

خلاصة

Atriplex halimus هو عبارة عن نبات يتميز بقدرة عالية على التأقلم و مقاومة الجفاف و الملوحة لهذا يستخدم في اصلاح و اعادة تأهيل التدهور البيئي في المناطق الجافة و الشبه جافة. التكنولوجيا الحيوية بأدواتها الفعالة كزراعة للأنسجة تمثل حل مثالي لتكثيف انتاج هادا النبات. تتضمن تقنية زراعة الكنب (callogenèse) ازدياع قطع من سيقان و اوراق *Atriplex halimus* في وسط مغذي (MS) مزود بثنائي هرموني (2,4D/Kinetine) بتركيز مختلفة. النتائج الاولية تظهر انتاج كتل خلوية ذات خصائص ظاهرية مختلفة من حيث الشكل و اللون و ذلك حسب طبيعة الجزء النباتي المزروع و تركيز الهرمونات النباتية.

تظهر تقنية الاقتسال الدقيق (la Micropropagation) انطلاقا من زراعة براعم إبطيه في وسط مغذي MS مخفف و غير مخفف مزود بهرمونات نباتية و خالي من هرمونات مضافة. النتائج تؤكد ان الوسط المغذي MS المخفف و بدون هرمونات مضافة يبدي قدرة اكبر على الاقتسال وتشكيل نبات جديد. مع زيادة تركيز الاكسين و الحفاظ على نفس تركيز السيبتوكينين في الوسط المغذي MS2 (2ANA/BAP) تم الحصول على نسبة مهمة من الاقتسال ثم تتضاءل النسبة على MS1 الى ان تنعدم على الوسط MS3 (AIA / kinetine) مع تشكل كتل خلوية فقط دون تشكل اعضاء.

الكلمات المفتاحية : *Atriplex halimus*. تقنية زراعة الانسجة. تقنية زراعة الكنب (callogenèse). تقنية الاقتسال الدقيق (la Micropropagation). هرمونات نباتية.

Introduction	1
Chapitre1 :	
Rappels bibliographiques sur l'espèce utilisée	3
1-Description de la famille des Chénopodiacées	3
2-Répartition géographique de la famille des chénopodiacées	3
3. Description du genre <i>Atriplex</i>	3
4-Systématique	4
5-Description d' <i>Atriplex halimus</i> L	4
6-Aspect physiologique de la tolérance aux stress	7
7-Importance écologique	8
8-Importance économique	8
9. Utilisation de l' <i>Atriplex halimus</i> en phytoremediation	8
Chapitre2 :	
Culture <i>in vitro</i>	10
1 Historique de la culture <i>in vitro</i>	10
2. les différentes applications de la culture <i>in vitro</i>	10
2.1. La micropropagation	10
2.2. La culture de méristèmes	11
2.3. Embryogenèse somatique	11
2.4.. L'organogenèse	12
2. 4-1. <i>La caulogenèse</i>	12
2. 4-2. <i>La rhizogenèse</i>	12
2.5.. La callogenèse	13
2.6. Les régulateurs de croissance	14
2.6.1. Les auxines	14
2.6.2. Les cytokinines	14
2.6.3 .Les gibbérellines	15
2.7. Les variations somaclonales	15
2.8. Avantages et inconvénients de la culture <i>in vitro</i>	15
Chapitre 3 :	
Matériels et méthodes	17
1 -Matériel végétal	17
2-Méthodes	17
2.1. Préparation du semis et obtention des plantes	17

2.2. Choix du milieu de culture	17
2..3. Induction de la callogenèse	
2.4. Micropropagation	18
Chapitre4	
Résultats et discussion	20
1.Initiation de la callogenèse chez <i>Atriplex halimus</i>	20
1.1.Résultats	20
1.2. Discussion	25
2. Micropropagation	28
2.1 Résultats	28
2.2 Discussion	33
2. Conclusion et perspectives	36
4. Références bibliographiques	38
Annexe	45

Liste des figures :

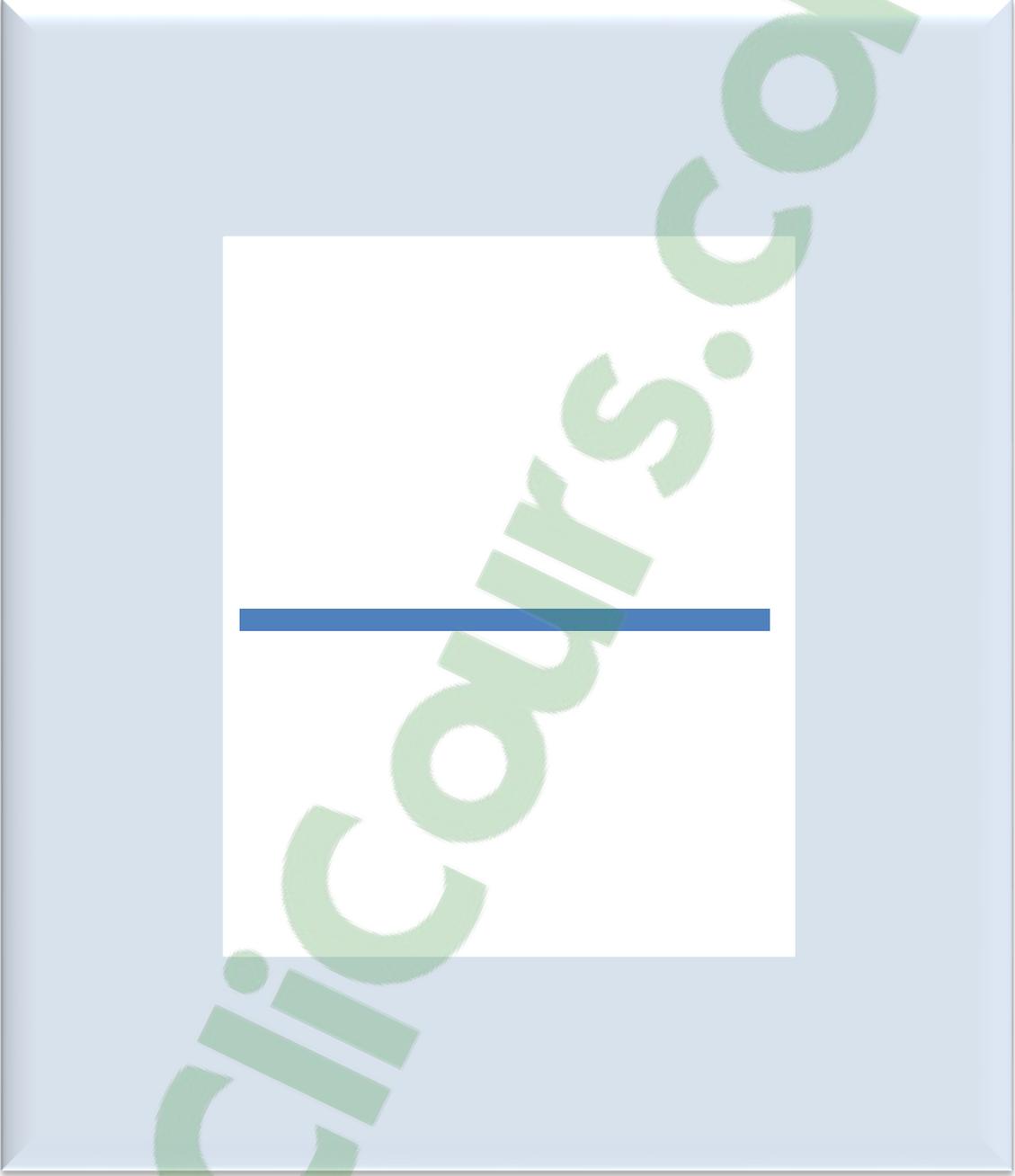
Figure 1 : Aspect morphologique d' <i>Atriplex halimus</i> L. (site IAP Es -senia)	6
Figure 2: Taux de cals formés à partir d'explants de tiges et de feuilles après un mois de culture sur différent milieu MS additionné de 2,4 -D/ Kinetine	21
Figure 3 : Aspects morphologiques des explants de tiges d' <i>Atriplex halimus</i> après un mois de culture sur différents milieux MS additionne de 2,4 D/ Kinetine	22
Figure 4 : Aspects morphologiques des explants foliaires d' <i>Atriplex halimus</i> après 30 jours de culture sur différents milieux MS additionne de 2,4 D/ Kinetine	22
Figure 5 : Aspect des cals à partir d'explants foliaires montrent les différentes zones concernées par les divisions cellulaires.	23
Figure 6 : Aspects morphologiques des explants de tiges d' <i>Atriplex halimus</i> après deux mois de mise en culture sur milieu MS additionné de 2,4 -D/ Kinetine	24
Figure 7 : Pourcentage de bourgeons évolués en pousses sur les milieux MS0, MS1, MS2 et MS3.	29
Figure 8: Micropropagation <i>in vitro</i> par bourgeons axillaires d' <i>Atriplex halimus</i> après deux semaines de mise en culture sur milieu MS additionnée de ANA/ BAP	30
Figure 9: Micropropagation <i>in vitro</i> par bourgeons axillaires d' <i>Atriplex halimus</i> après quatre semaines de mise en culture de milieu MS sans hormones végétales	31
Figure 10: Micropropagation <i>in vitro</i> par bourgeons axillaires d' <i>Atriplex halimus</i> après un mois sur de milieu MS1 additionnée ANA /BAP	31
Figure 11: Micropropagation <i>in vitro</i> par bourgeons axillaires d' <i>Atriplex halimus</i> Après un mois de culture sur milieu MS2 additionnée ANA e/ BAP	31
Figure.12 : Ramifications secondaires de racine néoformée obtenue sur milieu MS dilué de moitié sans hormones MS0.	32

Figure 13 : Les tentatives pour obtenir une micropropagation par développement d'axillaires 32

et une initiation de callogenèse observée au niveau du nœud sur les MS3

Liste des tableaux

Tableau1 : Les différentes combinaisons hormonales testées	19
Tableau 2 : Composition des différents milieux de micropropagation testés	19
Tableau3 : Pourcentage de débourrement des bourgeons axillaires	28



Clickours.com

Introduction

La convention des nations unies pour la lutte contre la désertification (UNCCD) définit la dégradation des sols dans les zones arides, semi-aride set subhumides sèches comme étant le produit de plusieurs facteurs dont les changements climatiques et les activités humaines. La désertification est un problème qui touche les zones arides et à défaut d'une gestion durable des ressources naturelles, les processus de désertification dans les zones menacées continueront à s'accroître et affecteront le couvert végétal.

*Dans ces régions, l'aridité est due au déficit de précipitations (Munns et al., 2006) accompagné d'une perte d'eau par évapotranspiration, et irrigation avec de l'eau riche en sels (Yamaguchi et al., 2005). La salinité affecte 100 millions d'hectares de la superficie du monde (Munns et al., 2006). L'Algérie est un des pays touché par la salinité où les sols salins couvrent une superficie de 3,2 millions d'hectares (Hamdy, 1999). Selon le Houérou (2000) la présence des sels dans le sol affecte les mécanismes physiologiques des plantes, constitue une importante contrainte à la croissance des plantes, limite le rendement des cultures (Ben Ahmed et al., 2008) et par conséquent la disparition et la menace d'extinction de certaines espèces (Munns, 2002). Seules les plantes halophytes peuvent résister et s'adapter en générant des mécanismes de résistances et / ou de tolérance (Sambatti et Caylor, 2007). Parmi ces plantes le genre *Atriplex* dont l'espèce *Atriplex halimus* considérée comme une plante fourragère, xerohalophyte qui tolère des sols salins pauvres en éléments nutritifs.*

*En Algérie, la production fourragère dans les régions arides traditionnellement à vocation pastorale, diminue de façon continue et le taux de satisfaction des besoins alimentaires du bétail par la production fourragère locale est passé de 70% en 1978 à 40% en 1986 et se maintient jusqu'en 1996 (Houmani, 1997). L'aménagement de ces régions en vue d'une amélioration de la production fourragère des parcours passe d'abord par une meilleure connaissance de la biologie et de l'écologie des *Atriplex*. Des analyses de valeur fourragère, d'appétence et de production de phytomasse, montrent l'intérêt que les *Atriplex* ont dans les régions arides et semi-arides de type méditerranéen (Kinet et al., 1998).*

Par ailleurs, les travaux de Martinez (2011) montrent que cette espèce est utilisée également, en Espagne, dans les programmes de phytoremediation des parcours contaminés par

des métaux lourds du fait de sa présence et son maintien dans des sols salins et riches en métaux lourds.

*Le présent travail est entrepris dans le but de valoriser cette espèce *Atriplex halimus*, par le biais des outils de la biotechnologie. Une callogenèse est initiée à partir d'explants de tiges et de feuilles, et une micropropagation in vitro de bourgeons axillaires pour la multiplication rapide de cette espèce destinée au repeuplement des zones arides et salées afin de lutter contre la désertification.*

Chapitre1 :
Rappels
bibliographiques
sur
l'espèce utilisée

Rappels bibliographiques sur l'espèce utilisée

1-Description de la famille des Chénopodiacées

La famille des chénopodiacées est largement répandue et comporte cent genres. Elle est caractérisée par des racines très profondes et pénétrantes pour absorber la plus grande quantité d'eau possible (Aboura, 2006). Les feuilles sont alternes petites et farineuses recouvertes de poils, lobées parfois épineuses, formées de manière à réduire les pertes en eau dues à la transpiration (Spichiger *et al.*,2004). Les fleurs sont enveloppées par deux bractéoles, d'une consistance généralement foliacée, ce qui permet de distinguer les espèces en fonction de leurs formes et si elles sont présentes ou non, soudées les unes aux autres. Les espèces appartenant au genre *Atriplex* sont dioïques mais il existe des arbustes monoïques (Rosas, 1989). La formule florale est $5S+5E+ 3C$

2-Répartition géographique de la famille des chénopodiacées

Les chénopodiacées sont largement répandues dans les habitats salins tempérés et subtropicaux, en particulier dans les régions littorales de la mer méditerranéenne, de la mer caspienne et de la mer rouge, dans les steppes arides de l'Asie centrale et orientale, au marge du désert du Sahara, dans les prairies alcalines des Etats-Unis, dans le Karoo en Afrique méridionale, en Australie et dans les pampas en Argentine (Martinez *et al.*,2003). Elles poussent également comme des herbacées sur les sols riches en sels, surtout en présence d'écoulement d'eau et de terrains accidentés (BelKheiri, 2009 ; Bouchaiki, 2010).

3. Description du genre *Atriplex*

Les plantes du genre *Atriplex* se rencontrent dans la plus part des régions du globe,et se caractérisent par leur grande diversité. Elles sont également caractéristiques des régions arides où le phénomène de désertification est important (Le Houérou, 1992).

Le genre *Atriplex* est le plus diversifié de la famille des chénopodiacées et comprend environ 200 espèces réparties dans les régions tempérées, subtropicales et dans différentes régions arides et semi-arides du monde. Il est répandu en Australie où l'on observe une grande diversité d'espèces et de sous-espèces (Maalem, 2002). Bien qu'en nombre très réduit, des exemplaires de ce genre sont présents dans les régions polaires (Smith, 1982 ; Rosas, 1989).

Les espèces du genre *Atriplex* sont caractérisées par le haut degré de tolérance à l'aridité et à la salinité et de fournir des fourrages riches en protéines. Elles ont la propriété de produire une abondante biomasse foliaire même pendant les périodes défavorables de l'année (Mulas et Mulas, 2004). Le genre *Atriplex* appartient au groupe des plantes ayant un métabolisme photosynthétique de type C4 ce qui explique leur résistance au déficit hydrique.

4-Systématique

D'après Chadefaud et Emberger (1960), la classification d'*Atriplex halimus* est la suivante:

Règne	Végétal
Embranchement	Spermaphytes (Phanérogames)
Sous-embranchement	Angiospermes
Classe	Dicotylédones
Sous-classe	Apétales
Ordre	Centrospermales
Famille	Amaranthacée (Chénopodiacée)
Genre	<i>Atriplex</i>
Espèce	<i>Atriplex halimus</i> L.
Noms vernaculaires Français	arroche maritime, ou pourpier de mer
Noms arabes	القطف, الرغل الملحي

Atriplex halimus est divisé en deux sous espèces :

- *Atriplex halimus* **Subp halimus** : généralement plus feuillée se rencontre sur les zones du littoral semi-aride à humide.
- *Atriplex halimus* **SubpSchweifurthi** : rameaux florifères dépourvus de feuilles; c'est une sous espèce des zones arides et désertiques (Franclet et Le Houérou, 1971).

5-Description d'*Atriplex halimus* L.

Atriplex halimus est une espèce spontanée vivace pouvant se développer au ras du sol ou prendre un port arbustif surtout en climat aride et semi-aride (Ozenda, 1983). C'est un arbuste natif d'Afrique du nord où il est très abondant (Kinet *et al.*, 1988), il s'étend également aux zones littorales méditerranéennes de l'Europe et aux terres intérieures gypso-salines d'Espagne.

Atriplex halimus est un arbuste dont le feuillage présente un aspect blanc-argenté, pouvant atteindre un à deux mètre de hauteur (Fig.1a). L'écorce a une coloration gris-blanchâtre et les tiges sont ligneuses (Bonnier et Douin 1996) (Fig.1a, b). Les feuilles présentent un polymorphisme (Fig.1c, d) selon l'état physiologique de la plante et la position des feuilles sur

l'axe. Elles peuvent être deltoïdo- orbiculaires à lancéolées avec un pétiole court. Elles sont plus ou moins charnues, légèrement coriaces alternes et entières, et leur sommet est terminé par une petite pointe (Fig. 1c, d). Leur surface est recouverte de trichomes glandulaires (Castroviejo *et al.*, 1990; Ighilhariz, 2008). Le système racinaire pivotant présente chez *A. halimus* un fort développement pouvant atteindre jusqu'à 10 m de profondeur (Le Houerou, 1992).

Le polymorphisme de cette espèce semble être lié à sa diversité d'habitat impliquant vraisemblablement une forte adaptabilité de la plante à son milieu naturel (Talamali *et al.*, 2003). Chez *Atriplex halimus*, on observe deux structures de fleurs, l'une constituée de fleurs mâles à cinq pétales et l'autre de fleurs femelles munies d'un unique carpelle inséré entre deux bractées opposées. À partir de ces deux types, des fleurs bisexuées peuvent apparaître (Talamali *et al.*, 2003). Les fruits sont composés par les deux bractéoles, ils sont arrondis en rêne, dentés ou entier, lisses ou tuberculeuse, droite ou recouvertes (Negre, 1961) ; (Fig. 1, e, f) et les graines sont petites et de couleur noire (Fig. 1g).



Figure 1 : Aspect morphologique d'*Atriplex halimus*

Touffes d'*Atriplex halimus* (Site IAP, Université Oran Es Sénia,) (a), rameau feuillé (b), polymorphisme foliaire (c,d), fruits immatures (e), fruits à maturité(f), graines décortiquées(g).

6-Aspect physiologique de la tolérance aux stress

L'anatomie foliaire du genre *Atriplex* est de type Kranz, c'est à dire qu'elle présente une gaine de cellules chlorophylliennes de grandes dimensions qui entourent les tissus vasculaires. L'anatomie Kranz est associée au métabolisme à haute efficacité photosynthétique, qui prend le nom de C4 (Raven *et al.*, 1992). Dans le métabolisme C4, les plantes présentent de nombreuses particularités physiologiques qui sont apparemment la conséquence immédiate de leur métabolisme carboné singulier, il est généralement admis que, dans certaines conditions, ces particularités physiologiques pourraient conduire à une productivité photosynthétique accrue et avoir des conséquences écologiques importantes (Hopkins, 2003).

Les *Atriplex* ont l'aptitude d'accumuler de grandes quantités de sels dans leurs tissus et plus particulièrement dans les trichomes situés à la surface des feuilles (Mozafar et Goodin, 1970). Chez les espèces du genre *Atriplex* il y a une translocation préférentielle des ions Na^+ vers les parties aériennes (Riemann, 1992). Le sel absorbé par les racines de la plante est transporté vers les feuilles où il s'accumule dans les trichomes pour être ensuite secrété (Riemann, 1992). Des études menées par Bajji en 1998 montrent qu'*A. halimus* est adapté aux zones arides et salées, résistance souvent attribuée à la présence de poils vésiculeux ou trichomes. Les plantes sous stress sont restées vivantes même en présence d'un contenu hydrique très bas dans le substrat. Le potentiel hydrique de ces plantes est resté plus bas du potentiel extérieur de l'eau ce qui confirme ainsi la grande résistance à la sécheresse d'*A. halimus* (Martinez, *et al.*, 2003)

A. halimus, est bien adaptée aux terrains salino-argileux et aux milieux caractérisés par des précipitations annuelles inférieures à 150 mm (Le Houerou, 1980). Si elle n'est pas broutée par le bétail, cette espèce peut atteindre 4 m de hauteur; de plus, elle appartient aux espèces d'*Atriplex* les plus appétibles pour le bétail dans les zones arides du WANA (Tiedeman et Chouki, 1989). Plusieurs études ont révélées qu'*Atriplex halimus* est doté de remarquables aptitudes de résistance et de tolérance au stress hydrique qui font de cette espèce un matériel de choix pour l'enrichissement de la flore et la protection des sols dans les zones arides et semi-arides (Essafi, 2007 ; Bassati, 2011). De plus David *et al.*, (2011) ont montré qu'*Atriplex halimus* développe une résistance importante au froid.

7-Importance écologique

Dans les régions méditerranéennes arides et semi-arides, le problème de la désertification se manifeste principalement par le recul des zones boisées et par la perte de végétation des zones steppiques à vocation pastorale et le repeuplement à base de buissons fourragers constituent une excellente solution (Osmond, 1980). En effet ces plantes possèdent un système racinaire très développé qui leur permet d'utiliser les réserves d'eau du sol de façon exhaustive et de former un réseau dense susceptible d'agrèger le sol et de le rendre résistant à l'érosion (Chalbi, 1991). En outre, les formations à base de buissons fourragers forment une bonne couverture végétale à feuillage dense qui protège le sol des agressions climatiques, source d'érosion (pluie, vent, grêle, etc.). Ils ont une croissance rapide, et nécessitent peu de soins dans les premiers stades de développement et leur exploitation peut commencer rapidement. Dans ce contexte, *Atriplex halimus* joue un rôle très important dans le repeuplement des régions arides et semi-arides méditerranéennes (Lutts *et al.*, 2004)

8-Importance économique

Atriplex halimus est utilisé comme plante fourragère car son feuillage persistant riche en protéines est très apprécié par les animaux durant la longue période de sécheresse estivale. Une bonne formation d'*Atriplex halimus* peut produire jusqu'à cinq tonnes/hectare de culture sèche par an sur des sols dégradés ou salins inutilisables pour d'autres cultures (Chalbi, 1991).

9-Utilisation de l'*Atriplex halimus* en phytoremédiation

L'idée de la phytoremédiation pour extraire les métaux lourds et leurs composantes est introduite depuis 1983, tandis que le principe est connu depuis 3 siècles. C'est dans les années 1990 que le concept de la bioremédiation émerge comme une nouvelle technologie qui utilise les plantes vertes et des microorganismes associés (Aoun, 2009). Plusieurs recherches ont montré la capacité de certaines plantes d'hyper accumulation de sels, principalement des halophytes et s'avèrent donc très prometteuses pour le dessalement principalement estimé par des mesures effectuées en sols salins (Abdelly, 2006). Les espèces de ce genre sont souvent utilisées dans la réhabilitation des sites dégradés, et peuvent être plantées pour stabiliser les sols et certains estiment qu'elles pourraient contribuer à la désalinisation des sols, dans les régions arides (McKell, 1975). L'espèce est présente, à l'état spontané, sur d'anciens sites miniers contaminés par divers métaux lourds (Lutts *et al.*, 2004). Des études récentes ont permis de souligner le caractère prometteur de l'espèce qui, soumise à une importante dose de cadmium (Cd) ou de zinc (Zn), est capable d'accumuler des quantités importantes de ces éléments sans présenter

d'inhibition de croissances ou d'augmentation de la mortalité (Lutts *et al.*, 2004). Dans le sud de l'Espagne comme dans d'autres zones semi-arides, *Atriplex halimus* est utilisé pour la phytoremediation des parcours contaminés par des métaux lourds (Martinez, 2011) et la population testée, en revanche, apparaît particulièrement sensible au cuivre (Cu). Mandak (2003) a démontré que dans le genre *Atriplex*, certaines espèces halophytes facultatives se sont répandues en Europe de façon non contrôlée le long d'axes routiers où des doses massives de sels (NaCl, KCl, CaCl₂) sont utilisées en période hivernale. Toutefois, quelle que soit la stratégie utilisée sur le site contaminé, il conviendra au préalable de déterminer le potentiel invasif de l'espèce utilisée (Belkheiri, 2009).

Chapitre2 :

Culture *in*

vitro

Culture *in vitro*

1. Historique de la culture *in vitro*

La multiplication *in vitro* est la culture de cellules, tissus ou organes végétaux sur des milieux nutritifs artificiels appropriés sous des conditions contrôlées (espace réduit, à l'abri de toute contamination) pour régénérer une plante entière grâce à la totipotence cellulaire. Ce concept énoncé au début de siècle mentionne l'autonomie de la cellule végétale et sa propriété à produire une plante entière (Hopkins., 2003). Elle possède toute l'information génétique nécessaire à régénérer une plante entière sous les conditions favorables à son développement. Cette hypothèse énoncée dès 1902 par Haberlandt, ne sera démontrée qu'en 1950 par Steward et son équipe, lorsqu'ils obtiendront les premiers « embryons artificiels » ou embryons somatiques à partir de cellules de carotte qui évolueront par la suite en jeunes plantules (Augé *et al.*, 1981 ; Zryd., 1988 ; Margara., 1989 ; Tourte et Tourte, 1989 ; Boxus, 1995). Depuis, la culture *in vitro* a connu plusieurs étapes décisives qui ont permis de mettre au point des techniques de plus en plus performantes grâce aux travaux de plusieurs chercheurs comme Nobecourt, White Hilderbrandt, Murashige et Skoog, particulièrement après la découverte des régulateurs de croissance végétales qui révolutionnèrent la culture *in vitro* (Vasil., 2008).

2. Les différentes applications de la culture *in vitro*

La culture *in vitro* consiste à prélever un explant qui peut être un fragment de plante (tige feuille, racine) ou un méristème et à le cultiver sur un milieu artificiel contenant tous les éléments nécessaires à sa croissance. :

2.1. La micropropagation

La micropropagation ou propagation clonale en masse, est la multiplication *in vitro* des plantes par la culture de tissus pour produire des copies ou clones génétiquement semblables à la plante mère (Ferry *et al.*, 1998, Semol., 1998). Cette technique s'avère utile pour la propagation des espèces sexuellement stériles tels les triploïdes, les aneuploïdes qui ne peuvent pas être perpétués par des graines, les plantes sans gaines comme la banane ou celles dont les semences sont rares ou présentent des difficultés de germination (Haicour., 2003).

Clicours.COM

2.2. La culture de méristèmes

Les méristèmes sont des tissus, en expansion continue conférant à la plante une organogenèse performante chez les végétaux supérieurs, ils représentent de petits massifs cellulaires capables 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 (Margara., 1989).

La culture de méristèmes appelée communément « culture d'apex » est la plus sûre méthode pour l'obtention de plantes indemnes de virus et conformes à la plante mère (Saadi, 1991). Elle est souvent appelée multiplication conforme, car elle part de méristème préexistant dans lesquels, les cellules sont génétiquement très stables (Boxus, 1995). L'individu est obtenu généralement en deux étapes successives, d'abord la formation de la tige, puis son enracinement.

Les premières cultures furent obtenues par Kotte et Robbins, dès 1922 à partir de méristèmes radiculaires de fève et de maïs (Tourte et Tourte., 1998), depuis, la culture de méristèmes a conduit à des applications nouvelles, originales concernant le domaine phytosanitaire, notamment pour l'éradication de nombreuses maladies (viroses, mycoses, mycoplasme) et a permis la régénération d'un grand nombre d'espèces saines (Tourte et Tourte., 1998).

2.3 Embryogenèse somatique

L'embryogenèse somatique est définie comme le développement d'embryon à partir de cellules somatiques c'est-à-dire non impliquées dans le phénomène de reproduction. Ces embryons dit « somatiques » se développent en passant par des stades bien définis (Globulaire, cordiforme, torpille, cotylédonaire chez les dicotylédones) identique à ceux de l'embryon zygotique (Aminaro, 1987).

Ce mode de reproduction asexuée, existant à l'état naturel chez certaines espèces (Tisserat *et al.*, 1987) a été depuis les années 1960 largement utilisé au moyen de la culture *in vitro*. Les premiers exemples d'embryogenèses somatiques ont été signalés par Steward *et al.*, 1958 à partir de cellules de la carotte *Daucus carotta*. Trente ans plus tard, l'embryogenèse somatique était décrite chez plus de 130 espèces appartenant à 30 familles différentes (Thrope., 1988). L'embryogenèse somatique peut être obtenue selon deux moyens :

-L'embryogenèse somatique directe qui se réalise en une seule phase, par culture des explants sur un milieu unique.

-*L'embryogenèse somatique indirecte* se déroulant en deux phases, par culture de l'explant sur un premier milieu pour initier la prolifération d'un cal, puis sur un second afin de développer des cellules embryogènes en embryon (Sondahl et Sharp., 1977).

2.4. L'organogenèse

L'organogenèse est la base fondamentale de la multiplication végétative sur laquelle s'appuie toujours la formation de méristèmes nouveaux (Margara, 1995), en partant d'un explant et aboutir à la formation d'un nouvel individu par l'élaboration des bourgeons et des tiges (caulogenèse) et de racine (rhizogenèse).

2.4.1. La caulogenèse

La caulogenèse désigne à la fois le développement de la partie aérienne, des bourgeons axillaires adventifs, ou néoformés sur un cal. Les études cytologiques conduites dans le but de déterminer l'origine des bourgeons néoformés à partir d'un fragment d'organe contenant divers tissus montrent souvent que l'aptitude à la callogenèse se manifeste à partir de certaines catégories de tissus tels que le cambium, le parenchyme vasculaire ou libérien (Portes et Pais, 2000). L'intensité de cette néoformation est dépendante de la nature de tissus contenus dans l'explant, (Margara., 1989).

2.4.2. La rhizogenèse

La rhizogenèse désigne la néoformation et la croissance de racines. La rhizogenèse est un phénomène complexe, il comporte différentes phases; la première est la dédifférenciation, la formation d'un amas de cellules méristématiques, différenciation et organisation des amas méristématiques en primordiaux racinaires qui se développent en jeunes racines (Boxus, 1995).

2.5. La callogenèse

Le cal est le tissu de néoformation produit par l'explant initial ou après des repiquages successifs (Margara, 1989). D'après Murashige (1974), les caractéristiques de l'explant initial qui influencera ces capacités de callogenèse sont :

- L'espèce est le génotype de la plante mère.
- L'âge est la position de l'organe sur la plante mère.
- La nature de l'organe dont il est issu.
- La taille de l'explant.

➤ La préparation de la plante mère.

2.6.. Les régulateurs de croissance

Le terme hormone provient du mot grec « *hormon* » ce sont des substances qui souvent peuvent supprimer, permettre ou modifier sous certaines conditions les processus de cytodifférentiation (Street, 1997). Les hormones de plantes ainsi que celles des animaux et d'autres organismes, dirigent la croissance et le développement ainsi que les stimuli du milieu, les plantes bien que dépourvues de systèmes nerveux et de cerveau qui leur permettraient de répondre aux stimuli, utilisent d'une manière remarquable les hormones (Murray, 2011).

L'orientation d'un explant vers un processus défini est fortement influencée par les régulateurs de croissance. Les deux hormones le plus souvent utilisées d'une manière conjointe ou séquentielle, sont les auxines et les cytokinines. Le rapport hormonal (auxine/cytokinine) conditionne, en grande partie le type de la néoformation obtenu, ce rapport a conduit dans le cas de la culture *in vitro* du parenchyme médullaire de tabac par exemple à l'orientation des tissus soit vers la callogenèse soit vers la rhizogenèse (Scoog et Miller, 1957 in Zryd, 1988). Ainsi la néoformation de bourgeons est souvent favorisée par des teneurs élevées en cytokinines (Abri et Stadn, 2001, Compton *et al.*, 2001, Tang et Guo, 2001), alors que les fortes doses en auxines stimulent la formation de racines et améliorent leur qualité (Druart, 1992, Hobbie, 1998; Abrie et Stadn, 2001; Compton *et al.*, 2001).

L'influence de ce rapport hormonal n'est cependant pas une règle générale pour toutes les espèces végétales. En effet il suffit dans certains cas d'ajouter au milieu de culture l'un ou l'autre des deux régulateurs de croissance pour parvenir à une réponse morphologique (Seon, *et al.*, 1988). Dans ce cas on peut citer deux exemples, le premier concerne l'organogenèse obtenue en présence uniquement d'auxine dans milieu (Vicran, 2001), le second c'est les travaux de Anand (2000) sur *Pipier barberi* qui a obtenu des bourgeons néoformés en utilisant des cytokinines seules dans le milieu d'induction. Cependant il est intéressant de savoir en se basant sur la diversité des réponses obtenues dans ce domaines, qu'il n'existe pas un milieu idéal pour toute les plantes, concernant l'efficacité de différentes auxines et cytokinines sur la caulogenèse ou la rhizogenèse. Les effets de la combinaison hormonale sont variés selon le matériel végétal employé (Primose, 2004).

2.6.1. Les auxines

Les auxines adaptent la plante à son environnement d'une manière qui lui est hautement avantageuse, elles provoquent la croissance et l'élongation des tiges et des racines et facilite la réponse de la plante à son environnement soit des signaux provenant du milieu de la plante (Janathan., 2007). La principale action des auxines est de provoquer l'élongation cellulaire dans des fragments excisés. Elles sont synthétisées à partir des apex caulinaires et racinaires et transportées dans de la plante. Les auxines sont les premières hormones végétales à avoir été découvertes (Janathan., 2007). Les auxines les plus utilisées en organogénèse ou en embryogénèse somatique sont la 2,4D, AIA et l'ANA (Evans *et al.*, 1991).

2.6.2. Les cytokinines

Les Cytokinines tirent leur nom du fait qu'elles stimulent les divisions cellulaires (cytocinèse). Leur représentant le plus connu est la kinétine, une 6-furfurylaminopurine qui déclenche la division cellulaire, stimule le métabolisme en augmentant les synthèses d'ADN et d'ARN et de protéines et inhibe la croissance racinaire. Les cytokinines exercent une action sur la morphogénèse des tissus en culture. La kinétine est la première cytokinine synthétisée découverte.

Le maintien d'une croissance de cals indifférenciés est obtenu en présence de quantité approximativement « équimolaire » de cytokinine et d'auxine. Ainsi lorsque :

Le rapport auxine / cytokinine est élevé, il favorise le développement de racines

Le rapport cytokinine / auxine est élevé, il favorise le développement de bourgeons

2.6.3 .Les gibbérellines

Les gibbérellines appartiennent à une grande famille chimique dont la structure de base est l'**ent-kauréne** (Précurseur de l'ent-gibbérelline). Il existe plus de 80 composés gibbérelliques naturels. En culture de tissus, le **GA3** est fréquemment utilisé. La principale action des gibbérellines sur les tissus en culture est l'allongement des tiges par allongement des entre-nœuds, l'utilisation de substances antigibberillique comme l'encymimidol permet de supprimer totalement les entre-nœuds est permet donc d'obtenir des amas d'apex (Hopkins, 2003). En culture de tissus la présence de fortes concentrations de gibbérellines dans le milieu peut empêcher la formation des racines, elles inhibent la formation des embryons somatiques et influe sur le développement des bourgeons.

2.7. Les variations somaclonales

Le terme variation somaclonales a été évoqué pour la première fois par Lakin et Scowcroft (1981) lors de la mise au point, *in vitro*, d'un test de résistance de la canne à sucre à un pathogène. Ils constatèrent alors que certaines des plantes sont résistantes, alors qu'elles n'avaient précédemment

pas été en contact avec le pathogène. Après avoir remis en cause la fiabilité de leur test, puis à la suite de nombreux contrôles, ils durent admettre que la résistance des vitroplants avait été acquise au cours du processus de régénération à partir de cultures cellulaires. Lakin et Scowcroft (1981) ont démontrés que la culture de tissus végétaux induit des modifications phénotypiques à une fréquence beaucoup plus élevée naturellement et baptisèrent ce phénomène de variation somaclonales. Depuis ce concept à été élargi à l'ensemble des altérations génotypiques et phénotypiques intervenant lors des processus de propagations tissulaire (Kaeppler *et al.*, 2000).

Ces phénomènes ont été décrit chez la plus part des espèces régénérés par culture *in vitro*, comme le café (Etienne et Bertrand., 2003), la pomme de terre (Joyce et Cassells., 2002) le Bégonia (Bouma et Deklerk, 2001), la banane (Peraza, *et al.*, 2001) ou bien encore le pin de Norvège (Fourré *et al.*, 1997), le concombre (Ladyzynski *et al.*, 2002, Filipecki *et al.*, 2006).

Dans un contexte d'amélioration variétale, ces vitrovariations présentent de nouvelles caractéristiques pouvant interposer les sélectionneurs, comme une meilleurs adaptation à des conditions environnementales extrêmes (sècheresse, basse températures, salinité) ou bien encore des résistances à certains pathogènes (insectes, champignons, bactéries (Duncan., 1997; Jain., 2001).

2.8. Avantages et Inconvénients de la culture *in vitro*

Les plantes régénérées via les outils de la biotechnologie sont génétiquement homogènes identiques à la plante ou variété de départ et peuvent être obtenues tout au long de l'année indépendamment des saisons. De plus, elles sont d'un bon état sanitaire, peuvent être produites en un laps de temps réduit à partir de peu de matériel végétatif permettant ainsi un gain considérable de place dans les serres d'où une économie d'énergie. Cette méthode acquière une importance particulière dans le cas des espèces difficiles à se reproduire naturellement, les plantes stériles. Elle permet également la conservation des variétés anciennes, facilite le transport des vitroplants d'un pays à l'autre sans risques sanitaires.

La culture *in vitro* malgré ces innombrables et importants avantages présentent cependant quelques inconvénients qui nécessitent d'être mentionnés dont notamment la nécessité d'un équipement spécialisé dispendieux pour sa mise en place. De plus les conditions optimales de culture ne sont pas toujours facilement déterminées.

Chapitre 3 :

Matériels

et méthodes

1. Matériel végétal

Les graines d'*Atriplex halimus* L., sont prélevées de l'atriplexaie de l'IAP (campus universitaire Es-Sénia, Oran).

2. Méthodes

2.1. Préparation du semis et obtention des plantes

Les graines subissent une décortication des téguments afin d'éviter l'effet inhibiteur de ces derniers. Elles sont désinfectées par passage dans une solution d'hypochlorite de sodium (NaClO) à 2% pendant 5 minutes puis rincées trois fois avec l'eau distillée stérile. Les graines sont ensuite mises à germer dans des pots remplis de terreau stérilisé et imbibé d'eau distillée stérile. La culture est menée dans une serre (abri vitré) et les plantes sont arrosées quotidiennement avec l'eau distillée.

2.2. Choix du milieu de culture

Le milieu de culture est une solution aqueuse constituée de sels minéraux, d'eau, de substances organiques et de régulateurs de croissance (hormones végétales). Le milieu de culture le plus utilisé est celui de Murashige et Skoog (1962) enrichi des hormones de croissance AIA (acide indole-3-acétique), 2,4-D (dichlorophenoxy acétique) comme auxines et la kinétine à des concentrations différentes. Le milieu de base MS est additionné de 10g d'agar, de 100mg d'inositol, 30 mg de saccharose et de vitamines. Le pH du milieu est ajusté à 5,8 puis les milieux sont autoclavés à 120°C pendant 20 minutes.

2.3. Induction de la callogenèse

Les tiges et les feuilles sont séparées soigneusement, les tiges débitées en segments d'environ 0,5 cm dépourvus de nœuds. Les feuilles sont découpées en fragments d'environ 0,5 cm de côté et les explants sont désinfectés avant leur mise en culture sous hotte à flux laminaire selon le Protocole suivant :

- Trempage dans une solution d'éthanol à 70% pendant dix minutes.
- Rinçage cinq fois à l'eau distillée stérile.
- Trempage dans l'hypochlorite de sodium à 5% pendant 20 minutes.
- Rinçage cinq fois à l'eau distillée stérile.
- Séchage avec du papier filtre stérilisé.

Les explants sont ensuite repiqués à raison de 50 explants sur le milieu d'initiation de la callogenèse enrichi de régulateurs de croissance: auxine (2-4D) et cytokinine (kinétine) (Tab. 1). Ces différentes hormones sont choisies pour leur aptitude à stimuler la croissance cellulaire et à favoriser une prolifération cellulaire de type cal.

Ce travail est réalisé sous hotte, les boîtes sont ensuite placées dans une chambre de culture sous une photopériode de 16h et à $22^{\circ}\text{C} \pm 2$. Le pourcentage de callogenèse est calculé après un mois de mise en culture sur les différents milieux.

Tableau1 : Les différentes combinaisons hormonales testées

Milieux \ Hormones	KIN mg^l⁻¹	2-4 D mg^l⁻¹
M1	0,5	0,5
M2	1	1
M3	1,5	1,5
M4	2	2

2.4 .Micropropagation

Le terme micropropagation désigne l'ensemble de techniques qui sont développées afin de régénérer des plantes complètes à partir de divers explants. Des fragments d'environ 1cm comportant un ou deux nœuds, sont prélevés sur de jeunes rameaux d'*Atriplex halimus* débarrassés de leurs feuilles. Après désinfection selon le protocole décrit précédemment, les fragments sont mis en culture sur le milieu MS dilué ou non de moitié et additionné de différents régulateurs de croissance : 6-benylaminopurine (BAP) acide α -naphtaline acétique (ANA), kinétine et acide indole-3acétique (AIA) (Tab.2).

Tableau 2 : Composition des différents milieux de micropropagation testés

Hormones	ANA	BAP	Kinétine	AIA
Milieux				
MS0 (dilué de moitié)	0	0	0	0
MS1 (dilué de moitié)	$10^{-7}M$	$10^{-6}M$	0	0
MS2 (dilué de moitié)	$2 \times 10^{-7}M$	$10^{-6}M$	0	0
MS3			0,57 μ M	4,7 μ M

Chapitre 4 :

Résultats

et discussion

Clicours.COM

Résultats et Discussion

1. Initiation de la callogenèse chez *Atriplex halimus*

1.1. Résultats

L'utilisation de la composition hormonale 2,4-D/Kinetine aux différentes concentrations (0.5/0.5 mg/l, 1.0/1.0 mg/l, 1.5/1.5 mg/l, 2.0/2.0 mg/l) induit la formation de cals à partir des explants de tiges et des feuilles chez *Atriplex halimus*.

La réaction des explants aux milieux de culture est observée au bout de 10 à 15 jours pour les segments de tige. Elle se manifeste par un gonflement des explants puis déchirement de l'épiderme et formation de boursoflures. La réponse des feuilles est plus tardive et n'est perceptible qu'après 4 semaines. Elle se traduit par un gonflement puis une formation de petits amas de cellules au niveau de la nervure principale, le limbe ou les zones d'excision.

Après un mois de culture, l'analyse des résultats obtenus montre que la combinaison entre le 2,4-D et la Kinétine semble favorable à la callogenèse chez *Atriplex halimus*. Toutefois, il est remarqué que le taux de cals formés varie selon le type d'explants mis en culture et les concentrations d'hormones utilisées.

Selon la source d'explant, ce sont les segments de tiges qui expriment un potentiel callogène où plus de 74% des explants mis en culture forment des cals. Un taux élevé (90%) est obtenu sur le milieu M1 suivi du milieu M2 (82%), M4 (78%) et M3 (74%). Les feuilles montrent une plus faible réactivité et plus de 42 % des explants mis en culture n'ont pas évolué en cals. Des quatre balances hormonales testées, c'est le milieu M3 (58%) qui semble favorable à la callogenèse pour ce type d'explants comparé aux milieux M2 (46%), M1 (44%), et M4 (38%).

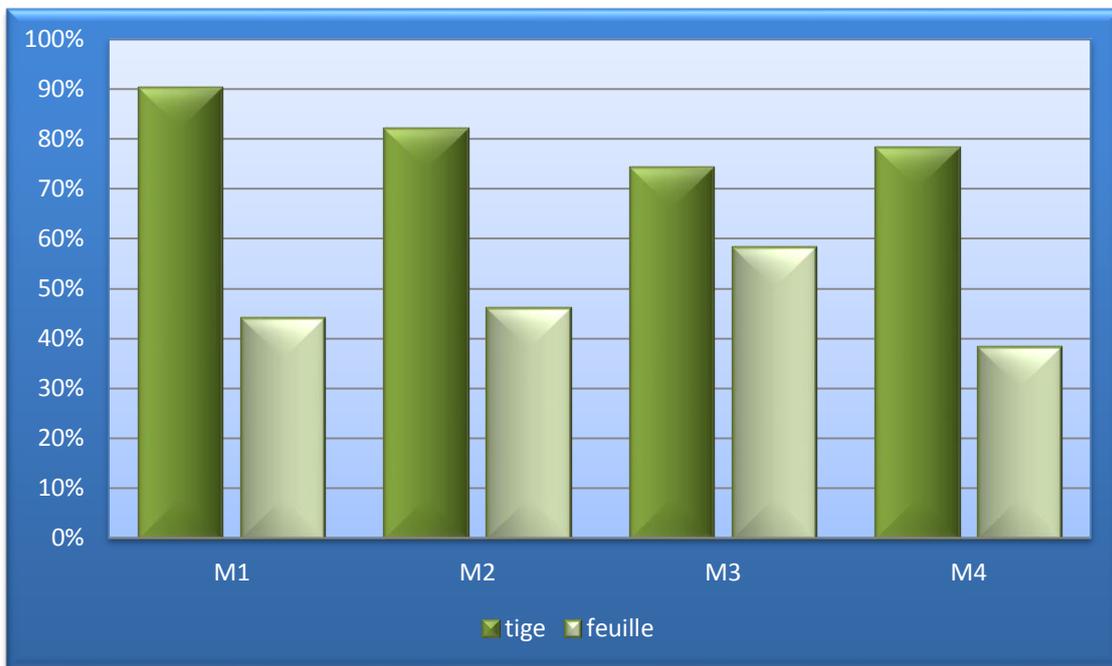


Figure 2: Taux de cals formés à partir d'explants de tiges et de feuilles après un mois de culture sur le milieu MS additionné 2,4 -D/ Kinetine après 1 mois de culture à 22°C ± 2 et 16 heures de photopériode.

Sur le plan morphologique, après 15 jours de mise en culture, sur le milieu de culture (2,4D/kinetine), l'induction de la callogenèse des explants de tiges se manifeste par une déchirure de l'épiderme (Fig1), sous l'influence des divisions cellulaires internes. Ce gonflement prolifère par la suite et donne, après un mois naissance à un cal plus ou moins nodulaire de consistance friable parfois dur et de couleur beige ou vert clair (Fig.3).

En ce qui concerne les explants foliaires qui manifestent au bout de deux premières semaines de mise en culture, une simple turgescence suivie de l'apparition de point blancs ou marron clair au niveau des zones d'excision, sur les limbe des feuilles et au niveau de la nervure principale. La prolifération de ces amas donne naissance après 1 mois à de petits cals de consistance friable, nodulaires et d'une couleur qui varie entre le beige et le marron clair (Fig. 4, 5).

Compte tenu des résultats obtenus, le milieu MS additionné de 2,4-D et kinetine induit chez *Atriplex halimus* l'aptitude à la callogenèse, la morphologie de cals obtenus dépend de la nature de l'explant et la concentration des phytohormones utilisée.

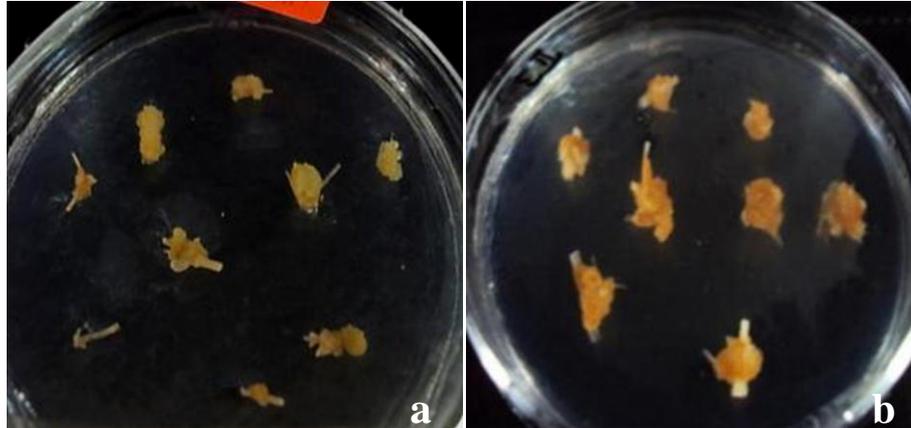


Figure 3 : Aspects morphologiques des explants de tiges d'*Atriplex halimus* après 30 jours de mise en culture sur différents milieux MS additionné de combinaison hormonale 2,4 D/ Kinetine à différentes concentrations, (a)cals obtenus sur le milieu M3(1,5 2,4-D/ 1,5 Kin) mg/l, (b) cals obtenus sur le milieu M2 (1,0 2,4-D/ 1,0 Kin)mg/l.

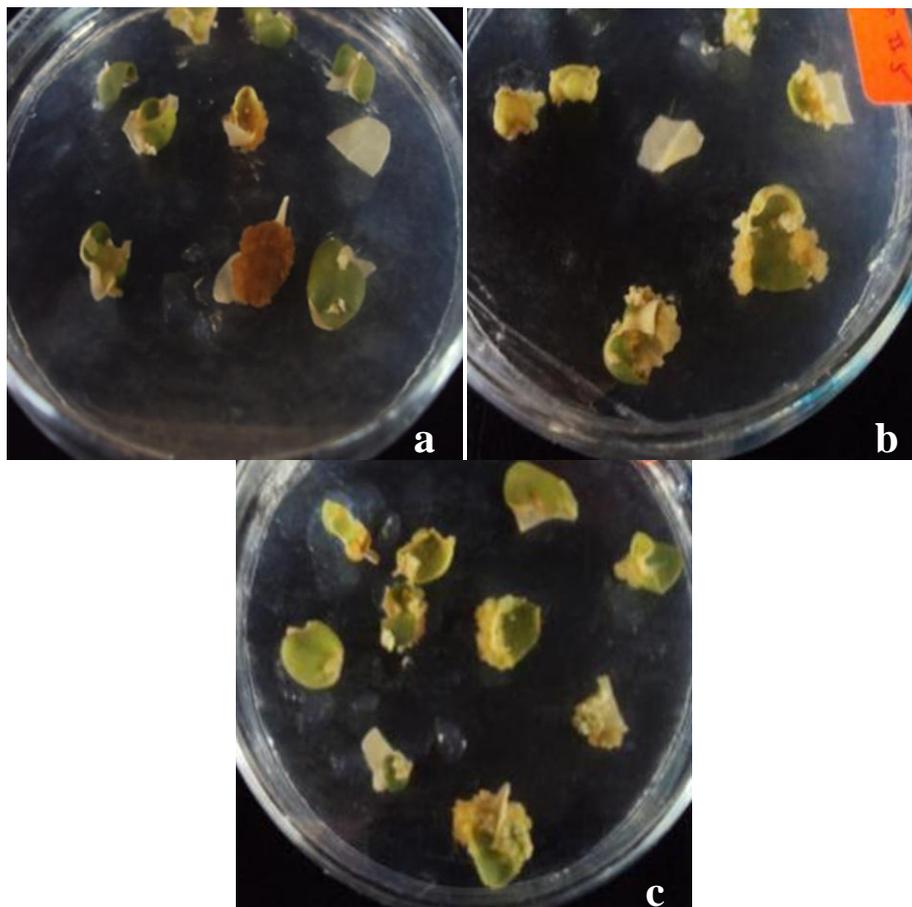


Figure 4 : Aspects morphologiques des explants feuilles d'*Atriplex halimus* après 30 jours de mise en culture sur différents milieux MS additionné de combinaison hormonale 2,4 D/ Kinetine à

différentes concentrations. (a) cals obtenus sur le milieu M4 (2,0 2,4-D/ 2,0 Kin) mg/l, (b) cals obtenus sur le milieu M3 (1,5 2,4-D/ 1,5 Kin) mg/l, (c) cals obtenus sur le milieu M1 (0,5 2,4-D/ 0,5 Kin) mg/l) .

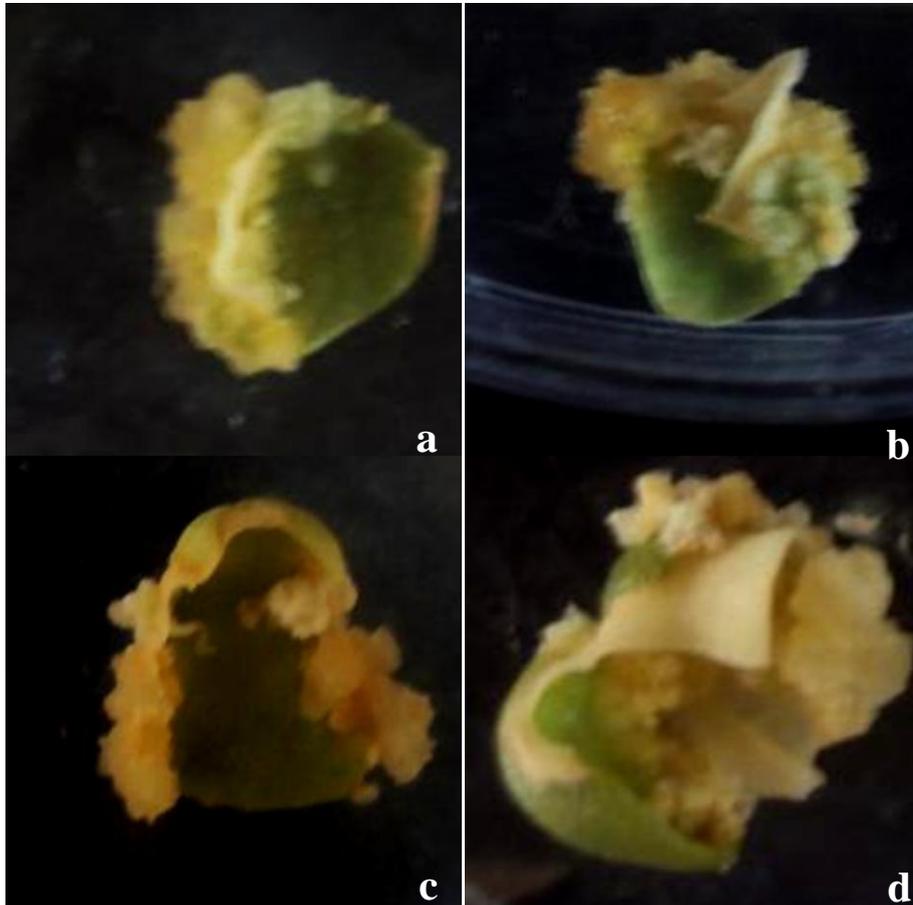


Figure 5 : Aspect des cals à partir d'explants foliaires montrent les différentes zones concernées par les divisions cellulaires chez *Atriplex halimus*, zone d'excision (a), au niveau de la nervure principale (b) et/ou le limbe (c,d).

Après repiquage sur le même milieu, les cals prolifèrent et forment un amas cellulaire important. Dans le cas des feuilles ils sont friables, formés de nombreux nodules visibles et une coloration marron claire (Fig. 6), les cals de tige présentent les mêmes caractéristiques morphologiques.

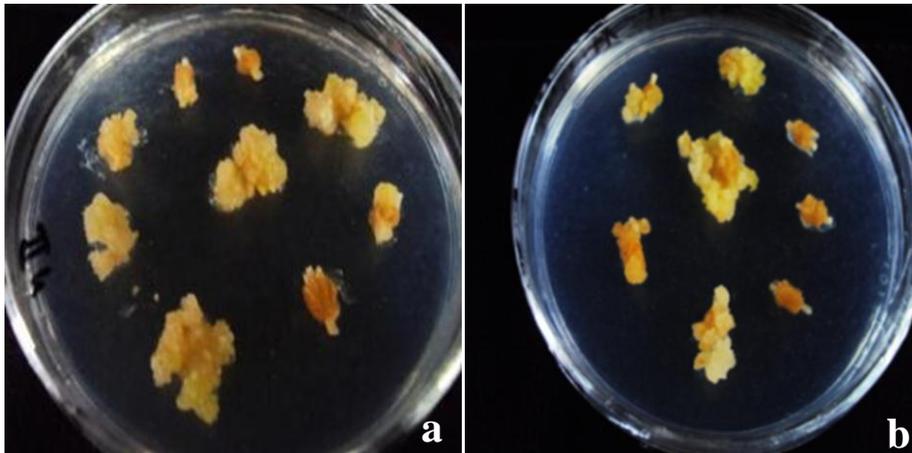


Figure 6 :Aspects morphologiques des explants de tiges d'*Atriplex halimus* après deux mois de mise en culture sur différents milieux MS additionné de combinaison hormonale 2,4 D/ Kinetine. (a) cals obtenus sur le milieu M3((1,5 2,4-D/ 1,5 Kin) mg/l, (b) cals obtenus sur le milieu M4 (2,0 2,4-D/ 2,0 Kin) mg/l.

Il est remarqué que l'initiation de la callogenèse sur les différents milieux testés est influencée par la nature de l'explant, la composition hormonale.. D'une manière générale, les différents résultats montrent une variabilité de réponse des deux types d'explant par rapport aux hormones utilisées. Le milieu M1(0.5/0.5 mg/l ; 2-4D/Kin) est celui qui a favorisé le maximum de réactivité des explants de tige chez *Atriplex halimus* et le milieu M3 (1,5/1,5 mg/l ; 2,4-D /Kin) dans le cas des explants foliaires.

1.2. Discussion

L'initiation de la callogenèse est étudiée chez *Atriplex halimus* à partir de segments de tiges et de feuilles mis en culture sur le milieu MS additionné de différentes concentrations d'auxines et de cytokinines.

La culture *in vitro* des végétaux exploite des potentialités morphologiques masquées au cours du développement d'un végétal, de nombreux méristèmes sont formés à partir de cellules différenciées sous l'influence de régulateurs de croissance. Des cellules dites «compétentes» subissent une dédifférenciation, retrouvent leur état méristématique et se divisent activement pour donner un cal (Ighilhariz, 2008). Les cellules somatiques des plantes contiennent toute l'information génétique nécessaire à la création de plants complets fonctionnels, elles sont totipotentes. Ainsi, une reprogrammation cellulaire complète est déclenchée (Fehér, 2006), induisant une élimination de profils et une mise en place d'un nouveau programme développemental (Fehér *et al.*, 2003).

La callogenèse est d'abord précédée par une dédifférenciation qui conduit des cellules quiescentes à retrouver une réactivité mitotique suivie d'une organisation spécifique.

Le suivi des résultats montre que les tiges et feuilles manifestent une réponse variable. En effet ce sont les explants de tiges qui sont plus réactifs par rapport aux explants de feuilles qui manifestent une réponse plus tardive quant au déclenchement de la callogenèse. Il est admis que l'acquisition de la compétence à la callogenèse est dépendante de plusieurs facteurs à savoir, les phytohormones utilisées et le type d'explant (Margara, 1989) mais également l'état physiologique des cellules cibles notamment le contenu en hormones endogènes (Gueye, 2007).

La connaissance du rôle des régulateurs de croissance dans les phénomènes d'organisation de cultures cellulaires a permis aux techniques de multiplication *in vitro* d'acquies d'importants progrès. La combinaison entre auxine et cytokinine joue un rôle fondamental dans l'orientation de

l'organogenèse végétale, et plusieurs auteurs rapportent qu'un taux élevé de callogenèse est obtenue lorsque le rapport cytokinine/auxine est égale à l'unité (Margara, 1984 ; Boxus, 1995).

Toutes les parties d'une plante sont susceptibles de suivre un processus de dédifférenciation, les jeunes feuilles et les jeunes tiges sont plus réactives ce qui indique que le pouvoir callogène n'est pas influencé seulement par la combinaison hormonale ou le type d'explant mais aussi l'âge de l'explant (Augé *et al.*, 1989),

La combinaison hormonale 2-4D/Kinétine à différentes concentrations a induit, chez *Atriplex halimus*, la formation de cals à partir des deux explants. Ces résultats sont rapportés par Ighilhariz (2008) sur *Atriplex halimus* et *Atriplex canescens*. En effet, chez ces deux espèces, la callogenèse est favorisée par l'utilisation du milieu MS additionné de deux combinaisons hormonales 2,4D/kinétine ou AIA/Kinétine à différentes concentrations. Cette dernière combinaison a également induit la formation de cals chez *Atriplex halimus* (Benrebiha (2005). Par ailleurs, Chaouch et Abdul Hussain (2008), montrent que le milieu MS contenant de l'AIA comme auxine et la BAP comme cytokinine à différentes concentrations initie la formation de cals à partir des explants nodaux et foliaire d'*Atriplex halimus* mais également chez *Atriplex nummularia* (Meza *et al.*, 1998). Toutefois, il faut signaler que la combinaison AIA/kinétine a induit également chez *Atriplex halimus* une embryogenèse somatique à partir des explants de tiges (Benrebiha (2005).

Les résultats obtenus montrent une faible réactivité des feuilles comparées aux tiges. Ceci est également rapporté par Ighilhariz (2008) et Halfaoui (2010).

Les régulateurs de croissance jouent directement ou indirectement un rôle indicateur des séquences génétiques, en activant ou réprimant des gènes particuliers. Les recherches les plus récentes mettent en œuvre la technique de microalignement qui ont montré que les tissus végétaux traités par des hormones végétales manifestent des modifications de l'expression de dizaines même de centaines de gènes (Ravin *et al.*, 2007). Les hormones sont responsables de la synthèse de protéines à rôle organisateur et les cellules somatiques spécialisées sont alors engagées dans une phase de dédifférenciation par réactivation sous l'effet des hormones de croissance (Gueye *et al.*, 2008).

Plusieurs travaux arborent le rôle indéniable des auxines et cytokinines dans l'induction de la callogenèse chez plusieurs espèces de Monocotylédones et Dicotylédones herbacées ou ligneuses: palmier dattier (Khelifi *et al.*, 1985, Sané *et al.*, 2006 ; Asemata *et al.*, 2007), le palmier à huile (Noiret *et al.*, 1986), le kiwi (Lahlimi *et al.*, 2001), le blé (Oudija *et al.*, 2002), le fraisier (Lamarti. *et al.*, 2005), le cotonnier (Kouadia *et al.*, 2004, Tanoh hilaire *et al.*, 2009), *Atriplex*

halimus (Benrebiha, 2005, Ighilhariz, 2008, Halfaoui,2010) *Atriplex canescens* (Ighilhariz, 2008, Halfaoui,2010) et la pomme de terre douce (Triqui, 2009).

L'utilisation de la même combinaison hormonale 2,4D/kinetine a permis la formation de cals à partir d'hypocotyles et de cotylédons chez d'*Atriplex halimus* (El Ferhi, 2005). Des cals sont également initiés sur le milieu MS additionné d'AIB/BAP à partir d'explant nodaux et d'apex chez *Atriplex nummularia* (Meza *et al.*, 1998).

Les résultats obtenus révèlent que l'induction de la callogenèse chez *Atriplex halimus* est influencée par la concentration des régulateurs de croissance ajoutés au milieu de culture et la source de l'explant mis en culture. La combinaison entre 2,4D et la kinetine est favorable à l'initiation de la prolifération cellulaire à partir des deux types d'explant testés. Il est toutefois remarqué que la réactivité des explants d'entreœuds est plus élevée comparé aux feuilles et les cals formés présentent des caractéristiques morphologiques variable.

2. Micropropagation *in vitro* à partir des bourgeons axillaires chez *Atriplex halimus*

2.1. Résultats

La micropropagation ou multiplication végétative ou encore la multiplication conforme, utilise les capacités naturelles de multiplication d'une espèce pour la produire un grand nombre de fois, la reproduction étant conforme, on obtient ainsi des clones.

La multiplication par bourgeons axillaires d'*Atriplex halimus* a été obtenue à partir de matériel végétal âgé de 3 mois cultivé sur du terreau et sous abri vitré. Les segments nodaux comprenant selon le cas 1 ou 2 bourgeons axillaires sont mis en culture sur milieux MS dilué ou non, additionné de différents régulateurs de croissance. Les réponses morphologiques sont différentes selon le milieu de culture utilisé (Fig.7).

L'utilisation du milieu MS (Murashige et Skoog, 1962) dilué de moitié ou non et additionné d'AIA/BAP ou ANA/kinetine à différentes concentrations, a induit après 15 jours de culture des réactions chez les explants nodaux d'*Atriplex halimus*. La culture de microboutures sur les milieux MS0 (milieu MS sans hormones), MS1 (Milieu MS dilué de moitié et additionné de 10^{-7} M ANA et 10^{-6} M BAP) MS2 (Milieu MS dilué de moitié et additionné de 2.10^{-7} M ANA et 10^{-6} M BAP, MS3 milieu MS additionné de $0,57\mu\text{M}$ Kinétine et $4,7\mu\text{M}$ AI a permis d'observer différentes modifications. Sur le milieu MS3 une prolifération cellulaire ou formation de cals de couleur beige foncé à marron claire est observée, alors que les milieux MS0, MS1, MS2 ont permis un débourrement des explants, avec des taux respectifs de 46%, 28% et 32% (Tab.3).

Tableau3 : Pourcentage de débourrement des bourgeons axillaires à partir d'explants nodaux d'*Atriplex halimus* mis en culture sur milieux MS dilué et additionnée ou non de régulateurs de croissance sous une photopériode de 16h et $22\pm 2^\circ\text{C}$.

Milieux	15 jours	1 mois	2 mois
MS0	46%	68%	76%
MS1 (ANA/BAP) 10^{-7} M ANA / 10^{-6} M BAP	28%	42%	46%
MS2(ANA/BAP) 2.10^{-7} MANA/ 10^{-6} M BAP	38%	54,5%	58 %
MS3 (AIA/kinetine) $0,57\mu\text{M}$ kinetine/ $4,7\mu\text{M}$ AIA	0	0%	0%

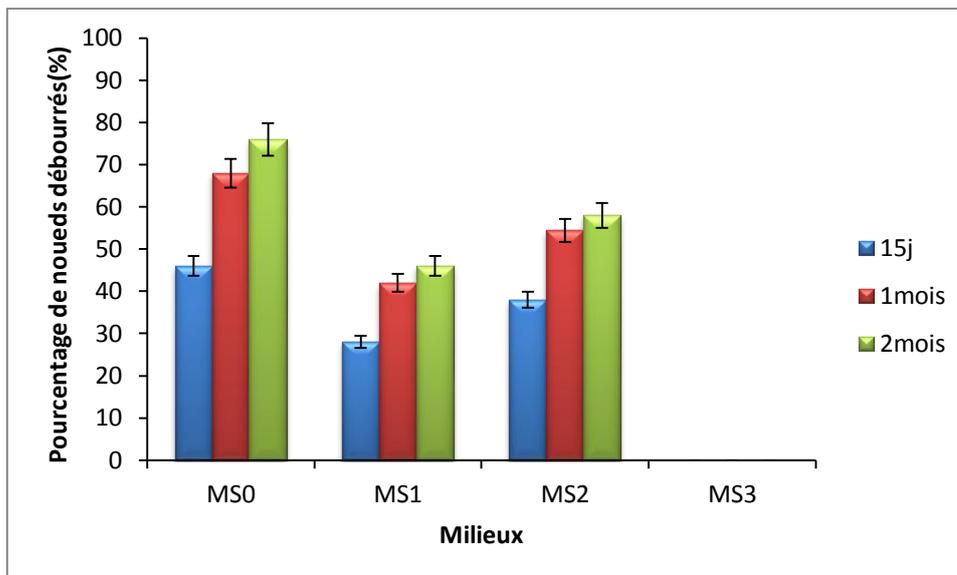


Figure 7 : Pourcentage de bourgeons évolués en pousses sur les milieux MS0, MS1, MS2 et MS3.

La première manifestation durant les deux premières semaines est un gonflement des explants qui perdent leur consistance compacte suivie par l'apparition d'une prolifération tissulaire à la base du nœud. Cette prolifération axillaire est à l'origine de la caulogénèse et de la rhizogénèse, (Fig.8) sur le milieu MS0 (milieu MS dilué de moitié et sans hormone), MS1 (ANA/BAP), MS2 (ANA/BAP) alors que sur le milieu MS3 (AIA/Kinétine). nous observons une callogénèse.

Le même profil est observé après un mois de culture où sur le milieu MS0, 68% des bourgeons mis en culture présentent des débourrements 54% sur MS2 et 42% sur MS1. Le suivi de l'évolution des explants après deux mois de culture montre que le milieu MS dilué de moitié sans hormones semble être plus favorable au déclenchement du débourrement des bourgeons axillaires d'*Atriplex halimus* qui se traduit par le développement de pousses feuillées (Fig.9) avec la formation chez quelques explants de racines spontanées (Fig.12). L'ajout d'une combinaison hormonale regroupant ANA et BAP à de fortes concentrations sur le milieu MS2 permet d'obtenir un taux appréciable de débourrement (fig11). Ce taux diminue dans le milieu MS1 lorsque la concentration de l'ANA est diminuée avec le maintien de la même concentration de BAP (fig10). Sur le milieu MS3 (de 0,57 μ M kinetine /4,7 μ M AIA) aucune évolution organogène n'est observée des bourgeons mis en culture (Fig.13). La combinaison entre AIA et KIN à ces concentrations semble favorable à l'orientation des explants vers une callogénèse, ainsi des amas cellulaires compacts nodulaires d'une couleur marron à beige sont formés.

Après deux mois de cultures sur ces différents milieux, il est important de noter que le milieu MS dilué de moitié et dépourvu d'hormones végétales est celui qui favorise le taux le plus important de débourrement de bourgeons axillaires (78%), 58% sur MS2 et 46% sur MS1, un aspect en rosette est observé dû à l'inhibition de l'élongation des entrenœuds. Un enracinement spontané est également observé sur les milieux MS0, MS1, et MS2, les racines qui s'installe du côté du bourgeon sont ramifiées, portent de nombreuses et courtes radicelles (fig.13). Les feuilles sont petites et vertes. Des ramifications secondaires sont également formées à l'aisselle des feuilles néoformées et les plantes obtenus présentent un état de miniaturisation dû aux conditions de culture.

Après deux mois de cultures sur les différents milieux, les explants présentent le même aspect morphologique, Cependant il est important de noter que le milieu MS dilué de moitié et dépourvu d'hormone végétale est celui qui favorise le taux le plus important de débourrement de bourgeons axillaire(78%),58% sur MS2 et 46% sur MS1, un aspect en rosette est observé dû à l'inhibition de l'élongation des entrenœuds.



Figure 8: Micropropagation *in vitro* par bourgeons axillaires d'*Atriplex halimus* après deux semaines de mise en culture sur milieu MS additionnée ANA et BAP, les flèches indiquent l'initiation de débourrement.

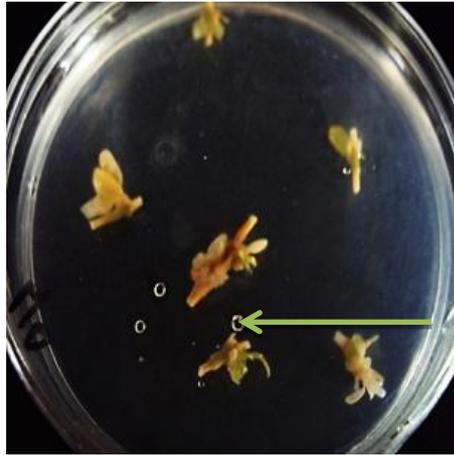


Figure 9: Micropropagation *in vitro* par bourgeons axillaires d'*Atriplex halimus* après quatre semaines de mise en culture de milieu MS sans hormones végétales dilué de moitié, les flèches indiquent le développement des jeunes pousses sur l'explant binodal.

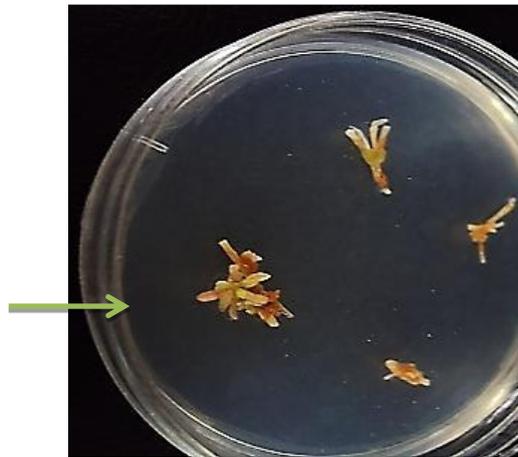


Figure 10: Micropropagation *in vitro* par bourgeons axillaires d'*Atriplex halimus* après quatre semaines de mise en culture de milieu MS1 additionnée ANA et BAP, les flèches indiquent l'initiation de pousses sur l'explant binodale.



Figure 11: Micropropagation *in vitro* par bourgeons axillaires d'*Atriplex halimus* après quatre semaines de mise en culture de milieu MS2 additionnée ANA et BAP, les flèches indiquent la néof ormation de feuilles et enracinement.



Figure.12 : Ramifications secondaires de racine néoformée obtenue sur milieu MS dilué de moitié sans hormones MS0.

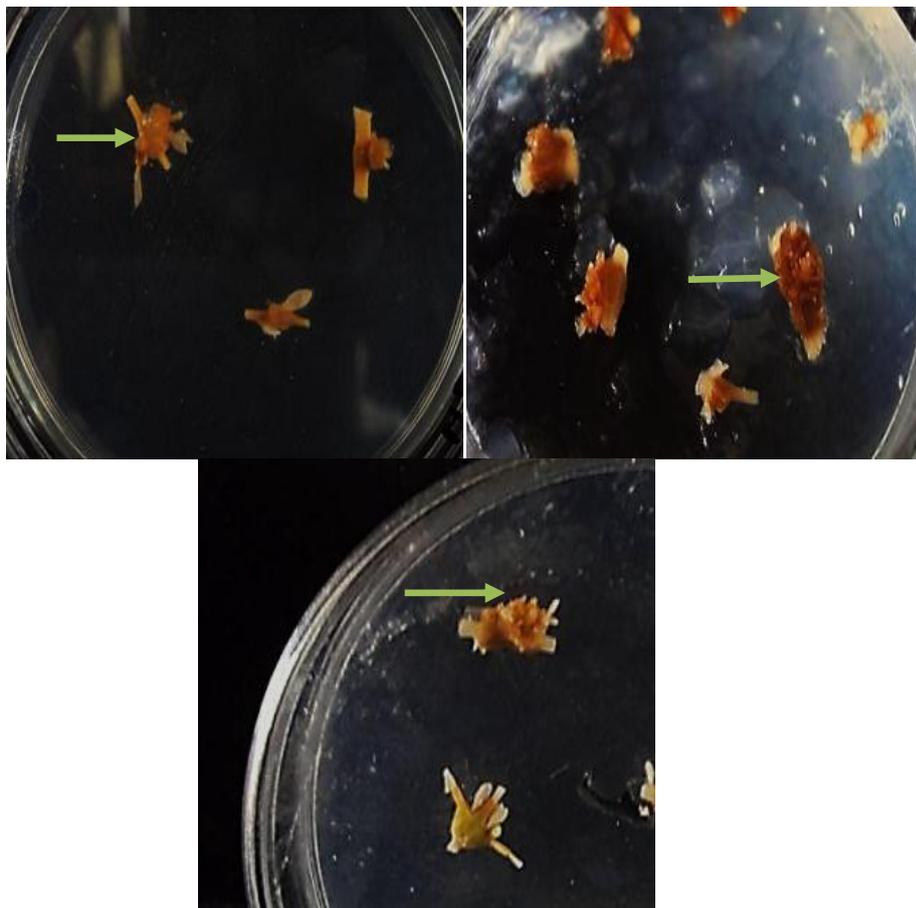


Figure 13 : Les tentatives pour obtenir une micropropagation par développement d'axillaires échoué et une initiation de callogenèse intense observée au niveau du nœud sur les MS3.les les flèches indiquent les cals initiées à partir des explants nodaux après 1 mois de mis en culture.

2.2.. Discussion

La micropropagation figure parmi les techniques de base les plus développées. Elle permet à partir d'un matériel de départ souvent très restreint, d'obtenir en un temps court et dans un espace minimum, un rythme de multiplication extrêmement élevé et donc la formation rapide d'un clone (Haicour., 2002).

L'objectif principal de ce travail consiste à essayer de régénérer *in vitro* des plantes entières d'*Atriplex halimus* par micropropagation. A cet effet, les bourgeons axillaires d'*Atriplex halimus* sont mis en culture. Une partie des explants est cultivée sur le milieu MS dont les macroéléments sont dilués de moitié sans ajout de régulateurs de croissance exogènes et pour le deuxième lot, le milieu MS de base additionné de différentes combinaisons hormonales (ANA/BAP) et (AIA/kinetine).

Plusieurs travaux montrent l'effet d'auxines et de cytokinines sur la micropropagation et les phénomènes de l'organogénèse. C'est le cas chez *Acacia auriculiformis* une plante ligneuse dont le pourcentage le plus important de débourrements a été obtenu sur un milieu MS+BAP+ANA alors que la rhizogénèse est obtenue sur MS dilué de moitié- (Girijashankar., 2011). Chez le curcuma *Bosenbergia rotunda* L., une plante médicinale très importante, la micropropagation par bourgeons axillaires sur milieu MS supplémenté de BAP et ANA a induit un débourrement et formation de pousses jusqu'à 80% avec un enracinement spontané dans presque tous les milieux testés (Norazma *et al.*, 2011).McGranahan et Leslie (1990) montrent que la micropropagation du noyer *Juglans regia* L. est obtenue sur milieu MS contenant 0,44-2,7 μM BAP et 0,54-1,6 μM ANA et l'enracinement sur MS additionné de 1,5 μM ANA et AIB.

la micropropagation *in vitro* de *Lilium longiflorum* utilisant les nœuds sur milieu MS contenant 1 mg l^{-1} acide gibbérellique (GA_3) et 0,5 mg l^{-1} 6-benzyladénine (BA) ont abouti à la formation de tige après une culture de 3 mois, la rhizogénèse est initiée sur le milieu 1/2 MS contenant 0,2 mg l^{-1} acide α -naphtalène (ANA). Une centaine de plants acclimatées en serre ont eu une survie de 100% (Leslie *et al.*, 1992).

Les résultats obtenus dans le cas d'*Atriplex halimus* montrent que les différents milieux testés à l'exception de milieu MS3 (AIA/Kinetine) qui s'est un milieu callogène, une caulogénèse multiple est une rhizogénèse sont simultanément obtenues. Ces résultats se déroulent habituellement en deux étapes, la première est la stimulation et le développement de la partie végétative et la seconde et la rhizogénèse qui sont obtenus en culture primaire. Ils peuvent avoir

des répercussions positives sur le plan économique car la formation de racines est souvent trop délicate et s'avère être à l'origine de nombreux échecs (Tourte et Tourte, 1998).

Les bourgeons mis en culture sur le milieu MS dilué de moitié ont un taux élevé de débourrement sans addition d'hormones. Les travaux de Fotso (2005) ont montré que le milieu de Murashige et Skoog. (1962) dilué de moitié (MS/2) est favorable à l'organogenèse *in vitro* chez plusieurs espèces ligneuses tropicales et influe sur l'aspect des vitro plants (Souyah *et al.*, 2004). L'utilisation de ce milieu sans hormones et dilué de moitié a permis l'obtention de pousses feuillées et un enracinement spontané sur les différents milieux ce qui serait probablement lié au taux de régulateurs de croissance endogènes suffisant au déclenchement du processus de formation de nouvelles pousses. Ces résultats sont en concordance avec ceux déjà rapportés par Ighilhariz (2008). Par ailleurs, le milieu MS de base associé à une combinaison hormonale regroupant ANA et la BAP est également favorable à l'orientation des bourgeons axillaires d'*Atriplex halimus* vers une micropropagation. Cependant, il est remarqué que pour la même combinaison hormonale, l'augmentation de la concentration de l'ANA augmente le taux de débourrement. En effet selon Gupta *et al.*, (2001), le rapport auxine/ cytokinine joue un rôle important dans les programmes d'organogenèse et la néoformation des pousses à partir de bourgeon axillaire est favorisée par un rapport auxine/cytokine faible alors que la forte concentration en auxines et cytokinines jouent un rôle inhibiteur. La balance hormonale combinant entre AIA et KIN testée semble être seulement en faveur d'une callogenèse.

Les travaux de Wochok et Lewis (1980) sur l'*Atriplex halimus* montrent que l'utilisation d'une auxine seule (AIA) ou de la Kinetine ne favorise pas le débourrement des bourgeons axillaires, alors que la combinaison AIA/Kinetine à différentes concentrations a des réponses organogènes différentes, les travaux d'Ighilhariz (2008) vont dans le même sens.

La multiplication de l'*Atriplex canescens* par micropropagation *in vitro* est également rapporté par Wurllet (1987) et Mei *et al.*, (1997) où le débourrement est obtenu en présence de MS additionné d'AIB à 1mg /l. L'association de l'AIB et de l'acide gibbérellique(Ga3) a favorisé la stimulation de la rhizogenèse. Ces derniers auteurs ont également obtenu un enracinement direct sur le sol.

Le milieu MS dilué de moitié, seul sans hormones est favorable à la micropropagation chez *Atriplex halimus* à partir de bourgeons axillaires. L'utilisation du milieu MS de base additionné de l'ANA comme auxine combinée à la BAP comme cytokinine permet également d'obtenir des vitro plants chez cette espèce. Par ailleurs, l'ajout d'un autre type d'hormones à savoir l'AIA et la KIN oriente les explants vers une dédifférenciation et formation de cals.

La qualité naturelle de multiplication végétative par bourgeons axillaire s'expriment pleinement sur des milieux sans hormones, la caulogenèse et toujours précoce par rapport à la rhizogenèse, le milieu MS0(sans hormones) dilué de moitié assure un développement plus rapide que les trois milieux MS1, MS2,.La richesse et l'équilibre des macroéléments ainsi que la dose de sucre conviennent parfaitement au développement. Le taux le plus faible de débourrement est observé sur le milieu MS1, et une absence totale de tout processus organogène sur le milieu MS3.Les vitroplants obtenus présentent un aspect en rosette avec l'apparition de plusieurs tiges feuillées et racines

A la lumière des différents résultats obtenus, la multiplication végétative *in vitro* d'une espèce endémique *Atriplex halimus* serait possible. Vu l'importance économique et écologique de cette xerohalophyte, il serait intéressant de développer des programmes de recherche dans le cadre de la réhabilitation et le repeuplement des zones désertiques et salées.

The logo for Clicours.COM, featuring the text "Clicours.COM" in a white, sans-serif font centered on a solid blue rectangular background.

**Conclusion
et
Perspectives**

Conclusion et perspectives

Les différentes méthodes de culture *in vitro* réalisées au cours de ce travail ont permis d'atteindre les objectifs fixés.

Une callogenèse à partir des explants de tige et de feuilles chez *Atriplex halimus* a pu être introduite sur milieu MS (Murashige et Scoog, 1961) additionné de différentes hormones végétales. On a constaté que l'initiation de la callogenèse sur les différents milieux testés est influencée par la nature de l'explant, la composition hormonale.

La composition hormonale interfère aussi avec la nature de l'explant et de l'espèce. En effet ce sont les explants de tige qui présentent toujours des taux de cals plus importants, cette réactivité est précoce chez les explants de tiges et tardive dans le cas des explants foliaires, une diversité morphologique des cals est obtenue ; la consistance, la couleur et l'aspect qui varient selon le type d'explant. Dans le cas des tiges les cals sont nodulaires de consistance friable parfois dure et de couleur beige ou vert clair. Le milieu M1 (0.5/0.5 mg/l ; 2-4D/Kin) est celui qui a favorisé le maximum de réactivité des explants de tige. En ce qui concerne les explants foliaires, les cals sont de consistance friable, nodulaires et d'une couleur qui varie entre le beige et le marron clair et le milieu M3 (1.5/1.5 mg/l ; 2-4D/Kin) dans le cas des explants foliaires.

La micropropagation a pu être réalisée sur le milieu MS dilué de moitié et non dilué avec ou sans hormones. Les résultats après deux mois de culture révèlent que le milieu MS dilué de moitié sans hormones semble être plus favorable au déclenchement du débourrement des bourgeons axillaires d'*Atriplex halimus* qui se traduit par le développement de pousses feuillées avec la formation chez quelques explants de racines spontanées. L'ajout d'une combinaison hormonale regroupant ANA et BAP à de fortes concentrations sur le milieu MS2 permet d'obtenir un taux appréciable de débourrement. Ce taux diminue dans le milieu MS1 lorsque la concentration de l'ANA est diminuée avec le maintien de la même concentration de BAP. Sur le milieu MS3 (de 0,57 µM kinétine / 4,7 µM AIA) aucune évolution organogène n'est observée des bourgeons mis en culture. La combinaison entre AIA et KIN à ces concentrations semble favorable à l'orientation des explants vers une callogenèse, ainsi des amas cellulaires compacts nodulaires d'une couleur marron à beige sont formés.

**Reference
bibliographique**



- Abrie A.L Et Staden J.V .**, 2001. Micropropagation of the endangered *Aloe polyphylla*. Plant Growth Regulations 33: 19 - 23.
- Aboura. R.**2006 Comparaison phytoécologique des atriplexaie situées au nord et au sud de Tlemcen. Thèse de magister. Université Abou Bakr Belkaid-Tlemcen.181p
- Adams P., Thomas J.C., Vernon D.M, Bonhert H.J., Jensen R.G.**, 1992. Distinct cellular and organismic responses to salt stress. Plant. Cell. Phys.33: 1215-1223.
- Alavena A.G.A. et Rota A.R.**, 1990. Tissus cultures of Bean (*P.Coccineus L*) and then application to breeding, Acta - Horticulturae. 280, *In-Vitro* Culture and Horticultural Breeding: 223-229.
- Aminaro P.V.**, 1983.-Embryogenesis in: handbook of plant cell culture. Vol 1, Evans D.A., Sharp W.R, Ammirato P.V and Yamada Y. New York: Macmillan Publishing Co: 82 -123
- Anand A. et Rao C.S.**, 2000. A rapid *in-vitro* propagation protocol for *piper barberi gamble*, A Critically Endangered Plant. *In-vitro* cellular and developmental biology plant. V36.
- Asemota O., Eke CR., Odewale JO.** (2007). Date palm (*Phoenix dactylifera L.*) *in vitro* morphogenesis in response to growth regulators, sucrose and nitrogen. *African Journal of Biotechnology Vol.6 (20)*, pp. 2353-2357.
- 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 Application Horticoles. Ed Lavoisier 225p.
- BelKheiri. O.**2008. Adaptabilité des espèces du Genre *Atriplex* aux conditions de Salinité Et d'aridité. Thèse de doctorat Universita Degli Studi Di Sassari. 90p :33-36
- Ben Ahmed H., Zrÿd E., ElGozzoh M. et Grignon C.** 1996.Croissance et accumulation ionique chez *Atriplex halimus* (cahier agricultures) : <http://www.auperf-uef.org/ref.agr.5.96.canumero.htm>
- Benrebaha, F.** 2005: Etude de différents milieux de culture, de substances de croissance et de salinité sur la morphogénèse de *l'Atriplex halimus L.* Thèse de Doctorat d'Etat en Sciences Agronomiques. INA El Harrach. Algérie. 139p.
- Borgel A.** (2006). Histological analysis of callogenesis and somatic embryogenesis from cell suspensions of date palm (*Phoenix dactylifera L.*). *Annals of Botany* 98 (2): 301-308.
- Boxus P.**, 1995: Multiplication Végétative: Micropropagation Et Embryogénèse Somatique In Biotechnologies Végétales. Bv 93, Ed Cned. Aupelf- Uref 191p.
- Chadefaud et Emberger L.** traité de botanique : systématique, les végétaux vasculaire. Tom II. Ed. Masson & Clie.Paris.1540p.
- Chaouche F.Z., Abdul Hussain M.S.**2008.Callogenèse de *l'Atriplex halimus* à partir de différents explants, en vue de régénération. Agricultura-Stiina si practica. Nr. 1-2.pp 65-66

Clemente, R., Walker, D. J., & Bernal, M. P. (2005). Uptake of heavy metals and as by brassica juncea grown in a contaminated soil in Aznalcóllar (Spain): The effect of soil amendments. *Environnemental Pollution*, 138, 46–58. doi:10.1016/j.envpol.2005.02.019.

-Compton E.M ., Pierson B.L Et Staub J.E., 2001. Micropropagation For Recovery Of *Cucumis Hystrix*. *Plant cell tissue and organ culture* 64: 63 - 67

-Druart Ph., 1992: *In-vitro* culture and micropropagation of plum (*Prunus Spp*) «Biotechnology in Agriculture and Forestry» V (18) High -Tech and Micropropagation Ii Ed Y.P.S Bajaj .Springer - Verlag Berlin Heidelberg: 279-301.

-Druart Ph., 1995. C - Source and Growth Responce Of *Prunus Glandulosa* »Sineusis" Thund And Malus Punila Mill. M26 and M9 Clone 29 During *in-vitro* propagation. *Bull.Rech.Agron.Gembloux* 30(1-2).

-Druart Ph., Delpote F., Brazda M., Ugarte - Ballon C., Da Camara - Machado A., Laimer Da Camara Machado M ., Jacquemin J Et Watillon B., 1998 . Genetic transformation of cherry trres. *Proc Third Int Cherry Sym, Ed Jones Ystaas Acta Hort*, 468 - 71 - 76

-Duncun R.R. 1997 Tissue culture induced variation and crop improvement advens in Agronomy. Embryogenic state. *Plant Cell Tissue Org Cult* 74:201 228.

-El ferchichi-Ouarda, H. 2005. Effect of mineral concentration of culture media without growth subsatneces on callogenesis of *Atriplex halimus* L. *African journal of biotechnology vol.4 (9).pp.960-962.*

-Etienne H, Bernard, 2012. La multiplication de *Coffea arabia* par embryogenèse somatique. *Cahier Agriculture* volume 21 n°2-3.

-Etienne H., Sotta B., Montoro P ., Miginiac E. Et Carron P.M., 1994. Régulateur De Croissance En Embryogenèse Somatique De L'hévéa. In *Teisson : La Culture In-Vitro De Plantes Tropicales Cirad. Montpellier.*

-Evans D.A., Sharp W.R. ET Flien C.E., 1981. Growth and Behaviour of cell cultures: embryogenesis and organogenesis in plant tissue culture, methods and application agricultures. *Throupe T.A Ed Academic Press: 45 - 113.*

-Fehér A, Pasternak TP et Dudits D 2003. Transition of somatic plant cells to an embryogenic state. *Plant Cell Tissue. Org Cult* 74:201–228.

-Fehér A. (2006) why somatic plant cells start to form embryos *Plant Cell Monographs.* Springer Berlin / Heidelberg. 2/2006:85-101.

-FERRY M., N. et BOUGUEDOURA EL HADRAMI je. 1998. Patrimoine génétique et technique de propagation *in vitro* pour le Développement de la culture du palmier dattier. Numéro spécial oasis. *Sècheresse.9 (2) : 139-146.*

-Filipecki, M., Z. M. Yin, A. Wisniewska, M. Smiech, R. Malinowski, and S. Malepszy.

2006. Tissue culture-responsive and autotetraploidy-responsive changes in metabolic profiles of cucumber (*Cucumis sativus*L.). *Journal of Applied Genetics* 47: 17-21.

-Fotso M., Ndoumou D.O., Mbouna D. (2002). Comparative study of *in vitro* regeneration of *C. anomala* and *C. Acuminata*. *Cahiers d'études et de recherché francophone: Agricultures. Volume 11; (5), 355-60.*

-Fourré, J-L P. Berger L. Niquet and P. André 1997. Somatic embryogenesis and somaclonal variation Norway spruce: morphogénétique, cytogenetique and molecular approaches. *Theoretical and applied genetics* 94:195_169.

-Girijashankar V.2011. Micropropagation of multipurpose medicinal tree *Acacia auriculiformis*. *Journal of Medicinal Plants Research Vol. 5(3), pp. 462-466,*

-Gueye B., Herve J., Sané D., Borgel A. Aberlenc-bertossi F. et Verdail J.L. 2008. Les cellules végétales compétentes à se réactiver constituent des cibles privilégiées du 2,4-D. AUF RENNES.

-Haicour. Robert. 2002. *Biotechnologie végétale, techniques de laboratoire.* Tec & Doc, Lavoisier. 305p 23-24

-Halfaoui Yamina.2010. Contribution à la valorisation d'*Atriplex halimus*. L et *Atriplex canescence* (Pursh) Nutt de tissu *in vitro*. Thèse de magistère d'Etat. Université d'Oran Es-Sénia 86p.

-Hamdy A. 1999. Saline irrigation assessment for a sustainable use. Saline irrigation Halophyte production and utilization; *Project N°IC 18 CT 960055, P.152-56.*

-Hobbie L.J., 1998: Auxines Molecular Genetic Approaches in *Arabidopsis*. *Plant Physiology Et Biochimestrie*36 (1-) :91 -102

-Houmani M.1997. Evolution des terres de parcours et bilan fourragere dans les zones arides Algériennes. Dans : *Actualité Scientifique : Biotechnologies, Amélioration des plantes et Sécurité Alimentaire.* Collection Université Francophones. ED. ESTEM, Paris, pp.175-176.

-Ighilhariz-Hennia Z.2008 Contribution à la valorisation d'*état halimus*. L et *Etat canescence* (Pursh) Nutt par la culture *in vitro*. Thèse de doctorat d'état. Université d'Oran Es-Sénia 143p

-Jain, S.M.2001 Tissue culture derived variation in crop improvement. *Euphytica* 118; 153166.

-Joyce S.M and S.M and Cassells, A. C (2002). Variation in potato microplant morphology *in vitro* and DNA methylation *Plant Cell Tissue Organ Cult.* 70. 125-137.

-Kouadio J-Y., Koné M., DjéY., D'Almeida M-A et Zouzou M.2004. L'étiollement est un facteur d'induction de l'embryogenèse somatique au cours de la callogenèse cher deux variétés de cotonnier (*Gossypium hirsutum* L.) cultivées en Côte d'Ivoire *biotechnol. Agron. Soc. Environ.* 8(3), 155-162.

-Ladyzynski M, Burza W, and Malepszy S, 2002. Relationship between somaclonal variation and type of culture in cucumber. *Euphytica* 125:349–356.

-Le Houérou H.N. 1981. Impact of man and his animals on mediterranean vegetation. In: di Castri F., Goodall D.W. and Specht R.L. (EDS), Ecosystems of the World. 11. Mediterranean-type shrublands. Elsevier, Amsterdam, pp. 479–521.

-Le Houérou H.N. 1992. The role of saltbushes (*Atriplex* spp.) in arid land rehabilitation in the Mediterranean Basin: A review. *Agrofor. Syst.* 18: 107–148. Nobs M.A. 1975. Chromosome numbers in *Atriplex*. *Carnegie Institute of Washington yearbook* 74: 762. Nun ~ ez O. 1968. An acetic-hematoxylin squash method for small chromosomes. *Caryologia* 21: 115–119.

-Le Houerou H.N. 1992. The role of saltbushes (*Atriplex* spp.) in arid land rehabilitation in the Mediterranean Basin: a review. *Agroforstery Systems* 18(2), 107-148.

-Lepoivre Philippe. 2003. *Phytopathologie*. De boeck. 427p 377-387.

-Leslie. C, McGranahan .G. 1990. *Micropropagation de Walnut persan (Juglans regia L.)*. *Biotechnologie dans l'agriculture et des forêts* Volume 18, 1992 pp 136-150.

-Lutts, S., Lefèvre, I., Delpèrèe, C., Kivits, S., Deschamps, C., Robledo, A., et al. (2004). Heavy metal accumulation by the halophyte species Mediterranean saltbush. *Journal of Environmental Quality*, 33, 1271–1279.

-Margara F., 1982 : La Multiplication Végétative *In-Vitro* .Aspects Généraux B.T.I.374 L1 *Agro* 15:701-711.

-Margara F.,1989. Bases De Multiplication Végétative : Les Méristèmes Et L'organogenèse . Ed Inra Paris 262p.

-Martinez J.P., Ledent J.f., Bajii M., Kinet, J.M and Lutts S., 2003. Effect of water stress on growth, Na⁺ and water use efficiency in relation to osmotic adjustment in two populations of *Atriplex halimus* L. *Plant Growth Regulation* 41. 63-73.

-Martinez J.P, Stanley ,L, Schanck.A, 2004. Is osmotic adjustment required for water stress resistance in the méditerrananean shrub *Atriplex halimus* L. *journal of plant physiology* 161: 1041-1051.

-MAROUF. A., Tremblin. G.2009. Abrégé de biochimie appliquée. EPD Sciences. 483p 343-344

-Mei B., E.G. No, E.L. McWilliams, J.H. Gould, and R.J. Newton. 1997. In vitro regeneration of fourwing saltbush [*Atriplex canescens* (Pursh) Nutt.]. *Journal of range Management* 50: 413-418.

Domingo Martinez Fernandez , David J. Walker. 2011. Les effets des amendements du sol sur la croissance d'*Atriplex halimus* et *Bituminaria bituminosa* en sols lourds contaminés par des métaux. [Eau, Air, et la pollution des sols](#). Volume 223, pp 63-72

-Meza, P., Gambardella, M. et Silva, H. (1998): Micropropagation d'*Atriplex nummularia* L., par culture *in vitro*. In: « *Etude de la biodiversité biologique de l'Atriplex halimus* L. pour le repérage *in vivo* et *in vitro* d'individus résistants à des conditions extrêmes du milieu et

constitution de clones ». In P. Dutuit (Eds) *Projet Européen SDT3 (1994-1998) Rapport final*.

-Mozafar A, Goodin JR (1970) Vesiculated hairs: a mechanism for salt tolerance in *Atriplex halimus* L. *Plant Physiol* 45:62–65

-Mulas, M., Mulas, G. 2004. Potentialités d'utilisation stratégique des plantes des genres *Atriplex* et *Opuntia* dans la lutte contre la désertification. *Revue bibliographique .Short and Medium - Term Priority Environmental Action Programme (SMAP)*

-Munns, R. 2002. Comparative physiology of salt and water stress. *Plant Cell Environ.* 25, 239–250.

-Munns, R., R.A. James and A. Lauchli. 2006. Approaches to increasing the salt tolerance of wheat and other cereals. *J. Exp. Bot.*, 57: 1025-1043.

-Murashige, T. and Scoog, F. 1962. A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiologia plantarum*, 15: 473-497.

-MURRAY. Nabort. 2011. *Biologie végétale, amélioration, structure, fonctionnement, écologie et biotechnologie.* Pearson éducation. 614p 47-296.

-Negre R., 1961 : Petites flores des régions arides du Maroc occidental. CNRS Paris : 373 – 374.

-Osmond C.B., Björkman O. and Anderson D.J. 1980. *Physiological Processes in Plant Ecology. Towards a Synthesis with Atriplex,* Springer-Verlag, Berlin.

-Osmond CG. Björkman O. and Anderson DJ., 1980. *Physiological processes in plant ecology.*

-Oudija, F., Ismaili, M. et Amsa, M. 2001. Etude de la compétence embryogène des cultures de Blé initiées en absence de sel et transférées sur milieux supplémentés en NaCl (soumis). *Pflanzenphysiol.* 97:13 – 17.

-Ozenda ,1983. *Flora du sahara.* Ed. CNRS Paris, 298p. Sané D., Aberlenc-Bertossi F., **PRIMORSE Twayman. Old.** 2004. *Principe de génie génétique.* Deboeck.400p 221-222-223.

-Qamar LAHLIMI-ALAMI. ; Bouchra CHLYAH., Hassan CHLYAH.2001. Callogenèse et régénération *in vitro* du kiwi (*Actinidia chinensis*) à partir de divers explants. *Act Inst. Agron. Vet.* Vol 21(2):75-81.

-Raven P.H., Evert R.F., Eichhorn S.E., 2007. *Biology of plants.* 5 ed. worth Publishers, New York: 791:325-512

-Rosas M.R., 1989.El genero *Atriplex* (*Chenopodiaceae*) en Chile. *Guyana, Bot.* 46 (12): 3-82

-Saadi A., 1991. Régénération De Plantes De Pois *Pisum Sativum* L Par Embryogenèse somatique. Thèse de doctorat. Paris Grignon 162p.

- Sambatti, J., K.K. Caylor** 2007 .When is breeding for drought tolerance optimal if drought is random?" *New Phytologist*, 175(1):70-80, doi: 10.1111/j.1469-8137.20007.02067.
- Sané D., Aberlenc-Bertossi F., Gassama -Dia Y.K., Sagna M., Trouslot M.F., Duval Y. and**
- Semal J.**, 1998: Reproduire A L'identique : Mythe Et Réalité .Cahier Agriculture (7):6-8
- Seon E.J., Jeongae K.O. Et Seon R.Y.**, 1998: Mass Propagation Of *Wasabia Japonica* By Apical Meristem Culture . *Journal Of The Korean Society For Horticultural Science* 39(3): 278- 282.
- Söndahl M.R et Sharp W**, 1977 High frequency induction of somatique embryos in cultured leaf explants of *Coffea arabia* L.*Z Pflanzenphysiol* n° 81 : 395-408.
- Spichiger. Rodolphe-Edouard., Vincent. V., Savolainem Murielle Figeat., Jeanmond.** 2004. Botanique systématique des plantes à fleurs. Press polytechnique et universitaires romondes.413p 196-197.
- Street H.E.**, 1977: Culture In-Vitro Cytologie Organogénèse Plant – Tissu and Cell Culture 2 Ed Oxford, London, 614 P
- TANG W. et GUO Z., 2001.** *In-vitro* propagation du pin blanc par organogénèse somatique directe à partir de cotylédons matures et les hypocotyles. *Ursine regalement Growth* 33: 25 - 31.
- Tanoh Hilaire KOUAKOU, Michel ZOUZOU, Yatty Justin KOUADIO1 et Abo Pierre ANNO.** 2009. Embryogénèse somatique chez le cotonnier (*Gossypium hirsutum* L.) : évolution des composés lipidiques au cours de la callogénèse et de la culture de suspensions cellulaires. *Afrique SCIENCE* 04(3) 147 – 159.
- Throp A.T** 1988 *in vitro* somatique embryogenesis in ISIS Atlas of science: Animal and plantp.81.88.
- Tiedeman J.A., Chouki S.**, 1989. Range management in Central Tunisia. Office of Livestock and Pastures, Ministry of Agriculture, Tunisia and Oregon State University, Corvallis OR (USA).
- Tisserat B ., Esane B. Et Murashige T.**, 1979. Somatic embryogenesis in Angiosperms . *Hort. Rev.*,1:1-78.
- Tourte Y., Tourtre.**1998: Genie Génétique Et Biotechnologie , Concepts Et Méthodes . Applications A L'agronomie Et Aux Bio-Industrie . Ed Dunod 2009p.
- Tremblay L., Levasseur. Et Tremblay F.M .,** 1999. Frequency Of Somaclonal Variation In Plants Of Black Spruce (*Picea Mariana, Pinaceae*) And White Spruce (*P.Glauca, Pinaceae*) Derived From Somatic Embryogenesis And Identification Of Some Factors Involved In Genetic Instability. *Amer. Jour. Bot* 86 (10): 1373 - 1381.
- Vasilenko A.J.K., Daniel M.C. Et Conger B.V.**, 2008 : Ultrastructural Analysis Of Somatic Embryo Initiation . Development and Polarity Establishment From Mesophyll Cells Of (*Dactylis Glomerata*). *In-Vitro Cellular et Developmental Biology Plant* V36.

-Vikrant .Et Rashid A., 2001. Comparative Study Of Somatic Embryogenesis From Immature And Mature Embryos And Organogenesis From Leaf- Base Of *Triticale* . Plant Cell Tissue And Organ Culture 64: 33 - 38.

-Walker, D. J., Bernal, M. P., & Correal, E. (2007). The influence of heavy metals and mineral nutrient supply on *Bituminaria bituminosa*. Water, Air, and Soil Pollution, 184, 335–345. doi:[10.1007/s11270-007-9422-0](https://doi.org/10.1007/s11270-007-9422-0).

-Walker, D. J., Clemente, R., & Bernal, M. P. (2004). Contrasting effects of compost and manure on the growth and uptake of heavy metals by *Chenopodium album* L. in a soil contaminated by pyritic mine waste. Chemosphere, 57, 215–224. doi:[10.1016/j.chemosphere.2004.05.020](https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2004.05.020).

-Walker, D. J., Moñino, I., & Correal, E. (2006). Genome size in *Bituminaria bituminosa* (L.) C.H. Stirton (Fabaceae) populations: separation of “true” differences from environmental effects on DNA determination. Environmental and Experimental Botany, 55, 258–265. doi:[10.1016/j.envexpbot.2004.11.005](https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2004.11.005).

-Wochok Z.S and Lewis C.J. 1980. Gibberellic acid promotes *Atriplex* shoot multiplication and elongation. Plant Science Letters 17 363-369.

-Wurlet S.E, Garton S., Young D., Balendrin M.F. and McKell C.M., 1987. Propagation of an elite high biomass- producing genotype of *Atriplex canescence* by axillary enhancement. Biomass, Vol.12, issue 4, 281-291.

Yamaguchi , H. ,M. Lorenz , S. Kempiak , C. Sarmiento , S. Coniglio , M. Symons ,J. Seg all , R. Eddy , H. Miki , T. Takenawa ,J. Condeelis. 2005. Mécanismes moléculaires de la formation de invadopodium: le rôle de la voie et cofilin N-WASP-Arp2 / 3 .J. Cell Biol. 168 : 441 - 452 . doi: [10.1083/jcb.200407076](https://doi.org/10.1083/jcb.200407076).

-Zryd J.P.,1988: Culture De Cellules , Tissus Et Organes Végétaux .Ed .Press. Polytechniques Romandes Suisse 308p.

Annexe



1. Composition du milieu Murashige et Scoog (1962)

Microéléments (mg/l)

NH_4NO_3	1650
KNO_3	1900
$\text{CaCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$	440
KH_2PO_4	170
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	370

Microéléments (mg/l)

$\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	22,3
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	8,6
H_3BO_3	6,2
KI	0,83
$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0,25
$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	0,025
$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0,025

Vitamines (mg/l)

<u>Inositol</u>	100
<u>Acide nicotinique</u>	0, 5
<u>Pyridoxine</u> HCl	0, 5
<u>Thiamine</u> HCl	0, 1
<u>Glycine</u>	2
<u>Saccharose</u>	20
<u>Agar-agar</u>	10

Solution Fe EDTA (mg/l)

Na ₂ EDTA*2H ₂ O	37, 25
FeSO ₄ *7H ₂ O	27,8

Résumé

L'*Atriplex halimus* est une espèce xerohalophyte utilisées dans les programmes de restauration et de réhabilitation des parcours dégradés dans les zones arides et semi-arides. Les biotechnologies avec ces nombreux outils tels que la culture *in vitro*, offrent une alternative pour la revalorisation de cette espèce. Une mise au point de technique d'initiation de la callogenèse à partir d'explant de tiges et feuilles sur le milieu MS (Murashige et Scoog, 1962) additionné de plusieurs combinaison hormonales (2,4D/Kinetine). Les observations des résultats montrent une variabilité de réponse en fonction de la concentration en phytohormones et l'origine de l'explant. Le débourrement *in vitro* des bourgeons axillaires par la micropropagation sur milieu MS dilué de moitié et non dilué, additionné de différents régulateurs de croissance, offre une solution pour la multiplication rapide et conforme. Le milieu MS0 dilué de moitié et sans hormones semble être plus favorable au déclenchement du débourrement des bourgeons axillaires d'*Atriplex halimus* qui se traduit par le développement de pousses feuillées, avec la formation chez quelques explants de racines spontanées. L'ajout d'une combinaison hormonale regroupant ANA et BAP à de fortes concentrations sur le milieu MS2 permet d'obtenir un taux appréciable de débourrement, avec la diminution de la concentration de l'auxine (MS1) le taux de débourrement est moins important. Sur le milieu MS3 (AIA/kinetine) aucune évolution organogène.

Mots clés :

Atriplex Halimus L.; Callogenèse; Micropropagation; Régulateurs De Croissance; Culture *In Vitro*; Cal; Auxines; Cytokines; Phytohormones; Rhizogenèse.

Clicours.COM