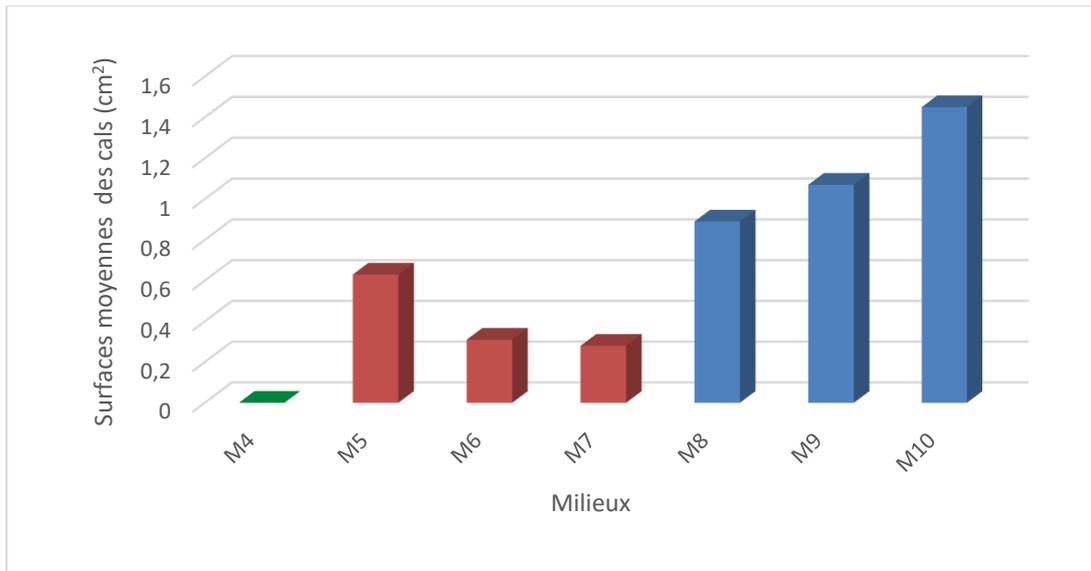


Figure 21 : Effet des différentes concentrations du 2.4-D seul (M5, M6, M7) et d'AIB seul (M8, M9, M10) sur la prolifération cellulaire.

L'histogramme montre une augmentation de la croissance des cals, en fonction de l'augmentation de la concentration d'AIB. Le milieu M10 s'est distingué en offrant une meilleure croissance de cal (1.45 cm²), suivi du milieu M9 avec une surface de (1.07 cm²) et M8 avec (0.89 cm²).

Quant aux milieux (M5, M6, M7), ils provoquent une callogenèse peu efficace voir faible (0.63, 0.31, 0.28) cm² respectivement. Ceci traduit probablement une certaine toxicité de cette hormone étant qualifiée de forte. Les embryons zygotiques ne semblent donc pas apprécier ce régulateur de croissance. Ce résultat est similaire à celui obtenu par LEBTAHI (2001).

A signaler qu'au niveau de ces traitements, des cals de nature globulaire ont été obtenu sur le milieu AIB seul à 3mg/l (**Fig.22, A**). Cette phytohormone AIB est intéressante dans la mesure où elle pourrait orienter les cellules globulaires vers une formation d'embryons somatiques quand les conditions du milieu de culture lui sont favorables.

De même, nous avons relevé des cals ayant néoformé des cellules rondes translucides d'apparence vitreuse, (cal non embryogène) (**Fig.22, B**).

Milieu M11 : Les cals obtenues sur les différents milieux avec l'auxine seul AIB et 2.4-D, ont été transférés sur le milieu MS contenant une combinaison (d'auxine + cytokinine), (2mg/l AIB + 2mg/l BAP).

Sur ce milieu, nous avons pu observer des cals nodulaires (**Fig.22, C**). De plus, une racine blanche a été constatée sur un cal compact. C'est un cal organogène, reste à vérifier par une étude histologique (**Fig.22, D**).

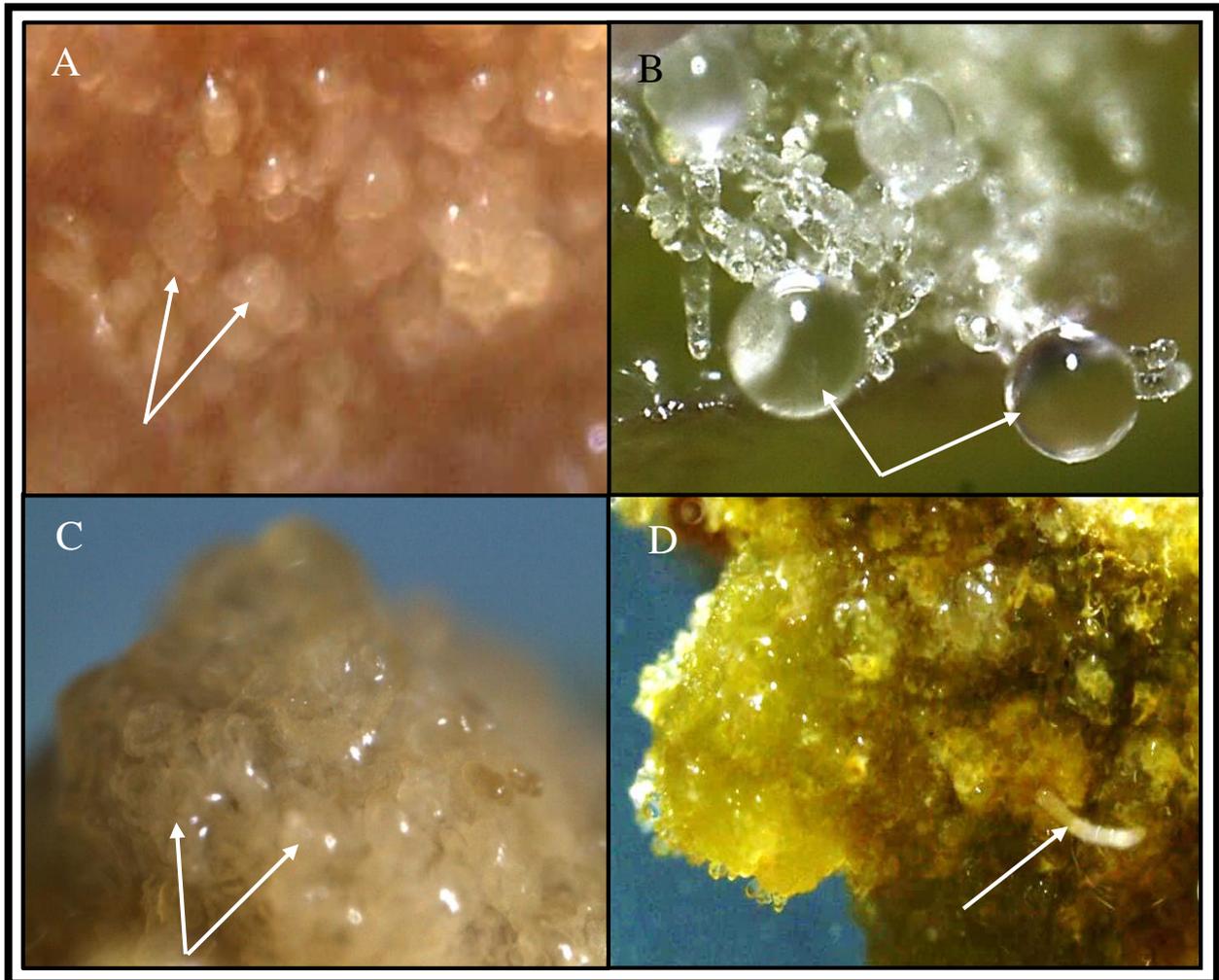


Figure 22 : **A-** Cellules globulaires rondes blanc nacré X5. **B-** Cellules rondes translucides cal vitreux non embryogène X8. **C-** Cal nodulaire X5. **D-** Développement d'une racine, cal organogène X1.7.

CONCLUSION

Cette étude se proposait de déterminer les possibilités de multiplication rapide et intense du sapin de Numidie selon la voie de l'organogenèse directe et la voie de l'embryogenèse somatique.

Il ressort de ce travail un certain nombre d'informations intéressantes :

La décortication d'un cône de sapin révèle que les bonnes graines se localisent au milieu de celui-ci, alors que les graines vides se trouvent à ces deux extrémités.

Nous avons également constaté plusieurs graines vides dans le lot de semences utilisé.

A cet effet, une étude approfondie des différentes étapes du cycle reproducteur du sapin de Numidie est à envisager.

Pour ce qui est de la germination des graines, les résultats obtenus mettent en évidence le rôle important du prétraitement au froid humide pour stimuler la germination. La durée de 5 à 6 semaines de prétraitement au froid est considérée comme une période optimale de levée de dormance des graines de sapin.

Quant aux travaux consacrés à la micropropagation, les essais ont montré l'importance d'une bonne désinfection du matériel végétal, pour l'obtention d'une culture stérile. L'utilisation de l'hypochlorite de sodium à 12° pour la stérilisation des apex de 4 semaines n'a pas permis une bonne désinfection du matériel végétale. La recherche d'une méthode efficace de stérilisation de ce type de matériel est nécessaire.

Pour ce qui est de la stérilisation des graines, la combinaison H₂O₂ avec l'Hypochlorite de sodium à 12° a permis une bonne désinfection de la surface des graines de sapin.

Les résultats obtenus sur les différents milieux testés pour la micropropagation confirment l'importance à accorder au milieu de culture utilisé. Nous avons relevé un bourgeonnement axillaire avec la concentration de 0.1mg/l de BAP à l'aisselle des feuilles cotylédonaires et le débourrement des bourgeons apicaux. Cette cytokinine stimule incontestablement le développement des bourgeons et paraît indispensable au maintien et à la vigueur des explants.

Cependant, des recherches supplémentaires sur un équilibre hormonal susceptible d'induire une bonne production de bourgeons axillaires sur l'ensemble des explants mis en culture est à prévoir.

Nos essais sur l'organogenèse indirecte ont montré que la présence d'une auxine seule

2.4-D a permis la néoformation de petits cals sur les fragments de tiges et de cotylédons, aucun bourgeonnement n'a été observé. Les racines quant à elles sont restées sans réaction.

L'étude consacrée à l'embryogenèse somatique a révélé que les embryons zygotiques immatures semblent être un bon matériel végétal à exploiter pour cette technique. Les résultats obtenus sur les différents milieux testés sont encourageants. Nous avons pu relever des cals nodulaires.

Le milieu de culture MS semble approprié pour le sapin de Numidie. De même la nature des régulateurs de croissance testés (AIB, BAP, 2.4-D) ont eu leur effet sur la callogenèse et la réactivité du matériel végétal mis en culture.

Par ailleurs, il serait judicieux de prévoir l'utilisation des cultures en milieu liquide, réputées pour leur efficacité dans la production d'embryons somatiques à grande échelle.

Une étude histologique s'impose aux différentes étapes de la culture *in vitro*, afin de déterminer l'origine des organes néoformés obtenus.

A signaler que cette étude n'a pas été poursuivie dans des conditions favorables, pour des raisons sanitaires qu'a connu le pays (confinement).

REFERENCES
BIBLIOGRAPHIQUES

1. **ARNAUD Y., FRANCKET A., TRANVAN H., JACQUES M. 1993.** Micropropagation and rejuvenation of *Sequoia sempervirens* (Lamb) Endl, a review. Annales des sciences forestières, INRA/EDP Sciences, 50 (3): pp 273-295.
2. **AUGE R., BEAUCHESNE G., BOCCON -GIBOD., DECOURTYE L., DIGAT B., JALOUZOT R., MINIER R., MORAND CL., REYNOIRDJ.P., STRULLUD G. et VIDALIE H. 1989.** La culture *in-vitro* et ses applications horticoles. Ed Lavoisier 225p.
3. **BARBERO M. ET QUEZEL P. 1975.** Les forêts de sapins sur le pourtour méditerranéen. Ann. Inst. Bot. Cavanilles, 32 (2): pp 1245-1289.
4. **BARBEY A. 1934.** Une relique de la sapinière méditerranéenne : Les monts Babors. Librairie Agricole de la maison rustique. Paris. pp 1-11.
5. **BENMAHIOUL B. 2009.** Amélioration de la micropropagation *in vitro* du pistachier (*Pistacia vera* L.) en vue de l'extension des vergers en Algérie. Thèse. Doctorat. Université des sciences de la technologie d'Oran. 136p.
6. **BIGOT C. 1980.** Multiplication végétative *in vitro* par néoformation de bourgeons et d'embryons somatiques : La multiplication végétative des plantes supérieures. Gauthier-Villars. pp 133-159.
7. **BONGA J.M. ET VON ADERKAS P. 1992.** *In vitro* Culture of Trees. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, 236p.
8. **BOUAZA F. 1982.** Contribution à l'étude de la végétation et des phénomènes de dégradations du mont Babors, en vue de la protection du site. Thèse ing. I.N.A. Alger.
9. **BOUDY P. 1955.** Economie forestière nord-africaine. Description forestière de l'Algérie et de la Tunisie. tome 4: 38p.
10. **BOULAY M. P., GUPTA P. K., KROGSTRUP P., DURZAN D.J. 1988.** Development of somatic embryos from cell suspension cultures of Norway spruce (*Picea abies* Karst.) Plant. Cell. Reports. 7: pp 134-137.
11. **BOURGFARD F. 1986.** Etude du comportement de cals en milieu solide et en milieu liquide en vue d'une recherche de l'embryogenèse somatique chez le *Sequoia sempervirens*. Thèse D.E.A. en Bio. Vég. Forest. Nancy I. 60p.
12. **BOXUS P. 1995.** Multiplication végétative. Micropropagation et embryogénèse somatique in biotechnologie végétales. BV 93. Ed: Cned. Aupelf- Uref, 191p.
13. **CABANNES., BOUKIL A., BOURDENNET P., JENCEN N., ROBIN C. 1998.** Disponibilité des plants, qualité et utilisation des bois de sapins. Forêt. médit. tome 9 N°2. Spécial Sapins en milieu méditerranéen. pp 193-194.

14. **CAMEFORT H. 1977.** Morphologie des végétaux vasculaires .Ed DOIN, 418p.
15. **CHAUSSAT R., et COURDUROUX J.C. 1980.** Régulateurs de croissance et multiplication végétative. In la multiplication végétative des plantes et multiplication supérieurs. Gauthier-Villars. pp 31-50.
16. **CHEVRE A.M. 1985.** Recherche sur la multiplication végétative *in vitro* chez le châtaignier, thèse. Doctorat. Uni. Bordeau II. 100p.
17. **CHIKH M. 1999.** Etude de la multiplication du Merisier par semis après levée de dormance et par micropropagation à partir de drageons. Thèse Magister en sciences agronomiques. I.N.A. 112p.
18. **COME D. 1970.** Les obstacles à la germination. Masson et Cie, Paris, 162p.
19. **DAFIS S. 1990.** Traitements sylvicoles des sapinières de Grèce. Sem. Int. Sapin Médit. Adaptation, sélection et sylviculture. Avignon, 11-15 juin. pp 243-256.
20. **DAVID A. et DAVID H. 1977.** Manifestation de diverses potentialités organogènes d'organes ou de fragments d'organes de pin maritime (*Pinus pinaster* Sol) en culture *in vitro*. C. R. Acad. Sc. Paris. pp 245-248.
21. **DAVID A.; DAVID H. et FAYE M. 2014.** Organogenèse chez les Gymnospermes: application à la multiplication végétative Bulletin de la Société Botanique de France. Actualités Botaniques,130:2, pp 69-78.
22. **DEKLERK G.J., BRUGGE J.,TET MARINOVA S. 1997.** Effectiveness of indole acetic acid, indole butyric acid and naphthalene acetic acid during adventitious root formation *in vitro* in *Malus* 'Jork 9'. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 49: pp 39-44.
23. **DEO P.C., TAYLOR M., HARDING R.M., TYAGI A.PET BECKER D.K. 2010.**Initiation of embryogenic cell suspensions of taro (*Colocasia esculenta* var. *esculenta*) and plant regeneration. Plant Cell Tissue Organ Cult. 100: pp 283-291.
24. **DERRIDJ A. 1990.** Etude des populations de (*Cedrus atlantica* M.) en Algérie. Thèse de doctorat de l'université Paul Sabastien. Toulouse. 288p.
25. **DESMET K., BOUAZA F. 1984.** La structure forestière du mont Babors. Sylva Gandensis. N°50, pp 65-84.
26. **DUCHATRE. 1970.** Des ovules à la graine. Masson et Cie (11-15), 134p.
27. **DUCKREY M. 1998.** Aspects écophysiologicals de la réponse et de l'adaptation des sapins méditerranéens aux extrêmes climatiques: gelée printanières et sécheresse

- estivale. Forêt. Méditerranée. tome XIX. N°2. Spécial sapins en milieu méditerranéen. Mai 1998. pp 105-115.
- 28. DUCLERCQ J., SANGWAN-NORREEL B., CATTEROU M. ET SANGWAN R.S. 2011.** De novo shoot organogenesis. Trends Plant Sci. 2011 Nov;16 (11): pp 597-606.
- 29. DURZAN D.J ET GUPTA P.K. 1987.** Somatic embryogenesis and poly embryogenesis in Douglas-fir cell suspension cultures. Plant Sci 52: pp 229-235.
- 30. FABRE J-P. ET KHEMICI M. 1990.** Un nouveau ravageur du sapin de Numidie en Algérie, la tordeuse *Dichelia numidicola*. Sémin. Intern. Sapin Médit. Adaptation, sélection et sylviculture. Avignon, 11-15 juin. pp 321-332.
- 31. FERRY M., BOUGUEDOURA N. ET EL HADRAMI I. 1998.** Patrimoine génétique et techniques de propagation *in vitro* pour le développement de la culture de palmier dattier. Numéro spécial oasis. Sécheresse, 9(2): pp 139-146.
- 32. FINER J.J., KRIEBEL H.B., BECWAR M.R. 1989.** Initiation of embryogenic callus and suspension cultures of eastern white pine (*Pinus strobus*). Plant Cell Report 8: pp 203-206.
- 33. FOURET Y., ARNAUD Y., LARIEU C. 1984.** Rajeunissement *in vitro* du *Sequoia sempervirens*. Effet du nombre de la fréquence des repiquages. Recherche de critères précoces de juvénilité. Annales de Recherches Sylvicoles. AFOCEL., Paris. pp 111- 136.
- 34. FULVIO D., PROIETI R. ET FAVRE J.M. 1998.** Le genre *Abies* en Italie écologie générale, gestion sylvicole et ressources génétiques. For. Médit. Tome XIX. N°2. Spécial Sapin en milieu méditerranéen. Mai 1998. pp 153-164.
- 35. GAUSSEN H. 1955.** Les gymnospermes actuelles et fossiles. Trav. Lab. For. Toulouse, II (5). pp 67-81.
- 36. GAUSSEN H. 1964.** Les gymnospermes actuelles et fossiles. Trav. Lab. For. Univ. Toulouse. pp 321-480.
- 37. GAUTHERET R. J. 1934.** Culture du tissu cambial. C. R Acad. Sci., 198, pp 219-2196.
- 38. GAUTHERET R.J. 1959.** La culture des tissus végétaux. Paris. Masson. 863p.
- 39. GERMANA M.A., MICHELI M., CHIANCONE B., MACALUSO L. ET STANDARDI A. 2011.** Organogenesis and encapsulation of *in vitro*-derived propagules of Carrizo citrange (*Citrus sinensis* L.) Osb. (*Poncirus trifoliata* L.). Plant Cell Tissue and Organ Culture. 106: pp 299-307.

40. **Gharzouli R. ET Djellouli M. 2005.** Diversité floristique de la Kabylie des Babors (Algérie). *Sécheresse* Vol. 16 (3): pp21-23.
41. **Ghobrini D. 2010.** Action des radiations bleues sur le développement des embryons zygotiques du Palmier dattier (*Phoenix dactylifera* L.) Cv. Takerboucht cultivés *in-vitro*. Thèse de magister en biologie et écologie des populations et des communautés. Univ Mouloud MAMMERI de Tizi-Ouzou. 115p.
42. **Gupta P.K., Durzan D.J. 1985.** Shoot multiplication from mature trees of Douglas-fir (*Pseudotsugamenziesii*) and sugar pine (*Pinus lambertiana*). *Plant Cell Rep.* 4: pp 177–179.
43. **Gutiérrez-Mora A., González-Gutiérrez A.G., Rodríguez-Garay B., Ascencio-Cabral ET Li-Wei L. 2012.** Plant Somatic Embryogenesis: Some Useful Considerations, in: *Embryogenesis*, Dr. Ken-Ichi Sato (Ed.). pp 230-241.
44. **Haberlandt G. 1902.** Culture versuche mit isolierten. Pflanzenzellen. *Slaungsber. Akad. WISS. Wiem. Math. Nat. Classe, 111, Abt 1*, pp 69-92.
45. **Haggman H., Jokela A., Krajnakova J., Kauppi Niemy K., Aronen T. 1999.** Somatic embryogenesis of scots pine. Cold treatment and characteristics of explants affecting induction. *Jou. Exp. Bot.*, 50(341): pp 1769-1778.
46. **Hakman I., Von Arnold S. 1985.** Plantlet regeneration through somatic embryogenesis in *Picea abies* (norway Spruce) *J. plante physiol.* Vol. 121. pp 149-158.
47. **Hakman L. 1985.** The development of somatic embryos in tissue cultures initiated from immature embryos of *Picea abies*. *Plant Physiol.* Vol. 121. pp 149-158.
48. **Hazubska p. 2019.** Propagation of Juniper Species by Plant Tissue Culture: A Mini-Review. Institute of Dendrology, Polish Academy of Sciences, Parkowa 5, 62-035 Kórnik, Poland. 17p.
49. **Heller R. 1982.** *Abrégé De Physiologie Végétale. 2. développement.* Masson. pp 75-144.
50. **Ighilhariz Z., Bouabdallah L. ET Belkhodja M. 2008.** Influence Hormonale sur l'induction de la callogenèse chez *Atriplex Halimus* L. et *Atriplex Canescens* (Pursch Nutt). *European journal of scientific research.* 24: pp211-218.
51. **Illoul M. 2016.** Variabilité morpho-anatomique, diversité génétique, potentiel de régénération et efficacité de la production grainière du sapin de Numidie (*Abies numidica*

De Lannoy) en plantation (cas de Serraiïdi, Annaba) thèse de doctorat Université Mouloud MAMMERI Tizi-Ouzou, 117p.

52. KHANFOUCI. 2005. Contribution à l'étude de la fructification et de la régénération du Cèdre de l'Atlas Université hadj Lakhdar Batna - magister en science forestière 2005.

53. KHATER N. 2018. Contribution à l'étude de la régénération du Genévrier thurifère (*Juniperus uthurifera* L.) par la production de plants *in vitro*. Thèse de doctorat en science agronomique. Université de Batna 1 Hadj lakhdar.74p.

54. KHELIFI L. 1990. Protoplastes d'organes et de cals de vitrosemis de mélèze d'Europe (*Larixdecidua* Mill): préparation de culture, élément de physiologie et de cytologie respiratoire. Thèse de Doctorat. Biologie végétale et forestière Nancy, 206p.

55. KOLAI L. 1986. La sapinière d'*Abies numidica* dans les monts Babors. Ann.Rech.For, INRF Bainem (Algérie) : pp 85-97.

56. KOLAI L. 1992. La Sapinière à *Abies mumidica* dans le mont Babors: phytosociologie et production. Ann. Rech. For. en Algérie. 2^{ème} semestre, 1992. pp 85-99.

57. KRIKORIAN A.D. 1995. Hormones in tissue culture and micropropagation. In: *Davies PJ* (Eds.). Plant hormones: Physiology, biochemistry and molecular biology. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht. pp 774-798.

58. KROUCHI F. 2011. Etude de la diversité de l'organisation reproductive et de la structure génétique du Cèdre de l'Atlas (*Cedrus atlantica* M.) en peuplement naturel (Tala-guilef. Djurdjura nord-Ouest, Algérie). Th. Doc. U.M. Mammeri, Tizi-Ouzou, Algérie.127p.

59. LAMBARDI M., HARRY I.S., MENABDI D., THORP T.A. 1995. Organogenesis and somatic embryogenesis in *Cupressus sempervirens*. Plant Cell, Tissue and Organ. Culture 40: pp 179-182.

60. LEBTAHI F. 2001. Contribution à l'étude de sapin de Numidie (*Abies numidica* De Lanoy) multiplication par semis et par culture *in vitro*. Thèse de Magister en biologie végétale. 96p.

61. LEBTAHI F. 2017. Multiplication végétative *in vitro* du chêne liège (*Quercus suber* L.) université de U.S.T.H.B. Thèse de doctorat en Biologie et physiologie végétale. 104p.

62. LEBTAHI F. 2019. Communication orale.

- 63. LIU T.S. 1971.** A monograph of the genus *Abies*. Dept of for,colleg of Agr. National T'aiwan Univ. 508p.
- 64. LUCAS G. 1980.** Listes des plantes rares et menacées de l'Afrique du nord et du moyen orient. C.P.M. de L'U.I.C.N. 22p.
- 65. MARGARA F. 1982.** La multiplication végétative *in-vitro*. Aspects généraux B.T.I.374 L1 Agro 15: pp 701-711.
- 66. MARGARA F. 1989.** Bases de multiplication végétative : les méristèmes et l'organogenèse. Ed INRA Paris. 262p.
- 67. MARIE-ANNE., LELU-WALTER., LUC H. 2020.** L'embryogenèse somatique des conifères, état et perspectives. Informations forêt AFOCEL, 2004, 6p.
- 68. MARUTANI-HERT M., EVENS T.J., GREGORY T., MCCOLLUM G.T. ET NIEDZ R.P. 2011.** Bud emergence and shoot growth from mature citrus nodal stem segments. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*. 106: pp 81-91.
- 69. MAZLIAK. 1892.** Physiologie végétale II, croissance et développement. Coll.Meth. Hermann, Paris. 465p.
- 70. MENTEUIIS O. 2016.** Micropropagation and production of Forest trees, Végétative Propagation of Forest Trees, National Institute of Forest Science (N.I.FoS).Seoul, Korea. pp 32-55.
- 71. MULLER C. 1975.** Conservation des graines de sapins. Bilan des recherches menées de 1966 à 1975. 48p.
- 72. MURASHIGE T. ET SKOOG F. 1962.** A Revised Medium for Rapid Growth and Bio Assays with Tobacco Tissue Cultures. *Physiologia Plantarum* 15. pp 473-497.
- 73. NEUMANN K.H., KUMAR A. ET IMANI J. 2009.** *Plant Cell and Tissue Culture-A Toolin Biotechnology: Basics and Application*. Ed. Springer, 293p.
- 74. PANDEY S., SINGH M., JAISWAL U. ET JAISWAL V.S. 2006.** Shoot initiation and multiplication from a tree of *Terminalia arjuna* Roxb. *In Vitro Cellular and Developmental Biology Plant*. 42: pp 389-393.
- 75. PEREZ-TORNERO O., TALLON CI ET PORRAS I. 2010.** An efficient protocol for micropropagation of lemon (*Citrus limon*) from mature nodal segments. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. 100: pp 263-271.
- 76. QUEZEL P. 1985.** Les sapins du pourtour méditerranéen. *Forêt méditerranéenne*. VII (1): pp 27-34.

- 77. QUEZEL P., BARBERO M. 1990.** Caractéristiques écologiques, dynamiques et structurales des populations naturelles de sapins sur le pourtour méditerranéen. Sémin. Intern. Sapin Médit. Adaptation, sélection sylviculture. Avignon, 11-15 juin. pp 3-25.
- 78. QUEZEL P. 1998.** Diversité et répartition des sapins sur le pourtour méditerranéen. Forêt méditerranéenne 19 (2): pp 93-104.
- 79. QUOIRIN M. ET LEPOIVRE P.1977.** Etude de milieux adaptés aux cultures *in vitro* de prunus. Acts. Horticulture, 78, pp 437-442.
- 80. RAI M.K., ASTHANA P., JAISWAL V.S. ET JAISWAL U. 2010.** Biotechnological advances in guava (*Psidiumgua java* L.): Recent developments and prospects for further research. Trees Structure and Function. 24: pp 1-12.
- 81. RAMDANI M., LOGRADA T., CHALARD P., FIGUEREDO G. 2014.** Chemical and antimicrobial properties of essential oils of *Abies numidica*, endemic species of Algeria.5: pp 432-430.
- 82. SAADI A. 1991.** Régénération de plantes de pois *Pisum sativum* L. par embryogenèse somatique .Thèse de doctorat. Paris Grignon. 162p.
- 83. SAHOO Y. ET CHAND P.K. 1998.** Micropropagation of *Vitexnegundo* L., a woody aromatic medicinal shrub, through high-frequency axillary shoot proliferation. Plant Cell Reports. 18: pp 301-307.
- 84. SAMA A.E., SIMON Z., NYOCHEMBENG L., TAMBONG T.A., NEZANA X. ET WUTAH J.G. 1998.** Culture *in vitro* et multiplication rapide de plante à tubercules et racines au Cameroun. Cahier Agriculture (7) : pp 63-66.
- 85. SASSON A. 1993.** Biotechnologies in developing countries: Present and future. UNESCO Publishing, Paris. 764p.
- 86. SATOUR A. 1992.** Contribution à l'étude biosystématique du Sapin de Numidie (*Abies mumidica* De Lann.). Thèse. Ing. Univ. de Tizi-Ouzou. 97p.
- 87. SCHMID J. ET KELLER E. 1981.** Nouvelles possibilités pour l'amélioration et la multiplication des plantes: les cultures de tissus et de cellules. Revue Suisse Agriculture 13(6): pp 265-272.
- 88. SCHWARZ O.J., SCHLARBUM S.E. ET BEATY R.M. 1988.** Plant let regeneration from mature zygotic embryos of eastern white pine (*Pinus strobus* L.) Plant. Cell. Reports. 7: pp 174-177.
- 89. SEMAL J. 1998.** Reproduire à l'identique : Mythe et réalité. Cahier Agriculture (7): pp 6-8.

90. SKIRVIN R.M., COGNER M., NORTON A.M. , MOTOIKA S. ET GORVIN D., 2000. Somaclonal variation: do we know what causes it. *Ag biotech Net* 2: pp1-4.
91. SKOOG F. ET MILLER C. O. 1957. Chemical regulation of growth and organ formation in plant tissues cultured in *Symp. Soc. Exp. Biol.*, 11: pp 118-130.
92. TLILI-AIT KAKI Y., BENNADJA S. ET ABDELGHANI D. 2012. The Therapeutic Importance of Products Extracted from the Fir Tree of Numidia (*Abies numidica*) and Research on its Antibacterial Activity. *Kastamonu University, Journal of Forestry Faculty*, pp 279-282.
93. TLILI-AIT KAKI Y., BENNADJA S., CHEFROUR A. 2013. Revalorisation d'une essence endémique : le sapin de Numidie (*Abies numidica*). *Flora Mediterranea*, 23, pp 123-129.
94. TOTH. 1978. Contribution à l'étude de la fructification et de la régénération naturelle de Cèdre de l'Atlas (*Cedrus atlantica* M.) dans le sud de la France. Th. Doc. Ing. Fac. Des Sci et Tch de Marseille St Jérôme. 136p.
95. TRIPATHI M. ET KUMARI N. 2010. Micropropagation of a tropical fruit tree *Spondia smangifera* Wild. Through direct organogenesis. *Acts Physiologiae Plantarum*. 32: pp 1011-1015.
96. WELLS S., KESTER S.T., GENEVE R.L. 2005. Somatic embryo development in Willow oak. *International Plant propagators. Society, Combined proceedings*, 55: pp 451-453.
97. ZAREI M., SALEHI H., JOWKAR A. 2017. Effects of Temperature and Season on *In Vitro* Establishment and Shoot Multiplication of *Picea abies* (L.) H. Karst. Department of Horticultural Science, Faculty of Agriculture, Shiraz University, Shiraz, Iran. Vol. 4, No. 1: June 2017, pp 51-56.
98. ZHANG B.H., FENG R., LIU F., WANG Q. 2001. High frequency somatic embryogenesis and plant regeneration of an elite Chinese cotton variety. *Bot. Bull. Acad. Sin.*, 42: pp 9-16.
99. ZIMMERMAN J.L. 1993. Somatic embryogenesis: a model for earl development in higher plants. *Plant Cell*, 5: pp 1411-1423.
100. ZRYD J.P. 1988. Culture des cellules, des tissus et organes végétaux. Ed. Presse. Polytechnique romande. Suisse. 308p.

ANNEXES

ANNEXE 1

Tableau XII : Composition du milieu de culture MS en (mg/l).

| Milieux MS | |
|--|-------|
| Macroéléments | |
| KNO₃ | 1900 |
| NH₄NO₃ | 1650 |
| MgSO₄.7H₂O | 370 |
| KH₂PO₄ | 170 |
| CaCl₂.2H₂O | 440 |
| Microéléments | |
| H₃BO₃ | 6.1 |
| MnSO₄H₂O | 22.3 |
| ZnSO₄.4H₂O | 8.6 |
| KI | 0.83 |
| Na₂MoO₄.2H₂O | 0.25 |
| CuSO₄.5H₂O | 0.025 |
| CoCl₂.5H₂O | 0.025 |
| Vitamines | |
| Thiamine HCl | 0.10 |
| Pyridoxine | 0.50 |
| Acide nicotinique | 0.50 |
| Glycine | 2 |
| myo-inositol | 100 |

Composition de la solution de fer :

FeSO₄.7H₂O.....5,57g.

NaFe EDTA.....7,45g.

Eau distillée.....1000ml.

ANNEXE 2

Tableau XIII : Balance hormonale utilisée pour l'organogénèse et l'embryogénèse somatique.

| Milieu MS | AIB | 2.4-D | BAP |
|--------------------|-----|-------|-----|
| Mo (Témoin) | – | – | 0 |
| M1 | – | – | 0.1 |
| M2 | – | – | 0.6 |
| M3 | – | – | 1 |
| M4 (Témoin) | 0 | 0 | – |
| M5 | – | 1 | – |
| M6 | – | 2 | – |
| M7 | – | 3 | – |
| M8 | 1 | – | – |
| M9 | 2 | – | – |
| M10 | 3 | – | – |
| M11 | – | 2 | 2 |

ANNEXE 3

Tableau XIV : Caractères morphologiques comparatifs entre 3 pieds de sapin de Numidie.

| | | Cone | | | Graines | |
|-------------|----|-------|------|-------|---------|---------|
| | | Long | Larg | Poids | Nbr G | Poids G |
| Arb1 | 1 | 18.5 | 4.8 | 197.5 | 330 | 30.9 |
| | 2 | 18.3 | 4.7 | 188.3 | 340 | 29.5 |
| | 3 | 19.5 | 5 | 239.8 | 350 | 30.1 |
| | 4 | 20 | 4.8 | 215.2 | 340 | 34 |
| | 5 | 19.5 | 4.8 | 176.2 | 310 | 30.7 |
| | 6 | 18 | 4.4 | 170 | 300 | 26.2 |
| | 7 | 16.5 | 4.5 | 152.9 | 366 | 26.4 |
| | 8 | 16 | 4.2 | 132.6 | 340 | 22.9 |
| | 9 | 13 | 4.5 | 135.1 | 230 | 18.3 |
| | 10 | 20.5 | 5 | 251.8 | 404 | 32.5 |
| | 11 | 10 | 4.7 | 105.9 | 344 | 13.1 |
| | 12 | 20.5 | 4.2 | 165.5 | 270 | 23.4 |
| | 13 | 13.5 | 4.3 | 127.9 | 304 | 18.9 |
| | 14 | 14 | 4.3 | 90.4 | 196 | 14.5 |
| | 15 | 13.4 | 4.1 | 87.8 | 211 | 17.6 |
| | 16 | 19.6 | 4.5 | 127.4 | 364 | 32 |
| | 17 | 20.02 | 4.7 | 133.6 | 320 | 29.6 |
| Arb2 | 1 | 14.8 | 4.3 | 127.2 | 243 | 20.5 |
| | 2 | 16.2 | 4.4 | 175.7 | 283 | 22.1 |
| | 3 | 14.3 | 4.4 | 137.6 | 254 | 19.9 |
| | 4 | 17 | 5.2 | 152.5 | 301 | 26.4 |
| | 5 | 11 | 4.4 | 96.8 | 184 | 17.3 |
| | 6 | 16 | 4.5 | 147 | 270 | 25.4 |
| Arb3 | 1 | 17.5 | 4.4 | 168.8 | 363 | 28.7 |
| | 2 | 15.3 | 4.5 | 143.7 | 263 | 20.3 |
| | 3 | 16.9 | 5 | 190.3 | 318 | 28.9 |
| | 4 | 14.3 | 4.7 | 146.5 | 297 | 25.8 |
| | 5 | 10.2 | 4.4 | 81.9 | 119 | 11.3 |
| | 6 | 11.3 | 4 | 80.3 | 126 | 10.1 |
| | 7 | 14.5 | 4.5 | 135.1 | 236 | 20.1 |
| | 8 | 14.8 | 5.1 | 140.9 | 230 | 24.8 |
| | 9 | 14.3 | 4.5 | 150.7 | 309 | 25.2 |
| | 10 | 16.8 | 4.7 | 175.5 | 326 | 28.3 |
| | 11 | 16.7 | 4.4 | 143.3 | 316 | 20.2 |
| | 12 | 20.4 | 4.6 | 254.8 | 155 | 19.6 |
| | 13 | 15.6 | 5.1 | 135.8 | 287 | 25 |
| | 14 | 15.3 | 4.8 | 141.6 | 250 | 22.2 |
| | 15 | 15 | 4.7 | 154 | 169 | 25 |
| | 16 | 15.3 | 4.6 | 147.6 | 300 | 24.6 |

| | | | | | |
|----|------|-----|-------|-----|------|
| 17 | 12.8 | 4.5 | 120.3 | 180 | 16.2 |
| 18 | 12.2 | 4.5 | 87 | 105 | 13.4 |
| 19 | 14.1 | 4.7 | 137.3 | 170 | 14.7 |
| 20 | 14.6 | 4.5 | 138.8 | 270 | 24.8 |
| 21 | 14.8 | 5 | 132.4 | 294 | 23.4 |
| 22 | 15 | 4.5 | 146.5 | 210 | 19.4 |
| 23 | 15 | 4.3 | 143.3 | 285 | 21.4 |
| 24 | 14.5 | 4.5 | 80.6 | 188 | 15 |
| 25 | 15.3 | 4.6 | 140.8 | 292 | 21.2 |
| 26 | 15.2 | 4.4 | 151.4 | 245 | 23.9 |
| 27 | 13.3 | 4.5 | 126.3 | 237 | 20.2 |
| 28 | 9.3 | 4.9 | 78.2 | 130 | 11.9 |
| 29 | 18 | 4.7 | 205.6 | 310 | 33.4 |
| 30 | 15.8 | 4.6 | 168.6 | 281 | 25.5 |
| 31 | 13.3 | 4.4 | 138.2 | 236 | 18.6 |
| 32 | 14.9 | 4.3 | 139.3 | 230 | 23.4 |
| 33 | 8.5 | 3.5 | 51.5 | 184 | 14.3 |
| 34 | 10.2 | 4 | 79.5 | 180 | 13.8 |
| 35 | 14.9 | 5 | 105.1 | 156 | 17.3 |