

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE

MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET

DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE

UNIVERSITE DE BATNA 1 HADJ LAKHDAR

INSTITUT DES SCIENCES VETERINAIRES ET DES SCIENCES

AGRONOMIQUES

THESE

En vue de l'obtention du diplôme de

Doctorat en sciences

**Contribution à l'étude de la régénération du
Genévrier thurifère (*Juniperus thurifera* L.) par la
production de plants *in vitro*.**

Présentée par : Mme KHATER Nadia

Devant le Jury :

Président : Mr. MALKI Hamana, Maitre de conférences "A", Université de Batna 1.

Rapporteur : Mme. BENBOUZA Halima, Professeur, Université de Batna 1.

Examineur : Mr. CHORFI Abdelamlek, Professeur, Université de Batna 2.

Examineur : Mme. KAID-HARCHE Meriem, Professeur, USTOMB, Oran .

Examineur : Mr. HARFI Boualem, Maitre de recherche "A", CRBT, Constantine.

Examineur : Mr. BEGHAMI Yassine, Maitre de conférences "A", Université de Batna 1.

Année Universitaire

2017-2018

Dédicace

A la fleure de ma vie, ma très chère mère qui a œuvré pour ma réussite, par son amour, son soutien, tous les sacrifices consentis et ses précieux conseils, pour toute son assistance et sa présence dans ma vie, reçois à travers ce travail aussi modeste soit-il, l'expression de mes sentiments et de mon éternelle gratitude. Puisse Dieu tout puissant te protéger du mal, te procurer longue vie, santé et bonheur afin que je puisse te rendre un minimum de ce que je te dois

A ma très chère sœur Naïma

A mon beau frère Abdelatif

Puisse Dieu, le tout puissant vous préserver du mal, vous combler de santé, de bonheur et vous procurer une longue vie.

À mes chers petites nièces Douaa et Numidia et a mon neveu Haytem ; Aucune dédicace ne saurait exprimer tout l'amour que j'ai pour vous, Votre joie et votre gaieté me comble de bonheur. Puisse Dieu vous garder, éclairer votre route et vous aider à réaliser à votre tour vos vœux les plus chers.

A mes chers cousins et cousines

A tous mes amies et collègues

Avant-propos

Je tiens tous d'abord à remercier « Dieu » très Clément et sa sainte miséricorde, qui nous avoir donné la force et la patience et de nous avoir aidé à réaliser et à accomplir ce travail.

Les travaux présentés dans cette thèse ont été effectués au Laboratoire de culture in vitro du Centre de recherche en Biotechnologie, Constantine.

L'encadrement scientifique de ce travail a été assuré par Mme BENBOUZA Halima, Professeur à l'Université de Batna -1- Je tiens vivement à lui exprimer ma profonde reconnaissance et gratitude pour l'intérêt porté à mon sujet de recherche. Toutes les facilités qu'elle m'a offertes pour la réalisation et l'accomplissement de ce travail. Ses apports scientifiques et logistiques ainsi que ses rapports humains dans le suivi et la réalisation de mes travaux de recherche ont été d'une qualité supérieure et fructueuse.

Mes remerciements les plus chaleureux au président du jury, Mr. MALKI Hamana, Maître de Conférence A à l'Université de Batna -1- d'avoir accepté, malgré ses préoccupations et ses tâches d'enseignement et d'encadrement de présider cette thèse.

Mes remerciements vont aussi à Mr. CHORFI Abdelmalek, professeur à l'Université de Batna -2-, d'avoir eu l'amabilité d'accepter volontairement et aimablement de critiquer et de juger ce travail. Je suis particulièrement reconnaissante et honorée par sa participation au jury de cette thèse.

Je tiens à remercier également Mr. HARFI Boualem, Maître de Recherche A, directeur de la division agriculture au niveau du Centre de recherche en Biotechnologie d'avoir accepté, malgré ses préoccupations, de lire et de juger ce travail. Qu'il trouve ici mes sincères sentiments de gratitude et de respect.

Que Mme KAID-HARCHE Meriem professeur à l'université des Sciences et de la technologie d'Oran Mohamed Boudiaf, qui trouve ici l'expression de ma profonde reconnaissance et mes sincères remerciements, d'avoir ménagé son temps pour juger et critiquer ce travail.

Je remercie aussi, Mr BEGHAMI Yassine Maître de Conférence A, Directeur de l'ISVSA à l'Université de Batna -1- d'avoir accepté d'être membre de mon jury.

Mes remerciements à tout le personnel du Laboratoire de culture in vitro du Centre de recherche en Biotechnologie, pour les relations amicales, conviviales, fraternelles et professionnelles qu'ils ont su tisser en dehors et au sein du laboratoire. Je tiens à exprimer ma profonde gratitude BENAHMED Amira, CHEROUANA Khaoula, BENCHIEKH El HOCINE Imen, BENBELKACEM Ibtissem et DAAS Abla.

Je tiens à exprimer mes remerciements à Monsieur Atman BRIKI, chef de service la protection des forêts, Monsieur Sadak BOUHRİK chef de district et Monsieur Tiab BRIMA chef de circonscription à la conservation des forêts de la wilaya Batna, qui ne n'ont jamais abstenus de me permettre d'accéder au terrain.

Je tiens à remercier toute personne ayant collaboré de près comme de loin à l'élaboration et à l'aboutissement de ce travail, que ce soit par leur participation ou leur encouragement. Merci à ABDERZAK Lilya, DAOUDI Imen, GARAH Kenza, KHENFOUCI Mohamed Salah, CHAFAI Chaouki, BENFARHI Sarra, RAHMANI Souad, etc. Merci à tous ceux qui ont participé à la réalisation de ce travail.

Je tiens à exprimer ma profonde gratitude à notre doyen de la faculté des sciences de la nature et vie Docteur CHAFAA Smail pour ses conseils et son encouragement et aussi merci à mes collègues Professeur SIBACHIR Abdelkarim , BEZZALLA Adel, LAABASSI Ayache KHELOUFI Abdenour et NOURI Lilya.

Je tiens également à remercier tout particulièrement ma famille pour leur soutien inconditionnel tout au long de ce doctorat. Merci toi ma chère maman tous de ce que je suis devenu dépend de toi. Je suis très fier de t'avoir comme mère et je m'en trouve chanceuse.

Abréviations

2,4-D : acide 2,4-dichlorophénoxyacétique

BAP : 6-Benzylaminopurine

AIB : Acide-3-indole butyrique

ANA : Acide naphthalène acétique

GA3 : Acide gibbérellique

pH : Potentiel Hydrogène

EDTA : Ehyène Diamine Tétra-Acétate.

NaOH : Hydroxyde de sodium.

Mg L⁻¹ : milligramme par litre.

gr L⁻¹ : Gramme par litre

MS : Milieu de Murashige et Skoog (1962)

WPM : Woody plant medium

FAA : Formaldéhyde, Alcool, Acide acétique

Table des matières

Avant-propos	
Abréviations	
Liste des Tableaux	
Liste des Figures	
Liste des Annexes	
Introduction	13

Chapitre 1

Etude bibliographique

1. Présentation de Genévrier thurifère (<i>Juniperus thurifera</i> L.).....	17
1.1. Description et systématique.....	17
1.2. Biologie.....	07
1.3. Ecologie.....	08
1.4. Répartition	09
1.5. Régénération.....	10
1.6. Intérêt	11
1.7. Les ennemis de <i>Juniperus thurifera</i>	12
1.8. Multiplication végétative de <i>Juniperus thurifera</i>	12
2. Régénération par techniques <i>in vitro</i>	13
2.1. Généralités.....	13
2.2. Les voies de régénération.....	13
2.2.1. Microbouturage.....	15
2.2.2. Organogénèse.....	15
2.2.3. Embryogénèse somatique.....	16
2.3. Facteurs influençant la régénération <i>in vitro</i> des plantes.....	17
2.3.1. Effet de l'explant.....	18
2.3.2. Le génotype.....	18
2.3.3. Le milieu de culture.....	18
2.3.4. Les régulateurs de croissances.....	19
2.3.5. L'influence de la source carbonique.....	21
2.3.6. Avantages et inconvénients de la micropropagation.....	21

Chapitre 2
Matériel et méthodes

1. Matériel végétal.....	24
1.1. Provenance du matériel biologique.....	24
1.2. Types d'explants utilisés.....	24
2. Stérilisation.....	24
2.1. Désinfection du matériel végétal.....	24
2.1.1. Méthode à base d'hypochlorite de sodium.....	24
2.1.2. Méthode de désinfection avec fongicide.....	25
2.2. Stérilisation des milieux et du matériel de travail.....	25
3. Milieux et conditions de culture.....	25
3.1. Compositions des milieux testés.....	25
3.2. Régulateurs de croissance utilisés.....	26
3.3. Autres additifs.....	27
3.4. Récipients de culture.....	27
3.5. Le pH des milieux de culture.....	27
4. Conditions de culture.....	28
5. Acclimatation des <i>vitro</i> plants.....	28
6. Techniques de micropropagation.....	28
6.1. La culture <i>in vitro</i> des graines et des embryons isolés.....	28
6.2. Microbouturage.....	29
6.2.1. Phase d'initiation.....	29
6.2.2. Phase de multiplication.....	30
6.2.3. Phase d'enracinement des pousses.....	31
6.2.4. Phase d'acclimatation des <i>vitro</i> plants.....	31
6.3. Phase d'induction de la callogénèse.....	31
6.3.1. Phase d'initiation des cals.....	31
6.3.2. Choix et multiplication des cals.....	33
6.3.3. Initiation à l'embryogénèse.....	33
6.3.4 Repiquage des cals sur les milieux de régénération.....	33
7. Techniques histologiques.....	35
7.1. Fixation.....	35
7.2. Déshydratation	35

7.3. Imprégnation	35
7.4. Inclusion	36
7.5. Confection des coupes	36
7.6. Déparaffinage	36
7.7. Réhydratation	36
7.8. Coloration	36
7.9. Montage	37
8. Analyses statistiques.....	38

Chapitre 3
Résultats et discussion

1. Désinfection des microboutures.....	40
2. Germination <i>in vitro</i> des graines.....	41
2.1 Effet du milieu sur le taux de germination	42
3. Microbouturage de <i>Genévrier</i> thurifère.....	43
3.1. Effet du milieu sur la morphogénèse.....	43
3.2. Effet de la combinaison cytokinine-auxine sur le développement des pousses.....	45
3.2.1. Effet de la combinaison cytokinine-auxine sur le développement des pousses en utilisant le milieu WPM.....	45
3.2.2. Effet du rapport BAP/2,4D sur le développement des pousses en utilisant le milieu MS.....	46
3.2.3. Effet de la composition de milieu sur la longueur de pousses régénérées.....	47
3.3. Effet de la subculture sur le développement des pousses (phase de multiplication).....	48
3.4. Effet de l'origine de l'explant sur le débourrement des bourgeons.....	50
3.5. Effet de la composition du milieu et le génotype d'explants sur l'élongation des pousses.....	50
4. Enracinement des <i>in vitro</i> plants.....	51
4.1. Effet des auxines sur l'enracinement.....	53
4.2. Effet des éléments minéraux sur la rhizogénèse.....	55
4.3. Effet du charbon actif sur la rhizogénèse.....	55

4.4. Effet de l'incubation à l'obscurité sur la rhizogénèse.....	56
5. Acclimatation des <i>vitro</i> plants.....	56
6. Induction de la callogénèse.....	57
6.1.Effet des milieux de culture sur l'induction de la callogénèse.....	58
6.2. Effet de la combinaison hormonale sur l'induction de la callogénèse	58
7. Entretien et multiplication des cals	61
7.1. Effet du milieu de culture sur l'évolution des cals.....	61
7.2. Effet du traitement hormonal sur l'évolution des cals dans le milieu WPM..	62
7.3. Repiquage des cals sur les milieux de régénération.....	63
7.4. Initiation à l'embryogénèse somatique	63
8. Discussion des résultats	64
8.1. Germination des graines.....	65
8.2. Développement et multiplication des pousses.....	65
8.3. Enracinement et acclimatation des <i>vitro</i> plants.....	68
8.4. Initiation à la callogénèse.....	71
8.5. Multiplication des cals et initiation à l'embryogénèse.....	72
Conclusion générale et perspectives.....	74

Références bibliographiques

Annexes

Liste des Tableaux

N°	Titre	Page
01	Composition des milieux de culture en macroéléments, microéléments et vitamines utilisées dans les différents tests (mg L ⁻¹).	25
02	Compositions en hormones (mg L ⁻¹) des deux milieux de multiplication utilisés	30
03	Compositions en hormones (mg L ⁻¹) des différents milieux utilisés en callogénèse.	32
04	Combinaisons hormonales testées en utilisant le milieu WPM.	33
05	Résultats de la désinfection des microboutures et graines.	40
06	Effet des différentes concentrations de la combinaison BAP/2,4 D sur le nombre des pousses et rameaux formés sur le milieu WPM au cours de la 1 ^{ère} culture.	46
07	Effet des différentes concentrations de la combinaison BAP/2,4 D sur le nombre de pousses et de rameaux de <i>J.thurifera</i> formés en utilisant le milieu MS au cours de la 1 ^{ère} culture.	47
08	Effet du milieu et des différentes concentrations hormonales sur la longueur moyenne des tiges de <i>J.thurifera</i> .	48
09	Effet du milieu WPM et de la combinaison BAP/2,4 D sur le taux de survie, la longueur moyenne des pousses et le nombre de rameaux de <i>Juniperusthurifera</i> formés au cours de la 2 ^{ème} culture.	49
10	Effet du milieu, des différentes concentrations et des combinaisons de régulateurs de croissance (AIB, ANA et GA3) sur l'enracinement des explants de <i>Juniperusthurifera</i> .	52
11	Effet du traitement hormonal sur l'évolution des cals dans le milieu WPM	62

Liste des Figures

N°	Titre	Page
01	Les galbules de <i>J.thurifera</i> ; A- Galbules à l'état jeune. B-Galbules matures.	07
02	Répartition mondiale de <i>J.thurifera</i> (Montès, 1999).	09
03	Répartition de <i>J.thurifera</i> dans les Aurès (source : Conservation des forêts, Batna).	10
04	Les principales méthodes de la micropropagation (Lindsey et Jones, 1989).	14
05	Effet de la balance hormonale sur l'orientation de l'organogenèse au cours de la micropropagation (Augé et al., 1989).	20
06	Mise en culture des graines et des embryons de <i>J.thurifera</i> : A- Excision des embryons, B- Traitement des graines, C- Mise en culture des graines et des embryons dans des tubes de culture.	29
07	Mise en culture des explants de <i>J. thurifera</i> sur différents milieux : A-Mise en culture des explants pour l'induction des cals, B- Mise en culture des microboutures, C- Multiplication des cals, D- Mise en place des cultures dans la chambre de culture.	35
08	Etapas de réalisation des coupes histologiques, A- Fixation, B- Déshydratation, imprégnation et inclusion, D- Confection, E- Réhydratation et coloration, F- Lecture des coupes.	37
09	Germination des graines ; A- Ouverture du micropyle, B- Sortie de la radicule.	41
10	des milieux de culture sur le pourcentage de germination des graines de <i>J. thurifera</i> après 3 mois de culture.	42
11	Embryons nécrosés après deux mois de culture	43
12	Débourrement des bourgeons axillaires dans la 1 ^{ère} culture.	44
13	Effet du milieu de culture sur la morphogénèse des bourgeons axillaires de <i>J. thurifera</i> .	45

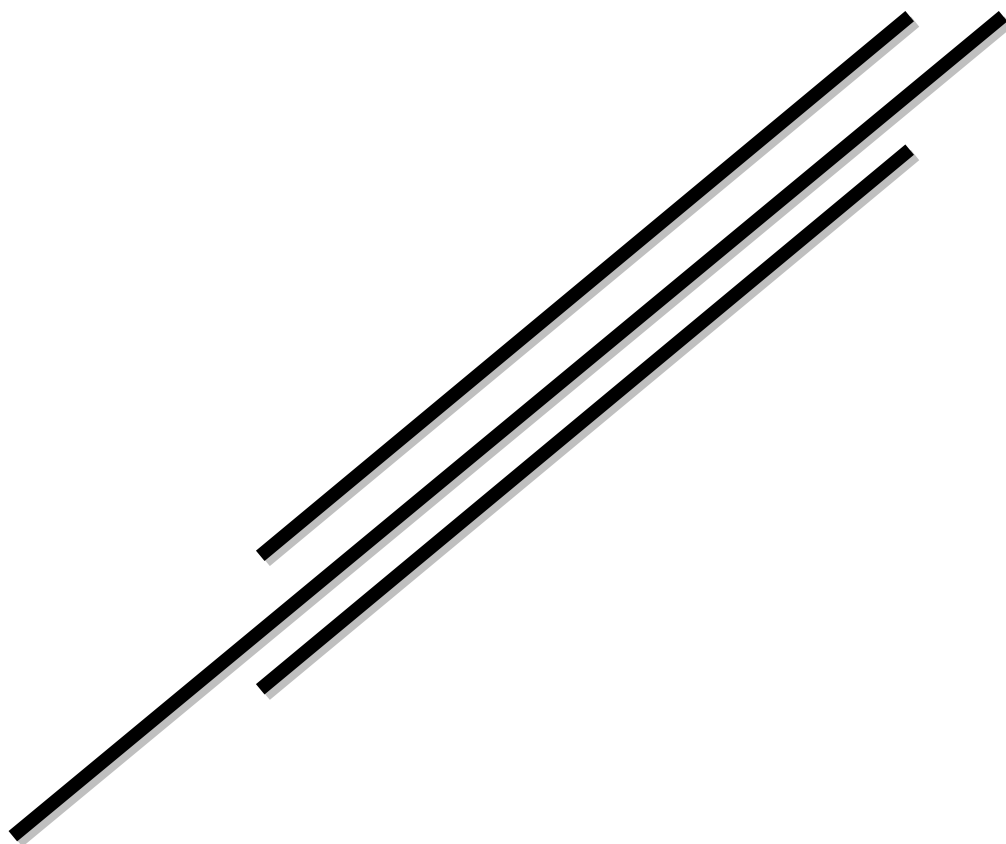
14	Effet du 2 ^{ème} subculture sur le développement pousses sur les milieux de culture (effet nanisme).	49
15	Variation du taux de débourrement des bourgeons axillaires de <i>J. thurifera</i> selon l'origine du matériel végétal sur le milieu WPM à différentes combinaisons hormonales	50
16	Effet de la composition du milieu et de l'origine des explants sur l'élongation des pousses.	51
17	Enracinement des <i>vitro</i> plants. A- Formation des racines par l'intermédiaire des calls basaux. B- La mise en place des racines sans formation de cals basale. C- Formation des racines dès le passage sur les milieux de multiplications. D- Formation de calls friables verts sur les milieux MS et WPM dépourvu de régulateurs de croissance. E- Développement de la racine principale après 4 mois d'acclimatation. F- Développement des racines adventives après 7 mois d'acclimatation (Bare=1 cm).	54
18	Acclimatation des <i>vitro</i> plants.	57
19	Induction de la callogénèse ; A- Gonflement et réactivation des la callogénèse, B- Prolifération des cals sur l'explant, C- Recouvrement total d'explant par les cals.	57
20	Effet des milieux de culture sur le taux l'induction de la callogénèse	58
21	Effet des traitements hormonaux et milieu WPM sur l'induction de la callogénèse.	59
22	Effet des traitements hormonaux et le milieu MS sur l'induction de la callogénèse.	60
23	Effet des traitements hormonaux sur le milieu N6 sur l'induction de la callogénèse.	61
24	Effet du milieu de culture sur l'évolution des cals Cals développés sur le milieu WPM, B- Cals nécrosés sur les milieux MS et N6.	62
25	Effet du traitement hormonal sur l'expression de la structure des cals dans le	63

	milieu WPM, A- Cals granuleux, B- Cals nodulaire.	
26	Développement des cals sur les milieux de régénération ; A- Cals chlorophylliens développés sur les milieux de régénération, B- Cals embryogènes développés sur le milieu WPM dépourvu de régulateurs de croissance.	64

Liste des Annexes

N°	Titre	Page
01	Analyse de la variance de nombre de pousses sur le milieu WPM	71
02	Analyse de la variance de nombre de branches sur le milieu WPM	71
03	Analyse de la variance de la longueur des pousses sur le milieu WPM	71
04	Analyse de la variance de nombre de pousses sur le milieu MS	71
05	Analyse de la variance de nombre de branches sur le milieu MS	72
06	Analyse de la variance de la longueur des pousses sur le milieu MS	72
07	Analyse de la variance de nombre de pousses sur le milieu WPM en 2 ^{ème} culture	72
08	Analyse de la variance de nombre de branches sur le milieu WPM en 2 ^{ème} culture	72
09	Analyse de la variance de la longueur des pousses sur le milieu WPM en 2 ^{ème} culture	73
10	Analyse de la variance des pousses survivant sur le milieu WPM en 2 ^{ème} culture	73
11	Analyse de la variance de nombre des racines	73
12	Analyse de la variance de la longueur des racines.	73
13	Analyse de la variance de nombre des cals sur WPM.	73
14	Analyse de la variance de nombre des cals sur MS	74
15	Analyse de la variance de nombre des cals sur N6	74
16	L'effet du milieu de culture sur le nombre des cals	74
17	L'effet du milieu de culture et de la concentration de la combinaison hormonale sur le nombre des branches	75
18	L'effet du milieu de culture et de la concentration de la combinaison hormonale sur le nombre des pousses	75

Introduction



Introduction

Les forêts méditerranéennes possèdent une valeur patrimoniale très élevée. Elles constituent des réserves importantes de la biodiversité génétique, spécifique et fonctionnelle qu'il convient de conserver au mieux dans l'optique d'une gestion durable de ce patrimoine biologique et ces ressources potentielles (Quézel et Médail, 2003).

La forêt algérienne avec sa diversité biologique, constitue un élément essentiel de l'équilibre écologique, climatique et socio-économique de différentes régions du pays. L'Algérie a une importante richesse en ressources phytogénétiques, et cela grâce à sa situation géographique et à sa diversité pédoclimatique (les zones côtières, les zones plaines, les zones de montagnes, les zones steppiques et les zones sahariennes) (Feliachi, 2006). Néanmoins, cette biodiversité est vulnérable notamment, en raison des facteurs de dégradation naturels et anthropiques. En effet, plusieurs espèces sont menacées d'érosion et d'extinction, si les mesures de gestion ne sont pas prises en charge, telle que le cyprès du Tassili, le pin Noir, le sapin de Numidie et le Genévrier thurifère (UICN, 2008).

Jouissant d'une multitude de caractéristiques toutes spécifiques, le Genevriethurifère (*J. thurifera* L.) (Famille des *Cupressaceae*), est une espèce endémique d'Algérie (région des Aurès), occupe une place privilégiée par sa grande valeur patrimoniale, environnementale et socio-économique. Véritable espèce relique et multi centenaire, soumise depuis de longues périodes, aux sévères et fluctuantes conditions naturelles et anthropiques. Elle témoigne d'une parfaite adaptation à ces différentes contraintes (Gauquelin *et al.*, 1988).

Dans la région des Aurès, le Genévrier thurifère n'est présent que dans le massif des Aurès (Est Algérien), avec des individus disséminés dans la cédraie ou sous forme de peuplement mono spécifique de quelques dizaines d'hectares (Chiro et Blanc, 1997). C'est une espèce menacée de disparition en raison de multiples dégradations (taillée, émondée, brûlée, malmenée, assèchement progressif du climat et vieillesse). En effet, la qualité des graines en est une cause principale, parce qu'elles sont soit en état de dormance, soient affectées au niveau de l'arbre et du sol par un grand nombre de ravageurs et de parasites, ce qui va conduire à la disparition totale de cette espèce endémique et induire des déséquilibres écologiques (Roques *et al.*, 1984).

Il est bien connu, qu'en plus de son intérêt socio-économique, le thurifère a un rôle écologique important, car il joue un rôle dans la protection des versants, et sa conservation permet de contribuer au maintien d'une richesse de la biodiversité (Gauquelin *et al.*,

1999b). Dès lors, des études concernant le fonctionnement de ces écosystèmes menacés, constitués par le Genévrier thurifère, sont plus que jamais nécessaires.

Aujourd'hui, le Genévrier thurifère est protégé par la loi algérienne, et est menacé de disparition à cause d'une grande insuffisance de la régénération naturelle en raison du faible nombre des graines viables. Toutefois, quelques jeunes sujets ont été observés, dans la station de T'kout ainsi que dans celle de la vallée d'Oued Abdi.

Ainsi, sa régénération, sa réhabilitation et sa conservation sont devenues une préoccupation importante des forestiers pour une gestion intégrée et durable. Dès lors, il est devenu indispensable de mettre en place un plan d'urgence pour la préservation de cette espèce dans son milieu naturel.

Dans des pays, faisons face à des problèmes identiques tels qu'au Maroc, les essais de la régénération artificielle se sont fréquemment heurtés à la difficulté de maîtriser la germination des semences de cette espèce en conditions contrôlées. Le pourcentage des cônes et graines attaqués par les ravageurs dépasse fréquemment 80 % (El Alaoui El Fels et Roques, 2006) et le processus de germination des graines viables est relativement faible du fait de la présence d'un tégument rigide et de la forte dormance des semences. En outre, les tentatives de la multiplication végétative par la technique du bouturage étaient infructueuses en raison du faible taux d'enracinement (15,6 %) (Ferradouset *al.*, 2013).

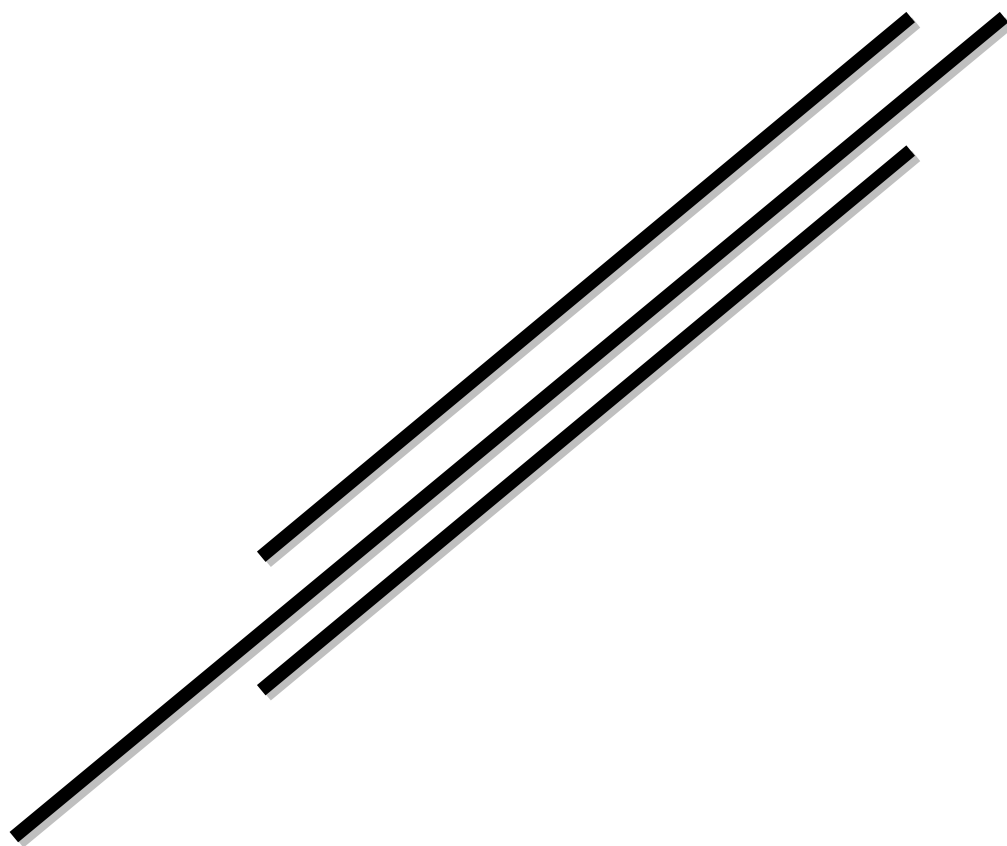
En Algérie, les études de recherche publiées sur la régénération sont inexistantes. Les quelques rares essais entrepris, dans le cadre des projets de fin d'études, sont restés sans succès. Alors, face aux contraintes de régénération naturelle que subit cette espèce, la mise au point d'une nouvelle technique moderne de production de plants s'avère une nécessité inéluctable pour contribuer à la régénération dans le cadre de gestion intégrée pour la conservation du *J.thurifera*. L'un des outils puissants de propagation des espèces végétales est la culture *in vitro* des tissus végétaux. Comme il est bien connu, la micropropagation est devenue une approche performante pour la multiplication rapide des plantes. Cependant, jusqu'à maintenant, les arbres forestiers, comme le genre du *Juniperus* (*Cupressaceae*), restent récalcitrants à la culture *in vitro* (Bongaet *al.*, 2010) et nécessitent des conditions de culture spécifiques pour une régénération réussie des plantes. La méthode à base de culture tissulaire initiée à partir de feuilles, de bourgeons et d'embryons matures des espèces de Genévrier a été largement explorée à l'aide de différentes techniques *in vitro* (Harry *et*

al.,1995 ; Gómez et Segura 1995 ;Negussie, 1997 ; Castro *et al.*, 2011 ;Koceret *al.*, 2011 ; Zaidi *et al.*, 2012).

C'est dans ce contexte que nous avons proposé et mené ce travail afin de concourir à la conservation et la réhabilitation de *J. thurifera*. L'étude constitue une première contribution pour développer un protocole de micropropagation *in vitro* pour la régénération de cette essence. Ce travail vise ainsi deux cibles importantes du programme Aichi Biodiversité (2010-2020) : conserver les zones d'importance particulière pour la biodiversité et les services écosystémiques (Objectif 11), et prévenir l'extinction des espèces menacées connues et améliorer leur état de conservation (Cible 12) (Pritchard *et al.*, 2014). L'étude a pour objectifs, 1) de régénérer des plantes entières de thurifère *in vitro* par microbouturage, en partant de microboutures d'origines diverses (prélevées à partir de plantes poussant dans la nature, et des *in vitro* plants), 2) d'établir un protocole reproductible pour l'induction des cals et l'initiation de l'embryogenèse somatique, ainsi que 3) l'analyse et la caractérisation des types de cals obtenus à partir de jeunes pousses.

Le document de la présente thèse s'articule autour de trois chapitres. En premier lieu une synthèse bibliographique où est présenté le *J. thurifera* et les techniques utilisées pour la régénération du genre *Juniperus*. Le second chapitre est consacré à la présentation du matériel et les techniques appliquées. Le troisième chapitre est consacré aux résultats et discussions. A la fin de ce document, une conclusion générale avec les perspectives de recherche sont données.

Chapitre 1 :
Etude
bibliographique



1. Présentation de Genévrier thurifère (*J. thurifera* L.)

1.1. Description et systématique

Le Genévrier thurifère est un petit arbre sempervirent, à très grande longévité, généralement dioïque, bien que certains individus monoïques ont été rencontrés dans les Alpes françaises (Borel et Polidori, 1983 ; Conrad, 1986) ; de même en Espagne et au Maroc dans le Haut Atlas de Marrakech (Gauquelin et *al.*, 1999). Son port est très variable, de l'état jeune à l'âge adulte. Sa forme et son port sont fortement liés à sa croissance en conditions édaphiques et anthropiques variées. Il peut atteindre 20 m de hauteur, mais la hauteur la plus fréquente est entre 3 et 8 m (Blanco *et al.*, 1997). Les plus hauts arbres se rencontrent le plus souvent en Espagne et c'est au Maroc que l'on rencontre les individus les plus gros et pouvant atteindre 5 mètres de diamètre soit 16 mètres de circonférence avec un tronc très ramifié montrant une structure « troncs multiples » ou multicaule (Boudy, 1958 ; Fromard et Gauquelin, 1993 ; Montes, 1999). L'écorce est de couleur grise à brunâtre. Le bois réputé imputrescible prend des teintes roses, rougeâtres à violacées, et brunes en vieillissant. C'est un bois très dur à l'odeur forte, enivrante, suave, sucrée et peu résineuse, reconnaissable entre toutes les autres espèces. Son nom, *thurifera* signifiant « porte-encens », lui vient de cette odeur caractéristique. Les aiguilles adultes sont appliquées sur les rameaux, en forme d'écailles subquadrangulaires opposées, disposées sur 4 rangs, en forme de losanges, allongées et aiguës, arrondies avec une glande très odorante sur le dos, décurrentes sur la tige et de couleur vert sombre ou glauque (Rameau *et al.*, 1993). Les rameaux jeunes sont épineux, les feuilles sont lancéolées, étalées et piquantes à l'extrémité, ceci pendant la jeunesse de l'arbre, puis elles se raccourcissent et se transforment en écailles. Des feuilles juvéniles persistant à l'âge adulte peuvent être révélatrices de conditions de développement défavorables (Bertaudière-Montès et Montès, 2004). Les cônes sont charnus, subglobuleux (à 3 paires d'écailles charnues la première année), assez gros (environ 10 mm de diamètre à maturité), de couleur verte à l'état jeune devenant bleu-noirâtre à maturité (**Figure 01**). L'apparition des galbules se produit en Août-Octobre, leur maturation demande un peu plus de 18 mois. Le nombre de graines par galbule est variable (Badri, 2003).

Le Genre *Juniperus* appartient à la famille des *Cupressacées* et plus précisément à la sous-famille des *Cupressoidées*, il se compose d'environ 67 espèces (Linée, 1753). En ce qui concerne le Genévrier thurifère, la systématique est très complexe en raison de nombreux synonymes et des erreurs d'identification. Gaussen (1968), a divisé le genre *Juniperus* en trois sous-genres :

- *Carocedrus* (1 espèce).
- *Oxycedrus* (13 espèces).
- *Sabina* (environ une cinquantaine d'espèces). C'est à ce dernier sous-genre qu'appartient *Juniperus thurifera*.

Gaussen (1968), a donné la classification pour le Genévrier thurifère.

Règne	<i>Plantae</i>
Embranchement	Spermaphytes
S/Embranchement	Gymnospermes
Classe	<i>Pinopsida</i>
Ordre	Pinales
Famille	Cupressacées
Sous famille	<i>Cupressoideae</i>
Genre	<i>Juniperus</i>
Sous-genre	<i>Sabina</i>
Espèce	<i>Juniperus thurifera</i>
Nom commun	Genévrier thurifère
Nom arabe	Arar El Bakhouri
Nom local	Aiwal, Azenzna

D'après Coincy (1898) et Maire (1926 ;in Gauquelin *et al.*, 1988), l'espèce *Juniperus thurifera* L., était classiquement, selon les critères géographiques et morphologiques, subdivisée en trois variétés :

- La variété *galica* de Coincy : correspond aux peuplements européens (Alpes, Corse et Pyrénées).
- La variété *hispanica* Miller : regroupent les peuplements de la péninsule Ibérique.
- La variété *africana* Maire : pour les individus d'Afrique du Nord (Maroc et Algérie).

Par la suite, Gauquelin *et al.* (1988), ont proposé une nouvelle systématique pour l'espèce *J.thurifera*, basée à la fois sur les critères morphologiques (nombre de graines par galbule) et

phytochimiques (pourcentage de la prodelphinidine par rapport au proanthocyanidines). L'espèce a été scindée en deux sous-espèces :

A) La première sous espèce :

- *J. thurifera* L. subsp. *Africana* pour les populations africaines.
- *J. thurifera* L. subsp. *thurifera* pour les populations européennes.

B) La deuxième sous espèce ; avec trois Chimiovar ont été proposés :

- Chimiovar *thurifera*, qui rassemble les populations d'Espagne et de Pyrénées.
- Chimiovar *galica*, pour les peuplements des Alpes.
- Chimiovar *corsicana*, limité à la Corse.



Figure 1 : Les galbules de *Juniperus thurifera* ; A- Galbules à l'état jeune. B-Galbules matures.

1.2. Biologie

La répartition spatiale de thurifère dans les Aurès est très irrégulière. La sex-ratio est généralement en déséquilibre au sein des populations. Cependant, ce sont souvent les mâles qui recolonisent (Belkassir et Temagoult, 2001). Borel et Polidori (1983) ont, en effet, noté un déséquilibre dans les petites stations d'essaimage dans les Alpes, avec 77 % des pieds mâles.

Le Genévrier thurifère atteint sa maturité sexuelle vers 40-50 ans, parfois moins dans des conditions stationnelles plus difficiles (Borel et Polidori, 1983). En revanche, il n'existe aucun signe distinctif entre les individus qui n'ont pas atteint leur maturité sexuelle, c'est-à-

dire il n'y a aucune certitude scientifique acquise concernant l'âge minimal de la maturité sexuelle (Bertaudière-Montès et Montès, 2004).

La floraison est dioïque, c'est-à-dire que, le pied mâle et le pied femelle sont différenciés, mais accidentellement, dans certaines stations des Alpes françaises et en Corse, on trouve des individus monoïques (Montes, 1999). Les fleurs femelles se forment en août-septembre. Elles sont composées de pièces foliacées vertes portant à leur base des ovules. Les fleurs mâles sont de petits cônes contenant le pollen. La pollinisation et la fécondation sont printanières, se déroulant en février-mars de l'année suivante. Les galbules seront bien formés à partir du mois d'octobre (Fertin, 2010).

La croissance du galbule, à partir du mois de mars, s'observe par une modification de la disposition des pièces et un accroissement général du cône. Les tissus des pièces fertiles, soudés à la base, deviennent charnus puis leurs parties libres se réduisent à mesure que la croissance du galbule s'effectue. Celui-ci atteint sa taille définitive au cours des mois d'octobre-novembre de la même année. Puis c'est la troisième et dernière phase de maturation. Cela concorde avec le processus de maturation des graines du galbule. La maturité des galbules, qui se traduit par un amollissement des tissus (d'où la formation d'une sorte de baie) est terminée à la fin de l'été de l'année suivante soit environ deux ans après la limitation du cône (Roques *et al.*, 1984). Les galbules charnus contiennent de 1 à 5 graines qui ne seront libérées que par broyage à la faveur de la consommation par un oiseau ou un petit rongeur, ou encore par décomposition du fruit (Bertaudière-Montès et Montès, 2004). La germination est aussi liée à un processus dont il ne faut pas écarter l'effet du climat, les graines pouvant présenter une double dormance dont la levée nécessite une période de froid (Sebastian, 1958) ni le rôle des endomycorhizes dont l'influence peut être décisive (Borel et Polidori, 1983).

Le Genévrier thurifère étant un arbre de hautes montagnes, sa croissance extrêmement lente, mais de grande longévité peut atteindre des âges très avancés. On rencontre les vieux peuplements dans le moyen et le grand Atlas du Maroc qui ont de 200 à 300 ans ou plus (Montès, 1999). Il montre généralement un développement racinaire par rapport à son houppier, d'autre part si sa croissance radiale habituelle est lente (1-1.5mm/an), il peut arriver à la multiplier par trois en profitant de deux ou plusieurs périodes favorables en printemps, en été et en automne (Caméro, 2006). L'accroissement radial annuel est compris entre 0,54 et 0,7 mm/an. Sur un sol superficiel, la croissance est globalement homogène. L'accroissement radial est de 0,54 mm en moyenne. En terrasse, sur sol constitué, l'accroissement radial est supérieur, de l'ordre de 2 mm/an, les conditions édaphiques étant moins limitantes. Comme

pour la plupart des arbres forestiers, la croissance initiale est forte dans les 30 premières années (Lorique, 2005). Ses adaptations leur permettent notamment une modulation de la croissance en fonction des disponibilités, hydriques, et une seconde phase de croissance en fin d'été (provoquant des cernes doubles compliquant l'estimation de l'âge des arbres) (Bertaudière, 1999). Pour estimer l'âge d'un arbre, l'une des méthodes les plus utilisées est la dendrochronologie. Le carottage sur chaque thurifère étant impossible en raison de vieillissement et de la dureté du bois de cette espèce. Il a été proposé d'estimer l'âge des individus grâce à la circonférence à la base (Cr) en déterminant le rayon moyen (r), puis d'estimer l'âge grâce à l'accroissement radial : $\text{Age} = r/\text{Cr}$ (Coussi *et al.*, 2013).

1.3. Ecologie

L'écologie du *J.thurifera* est marquée par son attachement au climat continental semi-aride et subhumide froid et très froid, sans aucune préférence apparente vis-à-vis du sol (Chabbatou, 1996). Un caractère commun aux Genévriers est qu'ils colonisent les stations dont ne peuvent se contenter les autres essences forestières. Le Genévrier thurifère excelle dans ce domaine. C'est une espèce méditerranéo-montagnarde. C'est l'essence forestière la plus résistante aux conditions climatiques très sévères (Fromard et Gauquelin, 1993).

D'après Belkassir et Temagoult(2001), il présente une capacité remarquable de réponse physiologique contre les facteurs environnementaux hostiles, cette capacité a voué une résistance aux agressions mécaniques et aux climats sévères (hiver plus froid et été très sec), c'est une espèce xéothermique qui ne craint ni la sécheresse ni le froid. Ainsi la forte teneur en substance aromatique semble la protéger efficacement contre les attaques des insectes et des champignons ou certains parasites, qui provoquent des dégradations très avancées. D'une manière générale, son amplitude altitudinale se situe entre 1300 et 2000 m.

Il est rencontré essentiellement sur substrats calcaires, à l'origine de sols brunifiés plus ou moins carbonatés, riches en bases. L'humus est de forme xéromull et de pH neutre à légèrement acide. Les sols sont souvent superficiels. C'est une espèce xérophile calcicole (Rameau *et al.*, 1993).

1.4. Répartition

Le Genévrier thurifère est une espèce dont l'aire de répartition est limitée à la partie occidentale du bassin méditerranéen présent en Italie, en France, en Espagne, au Maroc et en Algérie. Cet arbre présente non seulement une distribution très morcelée, mais également inégale. En Espagne, le nom le plus largement répandu est celui de *Sabina albar* ou encore *enebro* (Blanco *et al.*, 1997). Les peuplements sont beaucoup plus importants et variés essentiellement entre 350 à 1350 m d'altitude (Gauquelin, 1999). En Italie, la découverte du Genévrier thurifère est très récente, elle se localise dans les Alpes maritimes (Barbero *et al.*, 1988). Cette espèce porte le nom de *Ginepro thurifero* ou *Ginepro spagnolo* (Rameau *et al.*, 1993).

En France, Genévrier thurifère est relativement bien répandu dans les Alpes du Sud, plus rare au nord (Borel et Polidri, 1983). Il est également présent en Corse où ses populations sont localisées au centre de la moitié nord de l'île (Conrad, 1986 ; Gamisans *et al.*, 1994 ;inGauquelin *et al.*, 2003).

Au Maroc, selon Montès (1999), l'aire de cette *Cupressacée* constitue souvent la limite supérieure de la forêt atlasique, il se rencontre essentiellement dans deux grands ensembles montagnards : le Haut Atlas et le Moyen Atlas selon l'aire de répartition le Genévrier thurifère est connu sous différents noms.

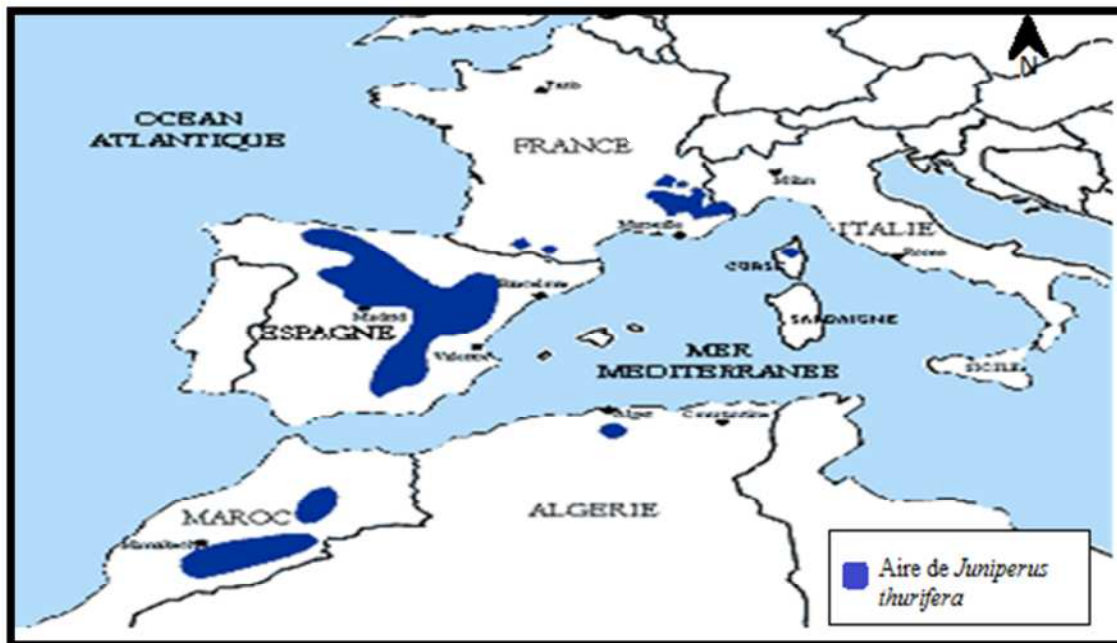


Figure 2 : Répartition mondiale de *Juniperus thurifera* (Montès, 1999).

En Algérie, d'après Boudy (1952), *thurifera* est extrêmement rare et se localise seulement dans les Aurès sous forme des peuplements clairs. Selon l'altitude on le rencontre dans cinq stations (Belkassir et Temagout, 2001).

- **Ain El-Beida (Tkout)**, caractérisée par des peuplements très clairs situés entre 1300 à 2000 m d'altitude dont le nombre de pieds est estimé à environ 4000, dont 10 % d'arbres femelles portant des graines généralement peu productives.
- **Oued Abdi (Zana)**, dans cette station, le thurifère se trouve dans cette zone à l'état de peuplements isolés (Zana, comptant environ 8000 sujets, dont 1600 femelles. La limite altitudinale inférieure est de 1300 m) et peut aller avec le chêne vert jusqu'à 2100 m (mahmel).
- **Tibhirine et Ichmoul** ; dans cette zone, le thurifère se localise sur les versants nord entre 1400 m et 1800 m en formant des peuplements clairs avec le chêne vert et le frêne épineux.
- **Station S'gag**, dans des conditions climatiques, en présence du chêne vert, le thurifère côtoie le cèdre jusqu'à 2100 m d'altitude. Il est cependant important de signaler la présence de jeunes plans témoignant d'une régénération naturelle.
- **Station Chelia et Tafrent**, sur cette station Oued à 1800 m, une vingtaine de sujets ont été comptabilisés en présence du cèdre et du chêne vert.

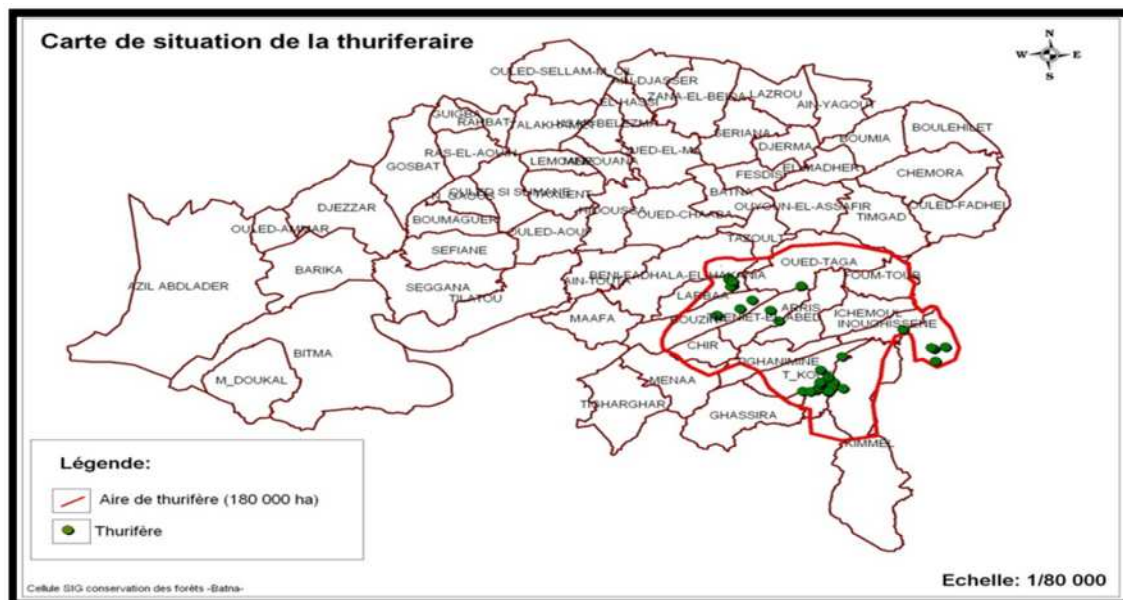


Figure 3 : Répartition de *Juniperus thurifera* dans les Aurès (source : Conservation des forêts, Batna)

1.5. Régénération

La régénération naturelle du thurifère est difficile, souvent rare, elle peut être facilitée lorsque le chêne vert se mêle au sous-bois (Belkassir et Temagoult, 2001). Il serait excessif de prétendre comme il a parfois été avancé qu'il ne se régénère plus ; il y a au contraire de nombreux exemples de régénération naturelle. Des jeunes sujets ont été observés notamment dans les thuriferaies marocaines (forêt d'el houamel - Oued Abid des Ait Afen, région de demrat) (Ouhammou, 1991). Dans le contexte algérien (Aurès), de jeunes sujets ont été observés, dans la station de T'kout ainsi que dans celle de la vallée d'Oued Abdi.

En effet, le véritable obstacle à sa régénération est la difficulté de la germination des graines, le genre *Juniperus* est connu par un pouvoir germinatif difficile et particulièrement le *Juniperus thurifera*. En effet, les graines ont une double dormance, c'est-à-dire qu'elles ont besoin de deux périodes de froid, l'une pour induire la post-maturation de la radicule, l'autre pour supprimer la dormance de l'épicotyle qui a commencé à se développer pendant la période la plus chaude intermédiaire (Sebastian, 1958). L'influence néfaste de surpâturage puisque non seulement les chèvres broutent les jeunes pousses, mais elles participent aussi à la dégradation et à l'entassement des sols, les mutilations par l'homme sont aussi nuisibles, car en diminuant le houppier des arbres, le micro climat sous couvert diminue et donc les précipitations augmentent l'érosion du sol (Lathuillière, 1994).

A tous ces facteurs limitants s'ajoute un phénomène très spécifique au Genévrier thurifère, à savoir l'impact des insectes spécialisés dans l'exploitation des cônes et galbules, limitant ainsi la production de graines susceptibles de germer (El Alaoui, 1991).

D'après, Lathuillière (1994), si les principaux facteurs inhibant ou activant la germination commencent à être mis en évidence, les données qualitatives et quantitatives manquent encore pour espérer régénérer artificiellement le Genévrier thurifère. De plus, nous n'avons aucune donnée sur le temps pendant lequel les graines gardent leur pouvoir germinatif (aussi faible qu'il soit). Les essais de régénération artificielle se sont fréquemment heurtés à la difficulté de maîtriser la germination des semences de cette espèce en conditions contrôlées et le processus de germination des graines viables est relativement complexe du fait de la présence d'un tégument rigide et de la forte dormance des semences. Les quelques essais, entrant dans le cadre des projets de fin d'études, sont restés vains.

1.6. Intérêt

Le Genévrier thurifère est une espèce qui présente de nombreux intérêts tant écologiques qu'historiques, culturels ou encore économiques. Forme des paysages très particuliers, façonnés par des siècles d'histoires, de civilisation agropastorale et d'évolution naturelle. C'est un arbre d'un grand intérêt forestier, biologique puisqu'il est endémique des pays riverains de la mer méditerranée occidentale. Il joue un rôle important dans la montagne et présente un grand intérêt scientifique en tant que relique botanique (Gauquelin *et al.* 1999 b).

J.thurifera L. a été utilisé de diverses façons au cours des derniers siècles (Montès, 1999), du fait qu'il soit odorant. Il est aussi utilisé en ébénisterie, lit en thurifère pour éloigner les punaises (Charras, 1993). Fabrication de « gin » (genièvre) à partir des galbules, destinées à l'exportation vers la Hollande (Lucas Santaloya, 1998). En médecine vétérinaire, décoction des galbules pour réaliser les insecticides contre les parasites des cochons (Archiloque et Borel, 1965). Les branches du Genévrier thurifère, à la forte odeur destinée à attirer les essaims, disposées au voisinage des ruches par les apiculteurs au moment de l'essaimage (Archiloque et Borel, 1965). Une autre utilisation traditionnelle est la production, à partir de la distillation des branches, une sorte de goudron, un peu analogue à l'huile de cade extraite du *Genévrier oxycèdre*, et utilisée en médecine vétérinaire (Gauquelin *et al.*, 2003). Son bois est utilisé comme bois de chauffage pour la cuisine, mais aussi comme bois de construction du fait de sa dureté et de son caractère d'imputrescible, et son feuillage est donné au troupeau (Montès, 1999). Belakhdar (1998) a rapporté que les galbules du thurifère sont utilisées pour les soins des gencives particulièrement contre les saignements, ou consommées comme amuse-gueule, en étant aromatiques et un peu sucrées.

1.7. Les ennemis de *Juniperus thurifera*

Un certain nombre de parasites attaquent les organes de reproduction de *J.thurifera*. Une étude sur la colonisation des cônes et galbules des genévriers méditerranéens par les insectes et les acariens a mis en évidence quatre parasites du *Genévrier thurifère* dans les Alpes du Sud. L'acarien *Trisetacus quadrisetus* (*Eriophiidae*), attaque les cônes, les galbules ainsi que les graines. L'hyménoptère *Megastigmus bipunctatus* (*Torymidae*), attaque les graines. Les lépidoptères *Brachyacma oxycedrella* (*Gelechiidae*) et *Pammene juniperana* (*Tortricidae*) attaquent les galbules et les graines. Ces parasites semblent avoir une influence directe sur la régénération naturelle en réduisant le nombre de graines disséminables (Fertin, 2010). L'action anthropogène qui ne s'est pas traduite uniquement par les défrichements, mais a également touché les forêts épargnées jusque-là par leur topographie accidentée. Aussi, la

dégradation a été le fait de l'augmentation des populations de pasteurs dont les troupeaux sont répandus dans les forêts. Pour sa part, l'Aurès n'a pas échappé au phénomène de dégradation qu'a connu le bassin méditerranéen. L'analyse de l'action humaine sur les formations forestières en général et du thurifère en particulier montre qu'en plus des conditions climatiques sévères caractérisées par des déficits hydriques (pluviométriques), les coupes, les pâturages et les mutilations diverses ont contribué à la régression de ces peuplements. L'un des facteurs dont les effets sont apparemment en plus spectaculaires par rapport aux coupes et aux incendies c'est le pâturage. Les semis sont broutés ou piétinés, ce qui constitue par conséquent une menace pour la pérennité de l'espèce.

1.8. Multiplication végétative de *Juniperus thurifera*

Les travaux de multiplication végétative sur cette espèce sont rares, la première possibilité de multiplier le Genévrier thurifère via la technique de bouturage a donné un taux de réussite atteignant 15 %. Les pourcentages et la qualité d'enracinement semblent être prometteurs, cependant aucune information précise n'est donnée quant aux pourcentages d'enracinement et/ou la qualité des racines. Néanmoins, ce bouturage a permis en particulier de réaliser un parc à pieds mères jeunes (Ferradous, 2013).

2. Régénération par des techniques *in vitro*

2.1. Généralités

Les biotechnologies constituent, depuis quelques années, une importante composante de toutes stratégies de recherche relatives à la multiplication et/ou à l'amélioration génétique des espèces végétales. En effet, devant une demande quantitative toujours croissante et qualitative de plus en plus restrictive, les techniques classiques encore employées aussi bien pour la multiplication que pour l'amélioration génétique des végétaux sont relativement lentes et toujours limitées (Chaari-khris *et al.*, 2008).

La technique de culture *in vitro* est une branche de la biotechnologie végétale, c'est un mode de multiplication végétative artificielle des plantes. Il s'agit d'un ensemble de méthodes faisant 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.).

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 de nouvelles organogénèses c'est-à-dire par

bourgeonnement adventif et embryogenèse somatique. Les particularités de ces trois techniques principales et plus généralement de la micropropagation *in vitro* sont examinées, en analysant leurs avantages respectifs et inconvénients ainsi que leurs efficacités et leurs limitations pour l'amélioration de la qualité de production en masse des plants par comparaison avec des méthodes plus conventionnelles de propagation (Menteuuis, 2016).

Cette technique est appliquée à des plantes portant des intérêts particuliers ou difficiles à reproduire naturellement. 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).

2.2 Les voies de régénération *in vitro*

La régénération de plantes entières, à partir d'un fragment d'organes, voire même d'une seule cellule, est basée sur l'une des propriétés fondamentales de la cellule végétale, la totipotence. Cette dernière est la faculté qu'a la cellule végétale spécialisée (différenciée) à perdre cette spécialisation, à se multiplier sous forme d'un tissu indifférencié, puis à retrouver sa spécialisation, voire une autre différenciation. Ainsi les cellules d'un fragment de pétiole ou de feuille, vont se dédifférencier en formant un cal et retrouver une différenciation en reformant une jeune plantule (Lafon *et al.*, 1987 ; *in* Bakiri, 2011).

Chaque cellule possède la totalité de l'information génétique qui régit l'organisation de la plante entière. Dans la cellule spécialisée, appartenant à un tissu spécialisé, seule une fraction du matériel génétique est exploitée et seule cette fraction peut l'être. Quand la cellule se dédifférencie, la totalité du matériel génétique est potentiellement réactivée puis utilisée lorsque la cellule s'engage de nouveau dans la voie de la différenciation (régénération). Le programme génétique de la cellule peut donc repartir dans un sens ou dans un autre. Ce sont les hormones ou plus généralement les régulateurs de croissance qui, en culture *in vitro*, permettent d'orienter le programme vers le cal, les bourgeons, les racines ou même la

régénération de la plante entière par embryogenèse somatique (Lafon *et al.*, 1987 ;in Bakiri, 2011).

Les techniques de micropropagation empruntent essentiellement deux voies. L'une qui utilise des tissus méristématiques (méristème ou apex de tige, bourgeons axillaires) potentiellement capables de donner suite, au développement normal, d'un individu est appelée microbouturage (Saadi, 1991). Cette technique est souvent appelée « multiplication conforme », car elle part de méristèmes préexistants dans lesquels, les cellules sont génétiquement très stables (Amato, 1977 ; in Boxus, 1995), l'individu est généralement obtenu en deux étapes successives, d'abord la production de tige, puis son enracinement (**Figure 04**).

L'autre voie, 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).

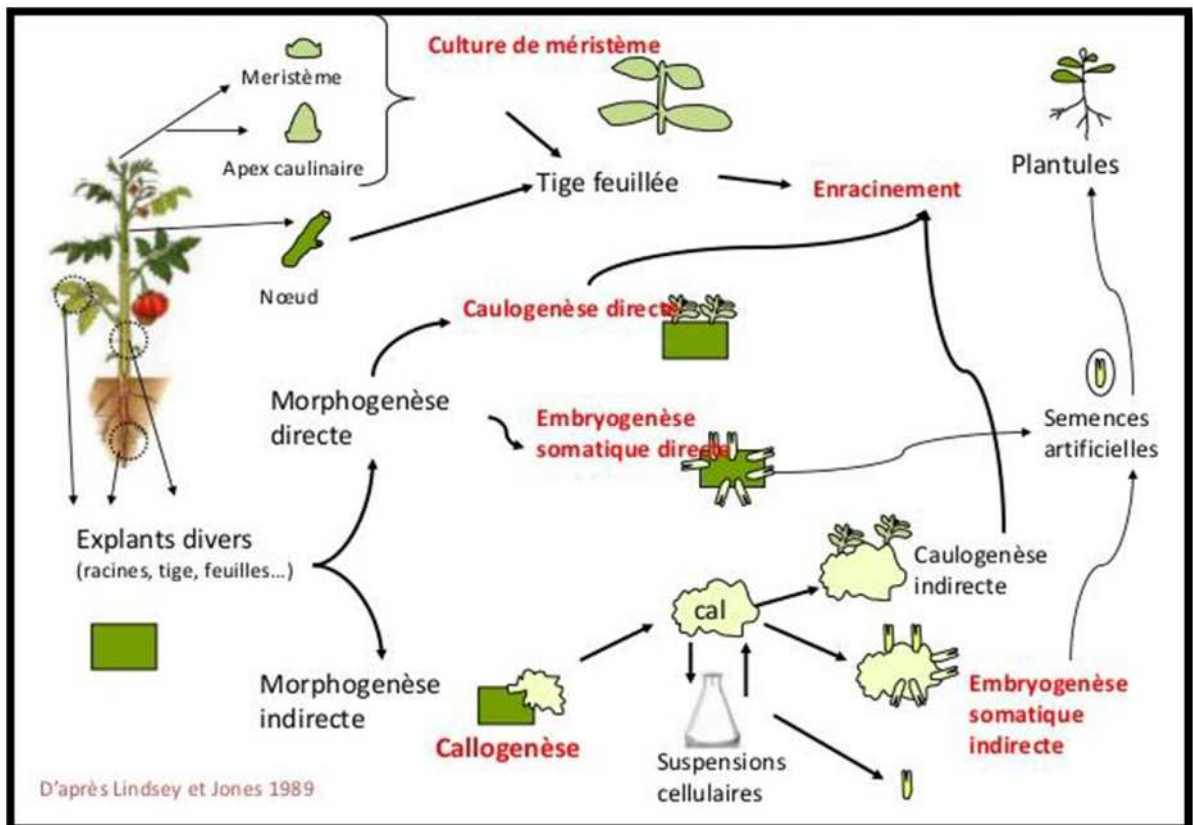


Figure 04 : Les principales méthodes de la micropropagation (Lindsey et Jones, 1989).

2.2.1. Microbouturage

Il consiste à produire, en conditions stériles, de nombreux bourgeons axillaires à partir d'un bourgeon ou plus précisément d'un méristème. Les bourgeons sont multipliés, allongés en tiges de quelques centimètres et enracinés en présence d'une auxine, puis utilisés soit en plantation directe, soit en pieds mères.

La micropropagation permet l'amplification du matériel sélectionné sur une petite surface indépendamment des saisons. Les vitro-boutures sont de qualité : elles sont indemnes de bactéries et de virus et présentent une vigueur juvénile souvent recherchée pour l'établissement de pieds mère destinés au bouturage horticole. À titre d'exemple, le succès du bouturage de pied mère d'Eucalyptus établis à partir de vitro-plants est augmenté de 40 % par rapport à des pieds mère classiques. La qualité des plants forestiers issus directement ou indirectement de la multiplication *in vitro* peut être appréciée au travers de multiples essais dont le recul est d'environ une dizaine d'années pour l'Eucalyptus au Brésil, le Peuplier, le Merisier et le noyer en France et le Bouleau en Suède (Gilles *et al.*, 2002).

2.2.2. Organogénèse

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

- La caulogénèse 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 caulogénèse se manifeste à partir de certaines catégories de tissus tels que le cambium, le parenchyme vasculaire ou libérien (Fortes et Pais, 2000).
- La rhizogénèse désigne la néoformation et la croissance de racines. C'est un phénomène complexe, il comporte différentes phases ; la première est la dédifférenciation, ensuite la formation d'un amas de cellules méristématiques, la troisième étape est la différenciation et organisation des amas méristématiques en primordiaux racinaires, qui enfin se développent en jeunes racines (Boxus, 1995).
- La callogénèse désigne la formation d'un ensemble de cellules non organisées, se divisant plus au moins activement et dont le degré de ploïdie est variable (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. Après un supplément d'hormones de croissance dans le milieu de culture, cette première activité de division cellulaire continuera, et la croissance mal organisée sera maintenue sans différenciation morphologique reconnaissable. Cependant, dans des conditions appropriées, la différenciation, par exemple, 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).

L'organogenèse exige également l'acclimatation ultérieure des plantes régénérées à la serre avant la plantation. Aujourd'hui, elle est considérée la méthode la plus appliquée pour la régénération *in vitro* des plantes (Honda *et al.*, 2001 ; Duclercq *et al.*, 2011).

2.2.3. Embryogenèse somatique

Durant l'évolution, pour surmonter les divers facteurs environnementaux et génétiques qui empêchent la fertilisation, beaucoup d'espèces ont développé différentes méthodes d'embryogenèse asexuelle, y compris l'embryogenèse somatique (Edwin *et al.*, 2008).

Selon Zryd (1988), Margara (1989), Edwin *et al.* (2008) et Neumann *et al.* (2009), les embryons somatiques ressemblent aux embryons zygotiques morphologiquement, ce sont des organes embryonnaires typiques bipolaires, qui peuvent se développer en plantes intactes, produisant des fleurs et des graines. Cependant, ils se développent par l'intermédiaire d'une voie différente.

L'embryogenèse somatique est considérée comme processus de développement par lequel les cellules somatiques dans des conditions appropriées d'induction subissent la restructuration par la voie embryogénique pour produire des cellules embryogènes (Yang et Zhang, 2010). Cette voie de développement a été décrite dans des suspensions de cellules de carotte (*Daucus carota*) par les équipes de Steward *et al.*, (1958) et Reinert (1958 ; *in* Landey, 2013). Pour les conifères, cette technique a été signalée pour l'épicéa (Hakman *et al.*, 1985 ; Chalupa 1985 ; *in* Salaj *et al.*, 2015) et elle a été appliquée pour d'autres espèces de conifères appartenant aux genres *Abies*, *Picea*, *Pinus*, *Larix*, *Pseudotsuga* et *Taxus*.

L'embryogenèse somatique consiste à produire des embryons en divisions mitotiques de cellules somatiques, tout en préservant leur patrimoine génétique original. C'est par conséquent, une technique de clonage, par opposition à l'embryogenèse zygotique dans laquelle les cellules germinales donnent lieu à des plants qui sont tous génétiquement différents. La Régénération des plantes via embryogenèse somatique comprend cinq étapes communes à suivre après la sélection de l'explant :

1. Induction des cultures embryogéniques en cultivant l'explant primaire sur un milieu complété avec des régulateurs de croissance, principalement, des auxines ; cette étape comporte également le choix et la séparation physique du cal (Von-Arnold *et al.*, 2002).
2. La prolifération des cultures embryogéniques (multiplication) sur un milieu solidifié ou liquide supplémenté avec des régulateurs de croissance (Dodeman *et al.*, 1997 ; Von-Arnold *et al.*, 2002).
3. Le développement d'embryons somatiques dans un milieu dépourvu des régulateurs de croissance ; cela inhibe la prolifération et stimule la formation et développement précoce de l'embryon (Dodeman *et al.*, 1997 ; Von-Arnold *et al.*, 2002).
4. La maturation des embryons par culture sur milieu additionné avec ABA ou avec un potentiel osmotique réduit (Edwin *et al.*, 2008).
5. Le développement des plantes sur milieu dépourvu des régulateurs de croissance jusqu'à ce que les plantes sont enracinées et capables d'être transférées au sol stérilisé sous serre (Landey, 2013).

L'obtention d'embryons somatiques peut se faire selon deux modes, le mode direct ou indirect. Lorsque l'embryogenèse est de type direct, la cellule somatique subit une dédifférenciation puis une prédifférenciation au sein du tissu dont elle est issue. C'est le cas de la chicorée où les embryons somatiques sont obtenus à partir de différents types d'explants sans passage par une phase de callogénèse (Dubois *et al.*, 1990). L'embryogenèse somatique indirecte passe par une phase de cals mettant en cause la prolifération de cals embryogéniques (Dodeman *et al.*, 1997 ; Von-Arnold *et al.*, 2002 ; Quiroz-Figueroa *et al.*, 2006 ; Namasivayam, 2007).

Par ailleurs, les embryons somatiques proviennent soit d'origine unicellulaire ou multicellulaire (Von-Arnold *et al.*, 2002 ; Quiroz-Figueroa *et al.*, 2006 ; Yang et Zhang, 2010). Néanmoins, pas toutes les cellules somatiques sont capables d'embryogénies

(Dodeman *et al.*, 1997). Les facteurs qui influencent l'adaptabilité *in vitro* et la régénération sont variés, allant du génotype, l'origine de l'explant aux conditions de la culture (Boxuset *al.*,1995). Théoriquement, les cellules de toutes les plantes sont totipotentes. Toutefois, il semble que le déclenchement de la voie embryogénique est restreint à certaines cellules sensibles possédant le potentiel pour activer des gènes impliqués dans la génération d'une réponse embryogénique (Feher, 2008). Les cellules qui sont plus capables d'embryogénie sont généralement celles qui viennent de jeunes tissus trouvés dans les jeunes plantes et des embryons zygotiques immatures (Gutierrez-Mora *et al.*, 2012).

L'embryogenèse somatique des conifères a trouvé l'application commerciale étendue, avec des compagnies employant un grand nombre d'embryons somatiques annuellement dans leurs plantations (Cyr et Klimaszewska, 2002 ; Lelu *et al.*, 2013). En particulier, elle a été efficace parce que les cultures embryogéniques peuvent être cryoconservées et réactivées par la suite. Ceci a permis faire un essai pratique à long terme des lignes clonales et, en conséquence, le choix des lignes supérieures avant la production en série des lignes choisies.

2.3. Facteurs influençant la régénération *in vitro* des plantes

L'initiation à l'organogénèse dépend de plusieurs facteurs comme le génotype et les explants testés, le milieu de culture, la nature et la concentration des régulateurs de croissance ajoutés au milieu de culture.

2.3.1. Effet de l'explant

Le succès de l'initiation de la culture dépend considérablement du type et de l'état physiologique des explants utilisés (Durzan, 1984 ; *in* Bonga *et al.*,2010). Généralement dans les cultures *in vitro*, on privilégiera les explants les plus jeunes (embryons immatures, jeunes feuilles, méristèmes, etc.), car c'est l'état juvénile qui semble offrir le plus de possibilités de régénération (Saadi, 1991). Souvent, ce sont les tissus provenant d'embryons qui expriment d'une manière nette et reproductible, l'aptitude à la régénération, le cas par exemple *Pinus sylvestris* (Haggman *et al.*, 1999) et bien d'autres espèces.

La période de prélèvement pose un problème surtout pour les espèces vivaces, on peut distinguer un stade de vie active et un stade de vie ralentie de la plante, ce qui conduit les explants à développer des réactions différentes en culture *in vitro*, cette différence peut être expliquée par la modification des équilibres internes des régulateurs de croissances lors des différentes saisons (Augé *et al.*,1989).

2.3.2. Le génotype

La capacité de micropropagation varie souvent considérablement en fonction du génotype et la plupart des plantes montrent une régénération génotypique spécifique liée à l'espèce. A l'intérieur d'une même espèce, un génotype donne des bourgeons tandis qu'un autre ne peut fournir que des embryons (Augé *et al.*, 1989). Cependant, plusieurs auteurs mentionnent que seulement certains génotypes paraissent posséder la capacité d'induire une embryogenèse somatique. Cette capacité chez beaucoup d'espèces semble être génotypiquement contrôlée (Dodeman *et al.*, 1997). Par exemple au niveau du genre *Pinus* et malgré une forte influence génotypique entre et dans l'espèce (Park *et al.*, 1998), *Picea sp* démontre une grande capacité de l'embryogenèse somatique que les Pins, Sapins et Douglas. De même pour le peuplier (Mentouis, 2016) et le *Pin radiata* (Aitken-Christie *et al.*, 1988) ont une prédisposition plus élevée pour bourgeonnement fortuit, ou la formation de nodules méristématiques que d'autres espèces.

2.3.3. Le milieu de culture

Les milieux de culture *in vitro* sont généralement synthétiques, gélifiés ou liquides, et se composent de combinaison d'une liste restreinte des sels, des vitamines, du saccharose et des régulateurs de croissance (Bonga et Von-Aderkas, 1992 ; George, 1993). Les caractéristiques de ces composants ainsi que leurs interactions sont susceptibles de changer de façon incontrôlable pendant le processus d'autoclavage, ainsi qu'au cours de chaque cycle de la subculture en raison de l'absorption d'éléments nutritifs par les explants, l'évaporation, la variation du pH, et l'influence de la température et lumière (George, 1993).

Ces changements inattendus sont totalement indépendants des besoins métaboliques associés au développement d'explants au cours du temps. Le stress causé, par exemple, par des composants moyens inappropriés, inadaptés, résistance de la matrice, des concentrations excessives de régulateurs de croissance et des macro-éléments, en particulier d'ammonium, peut affecter la physiologie et la réactivité de l'explant (Von-Aderkas et Bonga, 2000).

De nombreux milieux de culture ont été déjà établis afin de régénérer *in vitro* plusieurs espèces ligneuses et non ligneuses, dont les concentrations des composés varient suivant les besoins d'une espèce prédéfinie ou suivant l'objectif de la culture. Les milieux sélectionnés doivent être le plus parfaitement adaptés aux besoins nutritifs de la plante soumise à l'étude afin de laisser s'exprimer pleinement son potentiel génétique. Chez *Juniperus*, les milieux de base les plus utilisés sont le milieu de Murashige et Skoog (1962), le milieu WPM (McCown and Lloyd, 1981) et le milieu N6. Leurs compositions respectives sont énumérées

dans le chapitre 2. La différence entre ces milieux réside dans l'apport en macroéléments, microéléments, vitamines, et la concentration de certains éléments.

Ainsi, dans un premier temps, il est nécessaire de préparer des solutions mères complexes concentrées comprenant tous les éléments minéraux sauf les sels de calcium pour éviter les précipitations : une solution mère de macroéléments, concentrés 100 fois, une solution mère, de micro-éléments concentrée 1000 fois, une solution mère de chélate de fer, Fe-EDTA (x 1000), une solution mère comprenant les vitamines de groupe B (x 1000), et des solutions mères pour les régulateurs de croissance à la concentration de $0,1 \text{ g L}^{-1}$ soit $0,1 \text{ mg mL}^{-1}$. Le milieu de culture est solidifié par de l'Agar ou la gélose de l'ordre de 6 à 10 g L^{-1} , nécessitant un chauffage à l'ébullition au préalable pour dissoudre l'un de ces deux composés (Raugé *et al.*, 1984 ; *in* Rabotovao, 2004). Un ajustement de pH est nécessaire et doit être aux environs de 5,6 à 5,8. A la fin, le milieu de culture devra être stérilisé dans un autoclave à une température de $120 \text{ }^\circ\text{C}$ pendant 20 min sous une pression de 1 bar (Ramanankierana, 2000).

2.3.4. Les régulateurs de croissance

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 régulateurs de croissance sont synthétiques ou naturels produisent des signaux moléculaires pour la régulation des processus cellulaires et sont largement utilisés dans la culture des tissus, les principaux régulateurs de croissance sont les auxines, les cytokinines, les gibbérellines, l'acide abscissique (ABA) et l'éthylène. Les auxines dans les plantes sont les agents responsables de l'établissement de la polarité cellulaire, la division et l'élongation cellulaires, la dominance apicale et la formation des racines adventives. L'hormone d'origine endogène est l'acide indole -3-acétique (IAA) (Deo *et al.*, 2010 ; Gutierrez-Mora *et al.*, 2012). 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) et l'enracinement d'embryons somatiques au stade de cotylédons (dernier stade de développement). Parmi les auxines synthétiques les plus utilisées pour la régénération de l'espèce sont l'acide indole -3-butyrique (IBA), l'acide naphthalène (NAA), 2,4-acide dichlorophénoxyacétique (2,4-D).

Les cytokinines dans les plantes favorisent la division cellulaire et la différenciation. Elles induisent la formation de pousses adventives lorsqu'elles sont utilisées à des concentrations élevées ($1 \text{ à } 10 \text{ mg L}^{-1}$) en culture des tissus, mais dans de telles conditions la formation des

racines est généralement inhibée. En outre, elles favorisent la formation de pousses axillaires en diminuant la dominance apicale (Gutierrez-Mora *et al.*, 2012).

En ce qui concerne les gibbérellines, elles ont une action sur la croissance des tiges (et non des racines contrairement à l'auxine), et ont une influence sur la levée ou interruption de la dormance et s'opposent donc aux effets de l'acide abscissique. Elles interviennent également sur l'initiation de la floraison et le débourrement des bourgeons (Hopkins, 2003). La synthèse de ces molécules est effectuée dans des sites divers, mais toujours dans des lieux de division active (Hopkins, 2003).

La nature de la différenciation organogénique est déterminée par le rapport de la concentration des deux hormones l'auxine et la cytokinine. La néoformation des bourgeons est souvent favorisée par des teneurs élevées en cytokinines, tandis que les fortes doses en auxines supérieures favorisent la différenciation des racines (**Figure 05**).

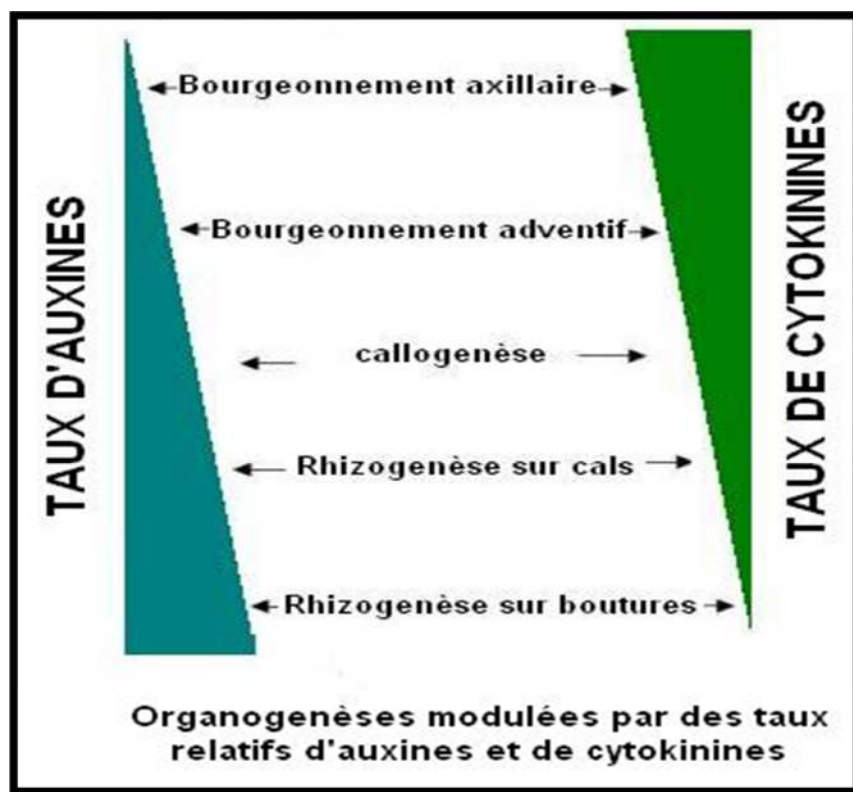


Figure 05 : Effet de la balance hormonale sur l'orientation de l'organogénèse au cours de la micropropagation (Augé *et al.*, 1989).

2.3.5. L'influence de la source carbonique

Les tissus en cultures *in vitro* sont largement hétérotrophes vis à vis du carbone en raison de l'absence ou de l'insuffisance de l'assimilation chlorophyllienne. Il est donc indispensable d'ajouter une source carbonée (des glucides) au milieu de culture. Les glucides remplissent deux fonctions principales dans les milieux de culture, ils fournissent de l'énergie nécessaire pour la croissance des tissus et maintiennent une pression osmotique donnée du milieu de culture (Zryd, 1988). Cette pression osmotique, appelée aussi « effet osmoticum », peut avoir diverses actions sur les tissus. Elle agit, dans certains cas, sur l'orientation ou l'expression morphogénétique des tissus (Belaizi et Boxus, 1995 ; Charniere *et al.*, 1998), dans d'autres cas, sur la maturation des embryons somatiques produits (Walker et Parrott, 2001).

Les glucides, les plus généralement utilisés sont le saccharose et le glucose (Margara, 1989 ; Druart et Samyn, 1995). Selon certains auteurs, le maltose peut constituer une bonne source carbonée puisqu'il permet, dans certains travaux portant sur l'embryogenèse, d'améliorer à la fois, et la qualité et la quantité des embryons somatiques produits (Saadi, 1991).

2.3.6. Avantages et inconvénients

La micropropagation *in vitro* d'arbres ligneux a de nombreux avantages par rapport aux méthodes de propagation classiques. 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 (Sasson, 1993).

Cette technique peut fournir également un approvisionnement constant en matériel végétal pour les manipulations et transformations génétiques, les études de pathologie, et celles de la conservation *in vitro* (Perez-Tornero *et al.*, 2010 ; Marutani-Hert *et al.*, 2011).

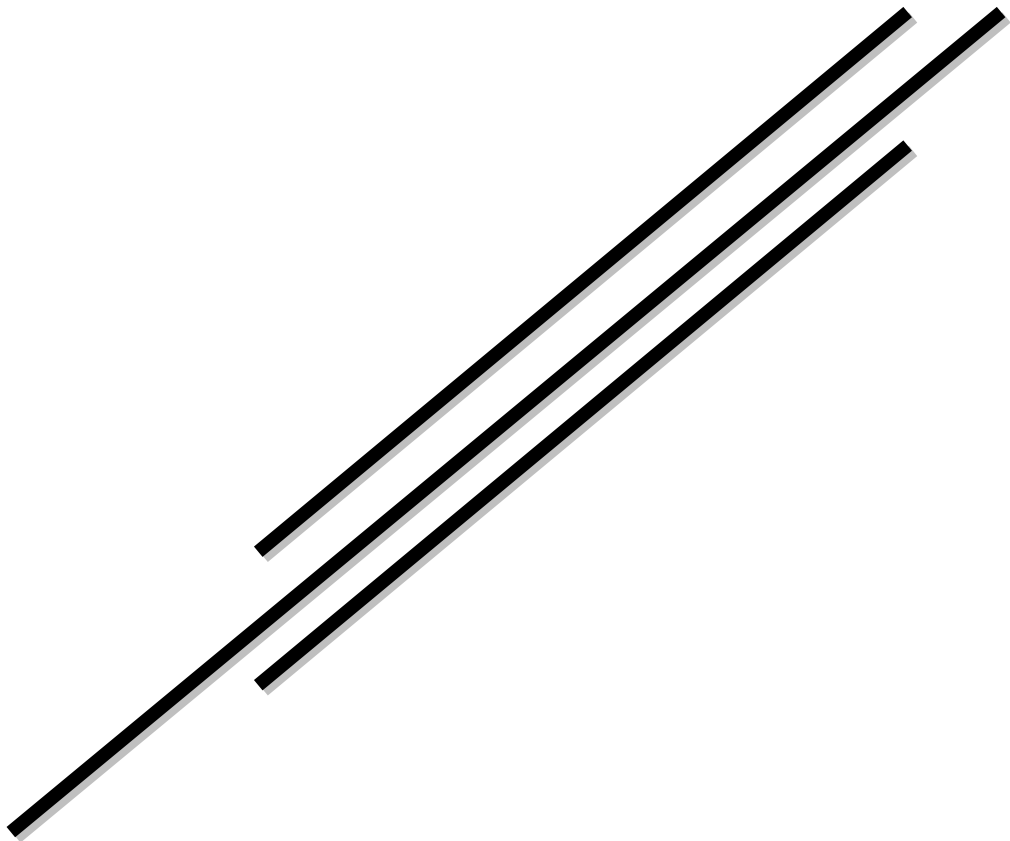
Les techniques *in vitro* sont également utiles pour la conservation des stocks de germoplasmes et permettent la multiplication d'arbres sélectionnés indépendamment de la saison et du stade de floraison ou de production de graines ce qui nous aide à contourner les cycles de vie longs, spécifiques aux arbres ligneux.

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 (Rai *et al.*, 2010). Malgré ces problèmes, un certain nombre de recherches rapportent la réussite de la technique de micropropagation sur plusieurs types d'arbres ligneux (Giri *et al.*, 2004 ; Pandey *et al.*, 2006 ; Phulwaria *et al.*, 2011). Le succès de cette technique, en particulier pour les espèces récalcitrantes, dépend essentiellement de la qualité des explants et des régulateurs de croissance utilisés. Cependant, cette technique a eu moins de succès chez d'autres espèces. En effet, la variabilité génétique de l'arganier, la récalcitrance, ainsi que la mauvaise qualité du système racinaire produit *in vitro*, ont été une difficulté majeure qui a rendu impossible la multiplication *in vitro* par microbouturage de cet arbre ligneux (Bousselmame *et al.*, 2001 ; Nouaim *et al.*, 2002). Cela est très fréquent chez les ligneux pour lesquels il faut souvent adapter les milieux en fonction des exigences des différentes variétés ou clones.

Chapitre 2 :

Matériel et

méthodes



1. Matériel végétal

1.1. Provenance du matériel biologique

Tout le matériel végétal utilisé dans ce travail appartient à l'espèce *J.thurifera*. Ce matériel est composé de :

- **Graines** : elles ont été récoltées à l'état mature et immature (au mois de septembre 2014) de la station de t'kout. Ces graines ont été, une fois leurs galbules enlevées, séchées naturellement et conservées, en lots, dans de différentes conditions :
 - Un premier lot a été conservé à température ambiante au laboratoire.
 - Un deuxième lot a été conservé à 4 °C pendant 6 mois.
- **Les boutures** : des boutures de 3 à 5 cm de longueur, ont été récoltées en automne 2015 à partir des jeunes arbres de 8- 10 ans, de la forêt domaniale de Z'gag, Wilaya de Batna, Est de l'Algérie.

1.2. Types d'explants utilisés

Les explants utilisés sont constitués de :

- graines matures de *Juniperus thurifer* ;
- embryons zygotiques prélevés des graines matures et immatures ;
- microboutures de 1 cm.

2. Stérilisation

2.1. Désinfection du matériel végétal

Il est noté que toutes les manipulations ont été réalisées sous une hotte à flux laminaire. Il est bien connu qu'il est primordial que les cultures « *in vitro* » soient dépourvues de champignons et de bactéries. On peut arriver à ce résultat par i) la stérilisation des récipients, ii) en auto clavant des milieux de culture et iii) par immersion du matériel végétal dans des liquides antiseptiques. La stérilisation de tout le matériel végétal a été effectuée en appliquant deux protocoles de désinfection différents :

2.1.1. Méthode de désinfection à base d'hypochlorite de sodium

Les explants (graines et boutures) ont été lavés à l'aide de l'eau de robinet, trempés pendant 15 min dans une solution d'hypochlorite de sodium (NaClO à 2,6 % de chlore actif) additionné de quelques gouttes de tween 20°, puis rincés dans de l'éthanol 70°, pendant 30 secondes. Les explants ont été ensuite rincés, durant 5mn, à l'eau distillée trois fois.

2.1.2. Méthode de désinfection avec un fongicide

Elle consiste à laver d'abord les explants (boutures) à l'eau courante, les trempés ensuite dans une solution de deux fongicides (systémique à large spectre d'action) $5 \text{ cm}^3 \text{ dm}^{-3}$ de pervicur et 4 g/L de Fostyl-aluminium pendant 2 h avant de les rincer 3 à 4 fois dans l'eau distillée. Les explants sont ensuite plongés dans l'éthanol à 70° pendant 30 secondes, puis émergés dans une solution d'hypochlorite de sodium pendant 20 à 30 min (Loureiro *et al.*, 2007). Enfin, on a effectué trois rinçages successifs avec de l'eau distillée stérile, avec 5 mn pour chaque rinçage, sous une hotte à flux laminaire.

2.2. Stérilisation des milieux de culture et du matériel de travail

En général, les milieux de culture sont stérilisés par autoclavage pendant 20 min à une température de 121°C et sous une pression de 13,5 bar (Deore et Johson, 2008 ; Purkaystha *et al.*, 2010 ; Sarika et Menakshi, 2009). Le matériel de travail a été stérilisé dans une étuve à 121°C pendant 20 min.

3. Milieux et conditions de culture

3.1. Compositions des milieux de culture testés

Plusieurs milieux de culture, variant par les apports en macroéléments (**Tableau 1**) et les régulateurs de croissance, ont été testés (ces milieux ont été complétés selon le but de l'expérience par des additifs).

Tableau 1 : Composition des milieux de culture en macroéléments, microéléments et vitamines utilisées dans les différents tests (mg L^{-1})

Milieux	MS	WPM	N6	$\frac{1}{2}$ MS	$\frac{1}{2}$ WPM
Macroéléments					
NH_4NO_3	1650	400	-	825	200
CaNO_3	-	360	-	-	180
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	440	96	125,33	220	48
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	370	180	90,27	185	90

Milieux	MS	WPM	N6	½ MS	½ WPM
Macroéléments					
KH ₂ PO ₄	170	170	400	85	85
K ₂ SO ₄	-	990	-	-	495
KNO ₃	1900	-	2830	950	-
(NH ₄) ₂ SO ₄	-	-	463	-	-
Microéléments					
MnSO ₄ H ₂ O	22.3	22,3	3,33	11,15	11,15
Znso ₄ .7H ₂ O	8.6	8.6	1,50	4,3	4,3
H ₃ BO ₃	6.2	6.2	1,60	3,1	3,1
KI	0.83	-	0,8	0,415	-
CuSO ₄ .5H ₂ O	0.025	0.025	-	0,0125	0,0125
Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	0.25	0.25	-	0,125	0,125
CoCl ₂ 6H ₂ O	0.025	-	-	0,0125	-
NaFe EDTA					
NaFe EDTA	37,25	37,25	37,30	18,62	18,62
FeSO ₄ .7H ₂ O	27,85	27,85	27,80	13,92	13,92
Vitamines					
Acide nicotinique	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
Thiamine hydrauchloride	1	1	1	1	1
Chlorhydrate de pyridoxal	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
Glycine	2	2	2	2	2

3.2. Régulateurs de croissance

Les hormones de croissance utilisées sont :

- pour la germination, la 6-benzyloaminopurine (BAP), et la GA₃ qui stimulent la levée de dormance ;
- pour la prolifération des bourgeons axillaires et multiplication, la 2,4 D et la 6-benzyloaminopurine (BAP) qui favorisent la ramification des pousses et s'opposent à la dominance apicale sur les méristèmes axillaires (George, 1993).
- pour l'enracinement, ce sont principalement les auxines connues par l'induction de la rhizogénèse, telles que l'acide indol butyrique (AIB) et l'acide naphthalène acétique (ANA).

Pour la GA₃, les auxines et les cytokinines utilisées, elles ont été dissoutes préalablement dans quelques gouttes d'éthanol, de NaOH (1N) ou de HCl (1N), respectivement avant leur dilution dans l'eau distillée.

3.3. Autres additifs

Les autres additifs aux milieux de culture utilisés sont :

- myo-inositol ;
- le saccharose ;
- agar-agar ;
- charbon actif ;
- vermiculite ;
- perlite.

3.4. Récipients de culture

- des bocaux en verre d'un volume de 400 mL pour la multiplication et l'enracinement, ont été remplis respectivement, par 75 mL de solution de milieu de culture/bocal pour la micropropagation et multiplication, et 100 mL pour la rhizogénèse.
- Des tubes de culture pour la germination des graines et des embryons ont été remplis par 15 mL de milieu de culture. Leur obturation a été assurée moyennant des bouchons vissant noirs.
- Des boîtes de pétries pour l'induction des cals.

3.5. Le pH des milieux de culture

Tous les milieux de culture utilisés avaient un pH ajusté à 5,8 pour des solutions de NaOH ou de HCl à 1N. Cette valeur du pH a été jugée bonne par Pennazio et Redolfi (1973 ;in Dridi, 2003) pour éviter l'apparition d'anomalies morphologiques.

4. Conditions de culture

Après la mise en culture sous hotte à flux laminaire, les conteneurs ont été placés dans des conditions de culture conditionnées à une température de $22 \pm 2^{\circ}\text{C}$ avec une photopériode de 16 h/8. La lumière dans les étagères a été assurée par des tubes fluorescents de type « cool white ».

- En ce qui concerne, la callogénèse, elle a été effectuée dans une chambre obscure à une température de 22°C .
- Pour la phase d'enracinement, deux intensités lumineuses ont été testées, elles seront exposées dans la partie, méthodes de travail.

5. Acclimatation des *vitro* plants

L'acclimatation des *vitro* plants a été menée dans une chambre d'acclimatation, dont les conditions, sont : température : $23 \pm 2^{\circ}\text{C}$, lumière 16/8h, Humidité : 70 %. Ensuite, les jeunes plants ont été transférés vers une serre sous différentes conditions de température, d'Humidité et d'éclairage.

6. Techniques de micropropagation

6.1 La culture *in vitro* des graines et des embryons isolés

Toutes les graines stratifiées et non stratifiées ont été trempées dans de l'eau, pendant 24 heures, pour séparer les graines vides des pleines. Les graines retenues pour les essais ont été désinfectées par l'hypochlorite de sodium et mises en culture dans des tubes de cultures contenant 15 mL des milieux MS et WPM solides et liquides complétés avec 1 g L^{-1} de GA_3 seul ou combiné avec $0,5\text{ mg L}^{-1}$ de BAP. L'incubation a été faite dans une chambre noire à 22°C .

Le prélèvement des embryons a été fait en ouvrant les graines à l'aide d'un scalpel stérile, en faisant attention à ne pas les endommager. Une fois les embryons enlevés avec des pinces, ils étaientensemencés dans des tubes contenant 15 mL des mêmes milieux nutritifs que ceux des

graines (**Figure 6**). Les tubes ont été placés dans la chambre de culture à 22 C ° avec une photopériode de 16 heures.



Figure 6 : Mise en culture des graines et des embryons de *J. thurifera*

A- Excision des embryons, B- Traitement des graines, C- Mise en culture des graines et des embryons dans des tubes de culture.

6.2. Microbouturage

6.2.1 Phase d'initiation

Les boutures décontaminées ont été coupées en microboutures de 1 à 1,5 cm contenant au moins un bourgeon axillaire et ont été mises en culture dans des pots de cultures. Ces derniers contenaient des milieux d'induction MS, N6 et WPM. En premier temps, et vu que le but de cette phase était d'optimiser les concentrations hormonales optimales nécessaires pour le débourrement des bourgeons axillaires, nous avons d'abord évalué l'influence de la BAP seule ou combinée avec la 2,4 D sur les boutures. Le milieu dépourvu de régulateurs de croissance a été pris comme contrôle (**Tableau 2**). Nous avons utilisé, 5 microboutures par pot de culture, contenant 75 mL de solution de milieu de culture, avec 7 répétitions. Au total, nous avons

testé 175 explants par milieu. L'incubation a été faite dans une chambre de culture dans les conditions décrites précédemment.

Le brunissement des tissus en culture *in vitro* des espèces ligneuses est un sérieux handicap. En fait, il résulte de l'oxydation par les composés phénoliques excrétés par les explants. Afin de limiter ce problème d'oxydation, on a rajouté au milieu du charbon actif (0,25 g L⁻¹). Ce dernier a pour rôle d'absorber les substances phénoliques sécrétées par les explants. De même, des repiquages successifs sur les milieux nutritifs ont été effectués, à raison de neuf ont réalisés tous les 15 jours.

Tableau 2 : Compositions en hormones (mg L⁻¹) des deux milieux de multiplication utilisés

Milieux		Concentration des hormones (mgL ⁻¹)	
		BAP	2,4D
WPM	MS		
M ₀	MS ₀	0	0
M ₁	MS ₁	0,25	0,5
M ₂	MS ₂	0,5	0,25
M ₃	MS ₃	0,5	1
M ₄	MS ₄	1	0,5
M ₅	MS ₅	0,5	-

6.2.2 Phase de multiplication

Les combinaisons choisies pour le débourrement sont testées pour la multiplication des boutures proliférées *in vitro*. Pour cela, les milieux MS et WPM de même composition de BAP et 2,4 D ont été utilisés pour une prolifération additionnelle des boutures.

Après deux mois de la 1^{ère} culture, les tiges proliférées sont excisées de l'explant mère, disséquées en petites microboutures de 1 cm contenant 1 à 2 bourgeons axillaires. Les explants ont été incubés dans les mêmes conditions. Des repiquages successifs ont été effectués à deux semaines d'intervalle. Ensuite, et après trois mois, des pousses ont été

obtenues de la 2^{ème} culture où les pousses de la 1^{ère} multiplication ont été séparées de leurs explants initiaux et transférées sur le milieu WPM avec les mêmes combinaisons.

6.2.3. Phase d'enracinement des pousses

Pour l'induction des racines, les *vitro* plants issus des milieux de prolifération ont été transférés dans des milieux d'induction des racines composés de :

- a- WPM solide additionné à des concentrations variés d'AIB (1, 2 mg L⁻¹) seuls ou en combinaison avec ANA (0, 1, 1,5 mg L⁻¹).
- b- de MS et WPM contenant la moitié des macro et micro éléments (½ MS et ½ WPM), complétés avec 5mgL⁻¹d'AIB et 5mgL⁻¹ de ANA, et avec 1 % de charbon actif et 0,6 % d'Agar.
- c- ½ MS et ½ WPM complétés avec 5mg L⁻¹d'AIB et 5mg L⁻¹ de ANA + 1 mg L⁻¹ et avec 1 % de charbon actif et 0,6 % d'Agar.
- d- Rinçage des *vitro* plants dans une solution d'AIB (5 mg L⁻¹) pendant 10 minutes.

Les cultures ont été incubées pendant une semaine à l'obscurité, puis soumises à une photopériode de 16 h.

Après deux semaines dans le milieu d'induction des primordiums racinaires, les *vitro* plants ont été transférés aux milieux MS et WPM dépourvus de régulateurs de croissance, pour induire l'élongation des racines.

Le taux de survie, le nombre de *vitro* plants avec des racines, et la longueur des racines ont été enregistrés au bout de huit semaines.

6.2.4. Acclimatation des *vitro* plants

Pour l'acclimatation, les *vitro* plants ont été débarrassés de leurs milieux de cultures et transférés dans trois substrats à différentes compositions :

1. Mélange : tourbe + perlite (1 : 1 v/v).
2. Perlite.
3. Vermiculite.

Les pots ont été maintenus dans une chambre d'acclimatation conditionnée avec 70 % d'humidité relative, 16 h de photopériode, 1000-1600 lux d'intensité lumineuse et 23 ± 2 °C de température durant 1 mois. Les *vitro* plants étaient arrosés avec une solution nutritive (WPM/10) chaque jour pendant deux semaines, ensuite, jour après jour pendant deux autres

semaines, et en fin une fois par semaine durant quatre semaines avec de l'eau distillée. Après deux mois, les plants ont été transférés en serres contrôlées où ils ont été irrigués une fois par semaine.

Durant cette période, et après 8 semaines de culture, plusieurs paramètres ont été observés à savoir :

- le taux de survie des *vitro* plants ;
- le nombre des pousses axillaires et branches (il s'agit des petites branches qui peuvent être utilisées pour la multiplication) ;
- la longueur des *vitro* plants ;
- le taux d'enracinement.

6.3. Phase d'induction de la callogénèse

6.3.1. Phase d'initiation des cals

Après la stérilisation des boutures de *J.thurifera*, elles ont été découpées en petits morceaux de 1 cm sans bourgeons et ont été mises en culture dans trois milieux de culture ; MS, WPM et N6 supplémentés avec des vitamines, 3 % de saccharose, 0,7 d'Agar et 0,25 g L⁻¹ de charbon actif. Différentes concentrations d'hormones de croissance, 2,4 D et BAP, ont été additionnées aux milieux de cultures avec neuf combinaisons (**Tableau 3**). Les explants ont été cultivés dans des pots de culture, et ont été repiqués sur les mêmes milieux chaque deux semaines, deux fois, pour éliminer les phénols. Après quatre semaines, les explants ont été placés dans des boîtes de pétri contenant les mêmes concentrations et combinaisons hormonales pour l'obtention des cals à raison de trois explants par boîte de pétri, et avec neuf répétitions pour chaque combinaison. Les cultures ont été incubées à 25 ± 2C ° dans l'obscurité, et les subcultures ont été reconduites chaque quatre semaines. Une fois la mise en culture réalisée, les boîtes de pétri sont scellées avec du para film, et chaque boîte porte des indications relatives à la date de la mise en culture et la concentration des régulateurs de croissance. Les cultures ont été incubées à 25 ± 2C ° dans l'obscurité, les subcultures ont été faites chaque quatre semaines.

Pour chaque traitement hormonal, des observations ont été réalisées et un bilan a été établi au bout de quatre semaines de culture, ainsi les observations ont porté sur le taux de callogénèse induit, le type et de la couleur des cals.

Tableau 3 : Compositions en hormones (mg L^{-1}) des différents milieux utilisés en callogénèse

Milieux de culture			Concentration des hormones (mg L^{-1})	
			BAP	2,4D
WPM	MS	N6		
M ₀	MS ₀	N ₀	0	0
M ₁	MS ₁	N ₁	0,25	0,25
M ₂	MS ₂	N ₂	0,25	0,5
M ₃	MS ₃	N ₃	0,25	1
M ₄	MS ₄	N ₄	0,5	0,25
M ₅	MS ₅	N ₅	0,5	0,5
M ₆	MS ₆	N ₆	0,5	1
M ₇	MS ₇	N ₇	1	0,25
M ₈	MS ₈	N ₈	1	0,5
M ₉	MS ₉	N ₉	1	1

6.3.2. Choix et multiplication des cals

Après deux mois de culture sur le milieu d'induction de la callogénèse, les cals ont été fragmentés et transférés dans des boîtes de pétri contenant 20 ml du milieu de culture, dans cette phase les milieux utilisés sont ceux présentant la formation des cals. Après deux subcultures, les cals développés ont été coupés et transférés sur les milieux qui ont présenté un développement des cals après multiplication (M1 et M4). Les subcultures ont duré quatre semaines en moyenne ou plus, selon les taux de contaminations, et les cals friables ont été repiqués dans les mêmes milieux frais. Les cultures ont été incubées à $25 \pm 2^\circ\text{C}$ dans l'obscurité.

6.3.3. Initiation à l'embryogenèse

Pour l'obtention des cals embryogéniques et après douze mois dans les milieux de multiplication (phase précédente), les cals de structure granuleuse et nodulaire ont été fragmentés puis transférés dans des boîtes de pétri contenant 20 mL de milieu WPM dépourvu de régulateurs de croissance pendant huit semaines.

6.3.4. Repiquage des cals sur les milieux de régénération

Dans l'intention de déterminer les conditions adéquates d'organogénèse sur cals, ceux ayant développé des structures embryonnaires dans les milieux de la phase précédente ont été collectés et cultivés dans de nouveaux milieux avec différentes combinaisons hormonales. Le milieu WPM a été additionné avec différentes concentrations de BAP seul ou combinés avec 2,4 D et ANA (**Tableau 4**). Quatre cals par milieu ont été mises en culture dans des pots de culture contenant 70 ml de milieu de culture avec 5 répétitions pour chaque traitement. Les pots sont placés en chambre de culture à 22 C ° avec une photopériode de 16 heures.

Tableau 4 : Combinaisons hormonales testées en utilisant le milieu WPM

Traitement	BAP (mg L ⁻¹)	2,4 (mg L ⁻¹)	ANA (mg L ⁻¹)
R ₁	1	0,25	-
R ₂	2	0,25	-
R ₃	4	0,25	-
R ₄	8	0,25	-
R ₅	1	-	-
R ₆	2	-	-
R ₇	4	-	-
R ₈	8	-	-
P ₁	0,5	-	-
P ₂	0,5	0,1	-
P ₃	1	0,1	-
P ₄	1,5	0,1	-
V ₁	1	-	0,1
V ₂	2	-	0,1
V ₃	4	-	0,1
V ₄	8	-	0,1

- Observations réalisées

Les observations réalisées ont porté sur :

- la couleur et l'aspect des cals ;
- le pouvoir régénératif des cals.

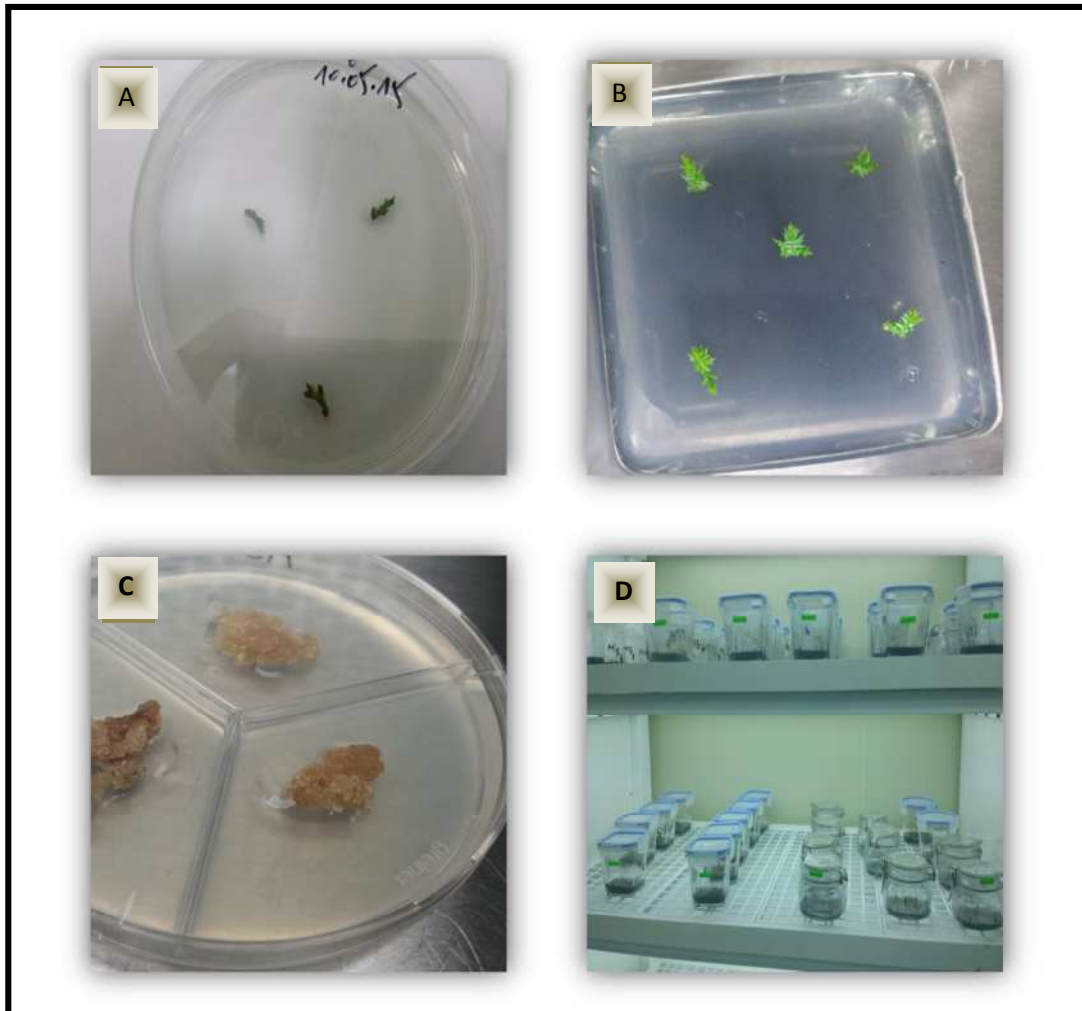


Figure 07 : Mise en culture des explants de *Juniperus thurifera* sur différents milieux
A- Mise en culture des explants pour l'induction des cals, B- Mise en culture des microboutures, C- Multiplication des cals, D- Mise en place des cultures dans la chambre de culture.

7. Techniques histologiques

L'étude histologique a été effectuée par observation au microscope photonique, elle est basée sur la réalisation des coupes au microtome à rotation manuelle. L'inclusion nécessite l'introduction des organes dans la paraffine. L'histologie des cals s'effectue sur plusieurs étapes, à savoir : Fixation, Déshydratation, Imprégnation, Inclusion, Confection des coupes, Déparaffinage, Réhydratation, Coloration et Montage.

7.1. Fixation

Elle a pour but de maintenir et d'immobiliser les structures cellulaires dans un état qui est le plus proche possible de l'état vivant. Une première étape consiste à fixer les tissus végétaux dans une solution FAA composée de :

- 8 volumes d'éthanol 70 ;
- 1 volume d'aldéhyde formique ;
- 1 volume d'acide acétique glacial.

Après 24 heures les échantillons ont été rincés 2 fois dans l'éthanol 70 % pendant 30 min. Ils peuvent ensuite, conservés à 4 ± 1 °C, ou être utilisés pour l'étape de déshydratation (**Figure 9**).

7.2. Déshydratation

La déshydratation consiste à éliminer entièrement l'eau qui se trouve dans les tissus destinés à être inclus dans la paraffine. La déshydratation est une étape qui consiste en un passage successif des organes dans des bains d'éthanol avec des concentrations croissantes (70°, 95°, 95°, 100°, 100°, 100°) pendant 1 heure à chaque passage (**Figure 9**).

7.3. Imprégnation

Cette étape permet d'éliminer les traces d'alcool avec une meilleure pénétration de la paraffine dans les tissus, les différentes étapes consistent à imprégner successivement les tissus dans :

- toluène + éthanol 100° (1/1) pendant 30 min ;
- 3 bains de toluène pur à raison de 1 h chacun ;
- 1 bain de toluène additionné de paraffine fondue (1/1) à 58°- 60 °C pendant 1 h permet d'infiltrer progressivement la paraffine dans les tissus ;
- paraffine pure pendant 1 h à 58-60 °C ;
- paraffine pure pendant une nuit ou plus à 58-60 °C (**Figure 9**).

7.4. Inclusion

La paraffine pure est coulée à chaud dans le modèle constitué de deux accessoires : un support métallique avec un diamètre variable selon la taille de l'échantillon à couper. Nous avons employé des supports et des cassettes en plastique permettent l'inclusion de l'organe dans la

paraffine. Après refroidissement de la paraffine, au fond de moule, les organes ont été plongés rapidement à l'aide d'une pince stérile et préalablement chauffée.

Notons que chaque organe a été étiqueté, les blocs de paraffine démoulés ont été mis à sécher à température ambiante ou par passage au réfrigérateur (**Figure 9**).

7.5. Confection des coupes

Les organes inclus dans la paraffine ont été débités en coupes sériées à l'aide d'un microtome manuel LEICA RM 2235RT avec une épaisseur de 7 μm .

Les rubans de coupes ont été recueillis sur des lames de verres propres (dégraissées avec de l'éthanol), étalés à l'aide d'une eau gélatineuse à 1 % après filtration, puis les coupes ont été dépliées sur une plaque chauffante réglée à 45 °C. Les lames, numérotées avec un diamant, ont ensuite été égouttées et mises à sécher à température ambiante (**Figure 9**).

7.6. Déparaffinage

Le déparaffinage sert à enlever la paraffine des tissus pour faciliter la pénétration des colorants, cette étape est assurée par 3 bains de toluène :

- 1 bain de toluène pur pendant 15 min ;
- 2 bains de toluène pur à raison de 10 min chacun (**Figure 9**).

7.7. Réhydratation

Elle consiste à faire passer les coupes dans :

- 3 bains d'alcool absolu pendant 10 min chacun ;
- 1 bain d'alcool pur/formol (4/1) pendant 5 min.

Les coupes sont ensuite rincées à l'eau courante (**Figure 9**).

7.8. Coloration

Nous avons utilisé la coloration avec le bleu de toluidine qui permet de visualiser les noyaux volumineux. La coloration se fait comme suit :

- coloration pendant quelque minute par le bleu de toluidine ;
- lavage à l'eau courante ;
- régression par l'acide acétique à 7 % sous contrôle microscopique ;
- déshydratation (par séchage rapide sur une plaque chauffante) (**Figure 9**).

7.9. Montage

Il se fait par le dépôt de 2 à 3 gouttes du liquide de montage (Surgipath) sur chaque lame, puis celle-ci est recouverte avec une lamelle en prenant soin d'éviter les bulles d'air. Le séchage des lames se fait à l'air libre (**Figure 9**).



Figure 8 : Etapes de réalisation des coupes histologiques, A- Fixation, B- Déshydratation, imprégnation et inclusion, D- Confection, E- Réhydratation et coloration, F- Lecture des coupes.

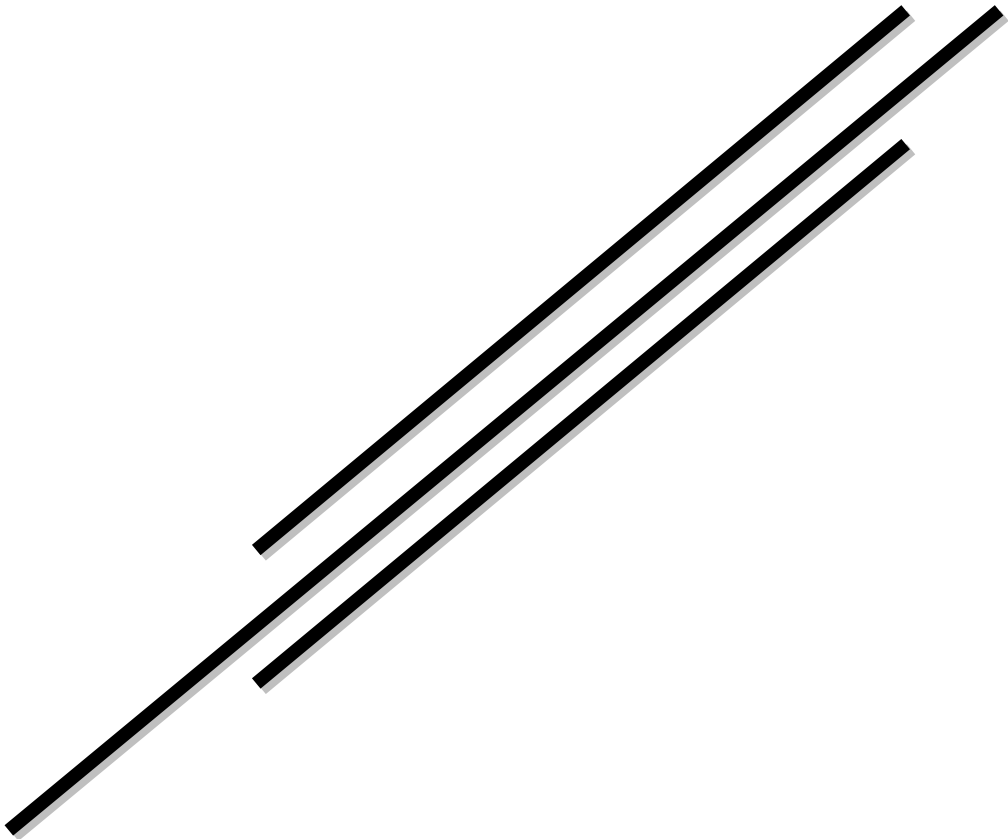
8. Analyses statistiques

Les études statistiques ont été effectuées en utilisant le logiciel SPSS, version 20.30 bit. Les résultats obtenus ont été traités par analyse de la variance (ANOVA) et les moyennes significativement différentes ont été séparées par le test de Tukey au seuil de probabilité de 5 %. Les résultats sont représentés par les moyennes \pm les écarts types (SE).

Chapitre 3:

Résultats et

discussion



L'objectif de la présente étude vise, comme nous l'avons précisé en introduction, à régénérer des plantes entières de Genevrier thurifère (*J. thurifera*) par les techniques *in vitro*. Deux principaux paramètres déterminants et connus pour leur influence sur ce processus morphogénétique ont été testés. Il s'agit de l'origine des explants (microboutures) et de la composition en régulateurs de croissances des plantes et des milieux de culture.

1. Désinfection des microboutures et graines

Au cours de notre expérimentation, nous avons testé deux traitements de désinfection, sur graines et sur les microboutures, afin de remédier aux contaminations lors de la culture des explants. Les résultats ont montré que le traitement (I) de stérilisation effectué au cours de la première série de désinfection a montré que toutes les microboutures étaient contaminées après deux jours de mise en culture. Par contre, l'utilisation du même traitement (traitement I) pour la désinfection des graines a permis d'obtenir des graines décontaminées et utilisables pour la suite de la manipulation. Sur les 30 graines désinfectées, 2 seulement ont été contaminés (**Tableau 5**).

Tableau 5 : Résultats de la désinfection des microboutures et graines.

Traitements	Nombre d'explants (microboutures) contaminés	Nombre d'explants non contaminés	Nombre de graines contaminées	Nombre de graines non contaminées
I	175	0	2	28
II	5	170	-	-

- **Traitement I** : Immersion dans l'Hypochlorite de sodium 12 % ensuite dans l'Alcool 70° ;
- **Traitement II** : Immersion dans une solution de fongicide ensuite dans l'Hypochlorite de sodium à 12 %.

L'augmentation du temps d'immersion des explants, supérieur à 15 mn, dans l'hypochlorite de sodium à 12 % a provoqué des brûlures. Alors que, l'utilisation de l'alcool 70°, après l'immersion dans l'hypochlorite de sodium, n'était pas suffisant pour remédier à la prolifération des contaminants sur les microboutures. De même, l'augmentation du temps d'immersion à plus de 5 min dans $HgCl_2$ à 1 %, a provoqué des brûlures sur les explants et la contamination des cultures est devenue totale à partir du 5^{ème} jour.

Pour le traitement II, où les deux fongicide sont été utilisés, le nombre d'explants contaminés était faible. En effet, sur les 175 explants désinfectés, 5 explants seulement ont été contaminés.

Les résultats obtenus de l'application du traitement II peuvent être expliqués par le fait que le fosetyl-aluminium est un fongicide du système ascendant et descendant, il est actif pour la protection des conifères contre de nombreux champignons, sa combinaison avec le pervicur permet d'augmenter le nombre d'explants sains. La matière active propamocarbe du pervicur agit d'une manière préventive et curative sur les champignons. En fait, elle affecte le développement du mycélium et la sporulation.

2. Germination *in vitro* des graines

La mise en germination des graines a été réalisée en décembre 2014. Après 3 mois, après une absorption de l'eau par la graine, nous avons remarqué l'ouverture et la sortie du micropyle, et par la suite, le développement de la radicule s'est arrêté, après une semaine (**Figure 9**).

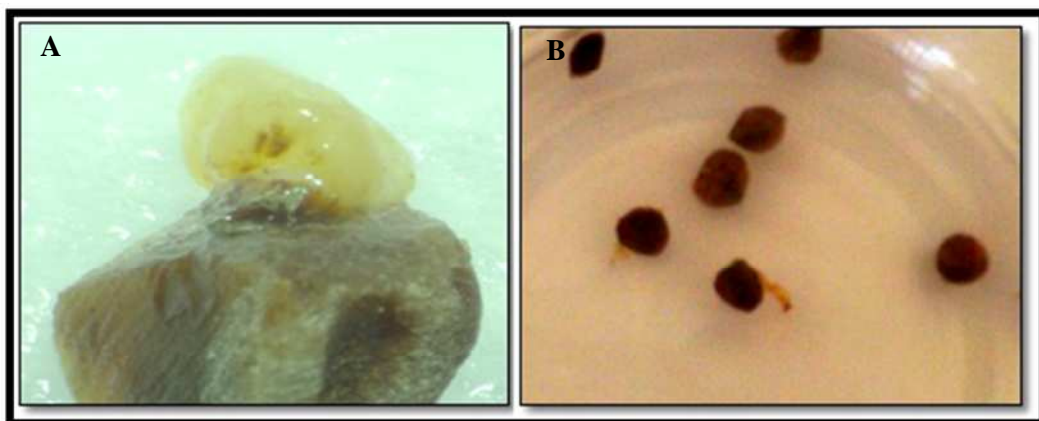


Figure 09 :Germination des graines ; A- Ouverture du micropyle, B- Sortie de la radicule.

2.1. Effet du milieu sur le taux de germination

Les différents milieux de culture utilisés n'ont pas eu un effet significatif sur le nombre de graines germées. Au cours de l'expérimentation menée, les taux de germination *in vitro* ont varié entre 3,1 % et 6,66 %, obtenus respectivement dans les milieux : MS (additionné à 1gr L⁻¹ de GA3) et WPM (complémenté par 1gr L⁻¹ de GA3) (**Figure 10**).

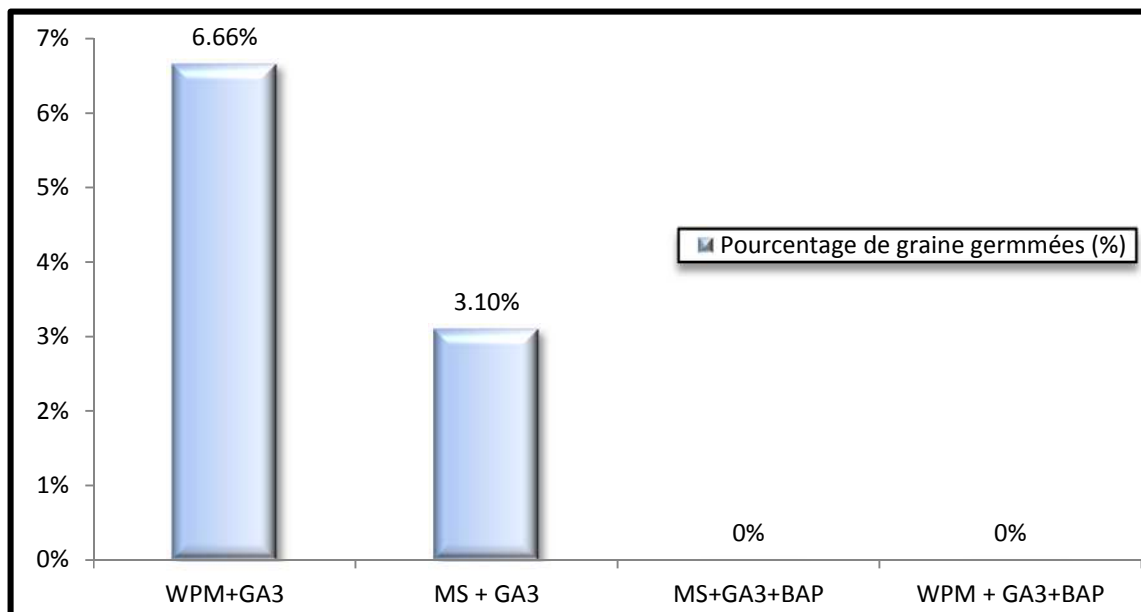


Figure 10 :Effet des milieux de culture sur le pourcentage de germination des graines de *J. thurifera* après 3 mois de culture.

Pour les embryons isolés aussi bien des graines qu'elles soient matures ou immatures, aucun développement, sur tous les milieux de culture testés, n'a été observé. Après 2 mois de culture tous les embryons ont desséché et ce sont nécrosés (**Figure 11**), ce qui peut s'expliquer par un état de dormance prolongée difficile à lever. D'autres hypothèses ont été émises dont celles liées à la présence de parasites ou encore par le fait que la graine doit transiter par le tube digestif d'un oiseau (Lathuillière, 1994). Toutefois, aucune étude consacrée à ce phénomène n'a encore été publiée.



Figure 11 :Embryons nécrosés après deux mois de culture.

3. Microbouturage du Genévrier thurifère

La régénération *in vitro*, dépend de la composition et de la concentration des sels de base, des régulateurs de croissance et des composants organiques (Ge *et al.*, 2006). La réactivité du matériel végétal de départ dépend de plusieurs facteurs liés essentiellement à l'état physiologique des explants, mais également aux conditions nutritionnelles et environnementales de la culture.

3.1. Effet du milieu sur la morphogénèse

Le débourrement désigne le moment où les bourgeons des boutures se développent pour laisser apparaître leur bourre (terme désignant le duvet et les jeunes feuilles et fleurs enfouies dans les bourgeons de nombreux arbres). La réussite de la phase d'établissement de la culture se base principalement sur la bonne maîtrise du débourrement des bourgeons. Lors de ce travail, plusieurs facteurs connus, pouvant influencer le pourcentage de débourrement, ont été testés. L'effet du milieu de culture, des régulateurs de croissance (particulièrement les combinaisons cytokinines /auxines) et de l'origine d'explant.

Dans l'ensemble des milieux testés, les bourgeons axillaires ont eu une reprise de croissance dès la 2^{ème} semaine suivant la mise en culture des explants. Sauf pour le milieu N6 où, après trois semaines de culture, les explants ont commencé à changer de couleur, du vert au jaune, puis ont pris une couleur brune, causée probablement par l'effet d'un milieu inapproprié avec les combinaisons des régulateurs de croissance. Une semaine plus tard, ces mêmes cultures, sur N6, ont été jetées en raison de la nécrose des explants (environ 90 %), par conséquent ces dernières n'ont pas été incluses dans l'analyse statistique.

Par contre, les bourgeons axillaires des microboutures croissants sur les milieux WPM et MS ont commencé à débourrer après deux semaines. La première réponse de ces explants cultivés s'est manifestée par un élargissement initial ou gonflement des bourgeons axillaires préexistants, suivi par leur débourement après environ 3 semaines de culture. Cela était suivi par un développement synchrone des pousses. Ces dernières n'étaient pas uniformes morphologiquement et ont montré des différences de vitesse de croissance (**Figure 12**). Ces variations dans la vitesse de croissance sur les mêmes milieux de culture peuvent être expliquées par la vigueur/état physiologique de l'explant de départ lors de son ensemencement.



Figure 12 : Débourement des bourgeons axillaires dans la 1^{ère} culture.

Les résultats illustrés dans la **Figure 13** montrent des réactions de développement des explants très différents, exprimés en terme de taux de débourement sur base du nombre de pousses et de rameaux ainsi que selon les deux supports de prolifération utilisés, MS et WPM, dépourvus de régulateurs de croissance. Sur ces milieux, les explants ont été en mesure de produire avec succès plusieurs nouvelles pousses au cours de quatre semaines. Ce résultat peut être attribué, en partie, à l'importante concentration des substances de croissance endogène des explants de *J. thurifera*. L'analyse de la variance a montré que les deux milieux testés ont donné une réponse significativement plus élevée en terme du taux de débourement, le nombre et la longueur des pousses ainsi que le nombre de rameaux par pousse. Cependant, le meilleur résultat du taux de débourement (45,71 %) a été obtenu pour la culture des explants sur le milieu WPM avec une valeur de 16 pousses par explants et 78 rameaux par pousse.

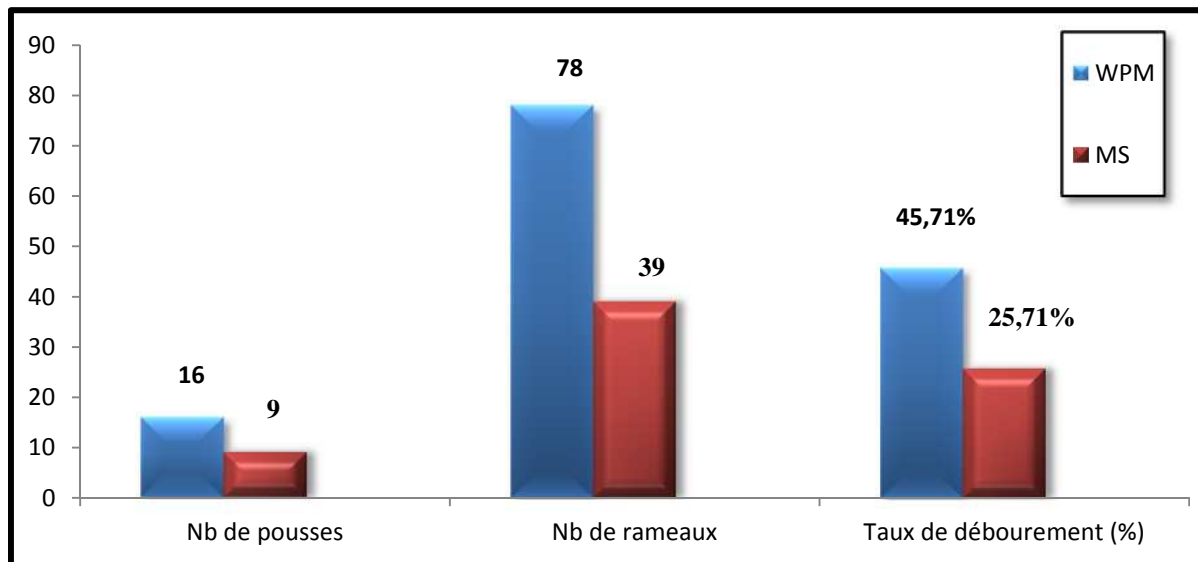


Figure 13 : Effet du milieu de culture sur la morphogénèse des bourgeons axillaires de *J. thurifera*.

3.2. Effet de la combinaison cytokinine-auxine sur le développement des pousses

Comme il est connu, un rapport auxine-cytokinine équilibré est nécessaire pour une régénération excellente des bourgeons (Skoog et Miller, 1957). La combinaison des cytokinines avec les auxines a amélioré la procédure de multiplication *in vitro* de plusieurs espèces (George, 1993), et aussi rentable pour les espèces difficiles à propager (Torres, 1989).

Dans cette étude, au cours de la première culture, on a observé que le nombre de pousses produites par explant sur les deux milieux de culture, MS et WPM, est fortement varié en fonction de la balance hormonale.

3.2.1 Effet de la combinaison cytokinine-auxine sur le développement des pousses sur le milieu WPM

L'analyse des résultats du **Tableau 6** montre que les taux de reprises des bourgeons axillaires varient selon la concentration des combinaisons hormonales employées. C'est avec la combinaison M2 que le meilleur taux de reprise a été obtenu (65,71 %). La même combinaison (0,5 mg L⁻¹ de BAP combiné à 0,25 mg L⁻¹ de 2,4 D) a permis de régénérer 12,9 pousses par explant en moyenne, et 57 rameaux par pousse après huit semaines. Cependant l'addition de 1mgL⁻¹ de 2,4 D à la même concentration du BAP (0,5 mg L⁻¹) a réduit le nombre des pousses et des rameaux. Par ailleurs, nous avons constaté que l'application de la même dose de BAP (0,5 mg L⁻¹) non combinée au 2,4D a eu un effet négatif sur la reprise de la croissance des bourgeons axillaires. Pour le nombre de pousses obtenues, on observe un

développement des microboutures de *J. thurifera*, mise en culture ; très hautement significatif sur le milieu WPM additionné avec la combinaison BAP/2,4D. Donc, on peut supposer que la combinaison BAP/2,4 D est performante pour l'induction des bourgeons axillaires et la multiplication des pousses. De plus, une dose moyenne de BAP ($0,5 \text{ mg L}^{-1}$) additionnée avec de faibles concentrations de 2,4 D sur le milieu WPM améliore significativement le potentiel caulogène des bourgeons axillaires de *J. thurifera* sans aucun développement de cals.

Tableau 6 : Effet des différentes concentrations de la combinaison BAP/2,4 D sur le nombre des pousses et rameaux formés sur le milieu WPM au cours de la 1^{ère} culture.

Milieux	Hormones de croissance BAP/2,4 D (mgL^{-1})		Nombre moyen des pousses (explants^{-1})	Nombre moyen des rameaux (pousses^{-1})
M0	0	0	8.6 ± 5.7^{ab}	42.9 ± 19.6^{ab}
M1	0.25	0.5	3.6 ± 1.4^b	30.7 ± 6.9^b
M2	0.5	0.25	12.9 ± 4.7^a	57 ± 19^a
M3	0.5	1	4.6 ± 1.4^b	36.4 ± 9.1^b
M4	1	0.5	2.6 ± 0.3^{ab}	43.6 ± 11.5^{ab}

- Les moyennes suivies par la même lettre ne sont pas significativement différentes ($p \leq 0,05$).

3.2.2 Effet du rapport BAP/2,4D sur le développement des pousses en utilisant le milieu MS

Les résultats présentés dans le **Tableau 7** montrent des réactions très différentes du comportement des explants suivant le support de prolifération utilisé et les différentes concentrations de BAP/2,4 D testées. Ces explants ont été en mesure de produire avec succès plusieurs nouvelles pousses durant huit semaines. Ceci indique que ce milieu affecte significativement ($p \leq 0,05$) la prolifération des bourgeons axillaires, lorsqu'il est utilisé seul ou complété par des phytohormones. Le taux de reprise le plus important des pousses a atteint 48,47 % avec le traitement MS4 (1 mg L^{-1} de BAP et 0,5 mg L^{-1} 2,4 D). Les résultats obtenus montrent aussi que le nombre moyen de pousses est significativement élevé (9 et

9,1 pousses/explant avec 52,7 et 37,8 rameaux/pousse) lorsque les axillaires ont été cultivés en présence respectivement, de MS3 (0,5 mg L⁻¹ de BAP et 1 mg L⁻¹ de 2,4 D) et de MS4.

Contrairement aux résultats obtenus sur WPM, le MS combiné avec 0,5 mg L⁻¹ additionné avec une dose réduite de 2,4 D (0,25 mg L⁻¹) a significativement réduit le nombre total de pousses et de rameaux formés par explant durant la même période. De ce fait, il s'est avéré que pour un bon développement des bourgeons axillaires sur le milieu de base MS, une concentration moyenne de BAP (0,5 mg L⁻¹) additionnée à une dose (1mg L⁻¹), qui semble optimale, de 2,4 D est plus favorable.

Tableau 7 : Effet des différentes concentrations de la combinaison BAP/2,4 D sur le nombre de pousses et de rameaux de *J. thurifera* formées en utilisant le milieu MS au cours de la 1^{ère} culture.

Milieux	Hormones de croissance BAP/2,4 D (mg l ⁻¹)		Nombre moyen des pousses (explants ⁻¹)	Nombre moyen des rameaux (pousses ⁻¹)
MS0	0	0	4.9±2.2 ^a	21.4±10.5 ^b
MS1	0.25	0.5	6.3±2.9 ^a	34±12.4 ^{ab}
MS2	0.5	0.25	5.9±1.7 ^a	26.6±4.9 ^b
MS3	0.5	1	9±4.7 ^a	52.7±26.1 ^a
MS4	1	0.5	9.1±3.1 ^a	37.8±13.6 ^{ab}

•Les moyennes suivies par la même lettre ne sont pas significativement différentes ($p \leq 0, 05$).

3.2.3. Effet de la composition du milieu sur la longueur des pousses régénérées

Le suivi des cultures a révélé aussi que les milieux de base additionnés avec du BAP + 2,4 D sont très efficaces à la fois pour le débourrement et pour l'élongation des tiges (**Tableau 8**). Nous avons constaté, lors de cet essai, que le rythme de développement des pousses peut diminuer avec le temps, à cause de l'épuisement des nutriments des milieux de culture. A ce moment, le transfert des pousses sur de nouveaux milieux de même composition, s'est avéré indispensable et semble stimuler davantage le développement des pousses régénérées.

Dans certains cas des ligneux, comme l'olivier, pour obtenir de jeunes pousses à partir de bourgeons axillaires, deux étapes successives de culture sont nécessaires : un premier milieu pour le débourrement (composé d'un mélange auxine/cytokinine), puis un second pour l'élongation (contenant des cytokinines seules) (Yakoub- Bougdal et *al.*, 2003). Nos résultats étaient différents, puisqu'un seul milieu a servi à la fois pour le débourrement et pour l'élongation des pousses.

Nous avons étudié aussi l'effet de l'acide gibbérellique sur l'allongement des tiges différenciées. Pour cela, les explants ont été cultivés sur les milieux de base MS et WPM additionnés de différentes concentrations de GA3 (0.1 et 1 mg L⁻¹). Les résultats obtenus ont montré que la GA3 était inefficace aussi bien sur l'élongation que sur la survie des tiges. Après une semaine de culture, tous les plants se sont nécrosés.

Les résultats obtenus révèlent que le milieu WPM dépourvu de régulateurs de croissance stimule significativement l'élongation des pousses régénérées que le milieu MS. En outre, l'ajout d'une dose optimale (1 mg L⁻¹) de BAP combinée à une dose moyenne (0,5 mg L⁻¹) de 2,4 D sur WPM a induit la formation de la plus longue pousse (**Tableau 8**).

Tableau 8 : Effet du milieu et des différentes concentrations hormonales sur la longueur moyenne des tiges de *J. thurifera*.

Milieux	Hormones de croissance		Longueur moyenne des pousses (cm)
	BAP	2,4D	
WPM	0	0	2.4 ± 0.4 ^{ab}
	0,25	0,5	1.9 ± 0.2 ^b
	0,5	0,25	2.4 ± 0.4 ^{ab}
	0,5	1	2.1 ± 0.2 ^b
	1	0,5	2.6 ± 0.3 ^a
		0,1 GA3	0
		1GA3	0
MS	0	0	1.6 ± 0.4 ^b
	0,25	0,5	1.6 ± 0.2 ^b
	0,5	0,25	2.2 ± 0.2 ^a
	0,5	1	1.9 ± 0.4 ^{ab}
	1	0,5	1.8 ± 3.1 ^{ab}
		0,1 GA3	0
		1GA3	0

• Les moyennes suivies par la même lettre ne sont pas significativement différentes ($p \leq 0,05$).

3.3. Effet de la subculture sur le développement des pousses (phase de multiplication)

Afin d'évaluer le potentiel morphogénétique des microboutures produites en présence du BAP et du 2,4D, un second passage sur les mêmes milieux et les mêmes concentrations a été effectué. Après 2 semaines, sur le milieu MS les pousses ont brunies et ont montré une nécrose basale qui s'est propagée pendant la multiplication à la totalité de la tige, conduisant à sa mort. Par conséquent, nous avons poursuivi la subculture uniquement sur le milieu WPM seul ou complété avec les combinaisons des régulateurs de croissance. Les résultats sont reportés dans le **tableau 9**.

L'analyse des résultats obtenus après cette seconde culture nous laisse supposer que le milieu basique WPM est performant pour la multiplication de *J. thurefera*. Concernant le nombre et le taux de survie des pousses, aucune différence n'a été observée lorsque le milieu WPM est additionné avec une combinaison hormonale ou quand il est utilisé sans régulateurs de croissance. Contrairement à la première culture, la présence du 2,4 D en concentration double

à celle du BAP a donné les meilleurs résultats de longueurs des pousses et du nombre de rameaux, avec une moyenne de 112,8 rameaux/pousse et une croissance moyenne de 2,6 cm (Tableau9).

Tableau 9 : Effet du milieu WPM et de la combinaison BAP/2,4 D sur le taux de survie, la longueur moyenne des pousses et le nombre de rameaux de *J. thurifera* formés au cours de la 2^{ème} culture.

Milieux	Hormones de croissance (mgL ⁻¹)		Longueur moyenne des pousses (cm)	Nombre moyen des pousses (explants ⁻¹)	Nombre moyen des rameaux (pousses ⁻¹)	Nombre moyen des pousses survivie	Pourcentage des pousses survie (%)
	BAP	2,4D					
	0	0	2.4±0.2 ^b	8.8±2.3 ^a	56.2±10,2 ^b	11.3±3.1 ^a	75.33
	0.25	0.5	3.3±0.2 ^a	13.6±4.1 ^a	101.2±50 ^{ab}	10±3.1 ^a	66.66
WPM	0.5	0.25	2.3±0.2 ^b	11.6±3 ^a	94.8±23.3 ^{ab}	15±0 ^a	100
	0.5	1	2.6±0.3 ^b	14.4±3.2 ^a	112.8±14.4 ^a	12±2.4 ^a	80
	1	0.5	2.5±0.1 ^b	8.8±1.1 ^a	54.4±6.3 ^b	9±4.8 ^a	60

- Les moyennes suivies par la même lettre ne sont pas significativement différentes ($P \leq 0,05$).

Toutefois, une baisse progressive des taux de multiplication des tiges a été observée à partir de la troisième culture (deuxième subculture), avec l'obtention de tiges naines (Figure 14).



Figure 14 : Effet du 2^{ème} subculture sur le développement pousses sur les milieux de culture (effet nanisme).

3.4. Effet de l'origine de l'explant sur le débourrement des bourgeons

Dans cette expérience, nous avons testé l'effet que peut procurer l'origine des explants (microboutures) sur le pourcentage de débourrement des bourgeons. Par origine des explants, nous désignons la provenance du matériel végétal choisi : soit des microboutures prélevées à partir de plantes adultes (première culture), soit à partir de *vitro* plants (2^{ème} culture). Les pousses ont été sectionnées en fragments de deux bourgeons axillaires et remis en culture sur les milieux MS et WPM, contenant les mêmes concentrations des combinaisons hormonales, dans ce cas on parle de la phase de multiplication ou seconde culture (**Figure 15**).

D'après les résultats présentés dans la **Figure 15**, nous constatons que le taux de débourrement des bourgeons axillaires provenant des plantes mères, après 30 jours de culture et sur le milieu WPM contenant les mêmes combinaisons hormonales, varie globalement entre 70 % et 96 %. Quant aux bourgeons issus de *vitro* plants, leurs taux de débourrements ont atteint les 100 %.

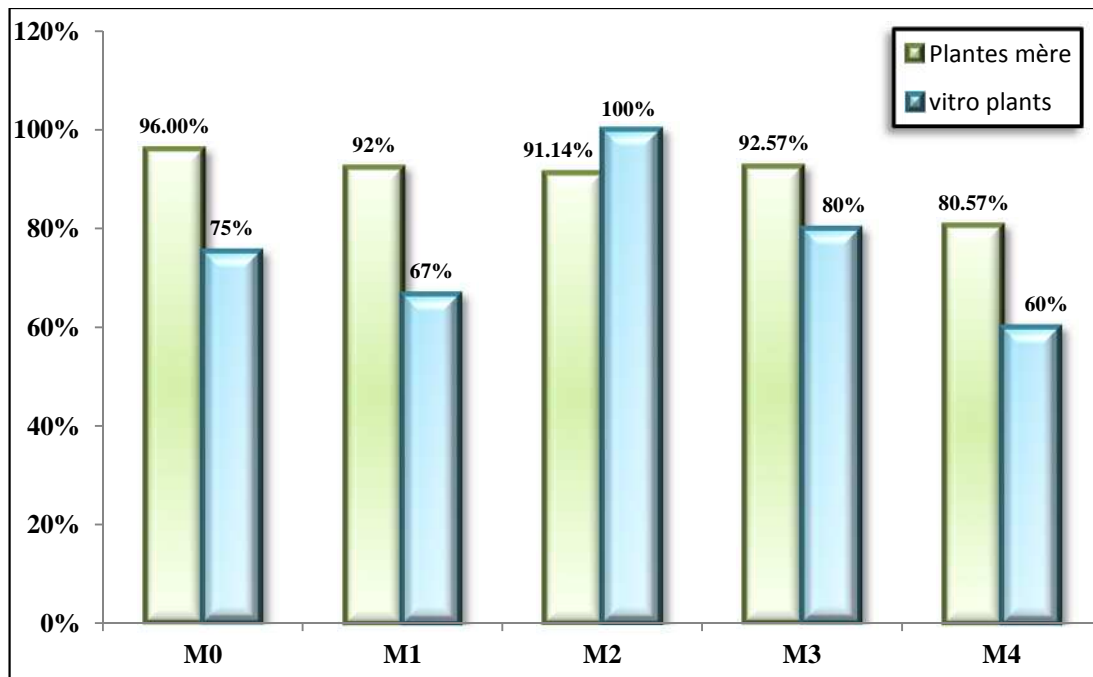


Figure 15 : Variation du taux de débourrement des bourgeons axillaires de *J. thurifer* selon l'origine du matériel végétal sur le milieu WPM à différentes combinaisons hormonales

3.5. Effet de la composition du milieu et le génotype des explants sur l'élongation des pousses

Pour stimuler le développement des pousses à partir des bourgeons débourrés (lors de la précédente phase), nous avons transféré ces derniers sur de nouveaux milieux, de même composition que le milieu de départ.

Les résultats, présentés dans la **Figure 16**, révèlent que la composition hormonale du milieu influence fortement le processus d'élongation des pousses régénérées. Que ce soit avec les bourgeons issus de plantes adultes ou de *vitro* plants, les meilleurs résultats ont toujours été obtenus avec les mêmes combinaisons hormonales. La taille moyenne des pousses développées à partir des bourgeons de plantes adultes était de 3,3 cm alors qu'avec les bourgeons issus de *vitro* plants, elle a atteint les 4,83 cm.

On note par ailleurs que les bourgeons issus de *vitro* plants de la 1^{ère} subculture ont mieux réagi en donnant des taux élevés (allant de 60 à 100 %) de pousses par rapport aux bourgeons issus de plantes adultes, quel que soit le milieu testé.

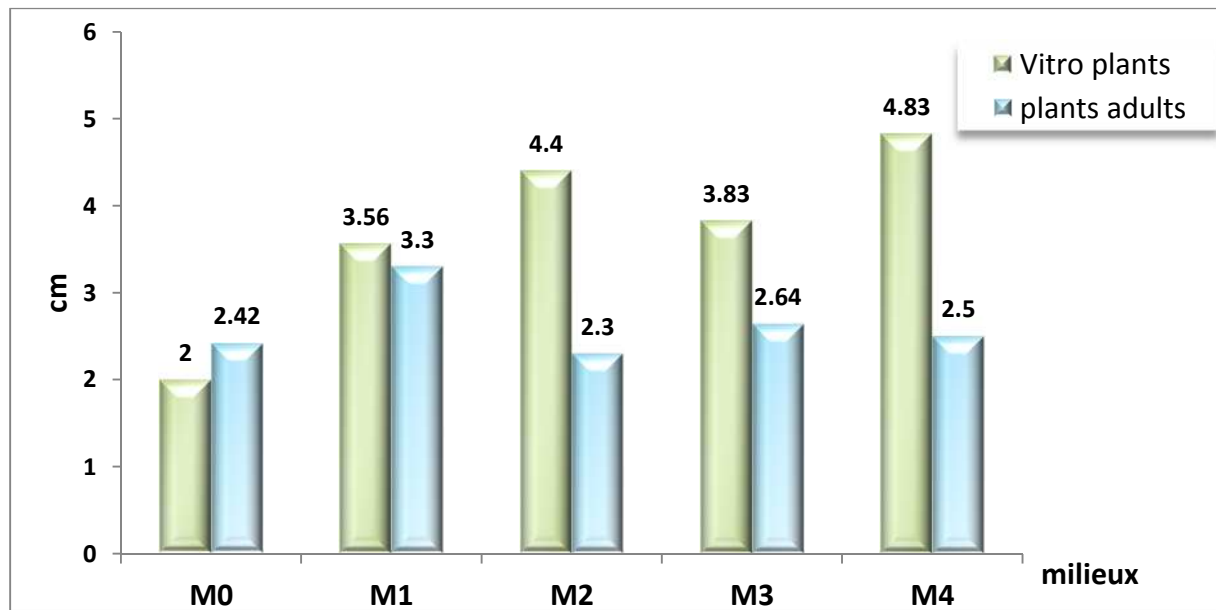


Figure 16 : Effet de la composition du milieu et de l'origine des explants sur l'élongation des pousses.

4. Enracinement des *vitro* plants

L'enracinement est l'étape la plus critique dans la micropropagation des plantes ligneuses. Les mécanismes qui interfèrent dans la formation des racines sont encore mal connus. Cependant, le succès de cette étape peut être lié à plusieurs facteurs. Parmi ces derniers, on peut citer la durée du traitement, la concentration et le type d'auxine utilisée, ainsi que l'âge de l'arbre mère source des explants (Zimmerman, 1984 ; De Klerk *et al.*, 1999). Plusieurs travaux suggèrent également une forte influence des génotypes sur le processus d'enracinement (Sanchez *et al.*, 1996 ; Nouaim *et al.*, 2002).

Malgré les avancées réalisées pour la compréhension du mécanisme de la rhizogénèse, cette phase présente toujours des difficultés majeures chez les ligneux. C'est une phase qui se déroule en trois étapes : l'induction, l'activité cellulaire et l'organisation des primordia, puis l'expression racinaire (Walali Loudiyi, 1993).

Dans le cadre de notre essai, la réalisation de la phase d'enracinement, conduite avec les pousses régénérées précédemment, s'est déroulée en deux phases : phase d'induction sur les milieux WPM, ½ MS et ½ WPM additionnés avec des auxines, et la phase de développement sur les milieux MS et WPM dépourvus d'hormones. Pour tester l'effet des milieux de culture seuls ou complétés par différentes concentrations et combinaisons d'hormones de croissance

sur l'induction et le développement des racines, quatre traitements ont été effectués sur les pousses obtenues par micropropagation.

Deux semaines après le transfert des explants sur les milieux testés, WPM, ½ WPM et ½ MS, l'enracinement s'est révélé être le plus actif sur les milieux enrichis en AIB et ANA et placé à l'obscurité pendant 7 jours (**Tableau 10**). Certaines tiges ont commencé de développer au niveau de leurs extrémités basales des cals cicatricielles formées de petits amas cellulaires qui constituent, en fait, le site de différenciation des racines (**Figure 17A**). La mise en place des racines pouvait même dans certains cas avoir lieu sans formation de cal basale (**Figure 17B**). Nous signalant, tout de même, qu'au cours des transferts entre les milieux de culture, certains explants se sont enracinés dès le passage sur les milieux de multiplications (**Figure 17C**).

Tableau 10 : Effet du milieu, de différentes concentrations et des combinaisons de régulateurs de croissance (AIB, ANA et GA3) sur l'enracinement des explants de *J. thurifera*.

Traitements	Milieux	Hormones de croissance (mgL ⁻¹)	Durée de rinçage dans la solution d'AIB (mgL ⁻¹)	Taux d'enracinement	Nombre des racines (explants ⁻¹)	Longueur des racines (cm)
1	WPM	1AIB	-	0	0	0
2	WPM	1 AIB+1 ANA	-	0	0	0
3	WPM	2 AIB+1,5 ANA	-	0	0	0
4	WPM	1 AIB+1 ANA	-	0	0	0
5	½ MS	5 AIB+5 ANA	-	38,75	2,5±1,38 ^a	0,98±0,25 ^a
6	½ WPM	5 AIB+5 ANA	-	28,57	1,33±1,24 ^a	0,83±1,24 ^a
7	½ WPM	1 AIB +1 ANA +1 GA3	-	0	0	0
8	WPM	5AIB	10 min	0	0	0

- Les moyennes suivies par la même lettre ne sont pas significativement différentes ($p \leq 0,05$).

4.1. Effet des auxines sur l'enracinement

L'efficacité des auxines dans l'induction des primordiums racinaires a été très bien élucidée par certaines études (Blakesley, 1994 ; Hartmann *et al.*, 2001). Leur application exogène a pu résoudre le problème de la difficulté d'enracinement de nombreuses espèces ligneuses comme le châtaignier (Mato and Vieitez, 1986), le peuplier (Hausman *et al.*, 1994) et le chêne (Vieitez *et al.*, 2009). Cependant, le type et la concentration d'auxine nécessaire pour la régénération *in vitro* des racines semblent être des facteurs spécifiques à chaque espèce.

Dans notre étude, l'effet des différentes auxines, sous différentes doses, sur l'enracinement des tiges de *J. thurifera* régénérées *in vitro* a été testé (**Tableau 10**). L'analyse des résultats montre que le maximum d'induction rhizogène a été enregistré quand l'AIB a été combinée à l'ANA. Les *in vitro* plants cultivés dans un milieu contenant L'AIB et L'ANA à concentration élevée de 5 mg/L pour chacun, ont donné le meilleur résultat avec un taux d'enracinement de 38,75 %. L'analyse du **Tableau 10** révèle, aussi que, pour les autres traitements auxiniques testés, aucun résultat positif n'a été enregistré. La combinaison de la GA3, à une concentration de 1 mg L⁻¹, au milieu d'enracinement (1/2 WPM contenant l'AIB et l'ANA), à concentration égale (5 mg/L), a eu un effet négatif sur les *in vitro* plants où la couleur de ces derniers a tourné au gris cendré comme s'il y avait des brûlures. En effet, aucune néoformation de racines (directe ou indirecte) ne s'est manifestée à leur niveau. Donc l'apport combiné de l'AIB et l'ANA à concentration égale (5mg/L) semble être plus efficace à l'enracinement du Genévrier thurifère comparativement aux autres traitements testés.

Cependant, le transfert des *in vitro* plants à un milieu dépourvu d'hormones de croissance améliore l'allongement des racines d'une manière très importante. En effet, après le transfert sur les milieux MS et WPM, dépourvu d'hormones, les primordiums racinaires ont montré une réactivation visible de leur processus d'allongement directement à partir des bases des pousses originales avec formation intermédiaire de cals. Ces cals avaient une couleur verte revêtue d'une couche brune foncée (**Figure 17D**). Il pourrait être possible que les hormones endogènes produites habituellement par les cals du *J. thurifera* aient été plus actives dans la promotion de la formation des cals à la partie basale des pousses. Il est important de noter que les cals produits étaient compacts et friables. Ceux-ci, plus tard, lorsqu'ils ont été transférés dans un mélange de tourbe et de perlite, ou de perlite et de vermiculite seule, ont

développé des racines. En fait, 10 % d'entre eux ont développé des racines après quatre mois d'acclimatation. Il est important de mentionner que seulement une racine principale a été formée et aucune racine mince ou épaisse n'a été observée (**figure 17E**). Après 7 mois d'acclimatation, nous continuons à observer un bon développement racinaire avec l'apparition des racines adventives (**Figure 17 F**).

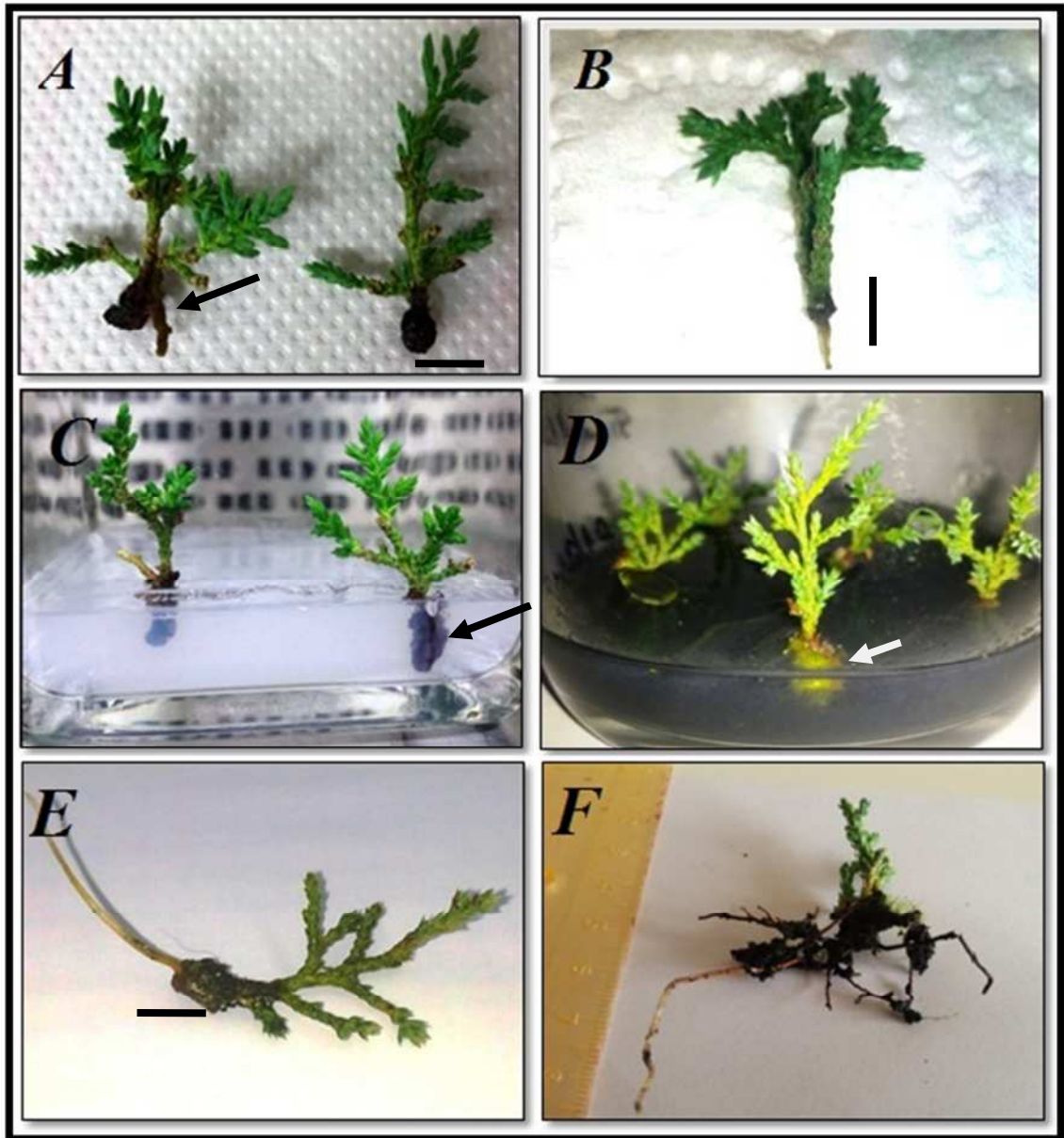


Figure 17:Enracinement des *vitro* plants. A- Formation des racines par l'intermédiaire des calls basaux. B- La mise en place des racines sans formation de calls basale. C- Formation des racines dès le passage sur les milieux de multiplications. D- Formation de calls friables verts sur les milieux MS et WPM dépourvu de régulateurs de

croissance. E- Développement de la racine principale après 4 mois d'acclimatation. F- Développement des racines adventives après 7 mois d'acclimatation (Bare=1cm).

4.2. Effet des éléments minéraux sur la rhizogénèse

Le processus d'induction des racines est généralement le résultat de plusieurs autres facteurs tels que la quantité d'éléments minéraux incorporée dans le milieu et l'ajout des additifs comme le charbon actif (Pan and Staden, 1998). Pour les ligneux, généralement de faibles concentrations en sels minéraux sont suffisantes, voire même sont adéquates pour l'enracinement des tiges (Rai *et al.*, 2010 ; Tripathi et Kumari, 2010).

Pour tester l'effet des milieux de culture sur les pousses obtenues par micropropagation, quatre traitements ont été effectués (**Tableau 10**). Après deux semaines nous avons observé que tous les tests utilisant les milieux WPM et MS, solides ou liquides, avec différentes concentrations et combinaisons d'hormones de croissance n'ont pas réussi à stimuler l'enracinement des pousses originales et elles ont fini par un arrêt complet de leur croissance. Alors que, les deux milieux MS et WPM, dilués à moitié, et additionnés avec la combinaison des hormones AIB et ANA à 5 mg L^{-1} , ont montré une initiation à l'enracinement après deux à trois semaines à partir des cals compacts et friables formés à la fin des pousses. Les milieux $\frac{1}{2}$ MS et $\frac{1}{2}$ WPM contenant l'AIB et l'ANA à concentration égale (5 mg L^{-1}) ont induit des pousses enracinées avec des taux de 38,75 % et 28,7 %, respectivement. Le nombre moyen des racines a varié de 1,33 à 2,55 racines/explants pour $\frac{1}{2}$ MS et $\frac{1}{2}$ WPM, respectivement. Ce qui pourrait fortement indiquer que le milieu MS dilué à moitié semble être plus efficace à l'enracinement des tiges de *J. thurifera*. La même tendance a été observée pour la longueur de la racine, mais les différences n'étaient pas statistiquement significatives (**Tableau 10**).

4.3. Effet du charbon actif sur la rhizogénèse

Le charbon actif peut améliorer la rhizogénèse chez plusieurs espèces ligneuses suite à l'obscurcissement, provoqué, à la base des *in vitro* plants. L'environnement sombre fourni par le charbon actif peut également contribuer à promouvoir la croissance rapide des racines. L'effet positif de l'obscurité sur la fréquence d'enracinement peut être également dû à la diminution de l'activité des peroxydases, ce qui retarde la dégradation des régulateurs de croissance. L'effet bénéfique du charbon est également attribué à l'adsorption de substances nuisibles qui peuvent être rejetées par le tissu végétal et/ou par la dégradation du milieu de culture (Dumas

et Monteuis, 1995 ; Sanchez *et al.*, 1996). En outre, il peut améliorer le développement et la croissance de nombreuses espèces végétales (McCown, 1988 ; Pan et Staden, 1998).

Dans cette étude, l'incorporation du charbon actif aux milieux de cultures s'est avérée efficace pour l'initiation des racines ainsi que pour la croissance des *vitro*plants. Les tiges cultivées en présence du charbon actif ont développé les racines et la partie aérienne, qui a atteint environ 2 à 3 fois la taille d'origine (**Figure 18D**). Ce résultat est en accord avec d'autres études ayant indiqués on efficacité lors de la rhizogénèse chez les espèces ligneuses telles que *Quercus rubra* (Sanchez *et al.*, 1996) et *Argania spinosa* (Ziani, 2014).

4.4. Effet de l'incubation à l'obscurité sur la rhizogénèse

Chez de nombreux arbres ligneux, les *vitro* plants s'enracinent mieux s'ils sont incubés à l'obscurité pendant la première phase d'enracinement (McCown, 1988 ; Sanchez *et al.*, 1996 ; Vieitez *et al.*, 2009). Dans cette expérience, une période d'obscurité de sept jours a considérablement amélioré l'enracinement des tiges et a accéléré la durée nécessaire pour l'émergence des primordiums racinaires. L'effet bénéfique de l'incubation initiale dans l'obscurité pourrait être attribué à la sensibilité des auxines à la lumière. Cependant, au-delà de 7 jours, l'obscurité favorise la sénescence et la nécrose des tiges, comme il a également été observé pour de nombreuses autres plantes ligneuses (Sanchez *et al.*, 1996 ; Vieitez *et al.*, 2009).

5. Acclimatation des *vitro* plants

L'acclimatation des plantes de *J. thurifera* est un autre défi particulier. Selon cette étude et sur la base de sa croissance qui extrêmement lente (Montès, 1999), la micropropagation de *J. thurifera* à travers les bourgeons axillaires pourrait demander une période minimale de 2 à 3 ans pour produire des *vitro* plants prêts pour le transfert au champ. Selon les essais qu'on a réalisés, on a constaté que la survie des *vitro* plants, pendant le transfert *ex vitro* est extrêmement liée à la qualité du système racinaire produit. Le taux de survie le plus élevé (jusqu'à 50 %) des plantules *in vitro* a été observé après transfert sur mélange de tourbe et de perlite (1/1). Les *vitro* plants de plus de 7 mois dans la chambre d'acclimatation ont développé un bon système racinaire permettant leur survie. Toutefois, leur croissance était très lente (**Figure 18 A et B**).



Figure 19 : Acclimatation des *vitro* plants

6. Induction de la callogénèse

La réactivité des explants, dans les milieux de culture testés, s'est manifestée dès le quinzième jour de mise en culture, et s'est traduite par un gonflement de l'explant, suivi d'une prolifération importante et anarchique de ses cellules le recouvrant complètement et le rendant méconnaissable. Cet amas de cellules est appelé cal (**Figure 19**). Ce dernier correspond à la reprise de la division cellulaire (mitose) et à l'amorce de la dédifférenciation cellulaire qui aboutit ainsi à la production de cal, qui est un tissu homogène et inorganisé. La callogénèse induite (callogénèse primaire) au niveau des explants mis en culture s'est toujours manifestée sous forme de cal hyper hydriques friables ou compactes. Elle a varié, cependant, en fonction de deux paramètres : le type du milieu et la combinaison hormonale testée.

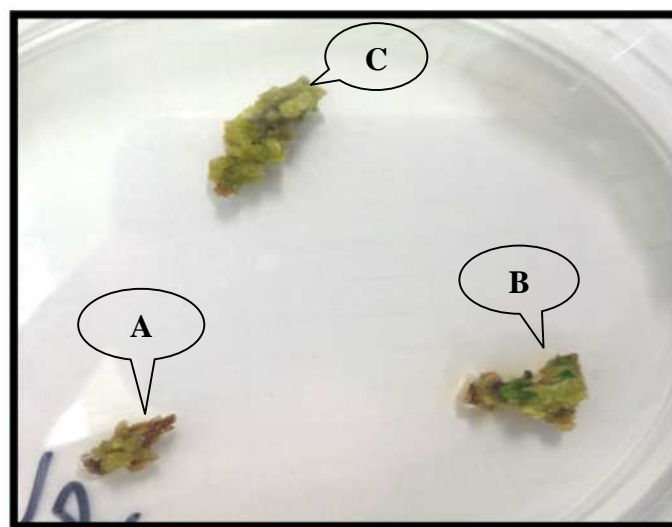


Figure 19 : Induction de la callogénèse ; A- Gonflement et réactivation des la callogénèse, B- Prolifération des cals sur l'explant, C- Recouvrement total d'explant par les cals.

6.1. Effet des milieux de culture sur l'induction de la callogénèse

Les trois milieux de culture testés WPM, MS et N6 ont permis d'aboutir à la réactivité des explants mis en culture avec respectivement, des taux de 86,32 %, 20,87 % et 22,89 %, de réactivité totale (gonflement et callogénèse), avec tous les traitements hormonaux confondus (**Figure 20**). Cependant, des différences ont été constatées par rapport à l'apparition de la callogénèse. En effet, les explants mis en culture sur le milieu WPM ont été les premiers à montrer une callogénèse.

L'analyse statistique des données effectuée à la fin des deux mois de culture a révélé une différence significative entre les trois milieux testés avec l'identification de trois types de groupes homogènes (a, b et c).

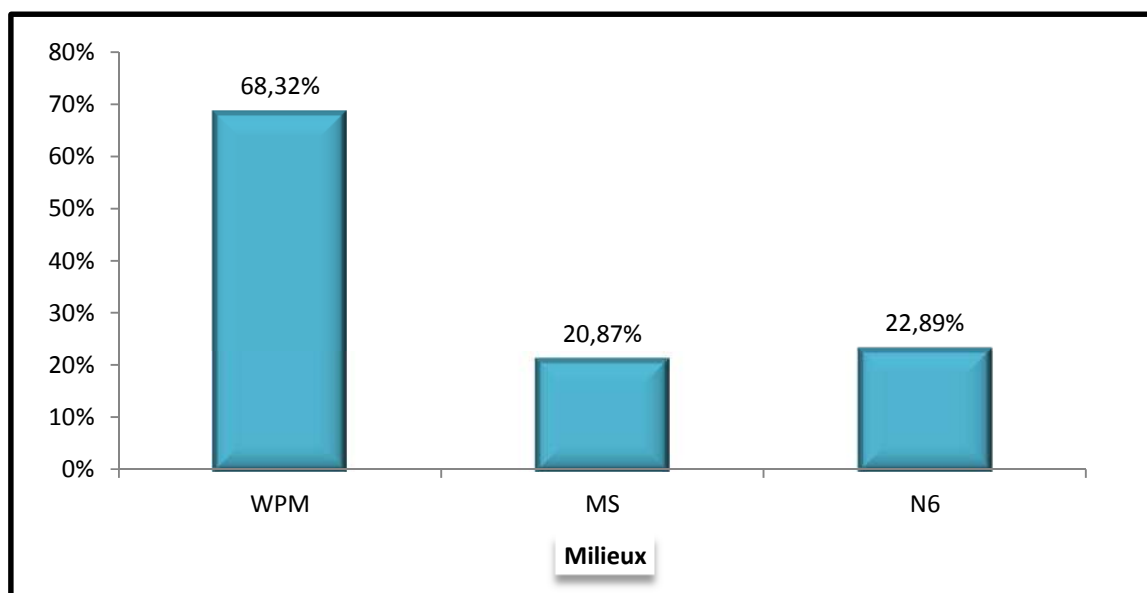


Figure 20 :Effet des milieux de culture sur le taux l'induction de la callogénèse

6.2. Effet de la combinaison hormonale sur l'induction de la callogénèse

L'effet de plusieurs combinaisons hormonales a été testé afin de déterminer celles qui permettent d'atteindre le pourcentage de callogenèse le plus élevé. Toutes les combinaisons hormonales utilisées ont induit une réactivité des explants mis en culture. Cependant, des différences ont été enregistrées par rapport au temps de réponse et au taux de callogénèse après deux mois de culture.

En effet, sur le milieu WPM, les traitements M1 (0,25 mg L⁻¹, 0,25 mg L^{-12,4} D) et M4 (0,5 mg L⁻¹BAP, 0,25 mg L^{-12,4} D) ont été les premiers a manifesté une callogénèse avec les

taux les plus élevés de 93,93 %, et de 96,97 %, respectivement. Le plus faible taux était de 24,24 %, et a été enregistré au niveau du traitement M3 ($0,25 \text{ mg L}^{-1}$, $0,25 \text{ mg L}^{-1}$ 2,4 D) (Figure 21).

D'après les résultats présentés dans les Figures 21 et 22, on observe que plus la concentration de 2,4 D est élevée dans le milieu, plus le taux d'induction de cals diminue, et ce quelle que soit la concentration du BAP.

L'analyse statistique a révélé une différence significative entre les différents traitements appliqués sur le milieu WPM avec l'identification de cinq groupes homogènes (a, b, c, d et e).

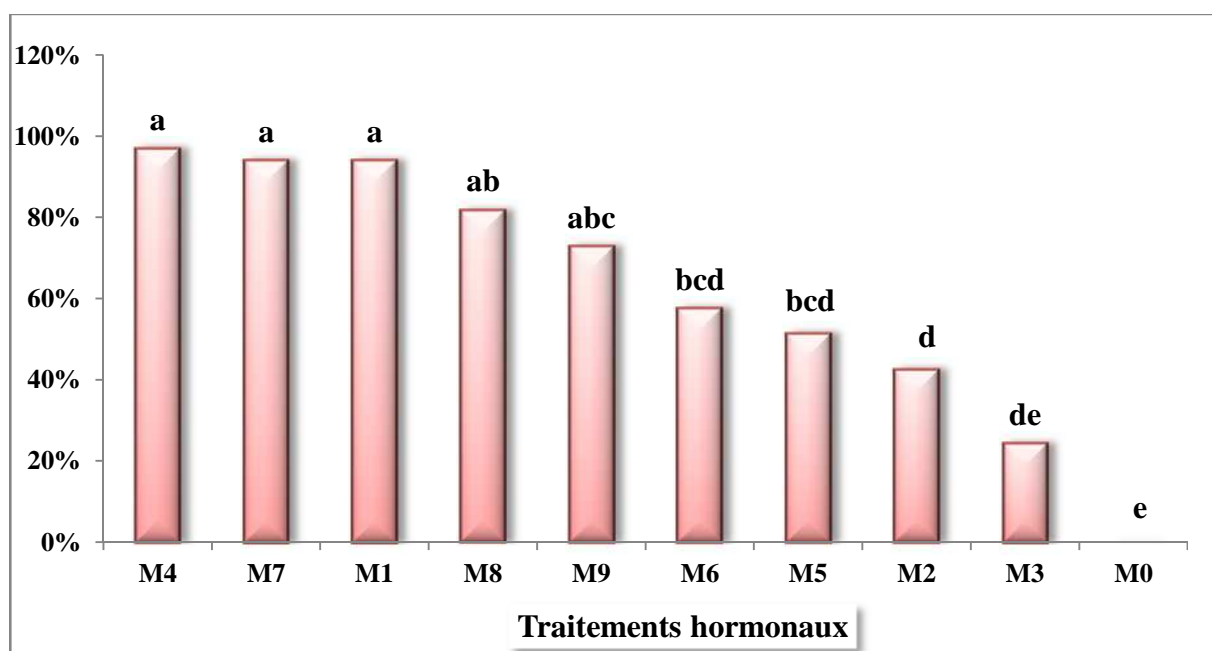


Figure 21 : Effet des traitements hormonaux et milieu WPM sur l'induction de la callogénèse.

Pour le milieu MS, les explants en présence des traitements MS5 ($0,5 \text{ mg L}^{-1}$, $0,5 \text{ mg L}^{-12,4} \text{ D}$) et MS8 (1 mg L^{-1} , $0,5 \text{ mg L}^{-12,4} \text{ D}$) ont été les premiers à induire une callogénèse. Ils ont présenté respectivement, des taux de 39,39 % et 33,33 % de callogénèse induites. Les plus faibles taux ont été enregistrés avec les traitements MS3 ($0,25 \text{ mg L}^{-1}$, $1 \text{ mg L}^{-12,4} \text{ D}$) et M2 ($0,25 \text{ mg L}^{-1}$, $0,5 \text{ mg L}^{-12,4} \text{ D}$) avec des taux respectivement, de 6,06 % et de 0 % (Figure 22).

Les résultats de l'analyse de la variance révèlent une différence significative entre les traitements hormonaux sur le milieu MS avec l'identification de deux groupes homogènes (a et ab).

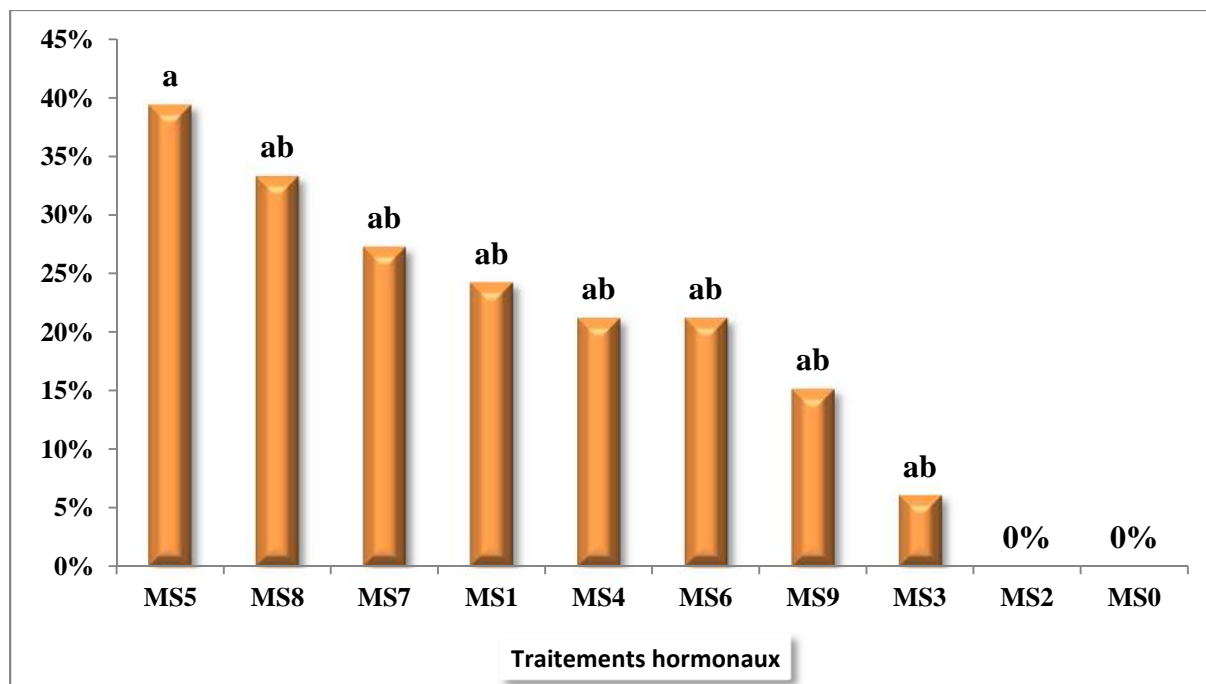


Figure 22 : Effet des traitements hormonaux et le milieu MS sur l'induction de la callogénèse.

En ce qui concerne l'utilisation du milieu N6, les résultats présentés dans la **Figure 23** montrent que le meilleur pourcentage de cals (48,48 %) a été obtenu en utilisant le traitement N5 ($0,5 \text{ mg L}^{-1}$, $0,5 \text{ mg L}^{-1} 2,4 \text{ D}$). Alors qu'un faible taux d'induction de cals (3,03 %) a été enregistré en utilisant le traitement N6 ($0,25 \text{ mg L}^{-1}$ BAP et $1 \text{ mg L}^{-1} 2,4 \text{ D}$). Globalement, la production des cals s'est améliorée avec l'augmentation de la concentration du BAP, quelle que soit la concentration du 2,4D.

Les résultats de l'analyse de la variance révèlent une différence significative entre les traitements hormonaux sur le milieu MS avec l'identification de trois groupes homogènes (a, b et c).

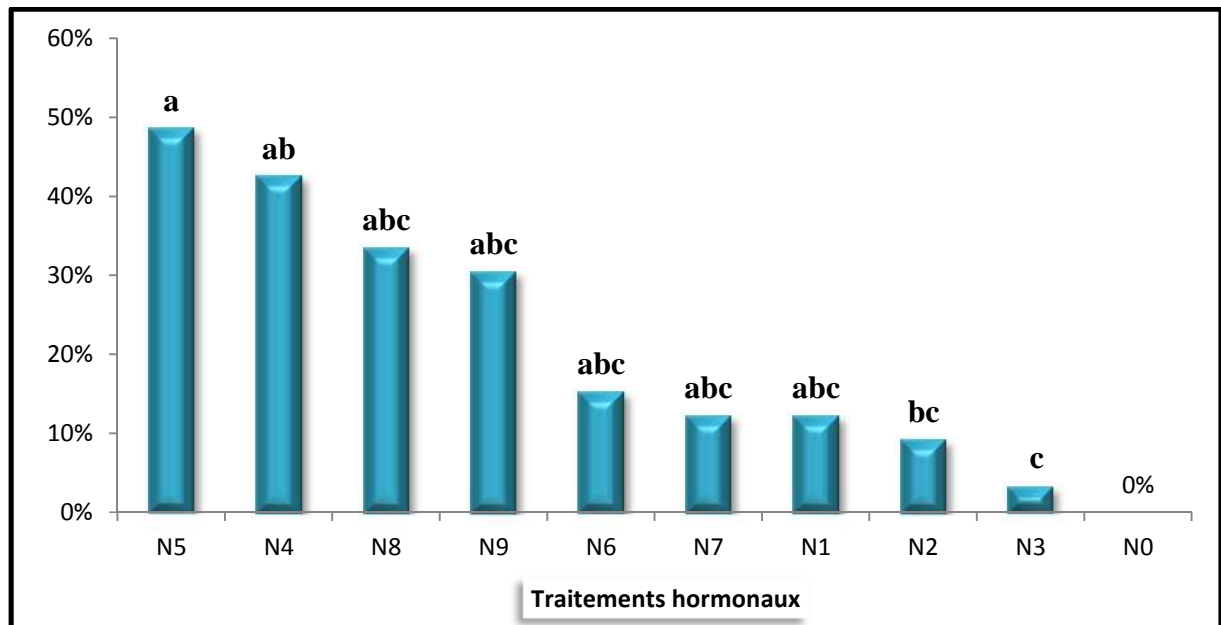


Figure 23 : Effet des traitements hormonaux sur le milieu N6 sur l'induction de la callogénèse.

7. Entretien et multiplication des cals

7.1. Effet du milieu sur l'évolution des cals

Les cals issus de la phase précédente se sont détachés des fragments de tiges qui les avaient engendrés et ont été transféré chaque mois sur des milieux frais de mêmes compositions avec l'élimination des cals nécrosés. Après deux subcultures (8 semaines), tous les cals obtenus sur les deux milieux MS et N6 ont arrêté de croître et ont tous fini par noircir. Contrairement à ce qui a été observé sur le milieu WPM, où les cals ont continué à proliférer et ont montré une structure friable avec une couleur blanche et/ou beige (**Figure 24 A et B**).



Figure 24 : Effet du milieu de culture sur l'évolution des cals

A- Cals développés sur le milieu WPM, B- Cals nécrosés sur les milieux MS et N6.

7.2. Effet du traitement hormonal sur l'évolution des cals dans le milieu WPM

Les résultats présentés dans le **Tableau 11** montrent qu'après deux semaines de subculture, les cals développés sur les milieux des traitements (M2, M3, M5, M6, M7, M8 et M9) ont subi un arrêt de croissance. Par contre, les deux autres traitements, M1 et M4, ont conduit au développement des cals à texture nodulaire ou granuleuse.

Tableau11 : Effet du traitement hormonal sur l'évolution des cals dans le milieu WPM

Traitement hormonal (BAP/2,4 D)	Pourcentage de réactivité des cals (%)	Aspect et structure des cals
M1 (0.25/0.25)	69	Texture nodulaire
M2 (0.25/0.5)	0	Arrêté de développement
M3 (0.25/1)	0	Arrêté de développement
M4 (0.5/0.25)	75	Texture granulaire
M5 (0.5/0.5)	0	Arrêté de développement
M6 (0.5/1)	0	Arrêté de développement
M7 (1/0.25)	0	Arrêté de développement
M8 (1/0.5)	0	Arrêté de développement
M9 (1/1)	0	Arrêté de développement

La croissance des cals a été différente, et plusieurs réponses morphologiques ont été observées. Ainsi trois groupes d'explants en fonction de leur réponse, ont été identifiés :

- Groupe 1 : caractérisé par l'arrêt de la callogenèse ou un arrêt du développement avec une couleur noire ;
- Groupe 2 : caractérisé par la présence d'une callogenèse nodulaire, de couleur blanche et beige ;
- Groupe 3 : caractérisé par la présence d'une callogenèse granuleuse, de couleur blanche ou beige (**Figure 25 A et B**).



Figure 25 : Effet du traitement hormonal sur l'expression de la structure des cals dans le milieu WPM, A- Cals granuleux, B- Cals nodulaire.

7.3. Repiquage des cals sur les milieux de régénération

Les cals bien développés sur les milieux M1 et M4 ont été transférés sur les milieux de régénération et exposés à la lumière, ils ont continué à se développer, sans modification de leur aspect. Par la suite, et après 4 semaines, ils sont devenus chlorophylliens sans aucune organogénèse (**Figure 26A**).

7.4. Initiation à l'embryogenèse somatique

Après le transfert des cals de sur les milieux de base dépourvus de régulateurs. Ces cals ont continué à se proliférer et ont pris un aspect nodulaire et à l'exposition à la lumière, ils sont devenus chlorophylliens produisant une structure qui a évolué rapidement en structure embryonnaire (**Figure 26 B**). L'étude histologique de cette structure montre qu'elle est d'origine unicellulaire caractérisée par des cellules embryogènes à gros noyaux, et à cytoplasme dense riche en protéines solubles (coloration le bleu de toluidine) (**Figure 26 C**).

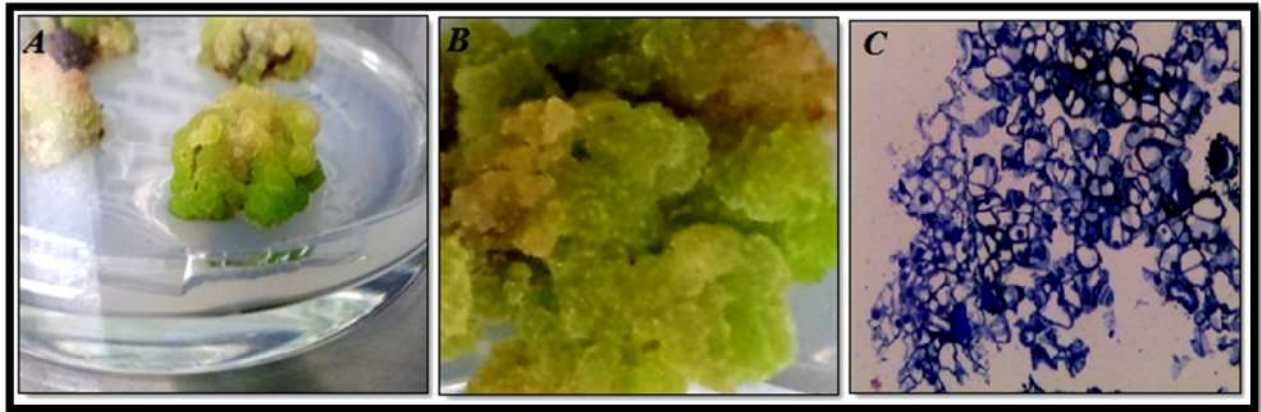


Figure 26 :Développement des cals sur les milieux de régénération ; A- Cals chlorophylliens développés sur les milieux de régénération, B- Cals embryogènes développés sur le milieu WPM dépourvu de régulateurs de croissance.

8. Synthèse des principaux résultats

Pour la micropropagation des espèces ligneuses, l'état sanitaire des explants cultivés *in vitro* est un problème récurrent qui peut compromettre le développement de la technique (Riffaud et Cornu, 1981 ; Meynier, 1985). Même chez certaines espèces herbacées comme le de l'*Artemisia absinthium*, les infections microbiologiques, notamment les contaminants bactériens, étaient l'une des causes principales des pertes des explants fraîchement installés *in vitro* (Nin *et al.*, 1994). Ces derniers, ont du recourir à l'utilisation de la streptomycine pour éliminer les bactéries de leurs cultures, les mêmes auteurs ont signalé que l'adjonction de cette substance antibiotique dans le milieu nutritif a permis de réduire considérablement la prolifération des bactéries, mais elle a inhibé la croissance des explants initiaux.

Chez le Genévrier thurifère, les pertes enregistrées sont variables selon le type d'explant mis en culture, la période de prélèvement et la technique de désinfection appliquée. Ainsi, en plein air, la prise d'échantillons doit s'effectuer sur des pousses en croissance. Dans le cas où le rameau est en repos physiologique (dormance), les infections sont toujours très importantes (100 %), et peuvent inhiber fortement le débournement des bourgeons axillaires.

En plus des contaminations et du récalcitrance, des arbres adultes, le brunissement du milieu de culture et/ou les explants suite à la sécrétion des composés phénoliques ont été rapportés comme un obstacle majeur empêchant l'établissement des cultures stériles (Dhavalala et Rather, 2010 ; Rai *et al.*, 2010 ; Phulwria *et al.*, 2012). Les polyphénols produits au niveau des surfaces des coupes sont oxydés par la polyphénol oxydase, une enzyme nucléaire contenant du cuivre et est largement distribuée dans les espèces végétales (Datta *et al.*, 2007 ; Ozyigitet

al., 2007). Ces composés phénoliques qui sont oxydés et transformés en quinones hautement toxiques entraînent le brunissement des explants, et peuvent être à l'origine des nécroses, voir de l'intoxication du matériel végétal mis en culture. Ces composés inhibent l'activité enzymatique et affectent négativement l'organogénèse des explants (Murashing et skoog, 1966). L'ensemble des bourgeons obtenus s'est développé en pousses ramifiées après quatre semaines sans présenter de nécroses ni de brunissement des feuilles. Cela est probablement dû à l'utilisation d'explants relativement juvéniles. Un matériel végétal jeune est caractérisé par une synthèse phénolique très limitée par rapport aux tissus adultes (Rai *et al.*, 2009). Cependant, l'addition des substances absorbantes comme le charbon actif dans le milieu a fortement diminué la perte d'explants et les repiquages successifs, toutes les deux semaines, ont amélioré significativement les résultats. De même, l'élimination des composés phénoliques par le renouvellement successif du milieu nous a permis d'obtenir 90 % de pousses. L'effet bénéfique du changement du milieu et des repiquages successifs a été signalé chez certains *Juniperus* comme le *J. excelsa*, *J. chinensis* et *J. horizontalis* (Ziadi *et al.*, 2011) et chez d'autres espèces ligneuses comme le pistachier de l'Atlas (Benmahioul, 2014), et l'arganier (Lamaoui, 2015).

8.1. Germination des graines

La propagation *in vitro* de *J. thurifera* par semi est aussi confrontée à des problèmes liés au manque de germination des semences à cause de l'effet combiné de la non-viabilité et de la dormance des graines. La perte de viabilité des graines peut dans certains cas apparaître après une longue dormance comme le confirment certains auteurs (Heller, 2000).

Selon l'étude de Frradous (2013), le pourcentage de germination des graines de Genévrier thurifère stratifiées au froid pendant six mois ne dépassait pas les 15 %, à cause de la dormance tégumentaire et embryonnaire, et de la perte de viabilité des semences. La difficulté de germination et d'obtention de jeune régénération chez le genre *Juniperus* a été signalée par Mandel et Alberts (2005).

8.2. Développement et multiplication des pousses

En technique de propagation végétative, et selon ce que nous avons lu dans la littérature, nos essais constituent les premiers essais conduits sur le Genévrier thurifère. Les pourcentages observés et la qualité d'enracinement sont très prometteurs. Il est bien connu, que la composition du milieu de culture joue un rôle très important dans l'organogénèse. L'effet d'un milieu de culture résulte de l'ensemble des interactions des différents éléments qui les

composent. Certains d'entre eux stimulent le processus du développement *in vitro*, d'autres, par contre, ont peu d'influence sur le débourrement (Grigoriadou *et al.*, 2002 ; Brhadda *et al.*, 2003).

La comparaison des résultats obtenus avec les différents milieux fait apparaître que le milieu WPM a eu un effet spectaculaire sur la néoformation des pousses dès le trentième jour, suivi du milieu MS, alors que le milieu N6 était le plus défavorable. Après le soixantième jour, les milieux WPM et MS restaient les plus favorables avec des effets variables, et des différences significatives. De même, en général, sur le milieu WPM, les explants ont une longueur de pousses plus élevée par rapport au milieu MS ($p \leq 0,05$) et globalement, sur les milieux MS et WPM, les explants ont conservé une couleur verte, devenant rarement jaune ou brun clair. Alors que Castro *et al.* (2011), ont constaté que le milieu WPM était généralement moins approprié pour la culture de *J.navigularis*. Par contre, Ziadi *et al.* (2012) ont démontré que le milieu WPM est le meilleur pour la régénération des trois *Juniperus* ; *J.chinensis*, *J.horizontalis* et *J.excelsa* testées. L'efficacité des milieux WPM et MS sur la culture des micrboutures a été signalée pour d'autres espèces ligneuses comme le caroubier (Saidi *et al.*, 2015). La différence du développement des explants observés entre les milieux de culture utilisés découlerait certainement de la différence dans leur composition minérale. Manzanera *et al.* (1990), ont montré que les milieux à concentrations faibles en ions sont plus souhaitables pour la croissance et la prolifération des explants de *Quercus suber* à l'égard d'autres milieux riches en ions. Cela veut dire que les jeunes explants n'ont pas besoin d'un milieu très riche en minéraux pour se développer. De plus, l'excès en minéraux, couplé à l'absence des phytohormones, entraîne la nécrose progressive des *in vitro* plants et la réduction de la taille des feuilles (Gharnit et Annabili, 2009).

En règle générale, les cytokinines sont indispensables pour le débourrement, la multiplication des pousses et leur croissance (Skoog et Miller, 1957). L'incorporation des cytokinines dans le milieu de culture initie le développement des pousses axillaires. Celles-ci prolifèrent d'autant plus qu'elles sont soustraites à l'inhibition corrélative du bourgeon apical. Les pousses ainsi multipliées sont isolées et mises à enraciner *in vitro* ou *in vivo* (Walali Loudiyi, 1993). Des travaux antérieurs sur d'autres espèces de *Juniperus* indiquent que la famille des *Cupressaceae* répond favorablement à des niveaux relativement faibles de cytokinines (Negussie, 1997).

La N⁶benzyloaminopurine (BAP) est traditionnellement la cytokinine la plus utilisée pour la prolifération des bourgeons axillaires chez les espèces ligneuses (David, 1982) *in vitro* (Benmahioul, 2014). 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 and Kumari, 2010; Germana *et al.*, 2011). L'efficacité du BAP peut être attribuée à la capacité des tissus de la métaboliser plus facilement que les autres régulateurs de croissance synthétiques, ou à son aptitude à induire la production d'hormones naturelles, telle que la zéatine, à l'intérieur du tissu (Malik *et al.*, 2005).

Au cours de nos expériences, l'utilisation de la BAP à 0,5 mg L⁻¹ combinée à 0,25 mg L⁻¹ de 2,4 D s'est révélée nécessaire pour maximiser la prolifération des pousses axillaires. L'effet bénéfique de la combinaison d'une auxine notamment la 2,4 D à la BAP durant la phase de prolifération des bourgeons a été constaté chez des espèces appartenant au genre *Juniperus*. L'effet de la BAP (0,5 mg L⁻¹) dans *J.chinensis*, *J.horizontalis* et *J.excelsa* s'est avéré être la meilleure dose pour la formation des pousses (Zaidi *et al.*, 2012). Kocer *et al.* (2011), ont rapporté que la formation des pousses est augmentée lorsque le composant auxinique a été exclu des milieux nutritifs, mais elle était, au contraire, nécessaire dans la première étape du développement des pousses dans l'organogenèse indirecte du *J.communis*. Loueiro *et al.* (2007), ont observé la même tendance en travaillant sur la micropropagation de *J.phoenicea*. Les auteurs ont expliqué cette tendance en raison du stress imposé par le processus de décontamination et du temps nécessaire pour que les pousses soient adaptées aux conditions de la culture *in vitro*.

L'amélioration de l'élongation des pousses, avant leur enracinement en micropropagation, est souvent induite par l'apport de gibbérellines dans les milieux de culture d'après, Zryid (1988).

Dans notre étude, l'addition des Gibbérellines dans le milieu de culture n'a pas conduit à l'amélioration de l'élongation des pousses, contrairement elle a un effet défavorable. El Kbiach (2002) a confirmé l'effet négatif de la GA3 sur le Chêne-liège. Ces résultats sont contradictoires avec l'effet synergique bien connu de l'acide gibbérellique (GA3) sur l'élongation des cellules végétales (Sahoo et Chand, 1998; Dronne *et al.*, 1999). Cependant, son inefficacité sur l'allongement des pousses *in vitro* a été également rapportée par les travaux de Di Michele et Bray (1997) qui ont porté sur la multiplication *in vitro* réalisés sur *A.flava*.

La multiplication des *vitro* plants peut être maintenue pendant une longue période sans aucune perte de viabilité ou de la vigueur, chose qui est très importante pour la propagation rapide de l'arbre. Contrairement à nos résultats où on a observé que les taux de multiplication ont régressé à partir de la troisième culture, cela peut s'expliquer par l'exposition des explants à des concentrations élevées de cytokinine en phase d'induction, ce qui peut conduire à l'accumulation des cytokinines, qui inhibent la multiplication et la croissance des tiges supplémentaires (Malik *et al.*, 2005). Des résultats similaires ont également été observés pour de nombreuses autres espèces ligneuses (Shekhawat *et al.*, 2011).

8.3. Enracinement et acclimatation des *vitro* plants

L'enracinement est le principal goulot d'étranglement de la micropropagation de la plupart des conifères, limitant les possibilités d'établir des protocoles commerciaux. En outre, des études antérieures ont révélé la difficulté d'induire des racines adventives dans des conditions *in vitro* pour les espèces du genre *Juniperus* (Oliveira *et al.*, 2003).

Malgré les résultats encourageants que nous avons obtenus, la rhizogénèse reste une étape difficile à obtenir en culture des tissus *in vitro* et particulièrement chez les ligneux (Margara, 1989). Le problème de croissance racinaire est difficile à résoudre chez le Genévrier thurifère. Cela pourrait être attribué à sa croissance qui est très lente en comparaison soit à d'autres espèces du genre *Juniperus*, soit à des espèces ligneuses comme l'olivier (Jiménez *et al.*, 2005).

En effet, en raison de la pénurie d'informations sur l'enracinement de cette espèce, il n'y a pas de résultats disponibles à affronter. Ferrauds *et al.* (2013), tout en testant la multiplication de *J. thurifera*, grâce à la technique des boutures, a rapporté que 15 % des boutures forment des cals, mais aucune information n'a été rapportée sur les pourcentages de cals qui ont donné des racines. Cependant, le brunissement et la nécrose qui sont été enregistrée lors du transfert à la phase d'acclimatation est probablement dû aux changements des conditions nutritionnelles, allant de la mixotrophie à une autotrophie. En fait, la présence d'une racine principale entourée par des cals friables pourrait ralentir, momentanément, la transition vers le mode autotrophe des jeunes plants. Castro *et al.* (2011) ont observé que pendant l'acclimatation des plantules de *J. navicularis*, les pousses enracinées directement dans le substrat augmentent plus rapidement que celles enracinées *in vitro*. De même, Neguisse (1997), a constaté que les pousses de *J. excelsa* qui, en raison des conditions stériles, ont été détruites après avoir été transférées, alors que celles qui étaient enracinées dans le

compost, dans des conditions non stériles, étaient robustes et tolérées même une manipulation brutale.

La régénération *in vitro* dépend de la composition et de la concentration des sels de base, des régulateurs de croissance et des composants organiques (Ge *et al.*, 2006). L'efficacité des auxines dans l'induction des primordiums racinaires est très bien élucidée (Blakesley, 1994 ; Hartmann *et al.*, 2001). Leur application exogène a pu résoudre le problème de la difficulté d'enracinement de nombreuses espèces ligneuses comme le châtaignier (Mato and Vieitez, 1986), le peuplier (Hausman *et al.*, 1994) et le chêne (Vieitez *et al.*, 2009). Cependant, le type et la concentration d'auxine nécessaire pour la régénération *in vitro* des racines diffèrent et sont des facteurs spécifiques à chaque espèce.

L'acide indole -3-butyrique est considéré comme l'auxine la plus importante impliquée dans le processus d'enracinement. Plusieurs résultats précédents chez plusieurs espèces ligneuses indiquent que l'AIB est l'auxine la plus utilisée et la plus adéquate pour l'enracinement (Vieitez *et al.*, 2009). Elle a été aussi mentionnée comme l'auxine la plus efficace parmi de nombreuses autres auxines (Zimmerman et Fordham, 1985 ; Shekhawat *et al.*, 1993 ; Ramesh *et al.*, 2005 ; Pandey *et al.*, 2006 ; Asthana *et al.*, 2011).

Nos résultats ont montré que L'AIB combiné à l'ANA à concentration égale (5mg/L) s'est révélé efficace pour stimuler la rhizogénèse *in vitro* chez le Genévrier thurifère. Ces deux substances auxiniques pourraient provoquer un effet synergique bénéfique sur la rhizogénèse. Une stimulation de l'enracinement *in vitro* sous l'effet de l'association de deux auxines (AIB/ANA) a déjà été observée chez d'autres espèces ligneuses : *Fraxinus excelsior* (Silveira et Cotignies, 1994), *Quercus sp.* (Ostrolucka et Bezo, 1994) et *Argania spinosa* (Bouselman *et al.*, 2001).

En effet, l'application des régulateurs de croissance est nécessaire au développement des racines des microboutures, mais le développement visible des racines n'a commencé qu'après le transfert des explants sur les milieux MS et WPM, sans hormone, et cela, quelle que soit la durée du traitement inductif appliqué. Ce résultat est en accord avec les résultats rapportés par De Klerk *et al.* (1995), qui ont suggéré que les auxines sont nécessaires seulement pendant la première étape de développement des racines, et que par la suite elles peuvent bloquer la croissance racinaire.

La réduction des macronutriments dans différents milieux a été rapportée pour favoriser l'enracinement dans de nombreuses plantes (Hyndman *et al.*, 1982). En effet, une concentration plus faible de sels dans le milieu de culture, en particulier la réduction de l'azote semble favoriser l'enracinement des boutures (Ordas *et al.*, 1985). Loureiro *et al.* (2007) et Ragonezi *et al.* (2010), ont rapporté que la réduction des macronutriments du milieu WPM à la moitié augmente de manière significative le pourcentage des pousses enracinées de *Pinus pinea* L. et de *J. phoenicea*, respectivement.

En effet, la composition minérale des milieux, principalement pour la quantité d'azote, pourrait être l'un des facteurs qui ont contribué à obtenir les taux les plus élevés de pousses enracinées lors de l'utilisation des milieux ½ WPM et ½ MS. Trewavas (1983), a suggéré que l'ion nitrate, utilisé par NO₃⁻ et NH₄⁺, à des concentrations plus faibles pourrait limiter l'action de l'IAA, qui en tous cas appuie son rôle. Dans notre expérience, l'addition de deux-auxines IBA et NAA avec du charbon actif a eu un effet important sur le développement de la racine. En outre, il a favorisé une croissance vigoureuse des pousses allongées. Par conséquent, et en comparaison avec des résultats précédents, la fréquence d'enracinement était supérieure à celle obtenue par Ferradous *et al.* (2013) sur l'enracinement de *J. thurifera* du Maroc. Des résultats similaires ont été signalés chez d'autres espèces de *Juniperus* (Negussie, 1997 ; Zaidi *et al.*, 2012). En comparant les taux des racines obtenues pour d'autres *Juniperus* méditerranéens, le thurifère semble avoir des capacités d'enracinement différentes que *J. excelsa*, avec un taux de 31 % (Negussie, 1997) et *J. oxycedrus*, avec des taux allant de 7 % à 10 % (Gómez et Segura 1995). Cependant, *J. phoenicea* et *J. navicularis* ont donné les taux d'enracinement les plus élevés pour le genre *Juniperus*, avec respectivement 40 % et 60 %, de racines (Loureiro *et al.*, 2007 ; Castro *et al.*, 2011). En ce qui concerne le nombre et la longueur de racines produits lors de l'évasement, nos résultats ont été inférieurs à ceux obtenus soit pour *J. phoenicea* (Loureiro *et al.*, 2007), soit pour *J. excelsa*, *J. horizontalis* et *J. chinensis* dans différentes conditions de culture (Zaid *et al.*, 2012). Les deux auteurs ont constaté que l'augmentation de la concentration d'hormones inhibe la croissance des racines.

Le transfert des bourgeons néoformés sur des milieux dits « de développement » (milieux généralement pauvres ou complètement dépourvus de cytokinines) a provoqué leurs développements et aussi leur enracinement. Il demeure néanmoins quelques imperfections à corriger, durant cette phase, principalement le brunissement des racines ou l'amélioration du taux de bourgeons enracinés. Ce type de transfert (transfert des bourgeons, avec leurs cals

d'origines, des milieux d'induction vers les milieux de développement) est recommandé par de nombreux auteurs (Karhu et Uvinen, 1995; Anand et Rao, 2000).

L'adjonction du charbon actif dans le milieu de culture a eu un effet favorable sur la croissance des *vitro* plants de *Juniperus thurifera*. Son effet bénéfique sur l'amélioration de la croissance tissulaire en condition *in vitro*, notamment des racines ont été rapportées par plusieurs auteurs (Pan et Staden, 1998 ; Bousselmane *et al.*, 2001 ; Benmahioul, 2014).

8.4. Initiation à la callogénèse

Le passage par formation de cal (callogenèse) est une étape primordiale de sélection *in vitro*. Ce tissu végétal est une source importante de variabilité génétique (variation somaclonale) et peut être considéré comme un stock de matériel génétique. Les aptitudes à la callogenèse varient en fonction de nombreux paramètres comme la nature et l'âge des explants, la composition hormonale des milieux de culture, la source carbonée, le génotype, etc. (Zryd, 1988 ; Margara., 1989 ; Hopkins, 2003). Les bonnes potentialités exprimées par les tiges à l'égard de la callogenèse et même de la caulogénèse sont signalées par de nombreux auteurs ayant travaillé sur des espèces du même genre (Kocer *et al.*, 2011 ; Zaidi *et al.*, 2012). L'utilisation des deux combinaisons hormonales 2,4 D et BAP est recommandée pour favoriser l'initiation et la formation des cals à partir des bourgeons axillaires de *J. thurifera*. Ces résultats rejoignent ceux obtenus chez plusieurs autres plantes ligneuses, chez lesquelles les auxines étaient l'élément le plus important pour l'induction de la formation des cals. Le 2,4-D était également l'auxine la plus active dans ce sens (Evans *et al.*, 1984). Zaidi *et al.* (2012), ont indiqué que 0,5 mg L⁻¹ de concentration de la BAP sur le milieu WPM se révélait être la meilleure concentration pour l'initiation des cals et la prolifération des pousses en travaillant sur trois espèces de *Juniperus*. Il est bien connu que la formation de cal est contrôlée par la concentration de la combinaison hormonale (auxine et cytokinine) dans le milieu de culture. Les concentrations d'hormones varient pour chaque espèce végétale et peuvent même dépendre de la source des explants ou de la plante individuelle.

Dans notre expérience, la balance hormonale pour l'induction des cals est très différente entre les trois milieux testés. En effet, le milieu WPM a nécessité moins de quantité d'un agent auxinique, l'acide dichlorophénoxyacétique (2,4D). Cette hormone est reconnue comme une auxine synthétique, à des concentrations plus faibles, et stimule la croissance par la division cellulaire (Campanomi et Nick, 2005).

Les hormones endogènes existantes dans les explants peuvent expliquer cela. Cependant, pour d'autres espèces, les concentrations de cytokinine et d'auxine ont été essentielles pour induire la formation de cals (Kocer *et al.*, 2011 ; Baravardiet *al.*, 2014) sur un milieu MS.

Concernant la callogenèse, on constate que la composition hormonale influe considérablement la taille (l'importance), la couleur et la texture des cals produits. Ainsi l'usage des auxines ou des cytokinines, seul dans le milieu de culture, s'est révélé incapable d'induire une callogenèse sur l'ensemble des explants testés et cela, quelles qu'elles soient leurs origines. Par contre, l'adjonction des auxines, en présence de cytokinines, au milieu de culture la stimule fortement. Des résultats similaires aux nôtres ont été signalés par Zaidi *et al.* (2012).

Par ailleurs, il est utile de rappeler, dans notre cas, que la présence du 2,4-D associé à une cytokinine (BAP), favorise considérablement la callogenèse. Cette association fait penser à un effet synergique et/ou complémentaire des auxines et des cytokinines sur l'organogenèse en général et la callogenèse en particulier chez cette espèce. En effet, cet effet complémentaire sur la callogenèse a déjà été démontré chez d'autres espèces ligneuses telles que *Quercus suber* (Noronha *et al.*, 1992), *Mangifera indica* (Litzet *et al.*, 1998), *Citrus grandis* (Huang *et al.*, 2002).

8.5. Multiplication des cals et initiation à l'embryogenèse

Après deux subcultures, des brunissements sont apparus au niveau des cals multipliés sur les différents milieux avec différentes concentrations des combinaisons utilisées. Le phénomène de brunissement a été présent tout au long des différentes subcultures avec des périodes de faible et de fortes intensités, qui engendraient dans le cas extrême la nécrose des cals mise en culture. Cette alternance d'intensité pourrait être expliquée par l'effet inhibiteur de la présence des polyphénols (Asemota *et al.*, 2007). Les brunissements des cals observés dans notre essai ont été également signalés par plusieurs auteurs sur de nombreuses espèces ligneuses notamment sur le palmier dattier (Boufis, 2008 ; Djillali, 2008).

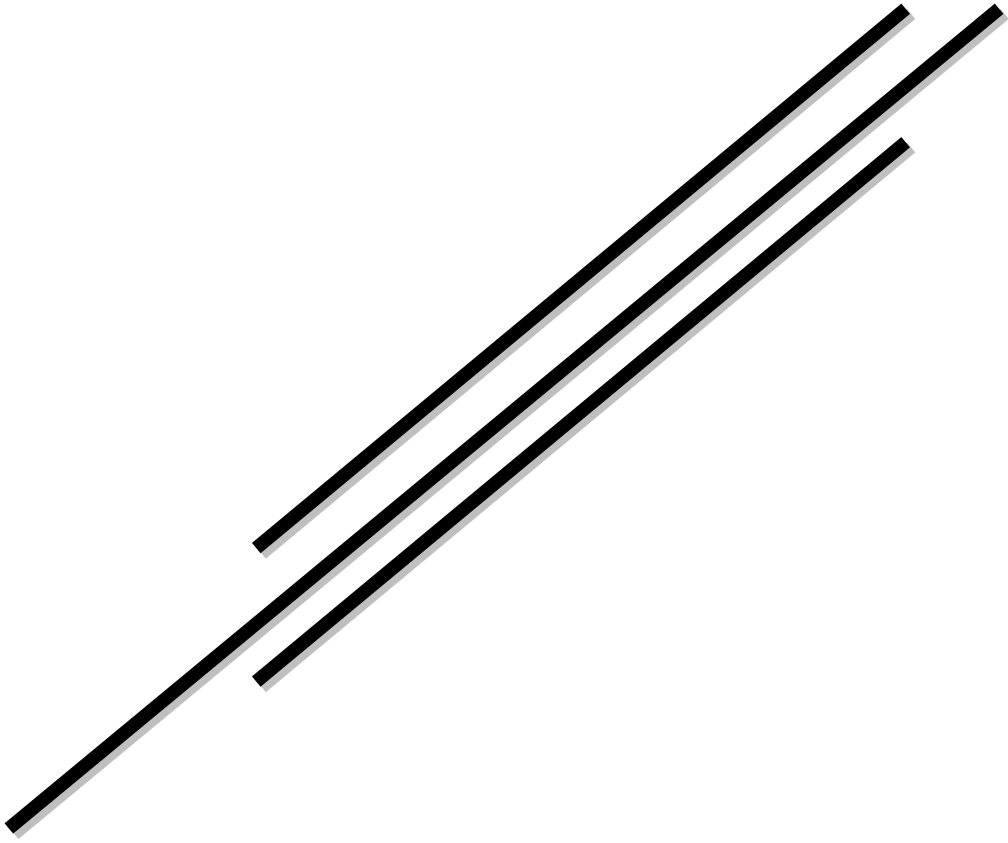
La croissance des cals a été différente, ainsi trois groupes d'explants en fonction de leur réponse ont été identifiés durant toutes les phases de multiplication, des cals nécrosés, cals à texture nodulaire et cals à texture granuleuse. Les cals ont été au départ granuleux beige et ont pris place sur les cals primaires friables. Les cals granulaires ont proliféré et ont formé des masses compactes. Au fur et à mesure des repiquages ces cals évoluaient vers une structure plus ou moins friable composée de petits agrégats. Après leur transfert, les cals obtenus sur milieu dépourvu de régulateurs de croissance a permis le développement des cals à structures

pro embryonnaires. L'effet inhibiteur de l'auxine sur le développement des embryons somatiques a été rapporté par plusieurs auteurs (Filonova *et al.*, 2000 ; Von Arnold *et al.*, 2002 ; Machakova *et al.*, 2008). Par ailleurs, il est nécessaire de transférer les cultures embryogènes à un milieu dépourvu d'auxine pour stimuler davantage la croissance des embryons somatiques (Von Arnold *et al.*, 2002). Dans notre cas les cals proembryonnaires n'ont pas évolué en embryons somatiques matures. Comme d'autres espèces de conifères, il était difficile d'arrêter la prolifération de la division des cellules embryonnaires somatiques et de les amener au stade de maturation, nos résultats sont similaires à ceux obtenus par Seblework Belaineh (2009) sur *J.procera*.

Le transfert des cals obtenus sur milieu frais a permis d'entretenir et de multiplier la masse callogène en présence des mêmes équilibres hormonaux qui ont été à l'origine de leur initiation pendant une durée supérieure à 24 mois. Il a été signalé que les repiquages successifs pourraient engendrer des variations soma clonales mais aussi la perte de la capacité embryogène des cals multipliés (Zaid *et al.*, 2002 ; Kunert *et al.*, 2003).

Edwin *et al.* (2008), signalent que l'induction de l'embryogenèse somatique doit comprendre l'arrêt d'un modèle d'expression génique courant dans les tissus d'explants et de son remplacement par un programme d'expression embryogénique. Un mécanisme possible pour la régulation de l'expression génique courante est une méthylation d'ADN, qui est influencée par les auxines. Le déclenchement de la voie embryogénique est limité seulement à certaines cellules sensibles qui ont le potentiel d'activer ces gènes impliqués dans la régénération des cellules embryogéniques. Seulement quelques cellules dans l'explant primaire sont compétentes pour l'induction embryogénique.

Conclusion



Conclusion

La multiplication *in vitro* par micropropagation peut être une alternative de propagation végétative conforme et rapide pour la multiplication du *J.thurefera*. Pour rappel, l'objectif essentiel visé par ce travail consiste à essayer de régénérer *in-vitro* des plantes entières de *J. thureferavia* l'organogénèse.

En dépit du fait que plusieurs travaux de recherche ont été publiés sur la régénération et micropropagation *in vitro* des essences forestières, mais ce n'est pas le cas de *J. thurifera*. Nous tenons à souligner ici que dans ce que nous avons lu dans la littérature aucun travail de recherche n'a été publié jusqu'à ce jour sur la micropropagation *in vitro* de cette essence. Au terme de cette étude, on peut conclure que le Genévrier thurifère comme la plupart des espèces ligneuses est une espèce « plutôt récalcitrante ». En revanche, l'ensemble des essais effectués ont montré que cette espèce peut être multipliée *in vitro* jusqu'à l'obtention des *in vitro* plants acclimatés.

Concernant la callogénèse, nos résultats ont montré que la composition hormonale des milieux de culture influence considérablement la couleur et la texture des cals produits. Ainsi, dans les milieux de culture, l'usage des cytokinines combinées aux auxines a influencé considérablement l'induction des cals et semble être plus contrôlé par la concentration d'auxine (2,4 D) que par celle de la cytokinine (BAP), quel que soit le milieu de culture. Néanmoins, parmi les différentes concentrations et combinaisons de BAP et du 2,4 D, le milieu WPM s'est révélé être le meilleur milieu pour induire les cals chez *J. thurifera*. Les résultats obtenus indiquent que la prolifération des callus embryogéniques a été stimulée avec succès dans le milieu WPM dépourvu des régulateurs de croissance.

Il est bien connu que la réponse morphologique en condition *in vitro* dépend de plusieurs facteurs. En effet, l'étude de l'effet de plusieurs milieux nutritifs sur la morphogénèse des microboutures a révélé que celui de l'effet du milieu WPM demeure le plus approprié pour la culture des bourgeons axillaires du thurifère. De plus, l'addition de ($0,5 \text{ mg L}^{-1}$) de BAP et ($0,25 \text{ mg L}^{-1}$ et 1 mg L^{-1}) de 2,4 D au milieu WPM a permis de produire un nombre élevé de pousses et de branches. Nos essais ont montré aussi que *J. thureferas*'enracine d'avantage avec les milieux moins riches en éléments nutritifs à savoir $\frac{1}{2}$ WPM et $\frac{1}{2}$ MS (Macroéléments et microéléments dilués à la moitié). En outre, la combinaison des régulateurs de croissance (AIB/ANA) à concentrations égales s'est révélée plus efficace pour stimuler la rhizogénèse *in vitro* chez cette espèce. L'enracinement simultané des pousses dans

les substrats était également prometteur, car ils augmentent le taux de survie des plantes dans la phase d'acclimatation. Suite aux essais menés, il semble que l'enracinement pourrait se produire sans avoir besoin de traitements hormonaux complexes d'induction de racines.

Par ailleurs, nos essais nous ont permis de mettre au point, pour la première fois, un protocole de micropropagation de *J. thurifera* par microbouturage *in vitro*. Nos résultats ont également montré la possibilité de sa multiplication *in vitro* en dépit du fait que l'arbre est décrit en littérature comme étant une plante récalcitrante à la culture *in vitro*. Bien que de nombreuses contraintes naturelles et d'expérimentation (récalcitrance, génotype contaminations, maturation, saison, âge et nature de l'explant) ont été rencontrées, nous avons pu atteindre des taux importants en matière d'induction (65,71 %), de multiplication (100 %), d'enracinement (38,75 %) et d'acclimatation (50 %).

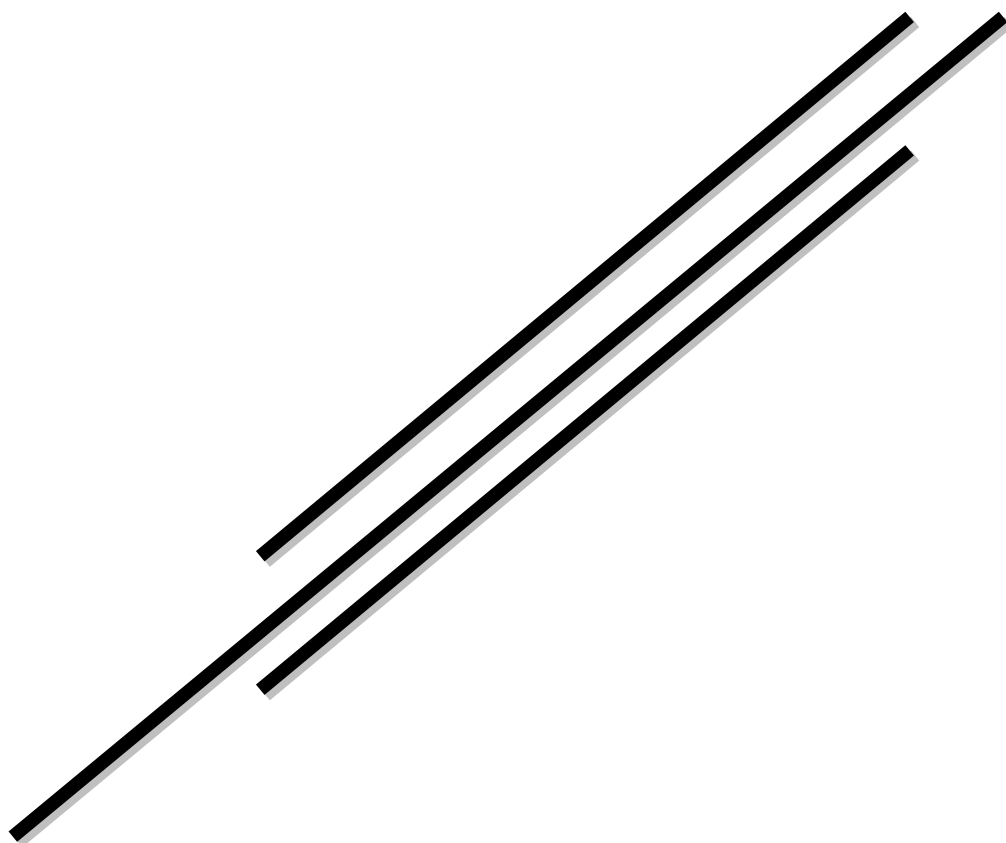
Les premières étapes d'une embryogénèse somatique sont induites et semblent être prometteuses chez le Genévrier thurifère par l'utilisation du milieu de culture WPM dépourvu des régulateurs de croissance. Cependant, les conditions de culture testées n'ont pas permis, encore, l'évolution des structures proembryonnaires au stade où nous avons arrêté nos essais.

Les résultats obtenus dans le cadre de ce modeste travail permettent d'avoir une information capitale sur les milieux et les conditions propices à la régénération *in vitro* de *J. thurifera*, jusqu'ici inconnus, et confirme, une fois encore, que les techniques de culture *in vitro* sont un excellent outil à grand potentiel pour la régénération et la conservation de *J. thurifera*. Le protocole développé et mis au point dans le cadre de notre recherche constitue un moyen pratique aussi bien pour la micropropagation de *J. thurifera* que pour la conservation de cette espèce menacée. Le présent travail doit d'être poursuivi pour une meilleure connaissance du processus de microbouturage de *J. Thurifera* afin de prospecter d'autres pistes d'amélioration et de valorisation de cette espèce emblématique aux multiples usages, rentrant dans le cadre d'un développement durable de la région des Aurès. Malgré les résultats satisfaisants acquis suite de ce travail, la production de plantes entières et de bonne qualité de *J. thurifera* dépend énormément de la réussite de la reprise. Mais il reste de nombreux problèmes à résoudre, pour que la technique soit exploitable en sélection végétale. Par ailleurs, les performances forestières des *in vitro* plants doivent être évaluées sur terrain pour estimer leur conformité avec les pieds mères.

Sur la base de nos travaux, il devrait également être possible d'évaluer le recours à des techniques avancées de multiplication plus performantes. Nous pensons tout particulièrement

à faire germer et pousser les graines in vitro. A la maîtrise de l'embryogénèse somatique. L'objectif à terme serait d'arriver à produire des semences artificielles et leur régénération qui restent encore difficiles au stade actuel. Les embryons somatiques pourront être induits à partir de cellules cultivées en suspension, ce qui rendrait possible une production en fermenteur et réduirait considérablement les coûts de production. Les manipulations pourront être simplifiées par rapport à la micropropagation conventionnelle qui nécessite plusieurs milieux différents pour la mise en culture, le développement des pousses et des racines en vue de l'obtention de plantules complètes à transférer au terrain. De même, les cultures de cals et, plus encore, les cultures de cellules isolées sont propices à l'apparition de mutations géniques pouvant être responsables d'une variabilité des plantes issues de la culture d'embryons somatiques. Le contrôle de cette variabilité permettra de produire des quantités très élevées de plantes à faible coût.

Références bibliographiques



1. **Aitken-Christie J., Singh A.P et Davies H., 1988.** Multiplication of meristematic tissue: a new tissue culture system for *Pinus radiata*. In: Genetic Manipulation of Woody Plants, cds. J.W. Hanover & D.E. Kcathly, Plenum Press, New York. 413-432 Pp.
2. **Anand A et Rao C.S., 2000.** A rapid *in vitro* propagation for *Piper barberi* gamle. a critecally endangered plant. *In vitro* cellular and Developmental Biology Plant. 36: 4 p.
3. **Archiloque A et Borel A., 1965.** Une série résiduelle du Genévrier thurifère dans les Alpes du Sud. Documents pour la carte de la végétation des Alpes III. Laboratoire de biologie végétale de Grenoble et du Lautaret, Université de Grenoble. 119-132 Pp.
4. **Asemota O., Eke C.R et Odewal J.O., 2007.** Date palm (*Phoenix dactylifera* L.) *in vitro* morphogenesis in response to growth regulators, sucrose and nitrogen. African journal of biotechnology. 6 (20). 2353-2357 Pp.
5. **Asthana P., Jaiswal V.Set Jaiswal., 2011.** Micropropagation of *Sapindus trifoliatus* L. and assessment of genetic fidelity of micropropagated plants using RAPD analysis. Acta Physiology Plant. 33: 1821-1829 Pp.
6. **Augé R., Beauchesne G., Boccon –Gibod., Decourtye L., Digat B., Jalouzot R., Minier R., Morand C.L., Reynoirdj P., Strullud G et Vidalie H., 1989.** La culture *in-vitro* et ses application horticoles. Ed Lavoisier. 225p.
7. **Badri W., 2003.** Structure, Dynamique et Fonctionnement des peuplements à Genévrier thurifère (*Juniperus thurifera* L.) dans les Atlas marocains. Thèse de Doctorat en Ecologie végétale, Faculté des sciences Marrakech.Université Cadi Ayyad. 5-7 Pp.
8. **Bakiri N., 2011.**Régénération *in vitro* de la pervenche (*Catharanthus roseus* L.). Mémoire Magister. ENSA El Harrach, Alger. 14-98 Pp.
9. **Baravardi H., Ranjbar G.A., Kamali S et Abadi F., 2014.**Investigation of the effects of growth regulators on callus induction in *Juniperusexcelsa* L. Bull.Env.Pharmacol. Life Sci 4: 80–84 Pp.
10. **Barbero M., Hammoud Aet Quézel P., 1988.**Le Genévrier thurifère dans les Alpes ligures. Bull. Soc. Linn. Provence :39. 75-79 Pp.
11. **Belaizi M et Boxus P., 1995.** *In-vitro* shoots multiplication of Cork.oak (*Quercus suber* L.) influence of different carbohydrates. Bull Rech. Agron. Gembloux 30 : 1-2 Pp.
12. **Belkassir M et Temagoult O., 2001.** Étude d'élevage et du pastoralisme au sein du Parc national de Belezma (Genévrier thurifère). Programme UICN pour l'Afrique du Nord. 21 p.
13. **Bellakhdar J., 1998.** La pharmacopée marocaine traditionnelle, *ibis Press*. 764 p.
14. **Benmahioul B., 2014.** 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. 28- 112 Pp.
15. **Bertaudière V., 1999.** Dendroécologie du genévrier thurifère (*Juniperus thurifera* L.) dans la haute montagne méditerranéenne (Haut Atlas, Maroc) et dans une station xéothermique des Pyrénées centrales (France). Thèse, Université Paul Sabatier, Toulouse. 234 p.

16. **Bertaudiere-Montes V et Montes N., 2004.** Le genévrier. Arles : Editions Actes Sud. 90 p.
17. **Blakesley D., 1994.** Auxin metabolism and adventitious root initiation. In: Davis TD, Haissig BE (Eds.). Biology of Adventitious root formation. Plenum Press. 143-154 Pp.
18. **Blanco Castro E., Casado Gonzalez M.A., Costa Tenorio M., Escribano Bombin R., Garcia Anton M., Genova Fuster M., Gomez Manzanaque A., Gomez Manzanaque F., Moreno Saiz J.C., Morla Juaristi C., Regato Pajares P et Sainz Ollero H., 1997.** Sabinares y enebrales. In *Los bosques ibéricos, una interpretación geobotánica* – Ed. Planeta. 309-343 Pp.
19. **Bonga J.M et Durzan D.J., 1982.** Tissue Culture in Forestry. Martinus Nijhoff/W. Junk, Boston, Massachusetts. 420p.
20. **Bonga J.M et Von Aderkas P., 1992.** *In Vitro* Culture of Trees. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, 236 p.
21. **Bonga J.M., Klimaszewska K. et Von Aderkas P., 2010.** Recalcitrance in clonal propagation, in particular of conifers. *Plant Cell Tissue Organ Cult* 100: 241-254 Pp.
22. **Borel A et Polidori J.L., 1983.** Le Genévrier thurifère (*Juniperus thurifera* L.) dans le parc national du Mercantour (Alpes maritimes). *Bull. Soc. Bot. Fra.*, 130: 227-242 Pp.
23. **Boudy P. 1952.** Guide du forestier en Afrique du Nord. Ed. La maison rustique, Paris. 505 p.
24. **Boudy P., 1958.** Economie forestière nord-africaine: I, II, III. Ed. Larose, Paris. 686- 363 Pp.
25. **Boufis N., 2008.** Régénération par embryogenèse somatique de vitro plants de palmiers dattiers (variété *Degla Beida*) en vue de la résistance contre le Bayoud. Th. Magister, INA, Alger. 86 p.
26. **Bousselmame F., Kenny L et Chlyah H., 2001.** Optimisation des conditions de culture pour l'enracinement *in vitro* de l'arganier (*Argania spinosa* L.). Comptes rendus de l'académie des sciences. 324: 995-1000 Pp.
27. **Boxus. P., 1995.** Multiplication végétative : Micropropagation et embryogénèse somatique in biotechnologie végétales. BV 93. Ed : Cned. Aupelf- Uref, 191p.
28. **Boxus P., Bercetche J., Bollon, Ducas J. P., Jemmali A., Pâque M., Petlard V et Pieron S., 1995.** Multiplication végétale, micropropagation, embryogénèses somatiques. Centre National d'Enseignement à distance (Eds.) 37-44 Pp.
29. **Brhadda N., Aboussalim A et Walali L.D.M., 2003.** Effet du milieu de culture et la lumière sur l'embryogenèse somatique de l'olivier (*Olea europea* L.) cv Picholine marocaine. *Fruit* 85 (3), 1- 14 Pp.
30. **Brown D.C., 1988.** Germplasm determination of *in vitro* somatic embryogenesis in alfalfa. *Hort Sci* 23:526-5 Pp.
31. **Camarero J.J., 2006.** Dendroecología de *Juniperus thurifera* en zonas biogeográfica y climáticamente contrastadas. In : García González D. (coord.), Actas des III Coloquio Internacional sobre los sabinares y enebrales (Género *Juniperus*) : ecología y gestion forestal sostenible. Soria 24 à 26 de Mayo de 2006. Madrid, *Junta de Castilla y Leon y Comunidad de Madrid*, Tomo I : 79-87 Pp.

32. **Campanoni P et Nick P., 2005.** Auxin-dependent cell division and cell elongation. 1-Naphthaleneacetic acid and 2,4-Dichlorophenoxyacetic acid activate different pathways. *Physiol Plant* 137: 939-948 Pp.
33. **Castro M.R., Belo A.F., Afonso A et Zavatieri M.A., 2011.** Micropropagation of *Juniperus navicularis*, an endemic and rare species from Portugal SW coast. *Plant Growth Regul.* 65-223 Pp.
34. **Chaari-Rkhis A., Maalej M et Drira N., 2008.** Utilisation de la micropropagation par bourgeonnement axillaire pour la multiplication des variétés tunisiennes d'olivier. 11ème journées Scientifiques du réseau "Biotechnologies végétales / Amélioration des plantes et sécurité alimentaire" de l'Agence universitaire de la Francophonie (AUF). 30 juin au 3 juillet 2008.
35. **Chabbatou S., 1996.** Le grand livre du forêt marocaine. Ministre délégué auprès du ministre de l'Agriculture, du développement Rural et de la Pêche Maritime Chargé des Eaux et Forêts.
36. **Charniere F., Sotta B., Miginiac E et Hahne G., 1998.** Induction of adventitious shoots or somatic embryos on *in-vitro* cultured zygotic embryos of *Helianthus annuus*: variation of endogenous hormone levels. *Plant Physiology et Biochimestrie* 36(9): 81-94 Pp.
37. **Charras A., 1993.** Quelques réflexions sur le Genévrier thurifère des Baronnies: St André de Rosan (Hautes-Alpes), Laux-Montaux (Drôme), Chauvac (Drôme) ou sur quelques subtilités dans le découpage des départements en 1970.
38. **Chiro L et Blanc C.P., 1997.** Analysis of the distribution of reptiles in the massif of Aurès. Algeria. *Ecologia* 28 (4): 281-292 Pp.
39. **Conrad M., 1986.** Essai sur la répartition de *Juniperus thurifera* L. en Corse, en 1985. *Le Monde des Plantes*, n°423-424. 1-2 Pp.
40. **Coussy B., Garraud L et Godron M., 2013.** Le Genévrier thurifère (*Juniperus thurifera* L.) dans les Préalpes françaises : étude de l'écologie et de la structure des peuplements. *ecologia mediterranea* – Vol. 39 (1) : 33-35 Pp.
41. **Cyr D.R et Klimaszewska K., 2002.** Conifer somatic embryogenesis: II. Applications. *Dendrobiology* 48: 41- 49 Pp.
42. **Datta M.M., Mukherjee P., Ghosh B et Jha T.B., 2007.** *In vitro* clonal propagation of biodiesel plant (*Jatropha curcas* L.). *Current Science* 93: 1438-1442 Pp.
43. **De Klerk G.J., Brugge J. et Marina S., 1997.** Effectiveness of indoleacetic acid, indolebutyric acid and naphthaleneacetic acid during adventitious root formation *in vitro* in *Malus* 'Jork 9'. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 49: 39-44 Pp.
44. **De Klerk G.J., Van Der Krieken W et De Jong J.C., 1999.** The formation of adventitious roots: New concepts, new possibility. *In Vitro Cellular and Developmental Biology-plant*. 35:189-199 Pp.
45. **Deo P.C., Taylor M., Harding R.M., Tyagi A. et Becker D.K., 2010.** Initiation of embryogenic cell suspensions of taro (*Colocasia esculenta* var. *esculenta*) and plant regeneration. *Plant Cell Tissue Organ Cult.* 100: 283-291 Pp.

46. **Deore, A et Johnson T., 2008.** High-frequency plant regeneration from leaf-disc cultures of *Jatropha curcas* L.: an important biodiesel plant. *Plant Biotechnology Reports* 2: 7-11 Pp.
47. **Dhaval A et Rathore T.S., 2010.** Micropropagation of *Embelia ribes* Burm f. through proliferation of adult plant axillary shoots. *In Vitro Cellular and Developmental Biology-plant*. 46:180-191 Pp.
48. **Di Michele M.N et Bray L., 1994.** Multiplication végétative *in vitro* d'*Acacia flava* syn. *Erhenbergiana*. In: AUPELF-UREF (Eds.). Quel avenir pour l'amélioration des plantes?. John Libbey Eurotext, Paris, 195-204 Pp.
49. **Djillali Z., 2008.** Régénération par embryogenèse somatique de *in vitro* plants de palmier dattier (cultivars Deglet Nour et Akerbouch) en vue de la résistance contre le Bayoud. Th.Magister, INA, Alger. 98p.
50. **Dodeman V.L., 1995.** Comparaison des embryogenèses zygotique et somatique chez la carotte (*Daucus carota* L.). Identification et induction de protéines de maturation. Thèse de Doctorat de l'Université de Paris-XI, Orsay.
51. **Dronne S., Jullien F., Caissard J.C et Faure O., 1999.** A simple and efficient method for *in vitro* shoot regeneration from leaves of lavandin (*Lavandula × intermedia* Emeric ex Loiseleur). *Plant Cell Reports*. 18: 429-433 Pp.
52. **Dridi B., 2003.** Système intégré de micropropagation de l'artichaut (*Cynara scolymus* L) thèse Doctorat, Université Gent. 175p.
53. **Druart P.H et Samyn G., 1995.** Carbohydrates and *in-vitro* organogenesis. Bull. Rech. Agron. Gembloux 30(1-2): 1-3Pp.
54. **Dubois J., 1989.** "Biotechnologie et amélioration des plantes: plantes vivrières tropicales," John Libbey Eurotext, Paris, France.151 p.
55. **Dubois T., Guedira M., Dubois J et Vasseur J., 1990.** Direct somatic embryogenesis in root of *Cichorium*: Is callose an early marker? *Ann. Boc.* 65 (5): 539-535 Pp.
56. **Duclercq J., Sangwan-Norreel B., Catterou M et Sangwan R.S., 2011.** De novo shoot organogenesis. *Trends Plant Sci.* 2011 Nov;16 (11):597-606 Pp.
57. **Dumas E et Monteuis O., 1995.** *In vitro* rooting of micropropagated shoots from juvenile and mature *Pinus pinaster* explants: influence of activated charcoal. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. 40: 231-235 Pp.
58. **Durzan D.J etGupta P.K., 1987.**Somatic embryogenesis and poly embryogenesis in Douglas-fir cell suspension cultures. *Plant Sci* 52 : 229-235 Pp.
59. **Edwin F.G., Hall M.A et DE Clerk G.J., 2008.** Plant propagation by tissu culture 3ed édition. Volume 1. The Background, Ed. Springer. 501p.
60. **EL Alaoui El fels M. A., 1991.** Contribution à l'étude des communautés animales frondicoles de la Junipéraie à *Juniperus thurifera* L.: Impact des ravageurs sur le peuplement du genévrier thurifère dans le Haut Atlas de Marrakech (Maroc). Thèse de 3ème cycle, Uni. Cadi Ayyad, Fac. Sci. Marrakech. 129 p.

61. **El Alaoui El Fels M.A et Roques A., 2006.** Les arthropodes associés aux galbules et aux graines des genévriers autochtones dans la partie sud du bassin méditerranéen. *IIIe Coloquio Internacional sobre los sabinares y enebrales (Género Juniperus) : Ecología y Gestión Forestal Sostenible*, Soria (Espagne), 24-26 mai 2006. Tome I : 437-445 Pp.
62. **EL kbiach M.L., 2002.** Culture *in vitro* des bourgeons axillaires de Chêne-liège (*Quercus suber* L.). *Bull. Soc. Pharm. Bordeaux*. 141 (1-4) : 73-88 Pp.
63. **Emberger L., 1930.** La végétation de la région Méditerranéenne. Essai d'une classification des groupements végétaux. *Rev. Géo. Bot.*, 42. 341-404 Pp.
64. **Evans A. S., Mitchell, R. J et Cabin, R. J., 1996.,** Morphological side effects of using gibberellic acid to induce germination: Consequences for the study of seed dormancy. *Am. J. Bot.* 83: 543-549 Pp.
65. **Fehér A., 2008.** The initiation phase of somatic embryogenesis: what we know and what we don't. *Acta Biologica Szegediensis*, vol. 52, n° 1. 53-56 Pp.
66. **Feliachi K., 2006.** Rapport national sur l'état des ressources phylogénétiques pour l'alimentation et l'agriculture. INRAA, Juin 2006.
67. **Ferradous A., Alifriqui M., Hafidi M et Duponnois R., 2013.** Essais de régénération artificielle du Genévrier thurifère (*Juniperus thurifera* L.) *Ecologia Mediterranea* 39 (1) :115-120 Pp.
68. **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) : 139-146 Pp.
69. **Fertin H., 2010.** Etat des lieux et évaluation de la dynamique des thuriféraires dans les Alpes françaises. Mémoire de fin d'études, Agro Paris Tech FIF/ ENGREF Nancy ; Conservatoire botanique national alpin. 103-115 Pp.
70. **Filonova L., Bozhkov P et Von Arnold S., 2000.** Developmental pathway of somatic embryogenesis in *Picea abies* as revealed by time-lapse tracking. *J. Exp. Bot.* 51: 249–264 Pp.
71. **Fortes A.M et Pais M.S., 2000.** Organogenesis from internode-derived nodules of *Humulus lupulus* var. Nugget (Cannabaceae): histological studies and changes in the starch content. *Am J Bot* 87: 971–979 Pp.
72. **Fromard F et Gauquelin T., 1993.** Les formations à Genévrier thurifère au Maroc: un milieu et une espèce en régression. *Unasylva*, Revue Internationale des forêts et des industries forestières, FAO, 172, 44 (1) : 52-58 Pp.
73. **Gaspar T., 1988.** Multiplication végétative des plantes supérieures par culture *in vitro*. Presse polytechnique ROMANDES (Laussane, SUISSE).
74. **Gauquelin T., Badri W., Bertaudière V et Montes N., 2003.** Le Genévrier thurifère (*Juniperus thurifera* L.), un élément menacé de la biodiversité du bassin occidental de la méditerranée. *Naturalia Maroccana* 1 (1) : 87-92 Pp.

75. **Gauquelin T., Badri W., Bertaudière V et Montes N., 1999b.** Le genévrier thurifère (*Juniperus thurifera* L.), un élément menacé de la biodiversité du bassin occidental de la méditerranée. Actes du Colloque « Etat de l'Environnement et Biodiversité des Ecosystèmes Terrestres ». 20-23 Avril 1999, Université Cadi Ayyad de Marrakech. Bulletin de l'Association Marocaine de Biodiversité.
76. **Gauquelin T, Hassani M.I et Lebreton P., 1988.** Le Genévrier thurifère, *Juniperus thurifera* L. (Cupressacées): analyse biométrique et biochimique, position systématique. *Ecologia Mediterranea*14:31- 42 Pp.
77. **Gauquelin T., Bertaudière V., Montès N., Badri W et Asmodé J.F., 1999.** Endangered stands of thuriferous juniper in the western Mediterranean basin: ecological status, conservation and management. *Biodiv.Cons.* 8: 1479-1498 Pp.
78. **Gausсен H., 1968.** Les Gymnospermes, actuelles et fossiles. X. Les Cupressacées. – Travaux du Laboratoire Forestier de Toulouse, n° 10 : 1-326 Pp.
79. **Ge X., Chu Z et Lin Y., 2006.**A tissue culture system for different germplasms of indica rice. *Plant Cell Rep* 25: 392-402 Pp.
80. **George E.F., 1993.** Plant propagation by tissue culture. Part 1. The technology. UK: Exegetics Limited. 3-4 Pp.
81. **Geneve, R.L., 1991.** Seed dormancy in eastern redbud (*Cercis canadensis*). *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 116 : 85-88 Pp.
82. **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.* 106:299-307 Pp.
83. **Gharnit N et Ennabili A., 2009.** Essai préliminaires de culture *in vitro* du caroubier (*Ceratonia siliqua* L.) originaire du Nord-Ouest du Maroc. *Biomatec Echo*, Vol 3, N° 06 : 18-25 Pp.
84. **Gilles P., Marc P., Jean C. L et Christophe P., 2002.** Les biotechnologies chez les arbres forestiers. *Rev. For. Fr.* LIV. 2 : 161- 181 Pp.
85. **Giri C.C., Shyamkumar B et Anjaneyulu C., 2004.** Progress in tissue culture, genetic transformation and applications of biotechnology to trees: An overview. *Trees.* 18:115-135 Pp.
86. **Gómez M.P et Segura J., 1995.** Axillary shoot proliferation in cultures of explants from mature *Juniperus oxycedrus* trees. *Tree physiology* 15: 625-628 Pp.
87. **Grigoriadou K., Vasilakakis M et Eleftheriou E.P., 2002.** *In vitro* propagation on the greek olive cultivar Chondrolia Chalkidikis. *Plant Cell, tissue Org. Cult.* 71 (1): 47- 54 Pp.
88. **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.).
89. **Haggman H., Jokela A., Krajnakova J., Kaupp I., Niemi K. et Aronen T., 1999.** Somatic embryogenesis of scots pine: cold treatment and characteristics of explants affecting induction. *Jou.exp.Bot.* 50 (341) : 1769-1778 Pp.

90. Haissig B.E., Davis T.D et Riemenschneider D.E., 1992. Researching the controls of adventitious rooting. *Physiologia Plantarum*. 84: 310-317 Pp.
91. Hartmann H.T., Kester D.E., Davies F.Tet Geneve R.L., 2001. Plant propagation principles and practices. 6th Edition, Prentice Hall of India private limited, New Delhi.
92. Harry I.S., Pulido C.Met Thorpe T.A., 1995. Plantlet regeneration from mature embryos of *Juniperus oxycedrus*. *Plant Cell Tissue and Organ Culture* 41:75-78 Pp.
93. Hausman J.F., Kevers C et Gaspar T., 1994. Involvement of putrescine in the inductive rooting phase of poplar shoots raised *in vitro*. *Physiologiae Plantarum*. 92: 201-206 Pp.
94. Heller R., 2000. Physiologie végétale 2. Développement. Edition de l'Abrégé DUNOD.366 p.
95. Honda H, Liu C et Kobayashi T., 2001. Large-Scale Plant Micropropagation. *Adv Biochem Eng Biotechnol*.72:157-82. Review.
96. Hopkins W. G., 2003. Physiologie Végétale. Tradition de la 2e édition américaine par Serge Rambour, révision scientifique de Charles-Marie Evrard. Ed : De Boeck Université.514 p.
97. Huang T., Peng S., Dong G., Zhang L et Li G., 2002. Plant regeneration from leaf-derived callus in *Citrus grandis* (Pummelo): effects of auxins in callus induction medium. *Plant Cell Tissue Organ Cult.*, 69: 141-146 Pp.
98. Hyndman S.E., Hsegawa P.MetBressan R.A., 1982. Stimulation of root initiation from cultured rose shoots through the use of reduced concentrations of mineral solts. *Hort. Science* 17: 82-83 Pp.
99. 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*. 24:211-218 Pp.
100. Jimenez M.N., Navarro F.B., Ripollmá., Bocioi D.E et Simón E., 2005. Effect of shelter tubes on establishment and growth of *Juniperus thurifera* L. (Cupressaceae) seedlings in Mediterranean semi-arid environment. *Ann. For. Sci.* 62: 717-725 Pp.
101. Karhu S.T. et Ulvinen S.K., 1995. The effect of different carbohydrates on the rooting of micropropagated apple shoots and their adaptation after transplantation. *Bull Rech Agron , Gembloux* 30(1-2) : 87-101 Pp.
102. Kocer Z.A., Gozen A.G., Onde S et Kaya Z., 2011. Indirect organogenesis from bud explants of *Juniperus communis* L. Effects of genotype, gender, sampling time and growth regulator. *Dendrobiology* 66: 33-40 Pp.
103. 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. 774-798 Pp.
104. Kunert K.J., Baaziz M et Cullis C.A., 2003. Techniques for determination of true- to type date palm (*Phoenix dactylifera* L.) *Emirates journal of agricultural science* n° 15(1): 1-16 Pp.

105. **Lamaoui M., 2015.** Sélection *in vitro* de l'Aganier (*Argania spinosa* L.) tolérant aux stress hydrique et salin et multiplication par microbouturage. These. Doctorat. Université Cadi Ayyad. Marrakech. Maroc. 38- 90 Pp.
106. **Landey R.B., 2013.** Influence of micropropagation through somatic embryogenesis on somaclonal variation in coffee (*Coffea arabica*): assessment of variations at the phenotypical, cytological, genetic and epigenetic level. Thèse de doctorat. Université. Montpellier II. France. 35-49 Pp.
107. **Lathuilliere L., 1994.** Le Genévrier thurifère (*Juniperus thurifera* L.). Monographie. Etude de la thuriferaie de Saint-Crépin. Le Genévrier thurifère dans le Sud- Est de la France. – École nationale du génie rural, des eaux et des forêts (ENGREF) ; Conservatoire botanique national alpin(CBNA). 80 p.
108. **Lelu-Walter M.A., Thompson D., Harvengt L., Sanchez L., Toribio M et Pâques L.E., 2013.** Somatic embryogenesis in forestry with a focus on Europe: state of-the-art, benefits, challenges and future direction. *Tree Genet Genomes* 9: 883-899 Pp.
109. **Lindsey K et Jones M. G. K., 1989.** Plant biotechnology in agriculture, biotechnology series, open university press.
110. **Linné C., 1753.** Species plantarum, exhibentes plantas rite cognitatas, and genera relates, cum Differentiis Specificis, Nominibus Trivialibus, Synonymis Selectis, Locis Natalibus, Secundum systema sexuale digestas. Stockholm. 1200 p.
111. **Litz R.E., Hendrix R.C., Moon P.Aet Chavez V.M., 1998.** Induction of embryogenic Mango cultures as affected by genotype explanting, 2,4-D and embryogenic nurse culture. *Plant Cell Tissue Organ Cult.*, 53, 13-18 Pp.
112. **Lorique N., 2005.** La thuriféraie de Saint-Crépin : proposition d'aménagement conservatoire et tentative d'étude dendroécologique. - Université Paul Sabatier, Toulouse III, Faculté des Sciences ; Formation des ingénieurs forestiers-Ecole nationale du génie rural des eaux et des forêts (FIF-ENGREF) ; Office National des Forêts (ONF). 68 p.
113. **Loureiro J., Capelo A., Brito G., Rodriguez E., Silva S., Pinto G et Santos C., 2007.** Micropropagation of *Juniperus phoenicea* from adult plant explants and analysis of ploidy stability using flow cytometry. *Biologia Plantarum* 51(1): 7-14 Pp.
114. **Lucas Santolaya J.A., 1998.** Gestion, aprovechamiento y desarrollo sostenible de las masas de enebro, jabino o sabina albar (*Juniperus thurifera* L.) en Soria, Montes, n°52: 121-130 Pp.
115. **Machakova I., Zazimalova EetGeorge E.F., 2008.** Somatic embryogenesis. Dordrecht, The Netherlands: Springer.335-354 Pp.
116. **Malik S.K., Chaudhury Ret Kalia R.K., 2005.** Rapid *in vitro* multiplication and conservation of *Garcinia indica*: A tropical medicinal tree species. *Scientia Horticulturae*. 106: 539-553 Pp.
117. **Mandel Ret Alberts D., 2005.** Propagation protocol for One seed and Utah junipers (*Juniperus monosperma* and *Juniperus osteosperma*) *NATIVEPLANTS, FALL* 2005: 263-266 Pp.

118. **Manzanera J.A et Parados J.A., 1990.** Micropropagation of juvenile and adult *Quercus suber* L. plant Cell, Tissue and Organ culture, 21: 1- 8 Pp.
119. **Margara F., 1982.** La multiplication végétative *in-vitro* .Aspects généraux B.T.I.374 L1 Agro 15:701-711 Pp.
120. **Margara F., 1989.** Bases de multiplication végétative : les méristèmes et l'organogenèse. Ed INRA Paris. 262p.
121. **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*. 106:81-91Pp.
122. **Mato M.C et Vieitez A.N., 1986.**Changes in auxin protectors and IAA oxidases during the rooting of chestnut shoots in vitro. *Physiol Plant* 66, 491-494Pp.
123. **McCown B.H. 1988.** Adventitious rooting of tissue cultured plants. In: Davis TM, Haissig BH, Sankhla N (Eds.). Adventitious root formation in cuttings. Discorides Press, Portland, OR.289-302 Pp.
124. **McCown B et Lloyd G.B., 1981.**Woody Plant Medium (WPM) - a mineral nutrients formulation for micro culture of woody plant species. *Horticultural Science*, 16: 453Pp.
125. **Menteuuis O., 2016.** Micropropagation and production of forest trees, Vegetative Propagation of Forest Trees, National Institute of Forest Science (NIFoS). Seoul, Korea. 32-55 Pp.
126. **Meynier V., 1985.** Propagation in vitro de noyers sélectionnés (*Juglan regia*, *Juglan nagraxregia*): Culture de noeuds, culture de méristèmes. Thèse doctorat. Université de Nancy I, 115p.
127. **Montes N., 1999.** Potentialités, dynamique et gestion d'une formation arborée à genévrier thurifère (*Juniperus Thurifera* L.) Des atlas marocains: le cas de la vallée de l'Azzaden. Thèse de doctorat, université toulouse le mirail ; UFR Sciences-Economie-Société Département Géographie-Aménagement, 10-52 Pp.
128. **Murashige T et Skoog F., 1962.** A Revised Medium for Rapid Growth and Bio Assays with Tobacco Tissue Cultures. *Physiologia Plantarum* 15.473-497 Pp.
129. **Namasivayam P., 2007.** Acquisition of embryogenic competence during somatic embryogenesis. *Plant Cell. Tissue Organ. Cult.* 90: 1-8 Pp.
130. **Negussie A., 1997.**In vitro induction of multiple buds in tissue culture of *Juniperus excelsa*. *For Ecol Manage* 98: 115-123 Pp.
131. **Neumann K.H., Kumar A et Imani J., 2009.** Plant Cell and Tissue Culture- A Toolin Biotechnology: Basics and Application. Ed. Springer, 293p.
132. **Noronha C., Romano et Martin-Laução M.A., 1992.** Influence of growth regulators on shoot proliferation in *Quercus suber* L. *Ann. Bot.*, 70, 513-536 Pp.
133. **Nin S., Schiff S et Bennici A., 1994.** *In vitro* propagation of *Artimisia absinthium* L. *Adv. Hort. Sci:* 8: 633- 640 Pp.
134. **Nin S., Schiff S., Bennici A et Magherini R. 1994.,** *In vitro* propagation of *Artimizia absinthium* L. *Adv.Hort.Sci.* 8 : 145-147 Pp.

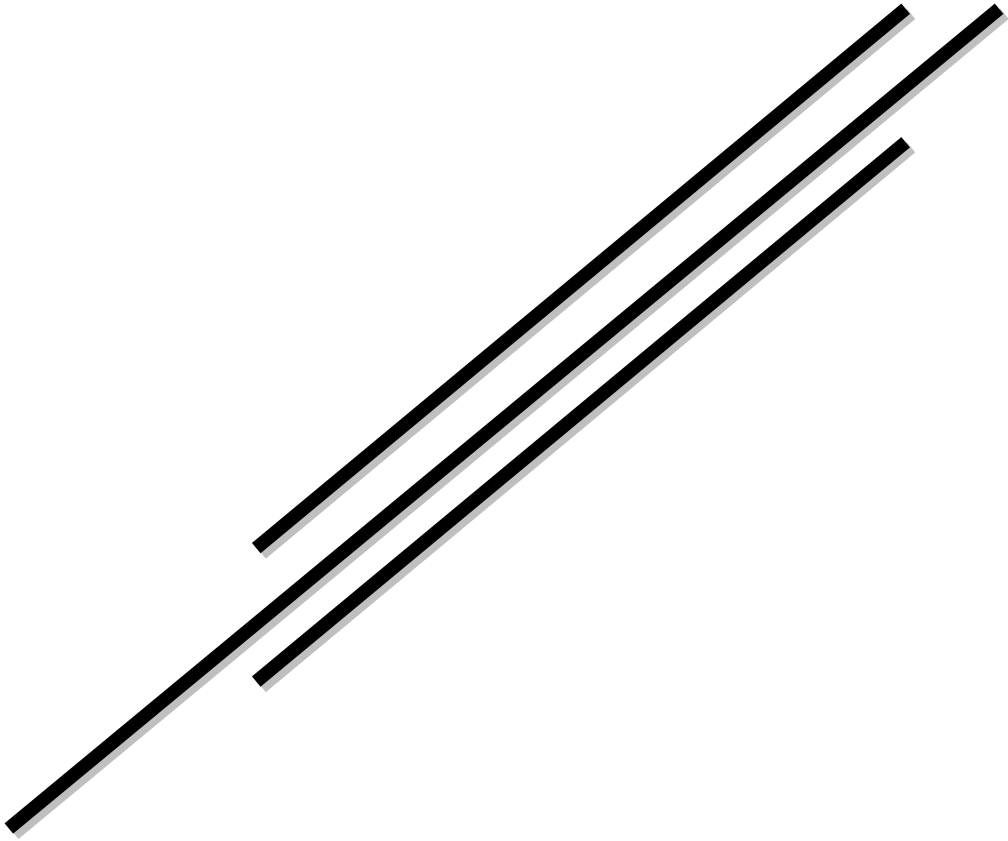
135. **Nouaim R., Mangin G., Breuil M.C et Chaussod R., 2002.**The argan tree (*Argania spinosa*) in Morocco: Propagation by seeds, cuttings and *in vitro* techniques. *Agroforestry Systems*.54:71-81 Pp.
136. **Oliveira P., Barriga J., Cavaleiro C., Peixe A et Potes A.Z., 2003.** Sustained *in vitro* root development obtained in *Pinus pinea* L. inoculated with ectomycorrhizal fungi. *Forestry* 76 : 579-587 Pp.
137. **Ordas R.J., Rodriguez A., Rodriguez R et Sanchez R., 1985.** Desarrollo de técnicas de cultivo "in vitro" para la micropropagacion de variedades de manzanasidrera. *EdafolAgrobactecnol.* 43: 905-917 Pp.
138. **Ostrolucka T.K., et Bezo M.**Utilisation of meristem cultures in propagation of oak (*Quercus* sp.). *Genetica polonica*, 35 : 161-169 Pp.
139. **Ouhammou A., 1991.** Aperçu sur l'étagement de la végétation du bassin de l'Ourika (Haut-Atlas de Marrakech, Maroc) ; Troisième session extraordinaire de Botanique méditerranéenne. Bulletin Mensuel de la Société Linéenne de Lyon, 60 (10), 401-405 Pp.
140. **Ozyigit I.I., Kahraman M.V et Ercan O., 2007.**Relation between explants age, total phenols and regeneration response of tissue cultured cotton (*Gossypium hirsutum* L.). *African Journal of Biotechnology* 6, 1, 3-8.*Physiologiae Plantarum.* 34: 299-305 Pp.
141. **Pan M.J et Staden J.V., 1998.**The use of charcoal *in vitro* culture: A review. *Plant Growth Regulators.* 26:155-163 Pp.
142. **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: 389-393 Pp.
143. **Park Y.S., Pond S.E et Bonga J.M., 1994.**Somatic embryogenesis in white spruce (*Picea glauca*): genetic control in somatic embryogenesis exposed to storage, maturation treatments, germination, and cryopreservation. *Theoretical and Applied Genetics* 89: 742-750 Pp.
144. **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.* 100:263-271Pp.
145. **Phulwaria M., Ram K., Gahlot P et Shekhawat N.S, 2011.** Micropropagation of *Salvadora persica*- A tree of arid horticulture and forestry. *New Forests.* 42:317-327 Pp.
146. **Phulwaria M., Rai M.K., Harish., Gupta A.K., Ram K et Shekhawat N.S., 2012.** An improved micropropagation of *Terminalia bellirica* from nodal explants of mature tree.*Acta P.*
147. **Pritchard H.W., Moat J.F., Ferraz J.B.S., Marks T.R., Luis J., Camargo C., Nadarajan J et Ferraz I.D.K., 2014.** Forest Ecology and Management Innovative approaches to the preservation of forest trees. *For Ecol Manage* 333: 88–98 Pp.
148. **Purkayastha J., Sugla T., Paul A., Solleti S. K., Mazumdar P., Basu A., Mohommad A., Ahmed Z et Sahoo L., 2010.** Efficient *in vitro* plant regeneration from shoot apices and gene transfer by particle bombardment in *Jatropha curcas*. *Biologia Plantarum* 54. 13-20 Pp.

149. **Quezel P et Médail F., 2003.** Ecologie et biogéographie des forêts du bassin méditerranéen. Paris, Elsevier, collection «Environnement». 573p.
150. **Quiroz-Figueroa F.R., Rojas-Herrera R., Galaz-Avalos R.M et Loyola-Vargas V.M., 2006.** Embryo production through somatic embryogenesis can be used to study cell differentiation in plants. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* 86:285-301Pp.
151. **Rabotavao A.S., 2004.** Mise au point de protocoles expérimentaux pour la germination et la regeneration "in vitro" de *Kalanchoe synsepala* (Baker). Mémoire. DEA. ESSA. Université d'Antananarivo.
152. **Ragonezi C., Klimaszewska K., Castro M.R., Lima M., Oliveira P et Zavattieri M.A., 2010.** Adventitious rooting of conifers: Influence of physical and chemical factors. *Trees - Structure and Function* 24: 975-992 Pp.
153. **Rai M.K., Jaiswal V.S et Jaiswal U., 2009.** Shoot multiplication and plant regeneration of guava *Psidium guajava* L. from nodal explants of *in vitro* raised plantlets. *Journal of Fruit and Ornamental Plant Research.* 17: 29-38 Pp.
154. **Rai M.K., Asthana P., Jaiswal V.S et Jaiswal U., 2010.** Biotechnological advances in guava (*Psidium guajava* L.): Recent developments and prospects for further research. *Trees Structure and Function.* 24:1-12 Pp.
155. **Ramanankierana H., 2000.** Régénération *in vitro* de *Catharantus lanceus*. Essai de la variation somaclonale. Mém DEA, Biotech, Microbio, Fac des Sciences. Tana, 71 p.
156. **Rameau J.C., Manson D et Dumé G., 1993.** Flore Forestière Française (Guide écologique illustré), Tome 2: Montagnes. Ed. Inst. Pour le Développement Forestier, Paris et Ecole Nationale du Génie Rural, des Eaux et des Forêts, Nancy. 241 p.
157. **Ramesh M., Umate P., Rao K.V et Sadanandam A., 2005.** Micropropagation of *Terminalia bellirica* Roxb. -A sericulture and medicinal plant. *In Vitro Cellular and Developmental Biology Plant.* 41:320-323 Pp.
158. **Riffaud J.L et Cornu D., 1981.** Utilisation de la culture *in vitro* pour la multiplication de Merisiers adultes (*Prunus asiium* L.) sélectionnés en forêt. *Agronomie*, 1 (8): 633-640 Pp.
159. **Roques A., Raimbault J.P et Goussard F., 1984.** La colonisation des cônes et galbules de genévriers méditerranéens par les insectes et acariens et son influence sur les possibilités de régénération naturelle de ces essences. *Ecologia Mediterranea*, X (1-2). 147-169 Pp.
160. **Saadi A., 1991.** Régénération de plantes de pois *Pisum sativum* L par embryogenèse somatique .Thèse de doctorat. Paris Grignon. 162p.
161. **Sahoo Y et Chand P.K., 1998.** Micropropagation of *Vitex negundo* L., a woody aromatic medicinal shrub, through high-frequency axillary shoot proliferation. *Plant Cell Reports.* 18: 301-307 Pp.
162. **Saïdi R., El bouzdoudi B., Kbiach M.B., Lamarti A et Maouni A., 2015.** Effets des macroéléments et des auxines sur la micropropagation du Caroubier (*Ceratonia siliqua* L., *Leguminosae*) par culture d'apex. *J. Mater. Environ. Sci.* 6 (8) : 2330-2337 Pp.

163. **Salaj T., Matusova R et Salaj J., 2015.** Conifer somatic embryogenesis – an efficient plant regeneration system for theoretical studies and mass propagation. *Dendrobiologie*. 74 : 69–76 Pp.
164. **Sanchez M.C., San-Jose M.C., Ballester A et Vieitez A.M., 1996.** Requirements for *in vitro* rooting of *Quercus robur* and *Quercus rubra* shoots derived from mature trees. *Tree Physiology*. 16: 673-680 Pp.
165. **Sasson A, 1993.** Biotechnologies in developing countries: Present and future. UNESCO Publishing, Paris.764p.
166. **Sarika Set Meenakshi B., 2009.** Algal filtrate: a low cost substitute to synthetic growth regulators for direct organogenesis of embryo culture in *Jatropha curcas* (Ratanjyot). *Acta Physiologiae Plantarum* 31, 1205-1212 Pp.
167. **Sebastian C., 1958.** Essais de germination de quatre espèces du genre *Juniperus*. Bulletin de la Société des Sciences Naturelles et Physiques du Maroc. 115-122 Pp.
168. **Seblework B., 2009.**Somatic Embryogenesis in *Juniperus Procera* using *Juniperus Communis* as a Model.MEJS, Volume 1 (2):95-105 Pp.
169. **Semal J., 1998.** Reproduire à l'identique : Mythe et réalité .Cahier Agriculture (7): 6-8 Pp.
170. **Shekhawat N.S., Rathore T.S., Singh R.P., Deora N.Set Rao S.R., 1993.** Factors affecting *in vitro* clonal propagation of *Prosopis cineraria*. *Plant Growth Regulation*. 12: 273-280 Pp.
171. **Silveira C.E et Cotignies A., 1994.**Period of harvest sprouting ability of cuttings and *in vitro* plant regeneration in *Fraxinus excelsior*. *Can. J. Bot.* 72 : 261-267 Pp.
172. **Skirvin R.M., Cogner M., Norton A.M ., Motoika S et Gorvin D ., 2000.** Somaclonal variation : do we know what causes it . Agbiotech Net.V12 ABNO48.
173. **Skoog F et Miller C.O., 1957.** Chemical regulation of growth and organ formation in plant tissues cultured *in vitro*. *Symposia of the Society for Experimental Biology*. 11:118-130 Pp.
174. **Tripathi M et Kumari N., 2010.** Micropropagation of a tropical fruit tree *Spondias mangifera* Willd. through direct organogenesis. *Acta Physiologiae Plantarum*. 32: 1011-1015 Pp.
175. **UICN-PACO., 2008.** Promouvoir l'efficacité en Afrique Centrale et Occidentale, Rapport annuel, Ouagadougou, Burkinafaso. 40p.
176. **Vieitez A.M., Corredoira E., Ballester A., Munoz F., Duran J et Ibarra M., 2009.** *In vitro* regeneration of the important North American oak species *Quercus alba*, *Quercus bicolor* and *Quercus rubra*. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*. 98:135-145 Pp.
177. **Von Aderkas PetBonga J.M., 2000.**Influencing micropropagation and somatic embryogenesis in mature trees by manipulation of phase change, stress and culture environment.*Tree Physiol* 20: 921-928 Pp.
178. **Von Arnold S., Sabala I., Bozhkov P., Dyachok J et Filonova L., 2002.** Developmental pathways of somatic embryogenesis. *Plant Cell Tiss.Organ.Cult.*69: 233-249 Pp.

179. **WalaliLoudiyi D., 1993.** La multiplication *in vitro* des espèces ligneuses : état actuel et perspectives de développement. Le progrès génétique passe-t-il par le repérage et l'inventaire des gènes ? Ed. AUPELF-UREF. John Libbey Eurotext, Paris 1993.399-409 Pp.
180. **Walker D.RetParrott A.W., 2001.** Effect of polyethylene glycol and sugar alcohols on soybean somatic embryo germination and conversion.Plant Cell Tissue and organ Culture 64: 55- 62 Pp.
181. **Yakoub-Bougdal S., Bonaly J., Barque J.P., Bennadji A et Gaouar A., 2003.** Organogénèse *in vitro* des microboutures de l'Olea europea L., prélevées à différentes stades physiologiques. The XII world forestry congress, Quibec city, Canada.
182. **Yang XetZhang X., 2010.** Regulation of somatic embryogenesis in higher plants.Critical Reviews in Plant Sciences, 29: 36-57 Pp.
183. **Zaid A., 2002.** Production industrielle de plants de palmier dattier par voie embryogène aux Emirats Arabe Unis. Workshop palmier dattier. Marrakech ; Maroc ; 12-15 Décembre 2002.
184. **Zaidi M.A., Khan S etJahan N., 2012.** Micropropagation and conservation of three juniperus species (cupressaceae). *Pak J Bot* 44:301-304 Pp.
185. **Ziani S., 2014.** Multiplication de l'Arganier (*Argania spinosa* L. Skeels) par vitro semis, microbouturage, microgreffage, organogénèse et/ou embryogénèse somatique. Mémoire. Magister. Unversité Chelef. 28-57 Pp.
186. **Zimmerman R.H., 1984.** Rooting apple cultivars *in vitro*: Interactions among light, temperature, phloroglucinol and auxin. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. 3:301-311 Pp.
187. **Zimmerman R.H et Fordham I., 1985.** Simplified method for rooting apple cultivars *in vitro*.Journal of the American Society for Horticultural Science.110: 34-38 Pp.
188. **Zryd J.P., 1988.** Culture des cellules, des tissus et organes végétaux. Ed. Presse. Polytechnique romande. Suisse. 308p.

Annexes



Annexe 1. Analyse de la variance de nombre de pousses sur le milieu WPM

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	3873,480 ^a	4	968,370	4,303	,005
Intercept	88704,720	1	88704,720	394,134	,000
Milieu	,000	0	.	.	.
Concentration	3873,480	4	968,370	4,303	,005
Milieu * Concentration	,000	0	.	.	.
Error	10127,800	45	225,062		
Total	102706,000	50			
Corrected Total	14001,280	49			

Annexe 2. Analyse de la variance de nombre de branches sur le milieu WPM

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	251,518 ^a	29	8,673	13,734	,000
Intercept	336,027	1	336,027	532,097	,000
Milieu	115,582	2	57,791	91,512	,000
Concentration	88,306	9	9,812	15,537	,000
Milieu * Concentration	47,630	18	2,646	4,190	,000
Error	189,455	300	,632		
Total	777,000	330			
Corrected Total	440,973	329			

Annexe 3. Analyse de la variance de la longueur des pousses sur le milieu WPM

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	3,091 ^a	4	,773	5,215	,002
Intercept	267,730	1	267,730	1806,544	,000
Milieu	,000	0	.	.	.
Concentration	3,091	4	,773	5,215	,002
Milieu * Concentration	,000	0	.	.	.
Error	6,669	45	,148		
Total	277,490	50			
Corrected Total	9,760	49			

Annexe 4. Analyse de la variance de nombre de pousses sur le milieu MS

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	5764,000 ^a	4	1441,000	5,578	,001
Intercept	59512,500	1	59512,500	230,381	,000
Milieu	,000	0	.	.	.
Concentration	5764,000	4	1441,000	5,578	,001
Milieu * Concentration	,000	0	.	.	.
Error	11624,500	45	258,322		
Total	76901,000	50			
Corrected Total	17388,500	49			

Annexe 5. Analyse de la variance de nombre de branches sur le milieu MS

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	145,120 ^a	4	36,280	3,313	,018
Intercept	2478,080	1	2478,080	226,286	,000
Milieu	,000	0	.	.	.
Concentration	145,120	4	36,280	3,313	,018
Milieu * Concentration	,000	0	.	.	.
Error	492,800	45	10,951		
Total	3116,000	50			
Corrected Total	637,920	49			

Annexe 6. Analyse de la variance de la longueur des pousses sur le milieu MS

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	2,557 ^a	4	,639	5,513	,001
Intercept	173,725	1	173,725	1498,202	,000
Milieu	,000	0	.	.	.
Concentration	2,557	4	,639	5,513	,001
Milieu * Concentration	,000	0	.	.	.
Error	5,218	45	,116		
Total	181,500	50			
Corrected Total	7,775	49			

Annexe 7. Analyse de la variance de nombre de pousses sur le milieu WPM en 2^{ème} culture.

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	14454,240 ^a	4	3613,560	4,251	,012
Intercept	175896,360	1	175896,360	206,908	,000
Milieu	,000	0	.	.	.
Cons	14454,240	4	3613,560	4,251	,012
Milieu * Cons	,000	0	.	.	.
Error	17002,400	20	850,120		
Total	207353,000	25			
Corrected Total	31456,640	24			

Annexe 8. Analyse de la variance de nombre de branches sur le milieu WPM en 2^{ème} culture

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	136,960 ^a	4	34,240	3,153	,037
Intercept	3271,840	1	3271,840	301,274	,000
Milieu	,000	0	.	.	.
Cons	136,960	4	34,240	3,153	,037
Milieu * Cons	,000	0	.	.	.
Error	217,200	20	10,860		
Total	3626,000	25			
Corrected Total	354,160	24			

Annexe 9. Analyse de la variance de la longueur des pousses sur le milieu WPM en 2^{ème} culture.

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	3,094 ^a	4	,774	9,792	,000
Intercept	173,186	1	173,186	2192,223	,000
Milieu	,000	0	.	.	.
Cons	3,094	4	,774	9,792	,000
Milieu * Cons	,000	0	.	.	.
Error	1,580	20	,079		
Total	177,860	25			
Corrected Total	4,674	24			

Annexe 10. Analyse de la variance des pousses survivant sur le milieu WPM en 2^{ème} culture

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	105,040 ^a	4	26,260	2,108	,118
Intercept	3294,760	1	3294,760	264,427	,000
Milieu	,000	0	.	.	.
Cons	105,040	4	26,260	2,108	,118
Milieu * Cons	,000	0	.	.	.
Error	249,200	20	12,460		
Total	3649,000	25			
Corrected Total	354,240	24			

Annexe 11. Analyse de la variance de nombre des racines

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	4,083	1	4,083	1,960	,192
Within Groups	20,833	10	2,083		
Total	24,917	11			

Annexe 12. Analyse de la variance de la longueur des racines.

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	,030	1	,030	,213	,654
Within Groups	1,407	10	,141		
Total	1,437	11			

Annexe 13. Analyse de la variance de nombre des calcs sur WPM.

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	92,624 ^a	9	10,292	17,225	,000
Intercept	378,562	1	378,562	633,593	,000
Milieu	,000	0	.	.	.
Cons	92,624	9	10,292	17,225	,000
Milieu * Cons	,000	0	.	.	.
Error	59,748	100	,597		
Total	527,000	110			
Corrected Total	152,373	109			

Annexe 14. Analyse de la variance de nombre des cals sur MS.

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	16,145 ^a	9	1,794	2,764	,006
Intercept	34,945	1	34,945	53,838	,000
Milieu	,000	0	.	.	.
Cons	16,145	9	1,794	2,764	,006
Milieu * Cons	,000	0	.	.	.
Error	64,909	100	,649		
Total	116,000	110			
Corrected Total	81,055	109			

Annexe 15. Analyse de la variance de nombre des cals sur N6.

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	25,236 ^a	9	2,804	4,202	,000
Intercept	42,036	1	42,036	62,997	,000
Milieu	,000	0	.	.	.
Cons	25,236	9	2,804	4,202	,000
Milieu * Cons	,000	0	.	.	.
Error	66,727	100	,667		
Total	134,000	110			
Corrected Total	91,964	109			

Résumé

Juniperus thurifera L. est une espèce de la famille des *Cupressaceae*. En Algérie, elle est endémique des montagnes des Aurès et est menacée d'extinction en raison de plusieurs facteurs biotiques. Cependant, la faible régénération et la pénurie de graines viables sont les causes principales. En outre, le manque d'un plan de gestion intégrée de cet arbre accentue cette situation. Pour contribuer à sa préservation, nous avons développé un protocole de micropropagation *in vitro*. Les microboutures avec bourgeons axillaires ont été cultivées sur différents milieux additionnés de régulateurs de croissance végétale avec différentes combinaisons et concentrations. Le plus grand nombre de pousses et de branches, régénérées à partir de pousses originales, a été obtenu sur Woody Plants Medium (WPM) additionné de 6-benzylaminopurine (BAP) ($0,5 \text{ mg L}^{-1}$) et de 2,4-dichlorophénoxyacétique (2,4D) ($0,25 \text{ mg L}^{-1}$). Les meilleurs taux d'allongements des pousses ont été obtenus sur (WPM) additionné de $0,5 \text{ mg L}^{-1}$ de (BAP) et de $0,25 \text{ mg L}^{-1}$ ou 1 mg L^{-1} de 2,4 D. La subculture a eu un taux plus élevé de nombre de pousses et de branches que celles de la première culture. Le taux d'enracinement le plus élevé, 38,75 %, a été obtenu avec des pousses cultivées sur le milieu $\frac{1}{2}$ MS additionné de 5 mg L^{-1} de l'acide indol-3butyrique (AIB) et de l'acide acétique naphthalène (ANA). De même, le nombre de racines le plus élevé ainsi que la longueur de racines ont été produits en milieu $\frac{1}{2}$ MS complété par l'AIB et l'ANA (5 mg L^{-1} pour chacun). Pendant le transfert des plantules à l'acclimatation, des taux élevés de pertes végétales, environ 50 %, se sont produits. La deuxième partie de l'expérience a montré que la meilleure induction des calls à partir des pousses a été observée sur un milieu WPM complété par le BAP et le 2,4 D avec soit la combinaison ($0,5 \text{ mg L}^{-1} + 0,25 \text{ mg L}^{-1}$) ou ($0,25 \text{ mg L}^{-1} + 0,25 \text{ Mg L}^{-1}$) et l'initiation d'une embryogenèse somatique a été induite et semble être prometteuses chez le Genévrier thurifèresuite à l'utilisation du milieu de culture WPM dépourvu des régulateurs de croissance. Cependant, les conditions de culture *in vitro* testées n'ont pas permis l'évolution des structures proembryonnaires au stade où nous avons arrêté nos essais. Le protocole développé et mis au point dans le cadre de notre recherche constitue un moyen pratique aussi bien pour la micropropagation de *J. thurifera* que pour sa conservation.

Mots clé : *Juniperusthurifera*, calls, conservation, régénération, culture *in vitro*, microbouturage.

المخلص:

العراة الباخوري هو كوبريساسي متوطن في جبال الأوراس، شرق الجزائر، وهو نوع من الأنواع المهددة بالانقراض بسبب ندرة البذور القابلة للإنتاش. وعلاوة على ذلك، هذا النوع مهدد بعوامل حيوية أخرى، وعدم وجود تسيير فعال لهذه الشجرة الهامة هي من العوامل التي تسرع الانقراض. في هذه الدراسة تم استنساخ بروتوكول نظام التكاثر الدقيق باستعمال البراعم الجانبية التي تم زرعها في أوساط مختلفة ومكملة بأنظمة النمو بتركيزات وتركيبات مختلفة. تم $2,4D$ ملغ/ل من $0,25$ و BAP ملغ/ل من $0,5$ الحصول على أكبر عدد من البراعم والفروع في الوسط PMW و 1 ملغ/ل من $D2,4$ و $0,25$ و BAP ملغ/ل من $0,5$ مكملاً ب WPM أفضل نسبة استطالة للبراعم تمت في الوسط وقد تم تحقيق مزيد من التكاثر في عملية الزرع المتكررة للبراعم.

علاوة على ذلك تم التوصل إلى تجذير البراعم في المختبر بنسبة (38,75%) في الوسط (SM) مع نصف تركيز قوة الأملاح مع زيادة 5 ملغ/ل من حمض النفتالين AAN و BIA. النباتات تأقلمت بنسبة 50% بعد تحويلها إلى التربة. ثانياً بالنسبة للتكاثر العضوي، أفضل النتائج المتعلقة بالكالوسات المتحصل عليها من أجزاء البراعم لوحظ في الوسط MPW مكملاً ب PAB و $D2,4$ مع التركيبة ($0,5$ ملغ/ل + $0,25$ ملغ/ل) أو ($0,25$ ملغ/ل + $0,25$ ملغ/ل).

وقد استحدثت عملية التطور الجنيني الجسدي ويبدو أنها واعدة عند العراة الباخور يفياً عقاباً استخدام وسط ومعدلاً، فإنظر وفالاستزراع في المختبر لمتسمح بتطور التراكيب الجنينية في المراحل حيث توفقتنا اختبار اتنا. إن البروتوكول الذي تم تطويره كجزء من بحثنا هو وسيلة عملية لتكامل الإكثار الدقيق للعراة الباخور يوحفظه.

الكلمات الدالة: العراة الباخوري، الكالوسات، المحافظة، تجديد، الزراعة في المختبر