

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية
REPUBLIQUE ALGERIENE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE

وزارة التعليم العالي و البحث العلمي
MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR
ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE

المعهد الوطني للفلاحة الحراش
INSTITUT NATIONAL AGRONOMIQUE EL HARRACH

THESE

Pour l'obtention du diplôme de DOCTEUR D'ETAT
En Sciences Agronomiques

Présentée par :

BENREBIHA FATIMA ZOHRA

Etude de différents milieu de culture, de substances de croissances et de salinité sur la morphogenèse de l'*Atriplex halimus*

Soutenue le : 01-10-2003

Devant le jury composé de :

Mr Z.BOUZNAD

Mr A.BOUTEKRABT

Mr Y.DAOUD

Mr H.ABDELKRIM

Mr L.KHELIFI

Professeur

Professeur

Professeur

Maître de conférence

Maître de conférence

Président

Directeur de thèse

Examineur

Examineur

Examineur

REMERCIEMENTS

Au terme de ce travail, je tiens à remercier toutes les personnes qui de près ou de loin m'ont aidé à le réaliser

Je tiens à exprimer ma profonde reconnaissance à Monsieur le Professeur A.BOUTEKRABT, pour l'intérêt qu'il a porté à mon travail ; la synthèse de ce travail n'aurait pas pu être réalisée sans son aide et son esprit critique ; je le remercie sincèrement pour les conseils et les encouragements qu'il m'a continuellement donné.

Je remercie Monsieur Le Professeur J.L .GUIGNARD pour sa gentillesse et son accueil chaleureux lors de mon séjour dans son laboratoire à Châtenay-Malabry (Faculté de pharmacie, Université de Paris XI).

Mes remerciements vont également à Monsieur Le Professeur P.BINET de l'université de Caen qui nous a fait part de sa longue expérience sur le problème de la salinité chez les *Atriplex*.

Je tiens à exprimer ma profonde reconnaissance à Madame Y.POURRAT pour l'intérêt qu'elle a porté à mon travail, pour ses conseils et son amitié, je la remercie sincèrement.

Je suis particulièrement reconnaissante à l'honneur que me fait Monsieur Le Professeur Z.BOUZNAD d'avoir bien voulu présider le jury.

Je remercie vivement Monsieur Y.DAOUUD professeur, H.ABDELKRIM maître de conférence et L.KHELIFI Maître de conférence de l'Institut National d'Agronomie d'EL-Harrache qui ont bien voulu examiner mon travail et participer au jury.

Que FAIROUZ, FATIMA et CHERIFA trouvent ici l'expression de ma profonde gratitude pour leur encouragement et leur amitié.

AVANT – PROPOS

Ce travail a bénéficié d'une aide financière de :

- International foundation for science, Stockholm (Sweden).
- Deux projets C.E.E. (STD3 et INCO-DC), Bruxelles.
- Projets M.E.R.S.

RESUME

Les *Atriplex* de part leur pérenité et leur résistance aux contraintes du milieu notamment à la salinité et à la sécheresse peuvent constituer dans les régions aride et semi-aride un moyen de mise en valeur et lutte contre la désertification. La diminution des stocks de semences dans le sol par divers facteurs, notamment les aléas climatiques et l'inhibition de la germination des graines rendent la propagation par semis de cette espèce à la fois faible et aléatoire.

L'expérimentation a porté sur la recherche d'un milieu de culture adéquat pour une meilleure micropropagation. L'effet des hormones de croissance (Auxines, cytokinines et 2-4D) et de la salinité ont également été testés

Les résultats obtenus ont montré que le milieu GAMBORG, favorise l'induction à la callogenèse et le milieu MURASHIGE et SKOOG, favorise la production foliaire, la longueur de tige et de la racine principales.

L'aptitude des différents types d'explants à la callogenèse et la formation de cals embryogènes varie en fonction des concentrations en auxines et cytokinine combiné et également en fonction du type d'auxine et cytokinine utilisé, les meilleures combinaisons qui ont permis aux différents explants d'exprimer leur pouvoir callogène sont l'AIA- Kinetine et 2,4-D-Kinetine pour le milieu GAMBORG et 2,4-D-Kinetine pour le milieu MURASHIGE et SKOOG.

L'étude des diverses concentrations de sel sur la croissance des plantules *in-vitro* et *in-vivo*, ont révélé que la concentration 5g/l de NaCl stimule la croissance des différents paramètres étudiés (Nombre de paire de feuilles, longueur de la tige et de la racine principale), mais à partir de 20g /l de NaCl la croissance diminue considérablement.

La teneur en proline augmente progressivement en fonction de la concentration en NaCl et varie selon des organes la plus grande concentration est obtenue à 40g/l.

mots clefs : *Atriplex halimus* - in vitro – embryogenèse somatique- stress salin

SUMMARY

The Atriplex of part their everlastingness and their resistance forced the middle including salinity and drought may be in the arid and semi-arid a means of development and the fight against desertification. The decline in stocks of seeds in the soil by various factors, including weather and the inhibition of germination of seeds make semis by the spread of this species in both weak and uncertain.

The experiment was focused on finding a culture medium suitable for a better micropropagation. The effect of growth hormones (Auxines, cytokinins and 2-4D) and some saltiness has also been tested.

The gotten results showed that the GAMBORG middle, promotes the induction callogenesis and the MURASHIG and SKOOG middle, encourage foliar production, the length of stem and root of the main root.

The faculty of the defers types of explants the callogenesis and training cals embryogènes varies depending on concentrations auxins and cytokinin combined and also depending on the types of auxin and cytokinin used, the best combinations that have enabled different explants to express their power callogène are AIA-Kinetine and 2,4-D-Kinetine for mid GAMBORG and 2,4-D-Kinetine for mid MURASHIGE and SKOOG.

The various concentration survey in salt one the growth of seedlings in-vitro and in vivo, revealed that the concentration 5g / l NaCl stimulates the growth of various parameters studied (Number of even leaf, length of the stem and the main root), but from 20g / l NaCl growth decreases considerably.

The content of proline increase progressively according to the concentration of NaCl and vary according to the organs. The biggest concentration is gotten to 40g/l.

Keys words : Atriplex halimus - in vitro – somatic embryogenesis- saline stress

المخلص

يعتبر نبات *Atriplex halimus* عنصر مهم مكافحة ظاهرة التصحر في مناطق السهوب وذلك راجع لمقاومته للملوحة و جفاف التربة, لذا تناولنا في دراستنا هذه تأثير هختلف المحاليل على نمو هذه النبة.

التجارب كان لها دور للبحث على وسط ملائم لنمو هذه النبة و أتر هرمونات النمو (الأوكسين و سيتوكينين و 2,4-D) و كذلك الملوحة.

النتائج المحصل عليها برهنة أن محلول (GAMBORG) يحفز النمو الكاليجوني بينما محلول MURACHIGE و SKOOG يحفز الأنتاج الورقي و طول السيقان و الجذر الرئيسي.

تجارب مختلف عينات النبة للكالوجيناز ينغير بدلالة النراكيز من الأوكسين و سيتوكينين و مرتبطة أيضا بنوع الأوكسين و سيتوكينين المستعملين, و أحسن تركيبة التي سمحت لمختلف عينات النبة للتعبير عن قدرتها للكالوجينيا هي AIA-kinétine و 2,4-D-kinétine و ذلك للمحلول GAMBORG و 2,4-D-kénitne للمحلول MURASHIGE و SKOOG .

دراسة مختلف تراكيز الملح على نمو النبيتات في الزراعة *in-vitro* و *in-vivo* أكدت أن التركيز 5 غل من NaCl تحفز نمو مختلف المقاييس المدروسة (عدد أزواج الأوراق, طول الساق و الجذر الرئيسي), لكن زيادة تركيز NaCl عن 20 غل يؤدي إلى انخفاض معتبر لدرجة النمو.

ان مدى البرولين يتزايد نسبيا بدلالة تركيز بـ NaCl و يتغير بتغير الأعضاء. أكبر تركيز تمكنا من تحديده هو 40 غل.

الكلمات المفاتيح :

Atriplex halimus – الزراعة *in-vivo*, الزراعة *in-vitro*, الاجهاد الملحي.

SOMMAIRE

	pages
INTRODUCTION	1
CHAPITRE I : DONNEES GENERALES SUR L'ATRIPLEX	6
1 – Présentation de la plante	6
2 – Caractéristiques morphologiques de l' <i>Atriplex halimus</i>	6
3 – Importance des <i>Atriplex</i>	8
3.1. Importance économique	8
3.2. Importance écologique	9
3.2.1. Mise en valeur des sols pauvres	9
3.2.2. Mise en valeur des sols salés	9
3.3.3. Production de bois de chauffe	10
3.3. Importance agronomique	10
3.3.1. Fixation des dunes	10
3.3.2. Intérêt fourrager	10
4 – Répartition en Algérie	11
5 – Exigences climatiques	11
6 – Exigences édaphiques	13
6.1. Nature du sol	13
6.2. La salure	13
6.3. Résistance à la submersion	13
7 – Mode de multiplication	14
7.1. Macropropagation	14
7.2. Semis direct	14
7.3. Bouturage	14
7.4. Eclats de souches	14
CHAPITRE II : MATERIEL ET METHODES	15
1 – Matériel végétale	15
1.1. Origine des semences	15
1.2. Préparation et désinfection des graines	15
1.3. Germination des graines	15
1.4. Repiquage des plantules	16

1.5. Obtention des explants	16
2 – Milieu de culture	16
2.1. Dilutions	19
2.2. Substances de croissance	19
2.2.1. Milieux pour plantules	19
2.2.2. Milieux pour callogenèse	20
2.3. Suspension cellulaire	20
3 - Le sel	21
4 - Stérilisation des milieux	21
5 – Condition de culture	21
6 – Dosage de la proline	22
7 – Paramètres étudiés	22
8 – Expression des résultats	22
CHAPITRE III : EFFET DES MILIEUX ET DES REGULATEURS DE CROISSANCE SUR LA MORPHOGENESE DE L' <i>ATRIPLEX HALIMUS</i>	23
1 - Effet des différents milieux	24
1.1. Nombre de paires de feuilles	24
1.2. Longueur de la tige	25
1.3. Longueur de la racine principale	29
1.4. Discussion et conclusion	31
	32
2 - Effet des dilutions sur la morphogénèse	
2.1. Nombre de paires de feuilles	33
2.2. Longueur de la tige	34
2.3. Longueur de la racine principale	36
2.4. Discussion et conclusion	38
3 – Effet des régulateurs de croissance sur la morphogénèse de l' <i>Atriplex</i>	40
3.1. Milieu Murashige et Skoog + AIA	40
3.1.1. Nombre de paires de feuilles	40
3.1.2. Longueur de la tige	41
3.1.3. Longueur de la racine principale	44
3.1.4. Discussion et conclusion	45

3.2. Milieu Gamborg + AIA	46
3.2.1. Nombre de paires de feuilles	46
3.2.2. Longueur de la tige	47
3.2.3. Longueur de la racine principale	48
3.2.4. Discussion et conclusion	50
3.3. Conclusion	53

CHAPITRE IV : EFFET DES SUBSTANCES DECROISSANCE SUR L'OBTENTION DE CALS EMBRYOGENES

1 – Influence des combinaisons en substance de croissance sur différents types d'explants	55
1.1. Milieu de base Gamborg	55
1.1.1. Effet des différentes combinaisons en AIA/ Kinétine	57
1.1.2. Effet des différentes combinaisons en 2-4D/ Kinétine	61
1.1.3. Discussion et conclusion	64
1.2. Milieu de base Murashige et Skoog	67
1.2.1. Effet des différentes combinaisons en AIA / Kinétine	67
1.2.2. Effet des différentes combinaisons en 2-4D/ kinétine	67
1.2.3. Discussion et conclusion	72
2 – Suspension cellulaire	74
3 – Conclusion	75

CHAPITRE V : EFFET DU SEL SUR LA MORPHOGENESE DE L'*ATRPLEX HALIMUS* ET LA TENEUR EN PROLINE EN CULTURE *IN –VITRO* ET *IN –VIVO*

1 – Effet de la salinité sur la croissance de l' <i>Atriplex halimus</i> en culture <i>in –vitro</i>	79
1.1. Effet du sel sur la croissance des plantules	79
1.1.1. Nombre de paires de feuilles	79
1.1.2. Longueur de la tige	80
1.1.3. Longueur de la racines principale	83
1.1.4. Discussion et conclusion	84
1.2. Accumulation de la proline chez les vitro-semis d' <i>Atriplex halimus</i>	87
1.2.1. Accumulation de la proline dans les feuilles	87

1.2.2. Accumulation de la proline dans les tiges	89
1.2.3. Accumulation de la proline dans les racines	90
1.2.4. Discussion et conclusion	92
2 – Effet de la salinité sur la croissance de l' <i>Atriplex halimus</i> en culture <i>in- vivo</i>	96
2.1. Effet du sel sur la croissance des plantules	96
2.1.1. Nombre de paire de feuilles	96
2.1.2. Longueur de la tige	97
2.1.3. Discussion et conclusion	100
2.2. Accumulation de la proline chez l' <i>Atriplex</i> en culture <i>in-vivo</i>	
2.2.1. Accumulation de la proline dans les feuilles	102
2.2.2. Accumulation de la proline dans les tiges	103
2.2.3. Discussion et conclusion	105
3 – Effet de la salinité sur le développement des cals	106
3.1. Effet du sel sur le pourcentage des cals	106
3.2. Effet du sel sur la couleur et la texture des cals	108
3.3. Effet du sel sur le poids frais des cals	111
3.4. Discussion et conclusion	112
4 – Conclusion	113
CONCLUSION GENERALE	115
BIBLIOGRAPHIE	117
ANNEXE	137

ABREVIATIONS

IAA : Acide indol-3-acétique

2-4D : Acide 2,4-dichlorophénoxyacétique

G : Milieu de GAMBORG

H : Milieu de HELLER

MF : Masse de matière fraîche

MS : Milieu de MURASHIGE et SKOOG

NaCl : Chlorure de sodium

Liste des tableaux

	Pages
Tableau 1 : Nombre de paires de feuilles	24
Tableau 2 : Longueur de la tige	27
Tableau 3 : Longueur de la racine principale	29
Tableau 4 : Effet des milieux et dilutions sur le nombre de paires de feuilles	33
Tableau 5 : Effet des milieux et dilutions sur la longueur de la tige	35
Tableau 6 : Effet des milieux et dilutions sur la longueur de la racine principale	38
Tableau 7 : Nombre de paires de feuilles	40
Tableau 8 : Longueur de la tige	42
Tableau 9 : Longueur de la racine principale	44
Tableau 10 : Nombre de paires de feuilles	46
Tableau 11 : Longueur de la tige	47
Tableau 12 : Longueur de la racine principale	50
Tableau 13 : Effet des différentes combinaisons en AIA, Kinétine (combinées) et les différents types d'explants sur le pourcentage des cals	57
Tableau 14 : Effet des différentes combinaisons en AIA, Kinétine sur la couleur et la texture des cals	60
Tableau 15 : Effet des différentes combinaisons en 2.4-D, Kinétine (combinées) et les différents types d'explants sur le pourcentage des cals	62
Tableau 16 : Effet des différentes concentrations en 2. 4-D, Kinétine sur la couleur et la texture des cals	63
Tableau 17 : Pourcentage des cals obtenus après 30 jours de culture	68
Tableau 18 : Effet des différentes combinaisons en 2.4-D, Kinétine sur la couleur et la texture des cals	69
Tableau 19 : Nombre de paires de feuilles	79

Tableau 20 : Longueur de la tige	81
Tableau 21 : Longueur de la racine principale	83
Tableau 22 : Concentration de la proline dans les feuilles après 30 jours de développement	88
Tableau 23 : Concentration de la proline dans les tiges après 30 jours de développement	89
Tableau 24 : Concentration de la proline dans les racines après 30 jours de développement	91
Tableau 25 : Nombre de paires de feuilles	96
Tableau 26 : Longueur de la tige	98
Tableau 27 : Concentration de la proline dans les feuilles après 30 jours de développement	103
Tableau 28 : Concentration de la proline dans les tiges après 30 jours de développement	104
Tableau 29 : Effet du NaCl sur le pourcentage des cals issus de feuilles(EX1), d'entre-nœuds (EX2) et de racines (EX3)	107
Tableau 30 : Effet du NaCl sur la couleur et la texture des cals issus de feuilles (EX1), d'entre-nœuds (EX2) et de racines (EX3)	110
Tableau 31 : Effet du NaCl sur le poids frais des cals	111

Liste des figures

	Pages
Figure 1 : Répartition des nappes principales d'Atriplex	12
Figure 2 : Effet des différents milieux sur le nombre de paires de feuilles	25
Figure 3 : Effet des différents milieux sur la longueur de la tige	27
Figure 4 : Effet des différents milieux sur la longueur de la racine principale	29
Figure 5 : Effet des milieux et dilutions sur le nombre de paires de feuilles	34
Figure 6 : Effet des milieux et dilutions sur la longueur des tiges	36
Figure 7 : Effet des milieux et dilutions sur la longueur de la racine principale	37
Figure 8 : Effet des différentes concentrations d'AIA sur le nombre de paires de feuilles	41
Figure 9 : Effet des différentes concentrations d'AIA sur la longueur de la tige	42
Figure 10 : Effet des différentes concentrations d'AIA sur la longueur de la racine principale	44
Figure 11 : Effet des différentes concentrations d'AIA sur le nombre de paires de feuilles	47
Figure 12 : Effet des différentes concentrations d'AIA sur la longueur de la tige	48
Figure 13 : Effet des différentes concentrations d'AIA sur la longueur de la racine principale	50
Figure 14 : Effet des différentes concentrations en AIA/Kinétine et les différents types d'explants sur le pourcentage de cals	59
Figure 15 : Effet des différentes concentrations en 2.4-D/Kinétine et les différents types d'explants sur le pourcentages de cals	62
Figure 16 : Effet des différentes concentrations en 2.4-D/Kinétine sur le pourcentage des cals issus d'entre-nœuds et de feuilles	68

Figure 17 : Effet de la concentration de NaCl sur le nombre de paires de feuilles	80
Figure 18 : Effet de la concentration de NaCl sur la longueur de la tiges	81
Figure 19 : Effet de la concentration de NaCl sur la longueur de la racine principale	84
Figure 20 : Concentration de la proline dans les feuilles	88
Figure 21 : Concentration de la proline dans les tiges	90
Figure 22 : concentration de la proline dans la racine	91
Figure 23 : Effet de la concentration croissante de NaCl sur le nombre de paires de feuilles	97
Figure 24 : Effet de la concentration de NaCl sur la longueur de la tige	98
Figure 25 : Concentration de la proline dans les feuilles	102
Figure 26 : Concentration de la proline dans les tiges	104
Figure 27 : Effet du NaCl sur le pourcentage des cals issus de différents types d'explants	108
Figure 28 : Effet du NaCl sur le poids frais des cals issus de différents types d'explants	112

Liste des planches

	Pages
Planche 1 : Caractéristiques morphologiques de l' <i>Atriplex halimus</i>	7
Planche 2 : Les différentes étapes de fragmentation <i>in-vitro</i> (A) et les différents étapes d'obtention de plants <i>In-vivo</i> (B)	17
Planche 3 : Aspect morphologique de vitro-plants développés pendant un mois sur différents milieux de culture	26
Planche 4 : Hétérogénéité de vitro-plants développés pendant un mois sur milieu MURASHIGE et SKOOG	28
Planche 5 : Aspect morphologique de vitro-plants après un mois de culture sur milieu MURASHIGE et SKOOG avec un développement racinaire hétérogène	31
Planche 6 : Aspect morphologique de vitro-plants développés pendant un mois sur milieu MURASHIGE et SKOOG additionné d'AIA	43
Planche 7 : Aspect morphologique de vitro-plants développés pendant un mois sur milieu GAMBORG additionné d'AIA	49
Planche 8 : cals développés à partir de différentes parties de la Plante sur milieu MURASHIGE et SKOOG	56
Planche 9 : Aspect morphologique de cals développés pendant un mois sur milieu GAMBORG additionné de 1mg/l 2-4D+ 1mg/l de Kinétine	65
Planche 10 : Aspect morphologique de cals développés pendant un mois sur milieu MURASHIGE et SKOOG additionné de 2-4D +Kinétine	70

Planche 11 : Embryons somatiques obtenus en suspensions cellulaire	74
Planche 12 : Aspect morphologique de vitroplants développés pendant un mois sur milieu de culture en présence de différentes concentrations en NaCl	82
Planche 13 : Plants d' <i>Atriplex</i> obtenus après un mois de culture <i>in-vivo</i> Avec différentes concentrations en NaCl	95
Planche 14 : Aspect morphologique de plantules d' <i>Atriplex</i> développés Pendant un mois en culture <i>in-vivo</i> (0 à 35g/l de NaCl)	100
Planche 15 : Aspect morphologique de cals développés pendant un mois en absence (A) ou en présence (B) de 5g/l de NaCl	109

INTRODUCTION

Les ressources alimentaires et en particulier les productions pastorales des zones semi-arides diminuent continuellement et de façon très accrue. Ce phénomène de désertification très préoccupant résulte d'une chaîne de causes et de facteurs souvent indissociables (accroissement de la population, défrichement, sécheresse, surpâturage). Ce processus de dégradation devenu alarmant ces deux dernières décennies touche particulièrement la steppe qui constitue le support principal de l'élevage ovin (BAUMER, 1963 ; LE HOUEROU et al., 1975 ; GRAINGER, 1983 ; AIDOUUD et AIDOUUD, 1988).

En Algérie, plus de 200.000 ha sont perdus chaque année (BENREBIHA et BOUABDALLAH, 1988).

D'autre part, plus de la moitié des terres irriguées souffrent d'une salinisation très difficilement réversible. En Algérie, l'extension de la mise en valeur grâce à la mobilisation des ressources hydriques souterraines, avec une irrigation souvent mal conduite aboutit à une stérilisation (forte salinité) des terres. Ce phénomène est aggravé par la forte évapotranspiration (particulièrement l'évaporation) liée au climat aride (GRILLOT, 1953 ; AUBER, 1960 ; SIMONNEAU, 1961).

Il faut souligner aussi que suite à une utilisation irrationnelle des labours et du surpâturage, la végétation naturelle se dégrade et se raréfie.

On estime actuellement que le potentiel des parcours steppiques a chuté de 90 à 50% selon les régions et le type de pâturage (BENREBIHA, 1991). Cela accentue la crise du pastoralisme amorcée depuis fort longtemps et qui se répercute sur le déficit en protéines animales d'une population de plus en plus croissante et exigeante.

La lutte contre la désertification par le repeuplement des zones est devenue une nécessité et une priorité aussi bien à l'échelle internationale (conférence de NAIROBI, 1978 et les différents réunions et congrès internationaux qui se tiennent régulièrement) qu'à l'échelle nationale (barrage vert, projets de développement intégré, code pastorale ..).

Dans ce contexte, les *Atriplex* peuvent jouer un rôle très important. *L'Atriplex halimus* connaît un intérêt et un développement important particulièrement dans le bassin méditerranéen, en Australie et aux U.S.A. En effet, ces arbustes semblent actuellement les mieux adaptés pour stabiliser et augmenter la production fourragère et mettre en valeur des terres dégradées, chargées en sels et dont leur surface connaît, pour diverses raisons une forte extension.

L'Atriplex halimus est utilisé fondamentalement comme arbuste fourrager dans les régions où l'activité principale reste le pastoralisme. Les nappes d'*Atriplex halimus* constituent des réserves fourragères importantes en saison sèche et en année difficile. La production fourragère s'étale durant toute l'année avec un maximum au printemps. Son feuillage persistant et riche en protéines est très apprécié en saison estivale, automnale et en année de sécheresse où le tapis herbacé est très rare.

En Afrique du Nord, la plantation d'*Atriplex* produit 1000 à 2500 U.F/HA/an (BOUABDALLAH,1992) alors qu'un bon parcours naturel à armoise sous pratiquement les mêmes conditions climatiques donne 300 à 400 U.F/ha/an (RODIN et al., 1970).

Ces trois dernières décennies, la culture de l'*Atriplex* connaît, une extension et un intérêt considérable dans les régions arides du monde.

En Algérie, un vaste programme de lutte contre la désertification a été engagé, particulièrement dans les régions semi-arides et arides (projet du « barrage vert » portant sur des programmes de mise en valeur intégrée sur une superficie de 3 millions d'ha) où les *Atriplex* occupent une place importante.

Les *Atriplex* présentent une grande diversité biologique et également des possibilités d'altérations génétiques, causées par des hybridations inter spécifiques inconsidérées, qu'il convient d'empêcher de disparaître et de protéger (FRANCLET et LE HOUEROU, 1971).

Cette diversité s'exprime au niveau des fonctions et des structures ; nous pouvons citer les différences des taux de germination des graines d'une même espèce (*Atriplex halimus*) provenant de différentes régions (BENREBIHA, 1987).

De nombreux auteurs ont montré l'existence d'une hétérogénéité au sein de cette espèce (QUEZEL et SANTA, 1962 ; SARSON, 1970 ; FRANCLET et LE HOUEROU, 1971 ; LE HOUEROU et al., 1979 ; BENREBIHA, 1995 ; KINET et al., 1998).

Il est par conséquent intéressant de rechercher des écotypes présentant de meilleures performances et de les sélectionner.

Cet objectif ne peut être atteint que par l'utilisation de la multiplication végétative (technique *in-vitro*). D'autre part, l'utilisation de la culture *in-vitro* pour cette espèce se justifie pour deux raisons principale.

La première est qu'il n'est pas facile de multiplier cette dernière pour plusieurs causes :

- La germination des graines est souvent bloquée par des substances inhibitrices contenues dans les valves fructifères et que les conditions exigées en température et surtout en humidité durant 2 à 3 semaines ne

sont pas réunies simultanément sur le terrain.

- Le développement en pépinière et le bouturage exigent des moyens financiers élevés.

La deuxième raison et la plus importante, concerne la forte hétérogénéité que présente cette espèce. Il est donc difficile et contraignant d'effectuer un clonage d'écotypes performants avec les méthodes classiques de multiplication.

Un sélectionneur cherche surtout à rassembler dans une plante d'une espèce donnée le maximum de caractères favorables avec une meilleure efficacité des paramètres du milieu et d'environnement. Jusqu'aux années 1960, la seule technique de sélection était la reproduction sexuée mais présentait des limites (opérations laborieuses et longues de 10 à 15 années selon les espèces et la difficulté de reproduction des individus identiques).

Les progrès biotechnologiques et les nouvelles techniques de propagation *in-vitro* et de la biologie moléculaire permettent de pallier aux difficultés de la sélection par reproduction sexuée.

L'objectif de ce travail s'insère dans le cadre d'un projet de recherche sur les formations steppiques qui consiste à mettre au point des milieux de culture pour une micropropagation de clones sélectionnés présentant les caractéristiques les plus intéressantes pour le repeuplement des zones dégradées des régions arides et semi-arides.

Après une présentation du matériel végétal puis des méthodes d'études, notre travail se décompose en trois chapitres :

1) La détermination d'un milieu de culture pour une meilleure Micropropagation, où cinq milieux seront testés avec différentes dilutions des substances de croissances seront également utilisées.

- 2) La recherche d'une meilleure combinaison en substance de croissance pour l'obtention de cals embryogènes et d'embryons somatiques.
- 3) L'effet du NaCl sur la morphogénèse ainsi que le dosage de la proline seront étudiés.

CHAPITRE I

DONNEES GENERALES SUR L'ATRIPLEX

En Algérie, les nappes naturelles d'*Atriplex* renferment principalement *Atriplex halimus*, *A. glauca*, *A. portulacoides* ; elles sont utilisées comme fourrage par les troupeaux (ovins et dromadaires) surtout dans les zones arides et semi-arides. Dans la région de Chellala où la pluviométrie est de 250 à 300 mm/an ; les peuplements d'*Atriplex* produisent 2000 à 3000 kg de matière sèche /ha /an (RODIN et al,1970).

Les mesures de biomasse effectuées dans la région du Hodna dans des peuplements naturels d'*Atriplex halimus* Var *schweinfurthii* donnent des valeurs voisines de 12 et 16 tonnes de matière fraîche / ha (FRANCLET et LE HOUEROU, 1971).

1 - Présentation de la plante

Le genre *Atriplex* est une plante arbustive de la famille des chénopodiacées. Il comprend environ 417 espèces (FRANCLET et LE HOUEROU, 1971) ; une quinzaine d'espèces ont été mises en évidence en Algérie (MAIRE, 1962), et parmi elles, *A.halimus* et *A.portulacoides* sont les plus répandues.

2 - Caractéristiques morphologiques de l'*Atriplex halimus*

La plante adulte est un arbuste de 1 à 3 m de diamètre à port très ramifié, étalé ou dressé. Les touffes formées peuvent atteindre 1 à 3 m de diamètre (Planche 1, figure A).

PLANCHE 1



Fig A : vue d'ensemble d'une plantation naturelle d'Atriplex dans la zone d'ELMESRANE (DJELFA). Notons l'importance d'un pied d'Atriplex présentant un diamètre appréciable (de 2 à 3 m).



Fig B : Plantule régénérée naturellement quand les conditions climatiques sont favorables.

Les feuilles sont alternes, brièvement mais nettement pétiolées, plus ou moins charnues luisantes, couvertes de poils vésiculeux et blanchâtres.

Les fleurs monoïques sont situées sur des inflorescences terminales composées de panicules d'épis (FRANCLET et LE HOUEROU 1971).

Les fruits sont des akènes et possèdent à leur base des valves fructifères cornées et papyracées de 0,3 à 0,4 cm de longueur et de 0,4 à 0,5cm de largeur.

La graine est entourée par deux téguments fins (le premier brun, le deuxième clair) ; elle comprend un embryon unique, annulaire entourant l'albumen farineux (BENREBIHA, 1987).

C'est une plante chaméphyte ou monophanérophyte, fleurissant et fructifiant à partir d'Avril jusqu'en Novembre (NEGRE,1961).

Elle comprend deux sous-espèces : *A. halimus* L ssp *halimus* et *A. halimus* ssp *schweimfurthii* Boss. La première est généralement plus feuillue et se rencontre en zone littorale et semi-aride, la seconde se caractérise par des rameaux florifères longuement nus, c'est une plante de la zone aride (LE HOUEROU et PONTANIER,1988).

3 - Importance des *Atriplex*

De nombreuses expériences réalisées en Australie, aux U.S.A et en Afrique du Nord, ont montré l'importance des *Atriplex*.

Les *Atriplex* constituent avec les kochia, le support principal de l'industrie pastorale des régions Australiennes (FRANCLET et LE HOUEROU,1971).

3.1 . Importance économique

Les nappes d'*Atriplex* servent comme pâturage particulièrement pour les ovins. Elles présentent un intérêt relativement important dans les régions arides et semi-arides qui enregistrent un déficit fourrager de plus en plus important.

La production fourragère bien qu'ayant un maximum en fin de printemps, peut être exploitée dans certains milieux presque toute l'année (FROMENT, 1972).

3 . 2 . Importance écologique

3 . 2 .1 . Mise en Valeur des sols pauvres

Les *Atriplex* sont parmi les arbustes, les mieux adaptés aux régions arides et aux sols pauvres. D'autre part, la couverture d'*Atriplex* accroît considérablement la perméabilité des sols et l'augmentation de drainage dans les horizons superficiels. Elle permet la reconstitution d'un tapis végétal herbacé.

Les *Atriplex* permettent également de remettre en état de nombreux pâturages à flore et sol dégradés.

Selon FRANCKET et LE HOUEROU (1971), des essais de semis réalisés en Tunisie (Souassi) ont donné des résultats intéressants et moyennant très peu de frais. Il importe cependant de disposer des quantités considérables de semences que nécessitent ces opérations.

Les espèces à utiliser dans ces conditions sont : *Atriplex glauca* et *A. halimus*.

3 . 2 . 2 . Mise en valeur des sols salés

Les plantations d'*Atriplex* peuvent permettre la récupération de zones salées, *Atriplex halimus* est particulièrement résistant au NaCl. Les *Atriplex* peuvent aussi « dessaliniser » les sols.

En effet, la teneur de NaCl atteint 20 % de la matière sèche pour *Atriplex nummularia* (SARSON,1970).

Il est donc possible d'extraire d'un hectare 1100 Kg de NaCl en une année de culture (FRANCKET et LE HOUEROU, 1971).

Il convient ainsi d'utiliser et d'introduire les *Atriplex* dans les régions agricoles menacées par la salinité.

3 . 2 . 3 . Production de bois de chauffe

La disparition des puissantes formations d'*Atriplex*, jadis exploitées, dans la région d'EL ALEM (Tunisie) est imputable aux besoins de bois de chauffe de la ville de Kairouan (Tunisie) et des fours à briques de la région de M'sila et Batna (Algérie). Cette pratique semble diminuée, voire disparue, avec le développement du gaz domestiqué pour le cas de notre pays.

3 . 3 . Importance agronomique

Leur qualité de résistance à la sécheresse et leur faculté de se maintenir malgré un pâturage intense ont été les critères les plus importants dans le choix des *Atriplex*.

Parmi les plantes testées, herbacées légumineuses, arbustes et arbres, l'*Atriplex* a donné les résultats les plus intéressants, restant parfaitement vert et se développant à une vitesse très supérieure (ANONYME, 1980).

3 . 3 . 1 . Fixation des dunes

L'emploi des *Atriplex* s'est révélé extrêmement efficace pour la fixation rapide des dunes.

Selon FRANCKET et LE HOUEROU (1971) les boutures racinées d'*Atriplex nummularia* ont maîtrisé l'épandage des sables dans la région de REKKADA (Tunisie).

En Algérie, des essais réalisés sur le cordon dunaire dans la région de Djelfa et Boussaada avec plusieurs espèces d'*Atriplex* semblent avoir donné un résultat satisfaisant.

3 . 3 . 2 . Intérêt fourrager

Dans les régions arides, les *Atriplex* présentent un très grand intérêt fourrager en raison de leur :

- rusticité,
- bonne valeur fourragère,
- résistance élevée à la sécheresse,
- excellent rendement pour de faibles doses d'eau,

- faculté de tolérer des salures élevées.

Les nappes d'*Atriplex* peuvent être utilisées dans l'alimentation des animaux (ovins surtout) par pâturage direct.

L'*Atriplex* présente un intérêt fourrager surtout en période de sécheresse, saisonnière et inter- annuelle (ANONYME,1974).

FRANCLET et LE HOUEROU (1971) insistent sur le fait que l'*Atriplex halimus* doit être considéré comme une réserve de disette exploitable entre le milieu de l'été et le début d'hiver, période où les *Atriplex* sont bien acceptés par les ovins en raison de l'absence d'autres aliments verts dans les pâturages.

La production fourragère varie de 500 à 2000 U.F./ha/an, selon les régions et l'état de la nappe d'*Atriplex*.

4 - Répartition en Algérie

La figure 1 illustre la répartition des principales nappes d'*Atriplex*, qui en association avec les Salsolacées couvrent une superficie de 1.000.000 d'ha ; ces nappes n'ont pas fait l'objet d'un inventaire cartographique précis.

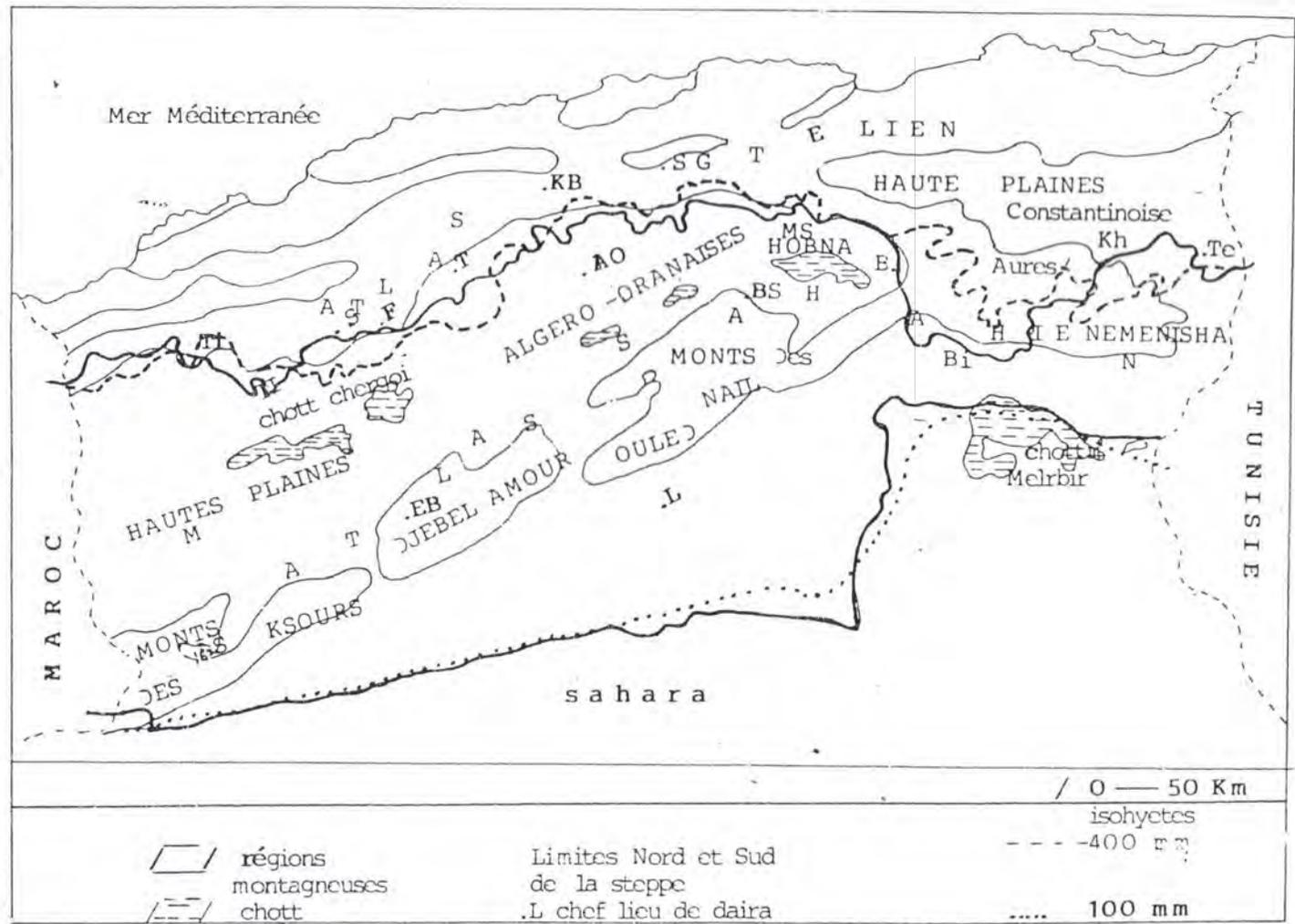
Les plus grandes superficies se trouveraient entre les isohyètes 100 et 400 mm/an, ce qui correspond aux zones dites steppiques (Tebessa, Batna, M'sila, Boussaada, Biskra, Djelfa, Tiaret, Saïda). Le genre *Atriplex* se rencontre aussi sur le Littoral et même au Sahara, au Hoggar, et particulièrement dans la région de Béchar où les nappes longent les dépressions d'oued.

5 - Exigences climatiques

Selon FROMENT (1972), l'*Atriplex halimus* peut s'adapter à un grand nombre de milieux.

Il peut supporter des températures minima absolu de 5 à 10°C en région continentale (LEFLOCH, 1989).

- OBSERVATIONS
- AO AIN OUSSERA
 - AS AIN SEFRA
 - B BARIKA
 - BI BISKRA
 - BS BOU SAAJA
 - ⊙ DJELFA
 - EB EL BAYADH
 - F FRENDA
 - KB KSAR EL BOUKHARI
 - KH KHENCHLA
 - L LAGHOUAT
 - M MECHERIA
 - MS M'SILA
 - S SAIDA
 - SG SOUR EL GHOZLANE
 - TE TEBESSA
 - TL TELAGH
 - TI TIARET
 - T TISSEMSILT



FORTE CONCENTRATION DE NAPPES D'ATRIPLEX

Fig:n°1 Répartition des nappes principales d'Atriplex

(Source: statistiques agricoles 1974)

6 - Exigences édaphiques

6.1 . Nature du sol

les *Atriplex* prospèrent en stations sablonneuse et limoneuse mais la préférence en est pour les sols limoneux (KILLIAN, 1953). Selon POUGET (1971), cette espèce est abondante sur sols à texture grossière plus salée en profondeur et sols à texture fine ou moyenne phréatique peu profonde.

Par ailleurs, d'après FROMENT (1972), cette espèce ne semble pas avoir d'exigences particulières et accepte tout type de sols.

6.2 . La salure

Pour son développement optimum, *Atriplex halimus* supporte une concentration en NaCl de 10 à 20 g/l et peut tolérer jusqu'à 30 g/l de NaCl. A cette dose, il semble que la durée de vie des feuilles est écourtée où il est noté une manifestation probable de la proximité de la zone de toxicité (ZID et BOUKHRISS, 1977).

L'implantation et la croissance de l'*Atriplex* sont favorisées par une salure faible en surface mais plus importante en profondeur (POUGET, 1980).

6.3 . Résistance à la submersion

La résistance des *Atriplex* à l'asphyxie dépend de divers facteurs notamment des espèces et des variétés (FRANCLLET et LE HOUEROU, 1971).

En général, l'*Atriplex portulacoides*, colonise en permanence les Schorres asphyxiées, à la limite des marées ou des zones inondées périodiquement par l'eau de mer lors des tempêtes.

L'*Atriplex glauca* supporte assez mal l'asphyxie temporaire et se développe sur sol plus ou moins drainé.

Par ailleurs, *Atriplex halimus* n'est pas résistant à la submersion.

Il semble que les espèces supportant l'asphyxie sont également résistantes aux sulfures.

7 - Mode de multiplication

7 . 1 . Macropropagation

Les *Atriplex* peuvent être multipliés par graines, boutures ou éclats de souches. Leur installation se fait directement au champs ou en pépinière puis une transplantation.

7 . 2 . Semis direct

Le semis direct exige un sol humide en surface pendant deux à trois semaines au moins, ce qui est rare à obtenir dans ces régions arides (sauf dans le cas d'apport d'irrigation).

Les graines doivent être préalablement traitées en raison de la présence de chlorure de sodium et d'autres substances hydrosolubles dans les valves fructifères et qui inhibent la germination.

La levée de cette inhibition est obtenue par trempage des graines dans l'eau pendant quelques heures, tout en la changeant plusieurs fois de façon à éliminer les substances inhibitrices que diffusent les pièces périnthaires. Pour *Atriplex halimus*, cette durée de trempage de semis se situe entre 26 et 36 heures (KOLLER et al.,1958). Pour le semis pratiqué en pépinière, les plants issus du semis du printemps peuvent être transplantés en automne et ceux d'automne peuvent l'être au printemps (FROMENT ,1972).

7 . 3 . Bouturage

Selon FRANCLLET et LE HOUEROU (1971), le bouturage comme méthode de multiplication est utilisée en cas de la rareté des graines. Les meilleures boutures sont celles prélevées sur des plants âgés de moins d'un an ou sur des repousses d'un an obtenues sur des plants anciens et recépés.

7 . 4 . Eclats de souches

L'éclat de souche est une méthode donnant des résultats aléatoires ; la difficulté réside dans les prélèvements ; la qualité des plants est assez réduite (BOUHRAOUA,1989).

CHAPITRE II

MATERIEL ET METHODES

1 – Matériel végétale

1 . 1 . Origine des semences

Les semences proviennent des nappes naturelles de la région d'El-Mesrane (Wilaya de Djelfa), dont la récolte a été effectuée en Décembre, à la maturité des fruits.

1 . 2 . Préparation et désinfection des graines

Les fruits sont décortiqués à la main pour séparer les graines des valves fructifères afin d'obtenir un meilleur taux de germination.

Les graines sont désinfectées dans l'alcool à 70%, par un trempage **pendant 10 minutes, puis égouttées et trempées dans l'hypochlorite de calcium à 8% pendant 20 minutes. Ensuite, elles sont rincées 5 fois avec de l'eau distillée stérile (BENREBIHA,1992).**

1 . 3 . Germination des graines

Après avoir été désinfectées, les graines sont déposées sur un papier filtre stérile, imbibé d'eau distillée stérile, dans des boîtes de Pétri scellées au parafilm, puis elles sont mises à germer dans la salle de culture.

La température est de 24+1°C et l'éclairement de 25 μ s 1m-1 avec une photopériode de 16 heures par jour.

1 . 4 . Repiquage des plantules

Après 5 jours de germination, les plantules obtenues et mesurant

1,5 à 2 mn sont repiquées soit :

- dans des tubes à essai contenant 20 ml de milieu de culture,
- des pots en plastique ayant une capacité de 200 ml d'eau et contenant 2/3 de tourbe et 1/3 de sable fin de mer.

1 . 5 . Obtention des explants

Après un mois de culture, les plantules ayant une longueur de 10 à 15 cm sont découpées soit en fragments d'entre-noeud, de feuilles, et de racines pour l'étude de la callogenèse, ou en microbouturage, pour l'étude de l'influence des régulateurs croissance et du NaCl sur la morphogenèse (Planche 2).

2 - Milieu de culture

Les milieux de culture utilisés diffèrent seulement par la nature et la concentration des macroéléments. Nous avons testé les macroéléments de GAMBORG et al. (1968), de MURASHIGE et SKOOG (1962), de HELLER (1953), de GAUTHERET (1959) et de WHITE (1943).

Tous les milieux contiennent les microéléments de MURASHIGE et SKOOG (1962), les vitamines de MOREL et WETMORE (1951), 0,1 mM/l de fer EDTA, 20g/l de saccharose et 8g/l d'agar (annexe 1). Le pH est ajusté à 5,8 à l'aide d'une solution de KOH.

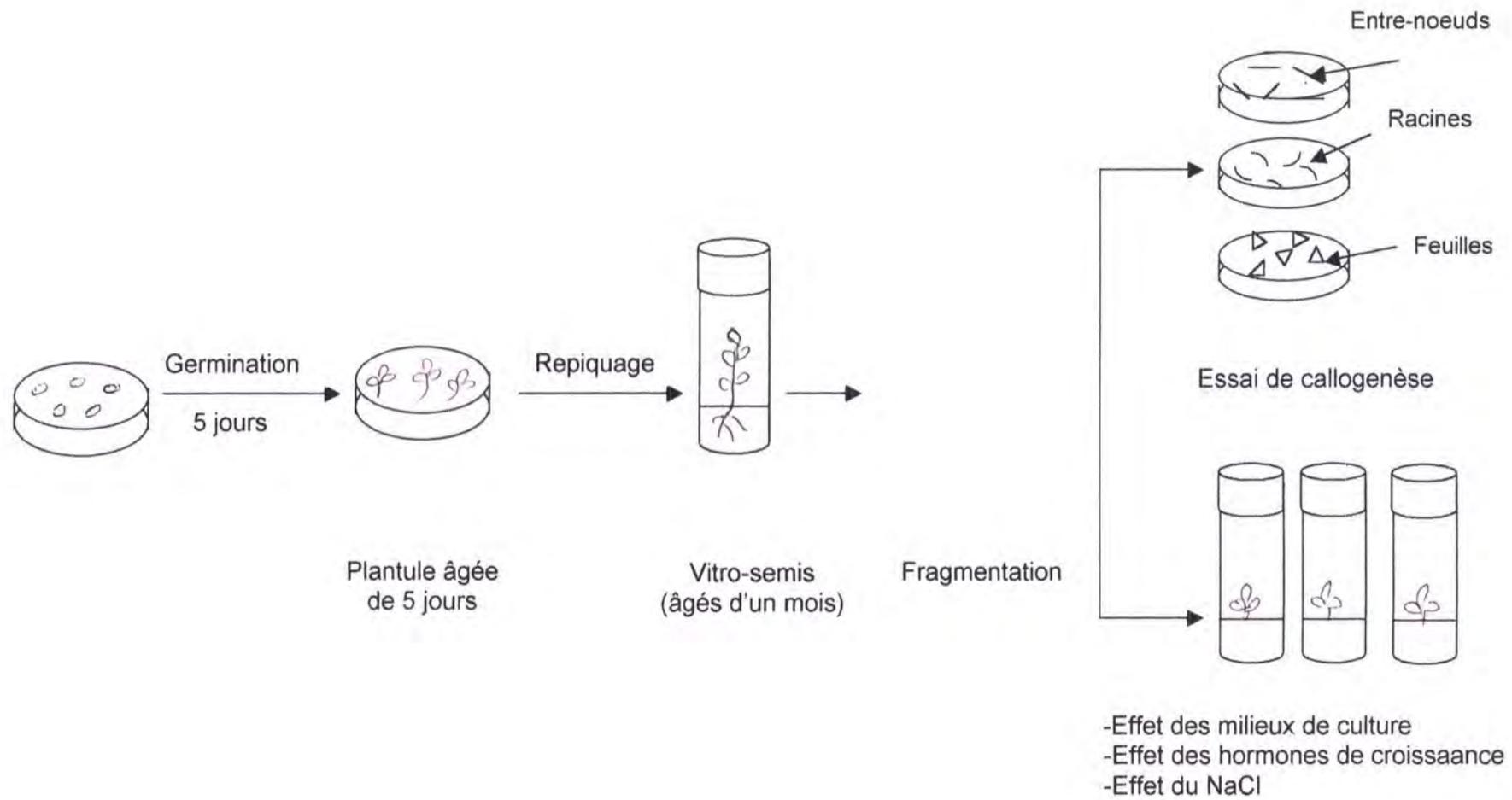


Planche 2.A : Les différentes étapes de fragmentation *in vitro*

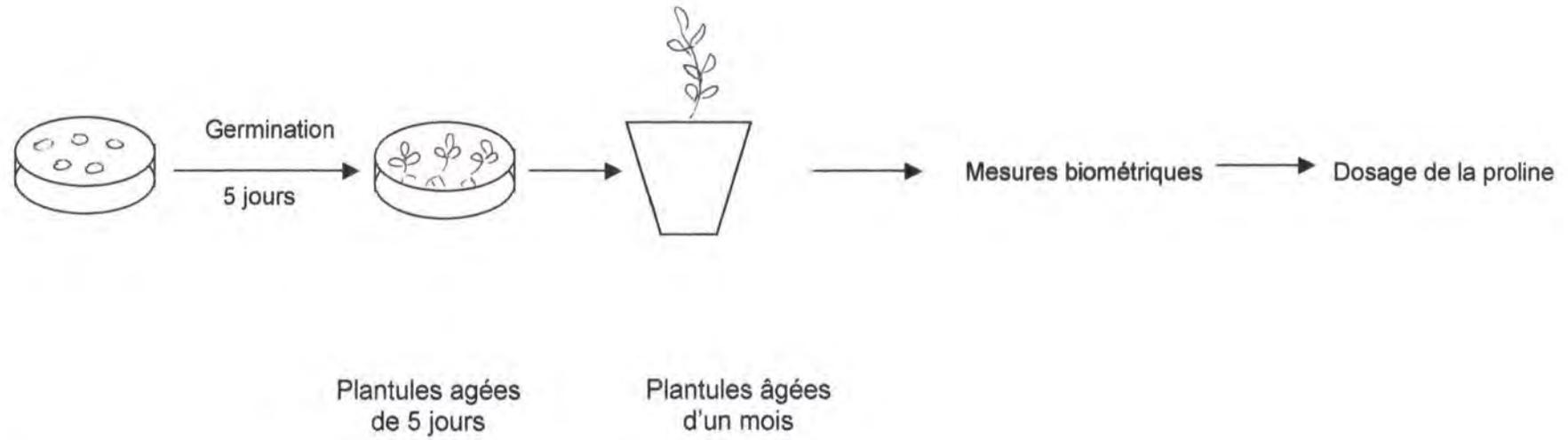


Planche 2.B : Les différentes étapes d'obtention de plantes *in vivo*

2.1 . Dilutions

Nous avons testé différentes dilutions (1, 1/2, 1/5 et 1/10) pour les trois milieux : MURASHIGE et SKOOG(MS), GAMBORG(G) et HELLER(H), et ce en raison de leur richesse en éléments majeurs

MS – MS/2 – MS/5 – MS/10

H - H/2 - H/5 - H/10

G - G/2 - G/5 - G/10

2.2 . Substances de croissance

Trois types de substances de croissance ont été utilisées afin de tester leur influence sur la morphogenèse et la callogenèse. Deux milieux ont été retenus : MURASHIGE et SKOOG et GAMBORG, auxquels nous avons rajouté différentes substances de croissance

- Acide α indole acétique (A.I.A)
- Acide 2,4 dichlorophenoxyacétique(2-4D)
- 6 furfuryl aminopurine (Kinétine)

2.2.1 . Milieux pour plantules

L'influence de l'A.I.A sur la morphogenèse de l'Atriplex

halimus a été étudiée. Nous avons retenu deux milieux de base (MURASHIGE et SKOOG et GAMBORG), auxquels nous avons rajouté de l'A.I.A :

C0 = Témoin

C1 = MS + 0,5mg/l d'A.I.A

C2 =MS + 1mg/l d'A.I.A

C'0 = Témoin

$$C'1 = G + 0,5\text{mg/l d'A.I.A}$$

$$C'3 = G + 1\text{mg/l d'A.I.A}$$

2 . 2 . 2 . Milieu pour callogenèse

Les milieux de base restent toujours les mêmes, ce sont les combinaisons en régulateurs de croissances qui font l'objet de cet essai ; deux combinaisons avec trois équilibres ont été testés pour chaque milieu :

1^{ère} combinaison

$$C1 = 0,5 \text{ mg /l (AIA) } + 0,5 \text{ mg/l Kinétine}$$

$$C2 = 1 \quad - \quad + 1 \quad -$$

$$C3 = 1,5 \quad - \quad + 1,5 \quad -$$

$$C4 = 2 \quad - \quad + 2 \quad -$$

2^{ème} combinaison

$$C1 = 0,5 \text{ mg/l (2-4D) } + 0,5 \text{ mg/l Kinétine}$$

$$C2 = 1 \quad - \quad + 1 \quad -$$

$$C3 = 1,5 \quad - \quad + 1,5 \quad -$$

$$C4 = 2 \quad - \quad + 2 \quad -$$

2 . 3 . Suspension cellulaire

Dans le but d'induire une embryogénèse somatique, nous avons testé quatre milieux de culture liquides (MURASHIGE et SKOOG, GAMBORG, HELLER et WHITE), en présence de 2,4 D à 10^{-6} M.

Chaque milieu a été réparti en fraction de 25ml dans des erlenmeyers de 100ml, disposés verticalement et agités de façon continue (120 tours/min).

Les erlenmeyers sont mis à une température de 25°C et une photopériode de 16 heures.

3 - Le sel

Afin de déterminer l'influence de NaCl sur la morphogénèse et la teneur en proline, huit concentrations en NaCl ont été utilisées

C0 = 0 g/l ; C1= 5 g/l ; C2= 10 g/l ; C3= 15 g/l ; C4= 20 g/l ;

C5 = 25 g/l ; C6 30 g/l ; C 7 = 35 g/l ; C8 = 40 g/l.

Cette étude a été réalisée en culture *in-vitro* et *in-vivo*

4 - Stérilisation_des milieux

Les milieux de culture sont stérilisés à l'autoclave en phase vapeur à 120° C pendant 20 minutes.

5 - Conditions de culture

La germination des semences et le développement des vitro-plantules ont lieu dans une salle de culture sous conditions contrôlées de température et d'éclairage.

La température est de 24°+1° C constante et l'éclairage est de 25 $\mu\text{s}^{-1} \text{ m}^{-1}$; 16 heures par jour.

Les plantules repiquées *in vivo* sont placées dans une serre vitrée avec une température variant entre 20 et 25 °c et un éclairage naturel.

Pendant 15 jours, les plantules sont arrosées avec de l'eau distillée pour favoriser leurs reprise, ensuite avec les différentes concentrations salines allant de 5 à 40g/l pendant un mois.

6 - Dosage de la proline

La proline s'accumule dans les plants exposés au stress salin. Dans ce contexte, des dosages de proline sont effectués au niveau des feuilles, tige et racines, sur des plants qui ont été précédemment stressés pendant un mois.

La méthode utilisée est celle de TROLLE et LINDLEY (1955), qui a été modifiée et mise au point par DREIR et GORING (1975).

7 - Paramètres étudiés

- Nombre de paires de feuilles,
- Longueur de la tige,
- Longueur de la racine principale,
- Pourcentage de cals,
- Couleur et texture des cals,
- Teneur en proline.

Les mesures sont faites sur 24 plantules avec 3 répétitions pour les cultures *in-vitro*.

Le dispositif expérimental adopté pour les cultures *in-vivo* est un bloc aléatoire complet, constitué de deux blocs.

8 - Expression des résultats

Le logiciel utilisé pour l'analyse statistique est le STATITCF. L'intervalle de confiance au seuil de 5p.100 est également utilisé.

Chapitre III

Effet des milieux et des régulateurs de croissance sur la morphogenèse de l'*Atriplex halimus*

Introduction

Le milieu de culture est l'élément déterminant de la réussite d'une multiplication. Il est composé d'une base comprenant des éléments minéraux (macro, micro éléments, des vitamines et de sucre). La concentration de ces composés peut varier d'une espèce à une autre.

De nombreux minéraux ont été utilisés pour la culture *in vitro* de tissus et d'organes. Certains de ces milieux ont été mis au point pour des objectifs bien déterminés tels que la culture d'embryons, la néoformation de fleurs, androgenèse.

Selon MARGARA (1989), la grande difficulté du choix d'un milieu de culture est quasiment impossible à faire à la suite d'une étude factorielle rigoureuse qui mettrait à l'essai toutes les combinaisons du facteur choisi.

On peut néanmoins gagner du temps, le plus souvent, en partant d'un milieu déjà utilisé par d'autres auteurs pour le même matériel ou des exemples comparables (MARGARA,89).

Selon ZRYD (1988), le choix du milieu de base reste malheureusement arbitraire, sauf indication préliminaire de la littérature. La plupart des auteurs commence par tester le milieu MURASHIGE et SKOOG, bien que de plus en plus, il s'avère nécessaire d'en modifier les concentrations et les rapports entre les éléments (ZRYD, 1988).

Certains milieux proposés dans un but donné sont, en fait, utilisables d'une manière beaucoup plus étendue (MARGARA,1989).

C'est dans ce contexte que nous avons étudié l'influence des milieux de culture, de leur dilution et également l'effet des substances de croissance sur la croissance de l'*Atriplex halimus* afin de déterminer un milieu adéquat pour une meilleure micropropagation.

I - Effet des différents milieux

Nous avons testé cinq milieux de culture, MUASHIGE et SKOOG(M1), GAMBORG(M2), WHITE(M3), HELLER(M4) et GAUTHERET(M5), afin de voir leur effet sur la morphogenèse de l'*Atriplex halimus*.

Après un mois de culture, nous avons effectué des mesures biométriques suivantes : nombre de paires de feuilles, longueur de la tige et de la racine principale.

1 . 1 . Nombre de paires de feuilles

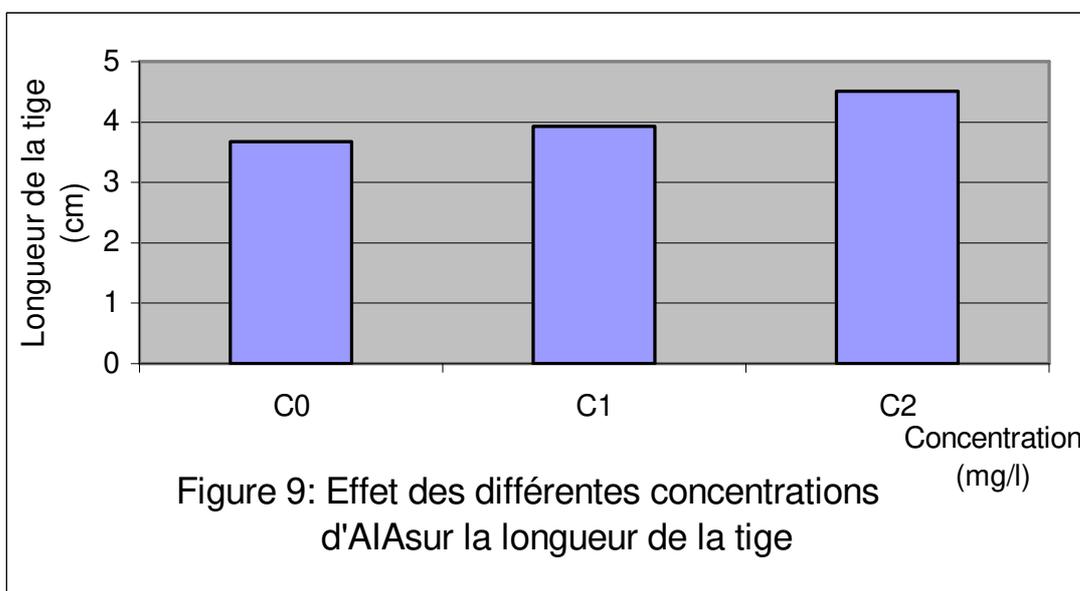
Nous avons pris en considération le dénombrement du feuillage afin d'évaluer la production foliaire qui constitue un critère important pour l'alimentation du cheptel.

D'après les résultats obtenus, nous constatons que la production foliaire est différente pour les cinq milieux.

Tableau 1 : Nombre de paires de feuilles

Milieu	M ₁	M ₂	M ₃	M ₄	M ₅
Paramètre					
Nombre de Paires de feuilles	5,73 ± 0.36	4,85 ± 0.38	4,44 ± 0.43	4,22 ± 0.85	4,04 ± 0.29

Le nombre de paires de feuilles le plus élevé est obtenu sur le milieu MURASHIGE et SKOOG (M1) avec une valeur de 5,73 et la valeur la plus faible sur le milieu GAUTHERET (M5) avec une moyenne de 4,04 (Tableau 1).



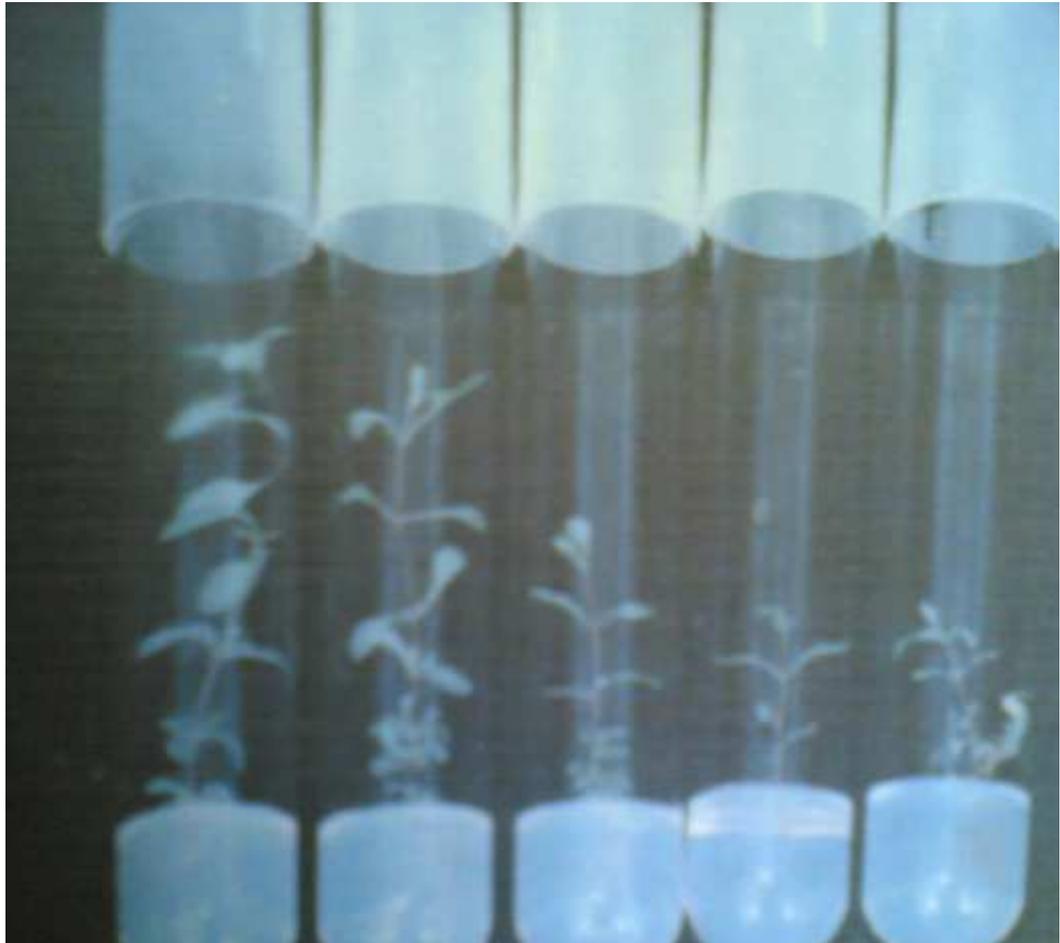
Le milieu GAMBORG (M2) donne une production foliaire moins importante avec un écartement important des entre-nœuds. Nous remarquons également que la production foliaire varie selon un ordre décroissant (Figure 2).

L'analyse statistique montre qu'il existe une différence significative entre les cinq milieux.

1 . 2 . Longueur de la tige

Après un mois de culture les tiges des vitro plants présentent des longueurs variables d'un milieu à un autre. Nous constatons que le milieu MURASHIGE et SKOOG est le plus favorable à l'allongement des tiges suivi par le milieu GAMBORG. Quant aux milieux HELLER et GAUTHERET l'allongement est réduit de moitié (Planche 3).

PLANCHE 3



M1 M2 M3 M4 M5

Aspect morphologique de vitro-plants développés pendant un mois sur milieu de culture.

M1 : Milieu MURASHIGE et SKOOG

M2 : Milieu GAMBORG

M3 : Milieu WHITE

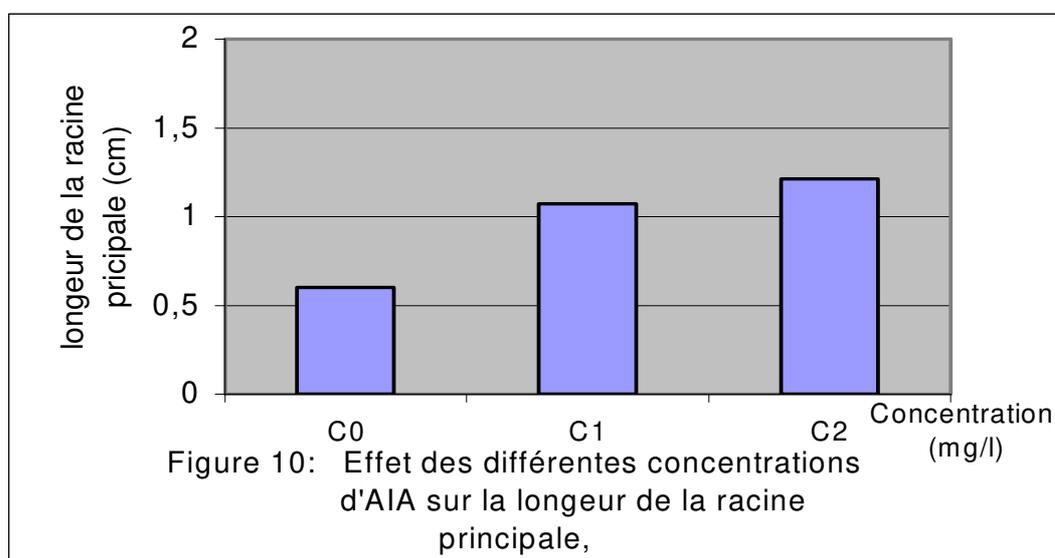
M4 : Milieu HELLER

M5 : Milieu GAUTHERET

Tableau 2 : Longueur de la tige

Milieu	M ₁	M ₂	M ₃	M ₄	M ₅
Paramètre					
Nombre Longueur de la tige	3,68 ± 0.44	2,77 ± 0.44	2,23 ± 0.34	1,63 ± 0.24	1,61 ± 0.53

Comme pour le nombre moyen de feuilles, la meilleure longueur de la tige est obtenue sur le milieu MURASHIGE et SKOOG (M1) avec une valeur de 3,68 cm et la plus faible sur le milieu GAUTHERET (M5) avec 1,61 cm (Tableau 2 et Figure 3).



L'analyse statistique montre qu'il existe une différence significative entre les cinq milieux utilisés.

Les observations des vitro-plants montrent une grande hétérogénéité et certains plantules présentent des cals au niveau du collet. Ce phénomène morphologique peut envahir la partie aérienne, la partie souterraine ou parfois être générale ; cette callogénèse diffère selon les milieux et est plus importante sur milieu GAMBORG (40%) alors que sur le milieu MURASHIGE et SKOOG elle n'est que de 19%.

Certaines plantules développent des bourgeons axillaires (Planche 4).

PLANCHE 4



A



B



C



D

Hétérogénéité de vitro-plants développés pendant un mois sur milieu MURASHIGE et SKOOG.

A et B : Vitro-plants présentant un cal au niveau du colet.

C : Vitro-plants développé en rosette.

D : Vitro-plants présentant un bourgeonnement axillaire.

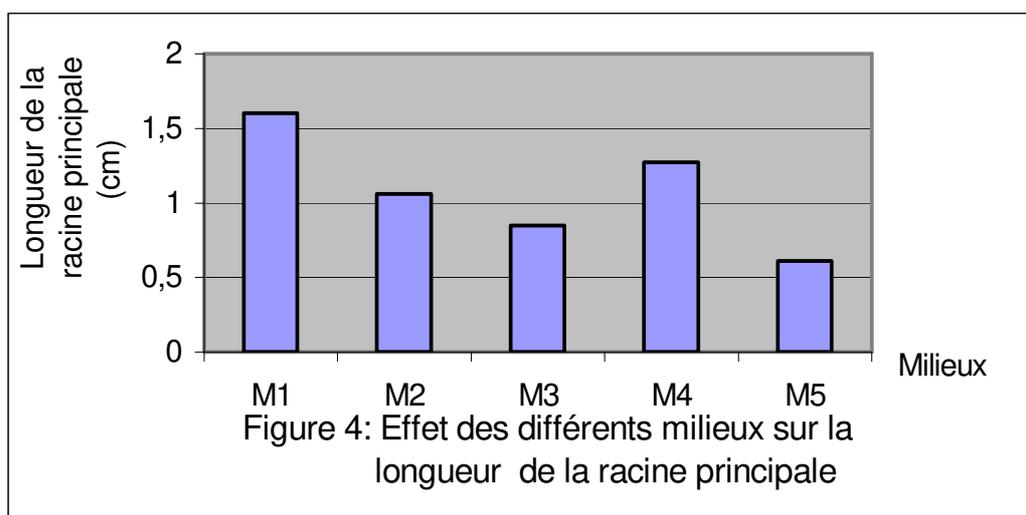
1.3. Longueur de la racine principale

D'après les résultats obtenus, nous constatons que l'allongement de la racine principale diffère d'un milieu à un autre.

Tableau 3 : Longueur de la racine principale .

Milieu \ Paramètre	M1	M2	M3	M4	M5
Longueur de la Racine principale .	1,60 ± 0.48	1,06 ± 0.36	0,85 ± 0.15	1,27 ± 0.45	0,62 ± 0.29

Le milieu MURASHIGE et SKOOG (M1) donne la longueur de la racine principale la plus importante (1,60 cm) suivi par le milieu HELLER (M4) avec une valeur de 1,27cm. Par contre, la valeur la plus faible est obtenu par le milieu GAUTERET (M5), les autres milieux GAMBORG (M2) et WHITE (M3) présentent des valeurs intermédiaires (Tableau 3 et Figure 4).



Cependant aucune différence significative n'a été signalée entre les cinq milieux.

Au cours de notre expérimentation, nous avons remarqué l'apparition de racines plumeuses au niveau de tous les milieux utilisés, elle est plus marquée pour le milieu MURASHIGE et SKOOG (8%), alors qu'elle est de 6% pour le milieu GAMBORG et seulement de 2% pour le milieu HELLER (Planche 5).

1 . 4 . Discussion et conclusion

Le milieu MURASHIGE et SKOOG favorise la production foliaire, la longueur de la tige et de la racine principale. Cette propriété est probablement liée à la richesse de ce milieu en éléments minéraux tels que l'azote et le potassium.

En effet, selon AUGÉ (1986), dans beaucoup de cas, la composition minérale de MURASHIGE et SKOOG donne des résultats satisfaisants.

D'après ZRYD (1988), le milieu MURASHIGE ET SKOOG est utilisé lorsqu'il s'agit d'organogénèse, ce sont les ions K^+ , NO_3^- et NH_4^+ qui ont une influence prédominante sur la croissance des tissus.

Si l'emploi des milieux riches principalement en N total, NH_4^+ et K^+ s'est développé fortement, c'est en raison de leur action souvent stimulante sur l'organogénèse (MARGARA, 1989).

La production foliaire des vitro-plants herbacés est moins importante sur le milieu GAMBORG ; ceci semble être lié à sa richesse en potassium qui induit un écartement important des entre-nœuds (BOULAY, 1979 ; MARGARA, 1984).

PLANCHE 5



A



B



C

Aspect morphologique de vitro-plants après un mois de culture sur le milieu MURASHIGE et SKOOG avec un développement racinaire hétérogène.

A : Racines développées en profondeur.

B : Racines développées en profondeur et en surface.

C : Racines développées en surface (racine plumeuses).

Les résultats obtenus montrent également que la production foliaire et l'élongation des tiges est moins importante pour les milieux WHITE et GAUTHERET. Selon ZRYD (1989) ceci s'explique par le fait que ces deux milieux sont moins concentrés par rapport aux autres milieux ; de même qu'ils sont pauvres en sels par rapport au milieu MURASHIGE et SKOOG.

La rhizogénèse est plus importante pour le milieu MURASHIGE et SKOOG suivi par le milieu HELLER.

L'apparition de racines plumeuses est plus importante sur milieu MURASHIGE et SKOOG.

Les jeunes plants mis en culture ont manifesté un pouvoir callogène assez important. Les cals obtenus sont hétérogènes par leur aspect, leur couleur et leur croissance. Cette callogenèse est induite sans substances de croissance mais diffère par la composition minérale ; elle est plus importante sur le milieu GAMBORG.

L'apparition de cals et de racines plumeuses est considérée comme des manifestations morphologiques particulières de la plante en réponse au stress minéral (BENREBIHA et al., 1992).

2 - Effet des dilutions sur la morphogénèse

Différents auteurs conseillent la dilution des milieux de culture, notamment le milieu MURASHIGE qui est très riche en sels (ZRYD, 1988 ; AUGE, 1989 ; MARGARA, 1989).

C'est dans cet esprit, que nous avons étudié l'influence de la dilution sur la croissance de l'*Atriplex halimus*. Pour cela, nous avons retenu trois milieux de culture : MURASHIGE et SKOOG, GAMBORG et HELLER, avec des dilutions de moitié (D2), du cinquième (D3) et du dixième (D4) (1/2 , 1/5 , 1/10) en comparaison avec le milieu entier (D1).

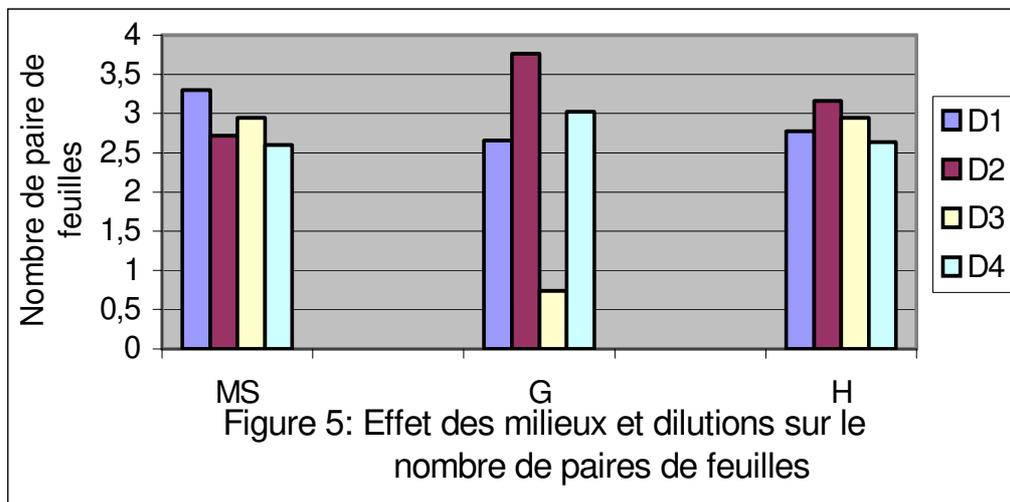
2 . 1 . Nombre de paires de feuilles

Après un mois de culture, la production foliaire diffère selon les milieux de culture et les dilutions utilisées.

Tableau 4 : **Effet des milieux et dilutions sur le nombre de paires de Feuilles**

	<i>S.C.E</i>	DLL	Carrés <i>Moyens</i>	Test F	Proba	E.T	C.V
VAR TOTALE	28.50	35	0.81	–	–	–	–
VAR Facteur 1	0.82	2	0.41	0.86	0.4406	–	–
VAR Facteur 2	5.36	3	1.79	3.74	0.0245	–	–
VAR Facteur 1.2	10.85	6	1.81	3.78	0.0086	–	–
VAR Résiduelle	11.47	24	0.48	–	–	0.69	25.1%

Les résultats obtenus montrent que le nombre de paires de feuilles est plus élevé sur le milieu GAMBORG dilué de moitié avec 3,76 feuilles, suivi par le milieu MURASHIGE et SKOOG sans dilution avec 3,30 feuilles puis le milieu HELLER dilué de moitié avec 3,16 feuilles (Figure 5).



L'analyse de la variance ne montre aucune différence significative entre les milieux, par contre, il existe une différence hautement significative pour les différentes dilutions utilisées.

2 . 2 . Longueur de la tiges

Les résultats obtenus après un mois de culture montrent une grande hétérogénéité des vitro- semis.

L'analyse de la variance (tableau 5) indique une différence significative entre les milieux, par contre, l'effet dilution n'est pas significatif.

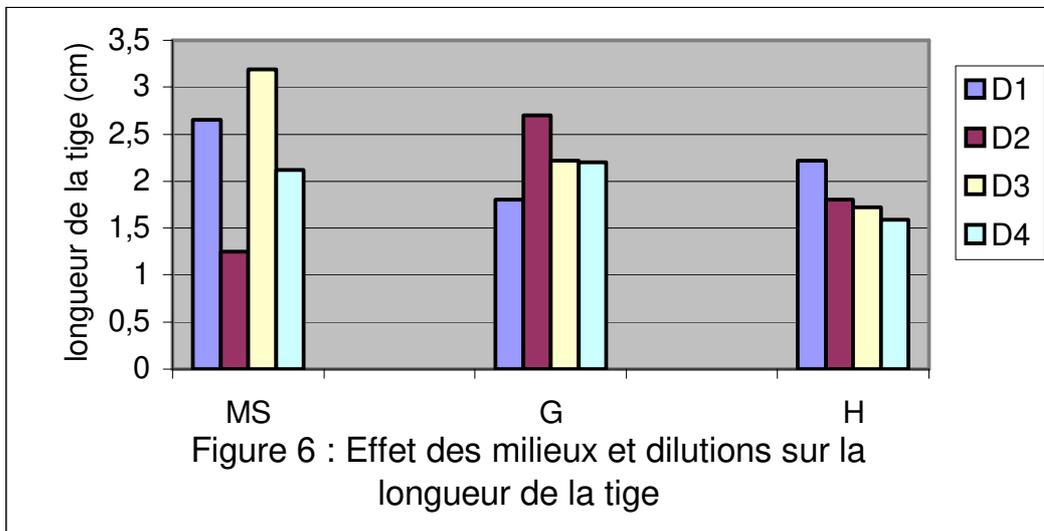
Tableau 5 : Effet des milieux et des dilutions sur la longueur de tige

	<i>S.C.E</i>	DLL	Carrés moyens	Test F	Proba	E.T	C.V
VAR TOTALE	15.84	35	0.45	-	-		
VAR Facteur 1	2.77	2	1.39	3.59	0.0422		
VAR Facteur 2	0.81	3	0.27	0.70	0.5637		
VAR Facteur 1.2	2.99	6	0.50	1.29	0.2975		
VAR Résiduelle	9.26	24	0.39	-	-	0.62	27.8 %

La figure 6 montre que le milieu MURASHIGE et SKOOG dilué au cinquième suivi par le milieu GAMBORG dilué au demi sont les plus favorables à l'allongement des tiges avec 3,15 cm.

Le milieu HELLER donne des valeurs faibles quelle que soit la dilution.

Les observations des vitro-semis montrent une grande hétérogénéité. Certaines plantules se développent en touffe, d'autres présentent des ramifications et quelques unes associent les deux aspects à la fois.

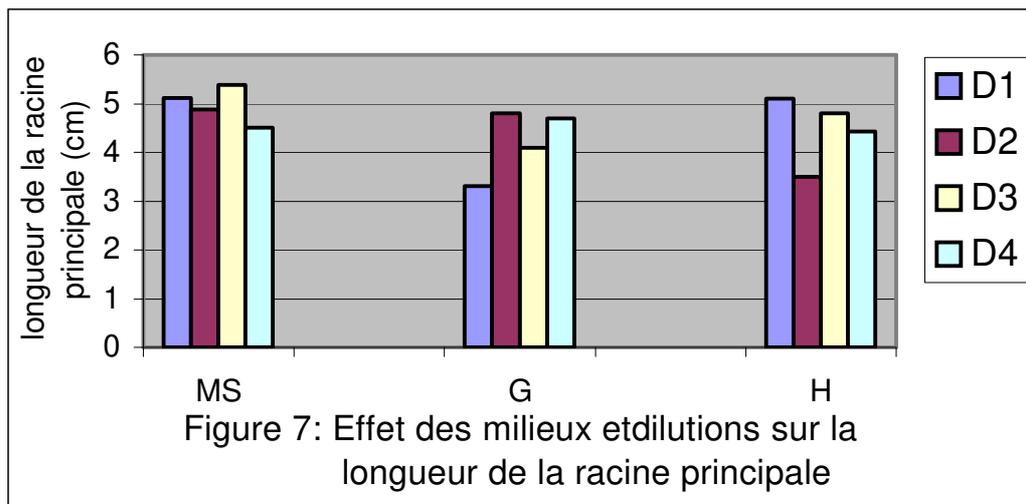


Sur les milieux dilués, nous avons également observé des jeunes plantules dont le système aérien réagit en réduisant le nombre de paires de feuilles et en allongeant les entre-nœuds.

2.3. Longueur de la racine principale

Au cours de notre expérimentation, nous avons noté, que l'élongation de la racine principale est lente pendant la première semaine du repiquage mais à partir de la deuxième semaine l'enracinement devient de plus en plus important notamment pour le milieu MURASHIGE et SKOOG (1962).

Le développement des racines est différent selon les milieux et les dilutions. La longueur de la racine la plus longue est obtenue sur le milieu MURASHIGE et SKOOG dilué au cinquième, puis le milieu HELLER et en dernier le milieu GAMBORG dilué au demi. Par contre les valeurs les plus faibles ont été enregistrées par le milieu GAMBORG non dilué et le milieu HELLER dilué au demi (Figure 7).



Nous avons également observé un développement des racines plumeuses, sur les trois milieux mais qui est beaucoup plus important sur le milieu MURASHIGE et SKOOG.

Tableau 6 : Effet des milieux et dilutions sur la longueur de la racine principale

	<i>S.C.E</i>	DLL	Carrés Moyens	Test F	Proba	E.T	C.V
VAR TOTAL	15.84	35	0.45	-	-		
VAR Facteur 1	2.77	2	1.39	3.59	0.0422		
VAR Facteur 2	0.81	3	0.27	0.70	0.5637		
VAR Facteur 1.2	2.99	6	0.50	1.29	0.2975		
VAR Résiduelle	9.26	24	0.39	-	-	0.62	27.8 %

D'après l'analyse de la variance il n'y a pas de différence significative entre les milieux et les dilutions.

2 . 4 . Conclusion et discussion

La meilleure production foliaire est obtenue sur les milieux MURASHIGE et SKOOG, GAMBORG et GAMBORG dilué de moitié.

Le milieu MURASHIGE est très favorable pour l'allongement de la tige par rapport aux milieux GAMBORG et HELLER. Cette différence de croissance du milieu MURASHIGE est probablement liée à sa richesse en éléments minéraux tels que l'azote et le potassium. En effet, l'élément 'azote' favorise le développement végétatif, tandis que le potassium favorise les divisions cellulaires (AUGE, 1986). Cela a également été montré sur le *Pin maritime* par DAVID (1972).

Le milieu MURASHIGE et SKOOG dilué au dixième est favorable à l'élongation de la racine ; cette propriété particulière semble être liée à la présence de calcium et de l'azote qui seraient indispensables à la production des racines. Ces observations confirment les conclusions de GREGORY et SAMATARAI(1950) , qui avaient déjà insisté sur le rôle déterminant de nutrition minérale sur la croissance des racines.

Par contre, l'effet de dilution n'est pas significatif sur l'allongement de la tige.

Le milieu MURASHIGE est sans doute le plus utilisé lorsqu'il s'agit d'organogénèse (ZRYD,1988). Ce même milieu est caractérisé principalement par une très forte teneur en azote (60még/l environ) dont 1/3 est apporté sous forme réduite (Ion NH_4^+) et par une concentration également élevée en potassium (MARGARA, 1989).

Le milieu MURASHIGE et SKOOG (1962) est aussi favorable à l'élongation de la racine, cette propriété semble être liée à la présence de l'azote et du calcium qui sont deux éléments indispensables à la production des racines (GREGORY et SAMATARAI, 1950 ; TRIPATHI et GAUTHERET, 1969 ; TRIPATHI, 1971).

Nous avons remarqué l'apparition de callosités et de racines plumeuses ,ceci a été également signalé BENREBIHA et al. (1992) et FERCHICHI (1994) .

Ce phénomène est expliqué par le fait que la concentration en macro éléments du milieu peut jouer un rôle déterminant dans l'induction de ce phénomène (BENREBIHA et al,1992).

3 - Effet des régulateurs de croissance sur la morphogénèse de l'*Atriplex halimus*

Les substances de croissance interviennent dans un grand nombre de mécanismes de la croissance et du développement ; elles n'ont pas de spécificité et le mécanisme de leur action est encore inconnu.

Au cours de cette étude, nous avons utilisé une auxine (AIA) afin de suivre son action sur l'organogénèse de l '*Atriplex halimus*.

Pour cela, nous avons retenu deux milieux de base MURASHIGE et SKOOG et GAMBORG et deux concentrations en A.I.A : 0,5mg/l (C1) et 1mg/l(C2), C0 étant le témoin.

3 . 1 . Milieu MURASHIGE et SKOOG + AIA

L'influence de l'A.I.A sur la croissance de l '*Atriplex halimus* (nombre de paires de feuilles, longueur de la tige et de la racine principale) a été testé avec comme milieu de base MURASHIGE et SKOOG (1962).

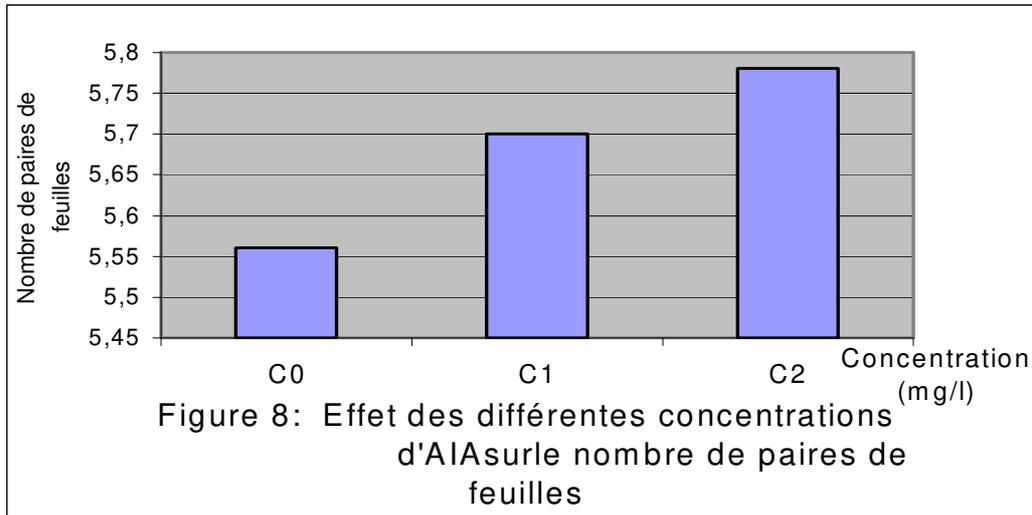
3 . 1 . 1 . Nombre de paires de feuilles

La production foliaire diffère selon la concentration en A.I.A dans le milieu, nous remarquons que le nombre de paires de feuilles augmente en fonction de la concentration, la valeur la plus élevée (5,78) est obtenue pour la concentration C 2 (1mg/l d'A.I.A) et la plus faible (5,56) pour le témoin C0.

Tableau 7 : Nombre de paires de feuilles

CONCENTRATION PARAMETRE	C0	C1	C2
Nombre de paires de feuilles	5,56 ± 0.38	5,70 ± 0.33	5,78 ± 0.51

L'adjonction de 1mg/l d'A.I.A au milieu donne de meilleurs résultats que la concentration 0,5mg/l (Tableau 7 et Figure 8).



L'analyse statistique ne montre aucune différence significative entre les concentrations en A.I.A et le témoin.

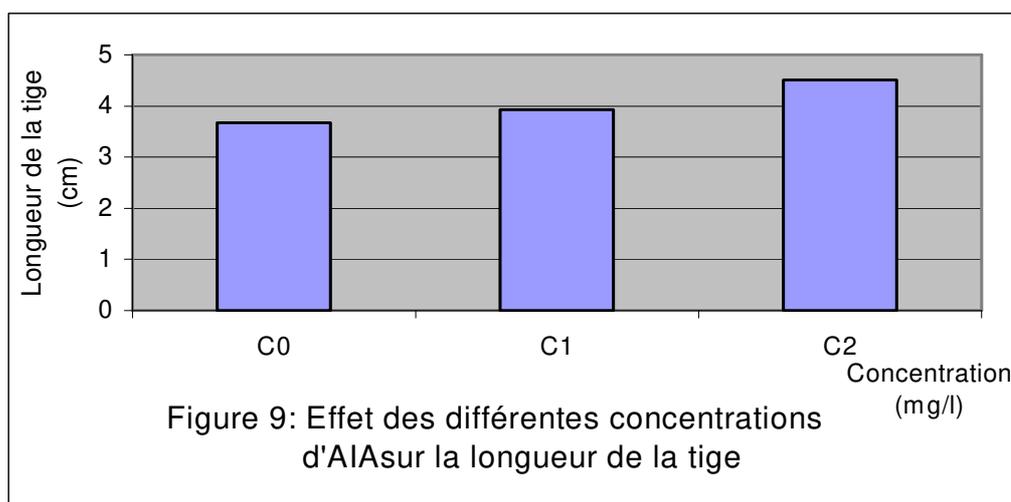
3 . 1 . 2 . Longueur de la tige

Les microboutures d'*Atriplex halimus* développent des tiges qui présentent une certaine variabilité en longueur selon les concentrations d'A.I.A utilisées ; la longueur la plus importante est obtenue avec la concentration C2 (1mg/l) qui est de 4,51cm et la plus petite par le témoin C0 avec une valeur de 3,67cm (Tableau 8 et Planche 6).

Tableau 8 : Longueur de la tige

CONCENTRATION PARAMETRE	C₀	C₁	C₂
Longueur de la tige	3,67 ± 0.44	3,93 ± 0.47	4,51 ± 0.75

Nous avons remarqué un développement assez important de bourgeons axillaires assez important qui donnent soit des ramifications secondaires qui s'allongent, soit un aspect de touffes, ce phénomène se retrouve au niveau du témoin et des autres concentrations.

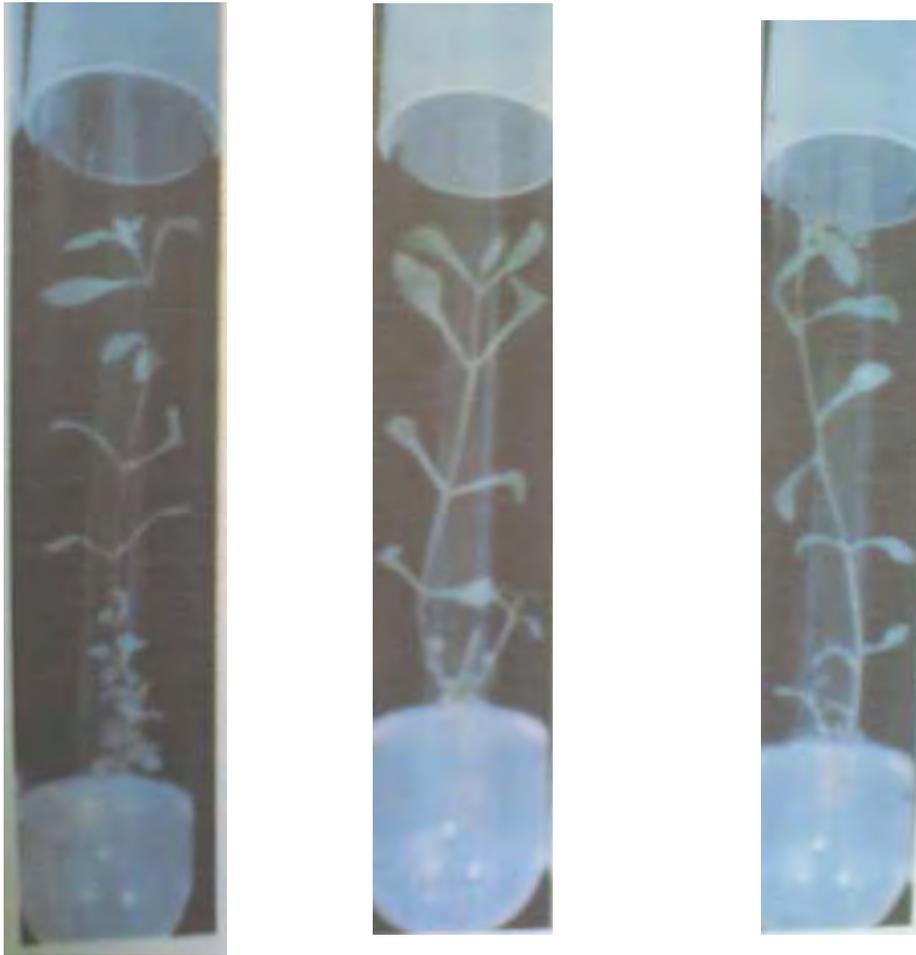


L'analyse statistique montre qu'il n'y a pas de différence significative sur la longueur des tiges.

Nous avons observé la formation de cals au niveau du collet de certaines microboutures.

Certaines tiges présentent une couleur rougeâtre caractérisant la présence de Bétalaine.

PLANCHE 6



C0

C1

C2

Aspect morphologique de vitro-plants développés pendant un mois sur milieu MURASHIGE et SKOOG additionné d'AIA.

C0 : Milieu MS sans AIA.

C1 : Milieu MS + 0,5 mg/l d'AIA

C2 : Milieu MS + 1 mg/l d'AIA

3.1.3. Longueur de la racine principale

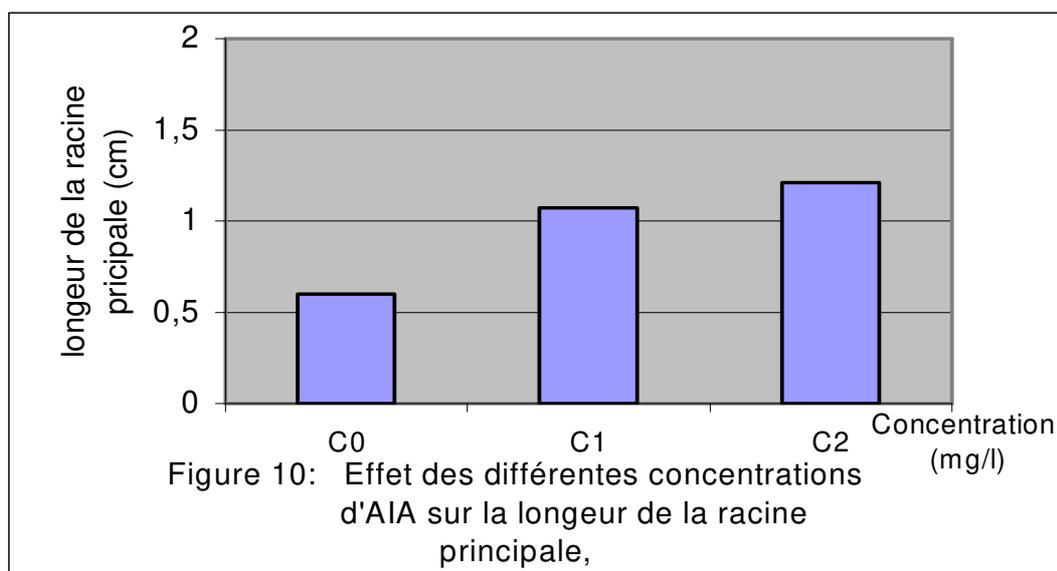
Après un mois de culture, les vitro-plants présentent une légère variation de la longueur de la racine en fonction de la concentration utilisée.

La valeur la plus élevée est obtenue avec la concentration C2 (1mg/l d'A.I.A) avec une valeur de 1,21cm et la plus petite par le témoin 0,60cm (Tableau 9).

Tableau 9 : Longueur de la racine principale

CONCENTRATION PARAMETRE	C0	C1	C2
Nombre de paires de feuilles	0,60 ± 0.48	1,07 ± 0.40	1,21 ± 0.45

Les racines obtenues prennent naissance sur la tige principale ; elles sont nombreuses et très ramifiées. La présence de racines plumeuses est généralisée sur l'ensemble des vitro-plants quelle que soit la concentrations.



L'analyse statistique des résultats montre que les concentrations utilisées ont un effet non significatif sur la longueur de la racine principale.

3 . 1 . 4 . Discussion et Conclusion

Les résultats obtenus montrent que la production foliaire et l'allongement de la tige sur milieu MURASHIGE et SKOOG avec les concentrations d'AIA utilisées sont presque similaires avec le milieu témoin. Certains individus montrent une organogenèse importante avec un taux de développement de ramification axillaire élevé au niveau de tout les milieux. Les substances endogènes et surtout les régulateurs de croissances se trouvent en quantité suffisante pour permettre un développement initiale des bourgeons axillaires (BOUZID, 1983 ; BENREBIHA, 1992, 1993).

Concernant la racine principale, les concentrations utilisées C1 (0,5mg /l d'A.I.A) et C2 (1mg/l d'A.I.A) donnent une légère variation de la longueur moyenne de la racine principale.

La néoformation des racines serait déclenché par l'action d'une substance mobile synthétisée par les feuilles adultes et associée à l'auxine qui migre ensuite vers la base de la tige (FAVRE, 1977 ; MARGARA, 1989 ; et HELLER, 1985). Chez les espèces ligneuses, l'absence d'hormones dans le milieu entraînent un faible taux d'enracinement (DURANT et BOUDET, 1979).

Parmi les facteurs internes qui contrôlent la rhizogénèse, on peut citer la juvénilité du matériel végétal.

La coloration rougeâtre observée au niveau des tiges et parfois au niveau des racines caractérisant la présence de Bétalaine ou glycine bétaine (composé d'ammonium quaternaire méthylé), a également été signalée par FERCHICHI, 1994 ; BENREBIHA, 1996, BENREBIHA 2001.

La bétalaine est synthétisée dans le chloroplaste contribuant à l'ajustement osmotique durant le stress salin ou hydrique (JOLIVET et al.,1983 ; GENARD et al.,1984 ; HANSON et al.,1994).

3 . 2 . milieu GAMBORG + AIA

L'effet de l'A.I.A sur la morphogenèse de *Atriplex halimus* a été également étudié avec le milieu GAMGORG.

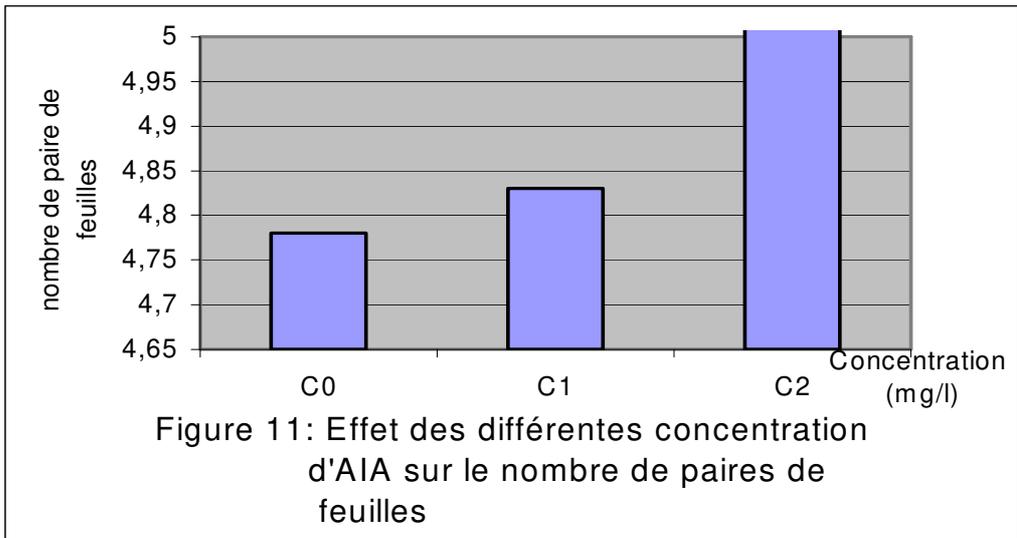
3 . 2 . 1 . Nombre de paires de feuilles

Nos observations sur la production du nombre de paires de feuilles nous permettent de constater que le milieu ne contenant pas d'hormone de croissance (C0) présente une valeur presque similaire avec le milieu (C1) contenant 0,5mg/l d'A.I.A.

Tableau 10 : Nombre de paires de feuilles

CONCENTRATION PARAMETRE	C0	C1	C2
Nombre de paires de feuilles	4,78 ± 0.38	4,83 ± 0.38	5,44 ± 0.37

L'addition de 1 mg/l d'AIA dans le milieu améliore la production foliaire, elle passe du simple au double (Figure 11).



D'après l'analyse statistique, l'effet hormone n'a aucune différence significative sur la production foliaire

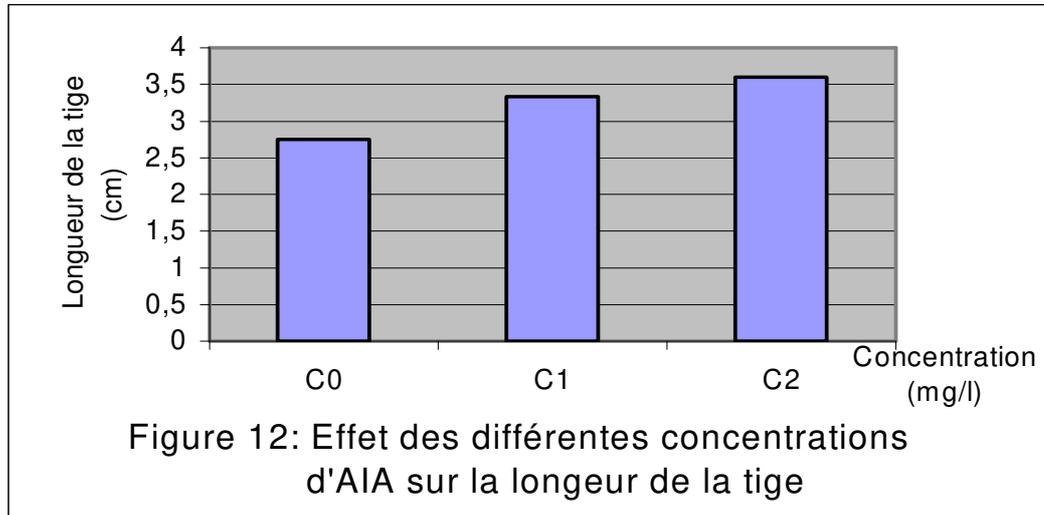
3 . 2 . 2 . Longueur de la tige

Les micro-boutures d'*Atriplex halimus* développent des tiges qui présentent une certaine variabilité en longueur selon les concentrations utilisées. La concentration C1(0,5 mg/l d'AIA) donne une longueur de la tige qui se rapproche du témoin C0.

Tableau 11 : Longueur de la tige

CONCENTRATION PARAMETRE	C0	C1	C2
Longueur de la tige	2,75	3,33	3,60
	±	±	±
	0.44	0.48	0.50

L'allongement de la tige est légèrement amélioré par l'addition de l'AIA (1mg/l) dans le milieu de culture (Planche 7).

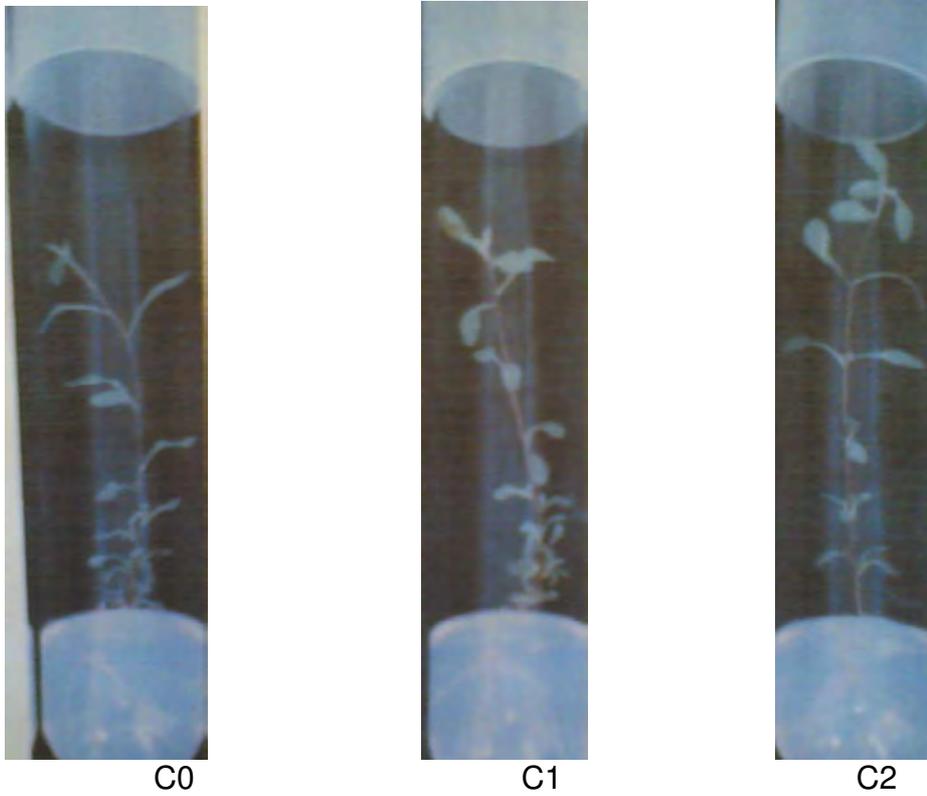


D'après l'analyse statistique, il n'existe pas de différence significative.

3 . 2 . 3 . Longueur de la racine principale

Les racines obtenues après un mois de culture sont nombreuses et très ramifiées. Elles présentent des valeurs très rapprochées ; la concentration C2 donne la valeur de 1,04 cm ; C1 une valeur de 0,86 et le témoin C0 la valeur de 0,71 cm.

PLANCHE 7



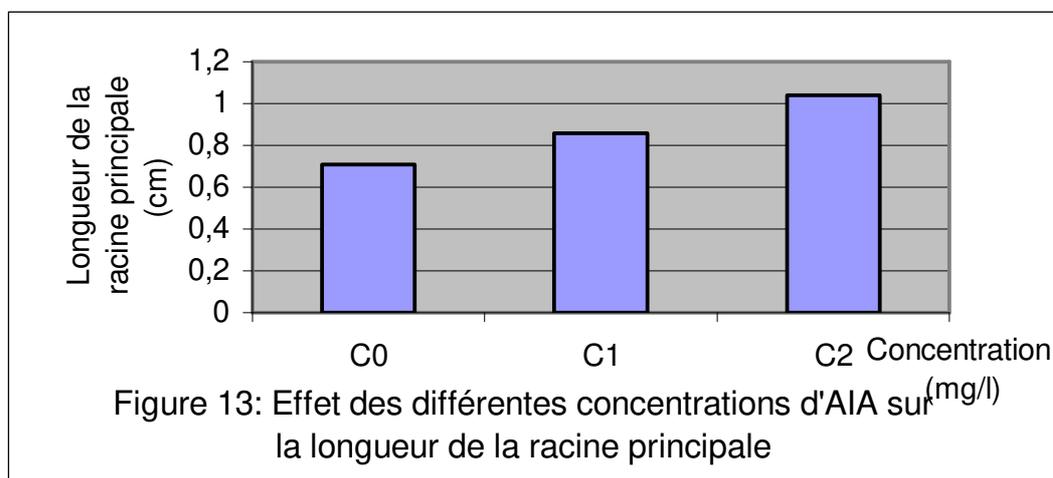
Aspect morphologique de vitro-plants développés pendant un mois sur milieu GAMBROG additionné d'AIA.

- C0 : Milieu G sans AIA
- C1 : Milieu G + 0,5 mg/l d'AIA
- C2 : Milieu G + 1 mg/l d'AIA

Tableau 12 : Longueur de la racine principale

CONCENTRATION	C ₀	C ₁	C ₂
PARAMETRE			
Nombre de paires de feuilles	0,71 ± 0.36	0,86 ± 0.41	1,04 ± 0.36

Nous constatons que l'addition de 1mg/l d'AIA dans le milieu de culture améliore légèrement la longueur de la racine principale



L'analyse statistique montre qu'il n'y pas de différence significative entre les concentrations utilisées.

3.2.4. Discussion et conclusion

La production foliaire et l'élongation de la tige sont similaires quelle que soit la concentration utilisée mais lorsque la concentration augmente, nous constatons une légère amélioration.

D'après MAZLIAK (1988), dans certains cas, l'AIA peut stimuler la mitose, mais l'effet de l' AIA ne se limite pas à une stimulation de la division cellulaire, il y a une action histogène aboutissant à la différenciation des éléments conducteurs.

Selon HELLER (1985) aux doses moyennes, l'auxine stimule la croissance de jeunes pousses. La production racinaire est également améliorée par l'A.I.A.

Par ailleurs, il faut signaler les relations existantes entre la partie aérienne et le système racinaire.

La présence de bourgeons et des feuilles est nécessaire à la rhizogenèse. FAVRE (1977), HARTMAN et KESTER(1983), la néoformation des racines serait déclenchée par l'action d'une substance mobile synthétisée par les feuilles et associée à l'auxine qui migre ensuite vers la base de la tige ; cette substance est appelée "rhizocaline" (FAVRE, 1977 ; HELLER,1985 et MARGARA, 1989).

D'après MARGARA (1989) l'application de l'AIA stimule fréquemment l'enracinement des boutures. En effet, selon DURAND et BOUDET (1979) chez les espèces ligneuses, l'absence d'hormone dans le milieu entraîne un faible taux d'enracinement.

Le mécanisme d'action de l'AIA sur la rhizogenèse fait toujours l'objet de discussion sur l'action du traitement auxinique, il a été observé des modifications des synthèses protéiques. Les auxines pourraient également agir au niveau des synthèses glucidiques en provoquant l'hydrolyse et le métabolisme rapide de l'amidon (MARGARA, 1989).

L'auxine, suivant les doses appliquées, favorise la caulogenèse ou la rhizogenèse, elle peut également les inhiber ou les stimuler.

3 . 3 . Conclusion

Les résultats obtenus montrent que le milieu MURASHIGE et SKOOG donne les meilleurs résultats en ce qui concerne la production foliaires, l'élongation de la tige et de la racine principale.

Le milieu GAMBORG semble favorable à l'induction de la callogenèse.

Les milieux HELLER, GAUTHERET et WHITE donnent des résultats similaires mais moins importants que les deux premiers.

En ce qui concerne l'effet de dilution, le milieu MURASHIGE entier donne toujours les meilleurs résultats concernant l'allongement des tiges par rapport aux milieux GAMBORG et HELLER.

Pour la longueur de la racine principale, ce sont les milieux MURASHIGE dilué au demi et au dixième qui semblent les plus favorables à l'enracinement. Le milieu GAMBORG/10 favorise la production de la callogenèse.

En ce qui concerne l'effet de la concentration en hormone, particulièrement en AIA , nous avons constaté que la valeur 1mg/l favorise la production foliaire, l'élongation de la tige et de la racine principale.

Le milieu MURASHIGE additionné d'hormone de croissance est plus favorable au développement végétatif par rapport au milieu GAMBORG.

Nous avons également noté une callogenèse importante sur le milieu GAMBORG.

CHAPITRE I V

Effet des substances de croissance sur l'obtention de cals embryogènes

Introduction

La culture *in-vitro* présente sans conteste un outil puissant, aux perspectives industrielles et économiques nouvelles (ZRYD et al., 1988),

Selon HELLER et ESMAULT (2000) la culture *in-vitro* des organes et des tissus isolés est devenue une technique de base de divers biotechnologies.

Elle permet de sauver les espèces en voie de disparition ou chez lesquelles, les semences sont rares ou germent mal. Une régénération d'un grand nombre d'espèces à multiplication végétative difficile dont l'état sanitaire est affecté par des virus (BOXUS,1975 ; BEAUCHESNE, 1976 ; MONCOUSIN, 1982 et GEORGES, 1987).

La culture *in-vitro* passant par les stades cals ou cellules isolées peut induire des variations phénotypiques, génotypiques ou métaboliques (LUTZ, 1969 ; MEINS, 1983 ; EVANS et al, 1984 ; DEMARLY,1985 ; et GOULD, 1986).

D'après MARGARA (1989),en culture *in-vitro*, l'embryogénèse somatique peut être assurée par différents explants présentant des potentialités embryogénétiques , feuilles, pétioles et racines , donnant naissance à des embryons diploïdes appelés embryoïdes.

L'embryogénèse somatique est une technique récente de la multiplication *in-vitro*, permettant de produire rapidement des milliers d'embryons par litre de milieu de culture.

D'après SCRIBAN (1999), l'embryogénèse somatique connaît un intérêt croissant depuis les années 80. Elle apparaît comme étant la meilleure méthode de multiplication végétative.

L'embryogénèse permet d'assurer en permanence un taux élevé d'individus sains, juvénils et homogènes en réduisant les coûts élevés liés à la propagation *in-vitro* (SIHACMACKR et al., 1995 et NOZERAN, 1985).

Par ailleurs, elle nous permet l'exploitation de la variabilité existante chez l'*Atiplex halimus*, qui est très hétérogène ; ce qui offre de vastes possibilités de sélection et de clonage d'individus résistants aux conditions externes : salinité, sécheresse et froid (FRANCLET et LEHOUEIROU, 1971).

Parmi les différents groupes de régulateurs impliqués dans les procédés de croissance et de morphogénèse des tissus, les auxines et les cytokinines sont les plus importants (IBRAHIM, 1983 ; ROLAND, 1984).

Dans ce chapitre, nous avons étudié l'influence de différentes combinaisons hormonales en auxine et cytokinine sur différents types d'explants afin d'obtenir des cals embryogènes et de voir également quel est l'explant qui donne le meilleur pouvoir callogène.

Pour ces essais, nous avons retenu deux milieux de base : MURASHIGE et SKOOG et GAMBORG et comme hormones de croissance l'A.I.A ; le 2-4D et la Kinétine.

1 - Influence des combinaisons en substance de croissance sur différents types d'explants

Des essais ont été réalisés sur différentes parties de la plante pour l'obtention des cals : feuilles, racines, hypocotyle, entre-nœud, feuilles cotylédonnaires (planche 8).

PLANCHE 8



Fig A : Cals obtenus à partir de fragments d'entre-nœuds.



Fig B : Cals obtenus à partir fragments de feuilles.



Fig C : Cals obtenus à partir de fragments de racines. cotylédonnaires.



Fig D : Cals obtenus à partir fragments de feuilles



Fig E : Cals obtenus à partir de fragments d'hypocotyles.

Cals développés partir de différentes parties de la plante sur milieu MURASHIGE et SKOOG.

Trois types d'explants sont retenus pour l'obtention de cals embryogènes. Nous avons testé deux combinaisons en A.I.A – Kinetine et en 2-4 D – Kinetine avec 4 équilibres sur trois types d'explants : feuilles (EX3), entre-nœud (EX1) et racines (EX2) afin de déterminer la combinaison donnant le meilleur pourcentage de callogenèse et de voir l'aptitude des différents explants à la callogenèse ainsi que l'obtention de cals embryogènes.

1 . 1 . Milieu de base GAMBORG

L'apparition des cals a lieu une semaine après la mise en culture.

Nous avons également remarqué l'apparition de cals au niveau du milieu témoin (sans substance de croissance).

1.1 .1 . Effet des différentes combinaisons en AIA/KINETINE

Après un mois de culture, nous avons calculé le pourcentage des cals, pour connaître l'aptitude des explants à donner des cals embryogènes en fonction des différentes combinaisons hormonales testées.

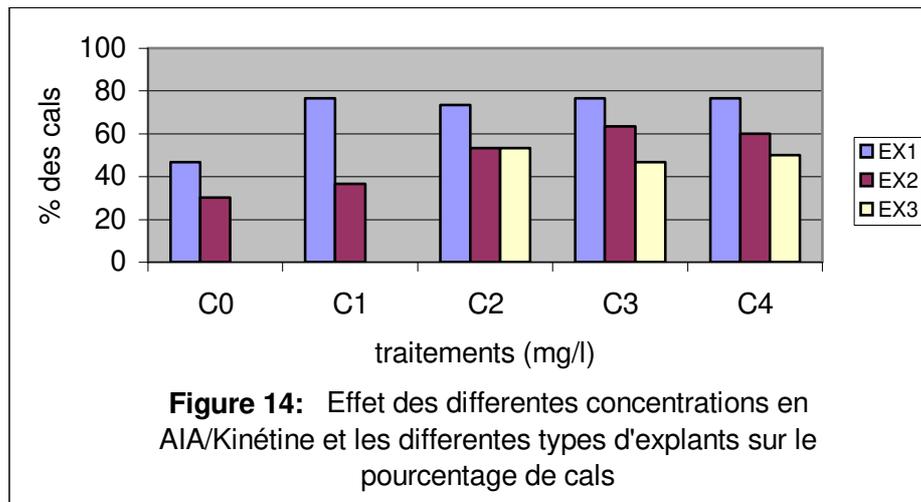
+ Pourcentage des cals

D'après les résultats obtenus, le tableau 13 montre que le pourcentage le plus élevé des cals est obtenu par les combinaisons C₃ et C₄ avec 62,22% et le plus faible pourcentage par le témoin avec 25,56%.

Tableau 13 : Effet des différentes combinaisons en AIA, Kinétine (combinées) et les différents types d'explants sur le pourcentage de cals.

Concentrations Explants	C₀	C₁	C₂	C₃	C₄	Moyennes Facteur 2
EX 1	46.67 ± 20.82	76.67 ± 20.82	73.33 ± 11.55	76.67 ± 20.82	76.67 ± 15.28	70 ± 15.43 A
EX 2	30.00 ± 10.00	36.67 ± 5.77	53.33 ± 11.55	63.33 ± 32.15	60 ± 10.00	48.67 ± 14.14 B
EX 3	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	53.33 ± 5.77	46.67 ± 15.28	50 ± 17.32	30 ± 9 C
Moyennes	25.56 ±	37.78 ±	60 ±	62.22 ±	62.22 ±	Moyenne
Facteur 1	11.55 B	10.80 B	8.66 A	20.62 A	12.53 A	Facteurs 1.2 = 49.56

L'analyse de la variance facteur 1 (combinaison hormonale) facteur 2 (nature de l'explant) révèle une action très hautement significative sur le pourcentage des cals ; l'analyse de la variance interfactorielle montre qu'il n'y a aucune différence significative entre les différentes combinaisons et les différents types d'explants.



Quant au deuxième facteur, le pourcentage des cals diffère d'un type d'explant à un autre d'une façon décroissante (70 ; 48 et 30 %) ceci pour EX1 (entre-nœud), EX2 (racine), EX3 (feuille) respectivement (tableau 13 et fig. 14).

Les combinaisons C0 et C1 n'ont pas permis aux explants issus de feuilles d'exprimer leur pouvoir callogène.

+ couleur et texture des cals

La couleur et la texture des cals nous permettent de connaître les caractéristiques morphologiques des cals embryogènes.

Les cals obtenus et issus des différents milieux présentent des caractéristiques morphologiques variés.

Les cals issus de feuilles sont de couleur beige avec une texture friable (caractéristique des cals embryogènes), ceci pour les combinaisons C2, C3 et C4. En ce qui concerne les combinaisons hormonales C0 et C1, nous n'avons pas eu de callogenèse.

En ce qui concerne les entre-nœuds, seule la combinaison C1 a donné des cals beiges à texture friable ; les cals issus des combinaisons C0 et C3 sont de couleur brune à texture desséchée, alors que ceux des combinaisons C2 et C4 sont de couleur jaunes, friables à consistance molle.

Pour les racines, seule la combinaison C0 (sans substance de croissance) a donné des cals beiges, friables de consistance molle ; pour les autres combinaisons, les cals obtenus sont de couleur brune de texture noduleuse et de consistance ferme.

Tableau 14 : Effet des différentes combinaisons en AIA, Kinétine sur la couleur et la texture des cals

<i>Concentrations</i> Explants		C0	C1	C2	C3	C4
<i>Feuilles</i>	COLEUR	-	-	Beige	Beige	Beige
	TEXTURE	-	-	Friable	Friable	Friable
Entre-nœuds	COLEUR	Brune	Beige à brune	Jaune	Brune	Jaune
	TEXTURE	Desséchée	Friable	Friable à consistance molle	Desséchée	Friable de consistance molle
Racines	COLEUR	Beige	Brune	Brune	Brune	Brune
	TEXTURE	Friable à consistance molle	Noduleuse de consistance ferme			

La dédifférenciation des racines à l'état de cellules indifférenciées aboutit à la formation de cals de couleurs et textures variables. Les concentrations C1,C2,C3 et C4 donnent des cals bruns de texture noduleuse, de consistance ferme, contrairement au milieu témoin qui permet la formation de cals beiges à texture friable de consistance molle.

1 . 1 . 2 . Effet des différentes combinaisons en 2-4D/ KINETINE

Après un mois de culture, nous avons analysé l'influence des combinaisons 2-4D – Kinétine sur le pourcentage et la morphologie des cals obtenus à partir des différents explants.

+ Pourcentage des cals

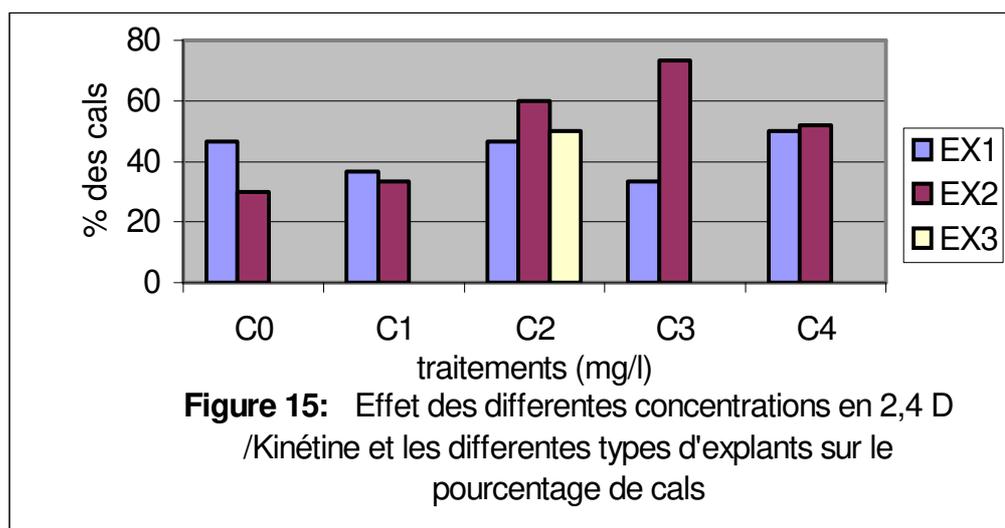
D'après le tableau 13, nous remarquons que les différentes combinaisons hormonales présentent une action très hautement significative sur le pourcentage de cals obtenus.

Les résultats montrent une action très hautement significative selon le type d'explant. Le pourcentage le plus élevé est donné par les racines : 49,73 % suivi par les entre-nœud : 42,67% et enfin par les feuilles : 10,00 %.

Nous notons également qu'il n'y a eu aucune calogénèse pour les combinaisons C0 ,C3 et C4.

Tableau 15 : Effet des différentes combinaisons en 2.4-D , kinétine
(combinées) et les différents types d'explants sur le pourcentage des cals

Concentrations Explants	C0	C1	C2	C3	C4	Moyenne Facteur 2
	EX 1	46.67 ± 20.82	36.67 ± 5.77	46.67 ± 5.77	33.33 ± 20.82	50.00 ± 10.00
EX 2	30.00 ± 10.00	33.33 ± 5.77	60.00 ± 26.46	73.33 ± 11.55	52.00 ± 23.07	49.73 ±14.63 A
EX 3	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	50.00 ± 10.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	10.00 ± 3.78 B
Moyennes Facteur 1	25.56 ± 11.55 B	23.33 ± 4.08 B	52.22 ± 14.43 A	35.56 ± 8.16 A	34.00 ± 12.53 A	Moyenne Facteur 1.2 = 34.13



+ Couleur et texture des cals

Les caractéristiques morphologiques des cals issues des différents types d'explants présentent des couleurs et texture variables.

Les feuilles en présence de la combinaison C2 donnent des cals beiges, de texture friable caractéristique des cals embryogènes. Quant aux autres combinaisons (C0,C1,C3 et C4) il n'y a eu aucune callogenèse.

Tableau 16 : Effet des différentes concentrations en 2,4-D, Kinétine sur la couleur et la texture des cals

<i>Concentrations</i> Explants		<i>C0</i>	C*1	C*2	C*3	C*4
Feuilles	COLEUR	-	-	Beige	-	-
	TEXTURE	-	-	Friable	-	-
Entre-nœuds	COLEUR	Brune	Beige	Beige	Jaune	Beige
	TEXTURE	Desséchée	Granuleuse de consistance ferme	Granuleuse de consistance ferme	Friable de consistance molle	Friable de consistance molle
Racines	COLEUR	Beige	Beige	Beige	Brune	Beige
	TEXTURE	Friable	Friable	Friable	Noduleuse	Friable

Quant aux entre-nœuds, la couleur et la texture des cals obtenus varient d'un milieu à un autre. Les combinaisons C1 , C2 et C4 ont donné des cals beiges mais de consistance différente qui sont respectivement granuleuse ferme pour les deux premiers et friable de consistance molle pour le dernier. Pour la combinaison C0, la couleur est brune avec une texture desséchée ; quant à C3 la couleur est jaune et une structure friable de consistance molle.

Les cals issus des racines sont de couleur beige avec une texture friable de consistance molle en présence des combinaisons hormonales C0,C1 C2 et C4

1.1.3 Conclusion et discussion

Les résultats obtenus montrent que le choix du type d'explant et les substances de croissance jouent un rôle très important sur la callogenèse et la formation de cals embryogènes.

L'aptitude à la callogenèse diffère d'un type d'explant à un autre, les entre-nœuds montrent une meilleure aptitude à la callogenèse par rapport aux feuilles et aux racines.

Selon AUGÉ (1989), les explants prélevés sur une même plante donnent des résultats différents.

Les fragments prélevés à différents niveaux de la plante ne donnent pas les mêmes résultats (NOVAK et KONECMA, 1982 ; DAIKH, 1987 ; AUGÉ, 1989 ; BOXUS, 1995).

L'âge de l'explant a également un effet sur la callogenèse car au cours du stade juvénile, les tissus présentent de bonnes réactions et sont à l'origine de nombreuses réussites en culture *in-vitro*. Par contre, le vieillissement de l'organe modifierait parfois les potentialités embryogènes des explants (RHISS et BEAUCHESNE,1979).

PLANCHE 9

A



C

B

**Aspect morphologique de cals développées pendant un mois
Sur milieu GAMBORG additionné de 1mg/l 2,4 D + 1 mg/l de kinétine.**

A : Cals obtenus à partir de fragments de feuilles.

B : Cals obtenus à partir de fragments d'entre-nœuds.

C : Cals obtenus à partir de fragments de racines.

L'état physiologique interne de l'explant intervient également en fonction des différentes concentrations en AIA, KINETINE (combinées) (TISSERAT, 1979 ; BIGOT et CHAUSSAT, 1980 ; AUGÉ, 1989).

Quand au pourcentage, de la couleur et de la texture des cals, le meilleur type d'explant qui montre une meilleure aptitude à la callogenèse et l'obtention de cals embryogène est l'entre-nœud avec les concentrations C2 et C3, suivi par les feuilles et en dernier les racines.

La modification des concentrations en 2,4-D, KINETINE (combinées) entraînent une action significative sur le pourcentage, la couleur et la texture des cals issus de différents types d'explants.

Le 2,4-D est l'auxine la plus utilisée en raison de son fort pouvoir callogène.

Chez beaucoup d'espèces, le 2,4-D est l'agent principale de la formation de cals embryogènes (KATO et TAKEUCHI, 1966 ; BOULAY, 1987 ; MARGARA, 1989.)

Les résultats montrent que l'effet des différentes combinaisons en substance hormonale donnent des cals avec différentes couleurs et textures.

La combinaison 2,4-D-Kinétine montre la meilleure aptitude à la callogenèse en donnant des cals de couleur beige avec une texture friable. D'après les travaux de ZAID et TISSERAT (1983) ; DAGUIN et LETOUSE (1988) ; BENREBIHA et HAMDANI (1998) : ce type de cals est embryogène.

PIATTI (1990) confirme que les cals ayant une couleur jaune à texture friable de consistance molle présentent des caractéristiques morphologiques des cals embryogènes.

Selon DAIKH et DEMARLI (1987), les cals embryogènes se caractérisent par une texture friable de couleur beige.

1 . 2 . Milieu de base MURACHIGE et SKOOG

Pour cette partie, nous avons étudié l'influence des combinaisons AIA - Kinetine et 2,4,D - Kinétine sur deux types d'explants : entre-nœud (EX1) et feuille (EX2).

1 . 2 . 1 . Effet des différentes combinaisons en AIA/KINETINE

A l'issue de nos essais, les résultats obtenus montrent que la modification des combinaisons en substances de croissance dans le milieu de culture n'a aucun effet sur la callogenèse.

Les explants cultivés sur les milieux de culture contenant la combinaison AIA/ KINETINE (combinées) n'ont manifesté aucune callogenèse. Les entre-nœuds et les feuilles se sont nécrosés après une semaine de culture.

1 . 2 . 2 . Effet des différentes combinaisons en 2,4,D-KINETINE

L'étude de l'influence des différentes combinaisons en 2,4,D -Kinétine sur le pourcentage, la couleur et la texture des cals a été réalisé après un mois de culture.

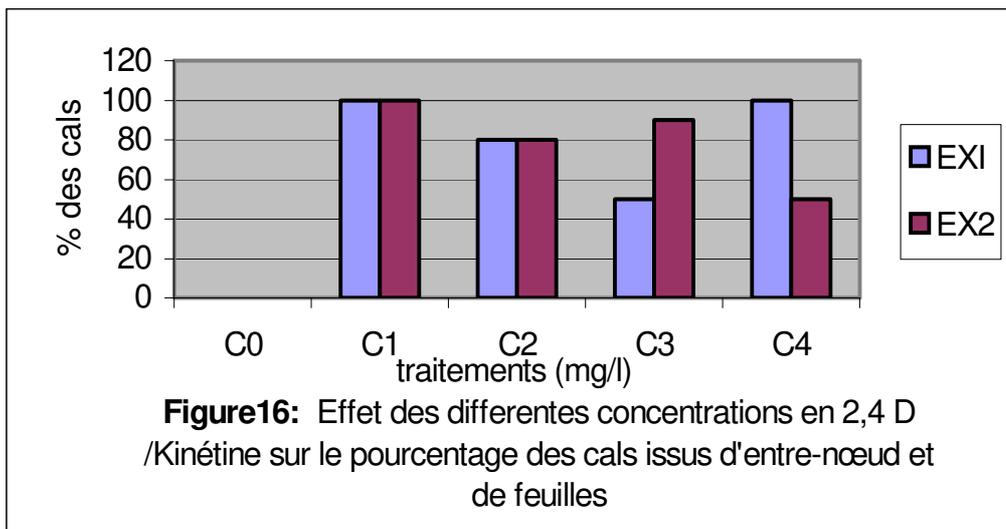
+ Pourcentage des cals

D'après le tableau 17, nous remarquons que les différentes concentrations hormonales présentent une action significative sur le pourcentage des cals. Le plus grand pourcentage (100%) est obtenu avec les concentrations C1, C2 pour les entre-nœuds et le plus faible : (50%) avec la concentration C3.

Tableau 17 : pourcentage des cals obtenus après 30 jours de culture.

<i>Concentrations</i> Explants	C ₀	C ₁	C ₂	C ₃	C ₄
EX 1		[100]	[91-69]	[63 – 37]	[100]
EX 2		[100]	[91 – 69]	[98 - 82]	[63 -37]

L'analyse statistique met en évidence une action significative sur le pourcentage des cals en fonction des combinaisons mais aucun effet significatif selon la nature de l'explant.



Pour les feuilles, le plus grand pourcentage des cals est obtenu avec la concentration C1 alors que la combinaison C0 n'a pas permis aux feuilles d'exprimer leur pouvoir callogène (Figure 16).

+ Couleur et texture des cals

Les cals issus des feuilles sont de couleur et de texture variables .

Les combinaisons C2, C3 et C4 donnent des cals de couleur verte et de texture noduleuse à consistance ferme (Planche 11). Par contre, la concentration C1 donne des cals de couleur brune à texture desséchée.

Tableau 18 : Effet des différentes combinaisons en 2,4-D, Kinétine sur la couleur et la texture des cals.

<i>Concentrations</i>		C0	C1	C2	C*3	C*4
Explants						
Feuilles	COULEUR	-	Brune	Vert	Vert	Vert
	TEXTURE	-	Desséché	Noduleuse de consistance ferme	Friable	Friable de consistance ferme
Entre-nœuds	COULEUR	-	Jaune	Beige	Jaune à Vert	Jaune à Vert
	TEXTURE	-	Friable	Fiable de consistance molle	Friable	Friable de consistance molle

D'après le tableau 18 les cals issus des entre-noeuds diffèrent par leur couleur et leur texture en fonction des différentes combinaisons en 2,4-D,KINETINE.

PLANCHE 10

A



B



C



D



Aspect morphologique de cals développés pendant un mois sur milieu MURASHIGE et SKOOG additionné de 2,4 D-kinétine à partir de fragments de feuilles et d'entre-nœuds.

- A : Cals embryogènes issu d'entre-nœuds avec une concentration de 1mg/l de 2,4D et 1mg/l kinétine.**
- B : Cals embryogènes issu de feuilles avec une concentration de 1mg/l de 2,4D et 1mg/l kinétine.**
- C : Cals embryogènes issu d'entre-nœuds avec une concentration de 2mg/l de 2,4D et 2mg/l kinétine.**
- D : Cals embryogènes issu de feuilles avec une concentration de 2mg/l de 2,4D et 2mg/l kinétine.**

Les combinaisons C1, C3 et C4 donnent des cals jaunes à verts de texture friable. Par contre la concentration C2 permet aux entre-nœuds d'être différenciés en cals présentant des caractéristiques morphologiques des cals embryogènes de couleur beige à texture friable.

La combinaison C0 n'a permis aucune callogenèse quel que soit le type d'explant. (planche)

1 . 2 . 3 . discussion et Conclusion

Les deux types d'explants étudiés ont pu exprimer leur pouvoir Callogène mais les entre-nœuds ont montré une meilleure aptitude à la callogenèse.

D'après BOULAY (1987), les cals issus des différents explants (hypocotyle, apex, feuilles, entre-nœud) ont été susceptibles de donner des structures embryonnaires. Cependant, un meilleur développement des cals embryogènes provenait des entre-nœuds.

Selon SAKA et al (1997) la réponse des explants est assez hétérogène.

D'après AUGÉ (1989), les explants sont constitués de divers types cellulaires dont la structure génétique n'est pas toujours homogène. Les recherches cytologiques ont montré que les niveaux de ploïdie n'étaient pas identiques d'une cellule à une autre.

SHARP (1980) et EVANS (1981) confirment que les cellules initiatrices sont déjà différenciées, mais dépourvues de capacité embryogène.

Les bouleversements de comportement semblent être essentiellement liés aux coupures des corrélations entre l'explant et la plante mère ainsi qu'à son nouvel environnement (BIGOT et CHAUSSAT, 1980 ; LUTZ , 1985 ; NOZERAN, 1985).

La combinaison AIA/KINETINE (combinée) n'a pas permis aux deux types d'explants d'exprimer leur pouvoir callogène quel que soit la combinaison hormonale utilisée.

Par contre, les différentes combinaisons en 2,4-D,KINETINE a permis aux deux types d'explants d'exprimer leur pouvoir callogène pour la concentration C2.

Le 2,4-D est considéré comme un facteur essentiel pour l'induction de l'embryogenèse somatique.

L'utilisation du 2,4-D comme meilleur inducteur de l'embryogenèse somatique a été discutée par différents auteurs : BOULAY,1987 ; MARGARA,1989 ;RAGHVAN,1997 ; VIANA,1997 ; CHOI et al ,1999).

En général, les concentrations en cette auxine varient entre 0,5 mg/l et 1mg/l (KOTT KASHA ,1984 ;CHAVEZ et al.,1992 ; CHOI et al.,1999 BENREBIHA et DJAADI, 1999).

Quant à la couleur et structure des cals, nous avons obtenu des cals beiges et jaunes à structure noduleuse et de consistance molle ainsi que des cals de couleur verte.

La coloration verte est une preuve de l'existence d'une activité photosynthétique (DUCREUX et al., 1986).

Selon SAKA et al. (1997), seul les cals de texture noduleuse, de couleur blanche à brun sont embryogènes.

TOURTE (1998) montre que les processus embryonnaires se manifestent très tôt par la formation de petits nodules de cellules méristématiques ; seules les cellules appartenant à ces nodules participent à l'élaboration des embryons somatiques.

D'après LEBRUN (1986), ces cals sont formés de proembryons bloqués au stade globulaire.

2 - Suspension cellulaire

Les quatre milieux de culture utilisés : MURASHIGE et SKOOG , WHITE, GAMBORG et HELLER en présence de 2,4-D à 10^{-6} M , nous montre une grande hétérogénéité de structure des cellules.

Seul le milieu GAMBORG a entraîné la formation d 'embryons somatiques du stade globulaire au stade cordiforme ; beaucoup sont coalescents et atypiques (planche 13).

Selon BAYLISS (1980), le milieu de culture peut influencer non seulement l'apparition des embryons somatiques mais aussi sur la conformité génétique de ce dernier.

Les milieux de culture choisis doivent être les plus parfaitement adaptés aux besoins nutritifs de la plante étudiée afin de laisser s'exprimer pleinement son potentiel génétique (PIATTI, 1990).

Selon BOXUS (1995),la modification des milieux de culture porte le plus souvent sur la forme de la source d'azote, nitrate, ammonium, acide aminé, sur la nature et la concentration de la source de carbone et en dernier la concentration en régulateur de croissance.

D'après RAGHVAN (1997) le facteur essentiel pour l'expression du pouvoir embryogène des tissus, c'est la présence des auxines dans le milieu et en particulier le 2,4-D.

PLANCHE 11



A



B

Embryons somatiques obtenus en suspension cellulaires.

A : Stade cœur.

B : Stade torpille.

3 - Conclusion

Les résultats obtenus sur l'effet des différentes concentrations en auxine, cytokinine (combinées) et différents types d'explants sur la callogenèse et l'embryogenèse somatique chez l'Atriplex halimus montrent que l'aptitude des différents types d'explants à la callogenèse et la formation des cals embryogènes de point de vue morphologique, varient en fonction des différentes concentrations en auxine, cytokinine (combinées) et également en fonction du type d'auxine et cytokinine utilisé.

Le milieu de culture GAMBORG induit une meilleure callogenèse que le milieu MURASHIGE et SKOOG, cela doit être dû aux effets des macroéléments.

Les meilleures combinaisons qui ont permis aux différents types d'explants d'exprimer leur pouvoir callogène et de donner des cals embryogènes sont :

AIA-KINETINE et 2,4-D pour le milieu Gamborg et 2,4-D, KINETINE pour le milieu Murashige et Skoog .

Tous les explants utilisés ont montré leur aptitude à la callogenèse en fonction des différentes combinaisons en substance de croissance mais le meilleur explant est l'entre-nœud.

Quant à la texture, les cals beiges à texture friable (caractéristique des cals embryogènes) sont obtenus surtout par les entre-nœuds sur milieu GAMBORG. Par contre, le milieu MURASHIGE et SKOOG donne plutôt des cals verts à activité photo synthétique.

Nous avons obtenu une callogenèse à partir d'explants cultivés sur le milieu de culture GAMBORG sans hormone de croissance. Cette callogenèse semble être possible par le choix des macroéléments qui ont un effet sur la balance minérale, cela a été signalé par BENREBIHA et al.(1992)

En ce qui concerne la suspension cellulaire, nous avons observé des embryons somatiques seulement sur milieu GAMBORG en présence de 2,4-D.

Chapitre V

Effet du sel sur la morphogenèse de *Atriplex halimus* et la teneur en proline en culture *in-vitro* et *in-vivo*

Introduction

La sélection, parmi les espèces cultivées ; des cultivars résistants à la salinité constitue une tâche aléatoire et difficile, puisque la plupart de ces espèces ont été domestiquées en absence de sel et de ce fait ne possèdent pas nécessairement toutes les composantes physiologiques requises pour l'expression de la résistance à la contrainte saline (FLOWERS YEO,1995).

La végétation halophile a fait l'objet de nombreux travaux dans différentes disciplines. En Afrique du Nord on peut citer quelques auteurs (DUBUIS et SIMMONNEAU, 1954, 1957, 1960 ; FROMENT, 1972 ; GUINOCHET,1954 ; KILLIAN et LEMEIG, 1948 ; KILLIAN, 1951,1953 ; QUEZEL, 1954, 1957 ; NOVIKOF, 1957 ; POUGET, 1980 ;KAABACHE, 1991 ; BOUABDALLAH,1992).

BINET (1982) a observé que l'action du sel sur les voies métaboliques suivies par les composés azotés et sur les propriétés des parois et des membranes concourt à la définition des bases physiologiques de l'halophilie et de la résistance au sel.

De nombreux auteurs ont contribué à l'étude des mécanismes physiologiques et écophysiologiques de la résistance ou de l'adaptation des plantes aux milieux salés ou présentant des conditions stressantes : chocs hydriques ou de températures (BINET,1968,1978,1989 ; BOUCAUD et

UNGAR, 1975 ; BIGOT et BINET,1979 ; BILLARD et al., 1976,1982 ; AYADI et al. ,1980 ; MOZAFAR et GOODIN,1970).

Selon CHRETIEN (1992), parmi les axes de recherche les plus développés se trouve l'étude des effets de la salinité sur la croissance et la morphologie des plantes qui se font sentir dès la phase de la germination et se poursuivent tout au long du développement de la plante.

BINET (1989) a montré également que les végétaux supérieurs adaptés aux milieux chauds, secs ou salés présentent des particularités biologiques, morphologiques, anatomiques, cytologiques qui leur permettent soit d'échapper aux contraintes du milieu soit de résister à ces contraintes par différentes adaptations.

Parmi les plantes manifestant une résistance à la salinité, on peut citer les *Atriplex* (ZID et BOUKHRIS,1977). Les *Atriplex*, classés comme halophytes ont fait l'objet de nombreux travaux relatifs à leur résistance et leur physiologie vis à vis du sel (TWITCHELL, 1955 ; BEADLE et al.,1957 ; BLACK,1958,1960 ; BINET1965 ; SPRINGFIELD,1966 ; CHARTTERTON et McKELL,1969 ; SANKARI et BARBOUR,1972 ; KAPLAN et GALE, 1972 ; BILLARD et al.,1976 ; BIGOT et BINET,1979 ; IGNACIUK et LEE,1980 ; TERRENCE et UNGAR, 1983. Ils sont capables d'accomplir leur cycle de développement et de survivre sur de tels milieux (FAURIE et al.,1984).

D'après EL HAMROUNI (1986), les *Atriplex* tolèrent une salinité élevée sur laquelle ils sont cultivés. Selon LE HOUEROU (1992), les *Atriplex* peuvent tolérer jusqu'à 45g/l de NaCl. Ils peuvent valoriser les sols pauvres et dégradés, comme ils peuvent déssaliniser les sols salés (PANTANER et LE HOUEROU,1988).

La tolérance à la salinité est une caractéristique génétique ; elle est variable selon l'espèce et le développement de la plante mère (BEADLE, 1952 ; BINET, 1968 ; BILLARD et BINET, 1975 ; ZID et BOUKHRIS, 1977).

En réponse à la contrainte saline, une des stratégies d'adaptation consiste à synthétiser des osmoprotecteurs, principalement des composés aminés (LEVIGNERON et al., 1995 ; HANDA et al. 1986 ; YANCEY, 1994).

De nombreuses études sur les halophytes ont mis en évidence une accumulation d'acides aminés libres (STEWART, 1981), comme *suéda macrocarpa* (BOUCAUD, 1970), *limonium vulgare* (LARHER et al., 1970).

Chez les halophytes, l'accumulation de ce composé aminé s'interprète comme un indicateur de la tolérance à la salinité (DAINES et GOULD, 1985).

En effet, dans les milieux salés, les plantes s'adaptent en accumulant dans le cytoplasme des composés azotés comme la proline (IRIGOYEN et al., 1992).

La proline ou acide pyrrolidine 2 carboxylique $C_5H_9O_2N$ est l'un des vingt principaux acides aminés naturels qui entrent dans la constitution des protéines. Elle a été extraite pour la première fois par Fisher en 1901 (NEMMAR, 1983).

La proline joue un rôle dans le maintien des pressions cytosol-vacuole, dans la protection des membranes et des systèmes enzymatiques ainsi qu'un rôle de régulation du pH (STEWART, 1972 ; MONNEVEUX et THIS, 1997).

Cet acide aminé est retenu comme indicateur de la tolérance au froid, à la sécheresse ou à la salinité (FLOWERS et al., 1977 ; CHRETIEN, 1992 ; DELAUNEY et VERMA, 1993 ; TAYLOR, 1996).

Dans ce chapitre, l'étude portera sur le comportement de *Atriplex halimus*, soumis à différentes concentrations de NaCl et de suivre également les variations de la teneur en proline des plantules issues de semis en culture *in-vitro* et *in-vivo*.

1 . Effet de la salinité sur la croissance de l'*Atriplex halimus* en culture *in-vitro*

Cette étude a pour but d'étudier l'influence de différentes concentrations de NaCl sur la croissance des plantules et de constater la limite de la tolérance de l'*Atriplex* ainsi que la variation de la concentration de la proline en fonction de la salinité

1.1 . Effet du sel sur la croissance des plantules

Pour évaluer l'effet du sel sur la croissance des plantules, nous avons pris en considération le nombre de paires de feuilles, la longueur de la tige et de la racine principale.

1 . 1 . 1 . Nombre de paires de feuilles

Après un mois de culture, nous avons procédé au dénombrement des feuilles afin d'évaluer la production foliaire.

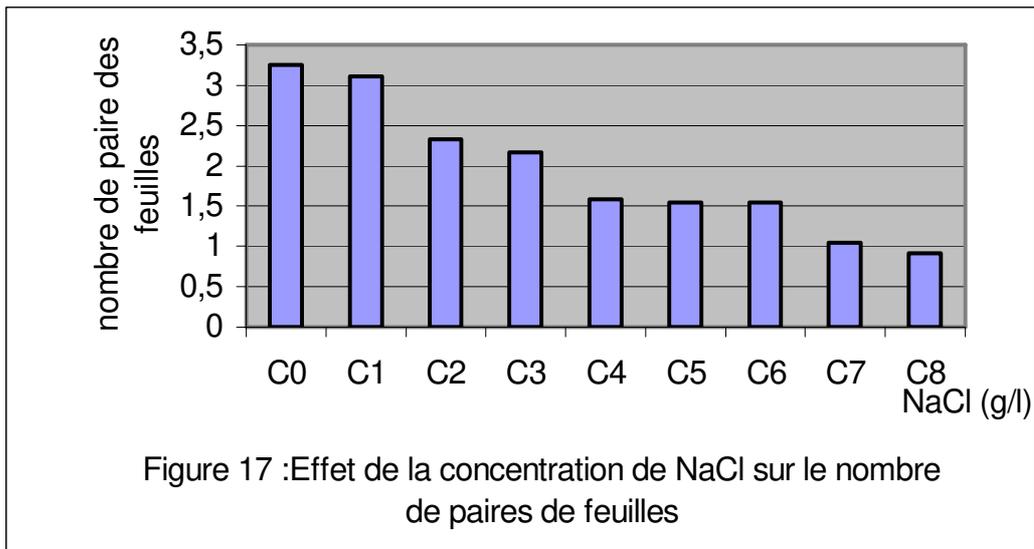
D'après le tableau 17, nous constatons que le témoin C0 et la concentration C1 (5g/l de NaCl) donnent le nombre de paires de feuilles le plus élevé respectivement 3,25 et 3,11 ; la valeur la plus faible est obtenue par la concentration C8 (40g/l de NaCl) et qui est de 0,91.

Tableau 19 : Nombre de paire de feuilles

Concentrations Explants	C0	C1	C2	C3	C4	C5	C6	C7	C8
	Moy	3,25	3,11	2,33	2,17	1,58	1,54	1,54	1,04
E.T. ±	0,35	0,42	0,47	0,12	0,11	0,06	0,06	0,06	0,12
G.H.	A	A	B	B	BC	BC	BC	C	C

La figure 17 montre que le nombre de paires de feuilles diminue en fonction de la concentration du NaCl dans le milieu ; à partir de la concentration C4 (20g/l de NaCl) la production foliaire est considérablement diminuée.

Au delà de 25g/l, nous avons observé un léger jaunissement accompagné de la chute des feuilles de la base mais n'avons pas observé de mortalité même à 40g/l de NaCl.



L'analyse statistique, montre que les différentes concentrations de NaCl ont un effet hautement significatif sur le nombre de paires de feuilles.

1 . 1 . 2 . longueur de la tige

Un mois après la mise en culture et à différentes concentrations de NaCl, les vitro-semis présentent une seule tige mince et d'une longueur variable.

La longueur la plus élevée a été obtenue pour la concentration C1 qui nous donne une valeur de 3,72cm suivi du témoin C0 et C3 avec les valeurs respectivement de 3,53 et 2,68 cm. Au delà de 20g/l (C4) de NaCl la longueur diminue considérablement, la l'allongement le plus faible est obtenu

par la concentration C8 (40g/l de NaCl est qui est de 0,56cm (Tableau 20 et figure17).

Tableau 20 : Longueur de la tige

concentrations Explants	C0	C1	C2	C3	C4	C5	C6	C7	C8
Moy (cm)	3,53	3,72	2,68	1,57	1,64	1,39	1,35	0,95	0,56
E.T. ±	0,67	1,38	1,83	0,42	0,12	0,22	0,29	0,21	0,01
G.H.	AB	A	ABC	ABC	BC	BC	BC	C	C

Nous remarquons qu'à partir de la concentration C3 , l'allongement des plantules est ralenti et qu'à partir de 35g/lde NaCl, nous avons observé une inhibition de la croissance des tiges (Planche 12).

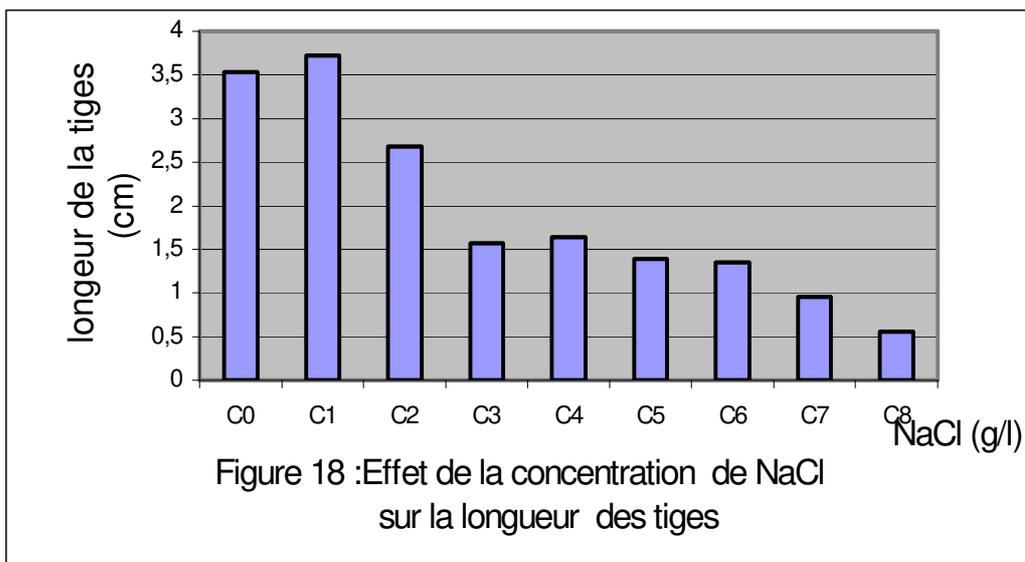


PLANCHE 12



**Aspect morphologique de vitro-plants développés pendant un mois
Sur milieu de MURASHIGE et SKOOG en présence de différentes
concentrations en NaCl (0, 5, 10, 15, 20, 25, 30 et 35 g/l de NaCl).**

L'analyse statistique montre qu'il existe une différence très hautement significative sur l'allongement des tiges.

1 . 1 . 3 . La longueur de la racine principale

D'après le tableau 19, c'est la concentration C2 qui donne la longueur la plus importante de la racine principale (4,44cm) suivie par la concentration C1 et le témoin qui donnent des valeurs respectivement de 4,30 et 4,22cm.

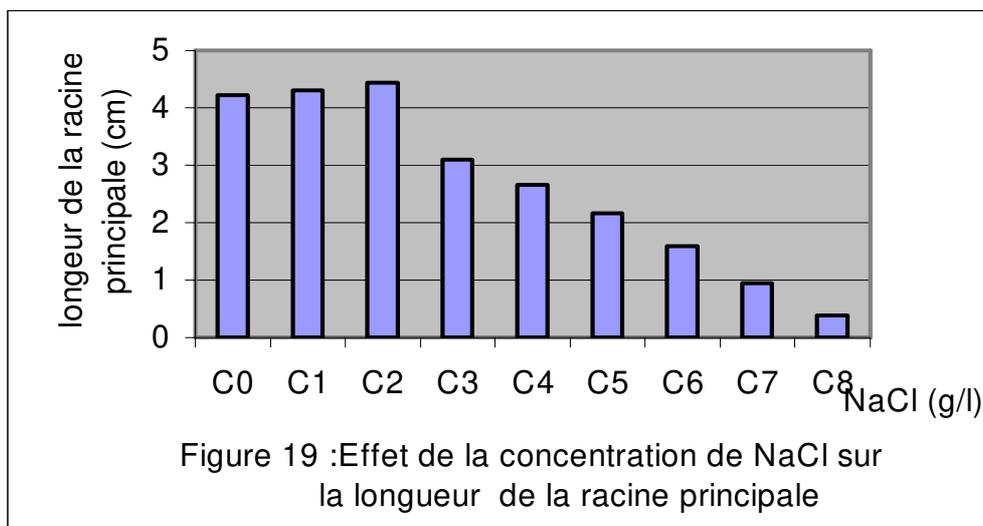
A partir de 15g/l de NaCl, la longueur de la racine est fortement réduite (Figure 19).

Tableau 21 : Longueur de la racine principale

Concentrations Explants	C0	C1	C2	C3	C4	C5	C6	C7	C8
	Moy	4,22	4,30	4,44	3,10	2,66	2,16	1,59	0,94
E.T. ±	0,69	0,75	0,49	1,20	0,28	0,13	0,64	0,02	0,04
G.H.	A	A	A	AB	ABC	ABC	BCD	CD	D

Les concentrations 5g/l et 10 g/l de NaCl produisent des racines ayant une longueur homogène et plus longue et des racines secondaires intenses.

Cependant, nous avons constaté que plus la concentration en NaCl augmente et plus les racines formées sont courtes et les racines secondaires moins intenses.



Une différence significative est révélée entre les différentes concentrations de NaCl sur la longueur de la racine principale.

1 . 1 . 4 . Discussion et conclusion

Nous remarquons d'après les résultats obtenus une stimulation du nombre de feuilles, de la longueur de la tige et de la racine à 5 et 10g/l de NaCl ; mais au delà de 20g/l la croissance diminue considérablement. Ce qui confirme les résultats déjà obtenus par BENREBIHA, 2001 et BENAHMED et al., 1996.

BLACK(1956), montre que 5g/l de NaCl améliore la croissance, chez l'*Atriplex hastata*. BILLARD et BINET (1975), observent que la croissance d'*Atriplex littoralis* est maximale à 5g/l de NaCl ; BILLARD et al.(1976) signalent également l'insensibilité d'*Atriplex arenaria* au sel tant que la concentration ne dépasse pas 10g/l mais au delà de 20g/l, le nombre de paires de feuilles diminue considérablement.

De plus, nous notons une manifestation d'un léger jaunissement, accompagné de la chute des feuilles les plus basses (indice de la proximité de la zone de toxicité) ; comme cela a été signalé par ZID et BOUKHRIS (1977) à 30 g/l de NaCl.

Quant au dépôt de sel et l'épaississement des feuilles, cela a été déjà signalé par divers auteurs (AYADI et al., 1980 ; BENREBIHA, 2001 ; FREITAS et al. ; 1992). Cet épaississement serait dû à l'accumulation du NaCl au niveau des feuilles.

Chez les halophytes, le sel induit une augmentation de l'épaisseur des feuilles et de la taille des cellules palissadiques, ainsi qu'une réduction de la densité stomatique (CHRETIEN, 1992).

Certaines halophytes excluent le chlorure de sodium de leur feuilles par glandes spéciales dites « glandes à sel », de structure plus ou moins complexe située à la face supérieure de ces feuilles. L'excrétion peut se faire aussi sous forme de poils salés comme chez les *chénopodiaceae* ; dans le genre *Atriplex*, les poils sont constitués par des cellules très allongées, l'accumulation se faisant dans les vacuoles (AYADI et al., 1980).

L'*Atriplex halimus* est caractérisé par une forte capacité d'absorption et une accumulation préférentielle du chlore et du sodium dans les feuilles, la contribution de ces ions peut rendre compte de la presque totalité de l'abaissement du potentiel osmotique (HAMZA, 1980) ; dans tous les cas, l'accumulation de Na⁺ est plus rapide que celle de Cl⁻ (SLAMA, 1982, 1987 ; HERNANDEZ et al., 2000).

Selon AYADI et al. (1980) chez ces halophytes 90% de Na⁺ accumulé se retrouve au niveau des organes aériens dont au moins 80% au niveau des feuilles.

Lors de notre étude, la réduction de la longueur de la tige est affectée par les concentrations élevées du sel (30,35,40 g/l de NaCl). Cette

réduction de croissance des tiges peut être due aux effets de NaCl dans le milieu de culture, se traduisant par une inhibition des éléments minéraux par les racines.

Des résultats analogues ont été observés par SOLTANI et al.(1990) montrant que les réductions de croissance en présence de NaCl sont attribuables aux effets du sel dans le milieu plutôt qu'à un effet toxique des ions Na^+ et Cl^- .

Le NaCl exerce un effet dépressif sur la croissance en limitant l'approvisionnement de la plante en Ca^{++} (élément indispensable pour le maintien de la structure cellulaire (SOLTANI et al.1990 ; POURRAT et DUTUIT, 1993).

Les travaux de LANGDAL et THOMAS (1971) ont montré que l'augmentation de la concentration du milieu en NO_3^- peut améliorer la croissance des plantules traitées par le NaCl. Cet effet a été attribué à une réduction de l'absorption des chlorures Cl^- par les nitrates NO_3^+ (KAFKAFI et al.,1982 ; MUNNS et TERMAAT,1986 ; TORRES et BINGHAM, 1973 ; YOUSSEF et SPRINT, 1983)

L'augmentation de sel induit une réduction de l'absorption de certains éléments nutritifs comme l'azote ; ce dernier favorise le développement végétatif (AUGE,1986).

Cette réduction est due à la présence élevée de sodium dans le milieu de cultures, qui bloque l'assimilation de certains éléments nutritifs nécessaires au développement des tiges par le phénomène d'antagonisme (MAZLIAK, 1981).

L'enrichissement des tissus en sodium serait plutôt la cause de la réduction de la croissance (DELANE et al., 1982).

Selon WINICOV (1998), dans le cas d'une présence excessive du sodium, ce dernier sera utilisé à la place du potassium.

Le développement racinaire a été aussi affecté par les concentrations élevées de NaCl.

Selon ZID et BOUKHRIS (1976), l'*Atriplex* pousse et se développe à 10 g/l ; mais au delà, se manifeste un effet dépressif très marqué par le chlorure de sodium sur la rhizogenèse. La diminution du taux d'enracinement des racines peut être due aux phénomènes de toxicité.

Dans le cas de l'*Atriplex arenaria*, une augmentation de la concentration du milieu en NaCl modifie le rythme de croissance des racines (THUAULT, 1984).

D'autre part, les travaux de LEVITT (1982) montrent que les halophytes accumulent des quantités importantes de sodium dans la partie aérienne, alors que les racines sont moins riches en sodium que les feuilles.

Selon ZID et BOUKHRIS (1977) à 30 g/l de NaCl, les racines deviennent blanches grêles et ramifiées.

Nous avons constaté l'apparition de calcs sur les différentes concentrations de sel (0,5 ,10 ,et 15g/l) avec un pourcentage relativement faible (4,16 à 13,63 %) ; cette manifestation est considérée comme une manifestation morphologique de la plante (BENREBIHA, 1992).

1 . 2 . Accumulation de la proline chez les *vitro-semis* d'*Atriplex halimus*

Les essais ont été réalisés pour suivre l'évolution de la teneur en proline sous stress salin chez l'*Atriplex halimus* au stade 30 jours de développement pour les différents organes (tiges, racines et feuilles).

1 . 2 . 1 . Accumulation de la proline dans les feuilles

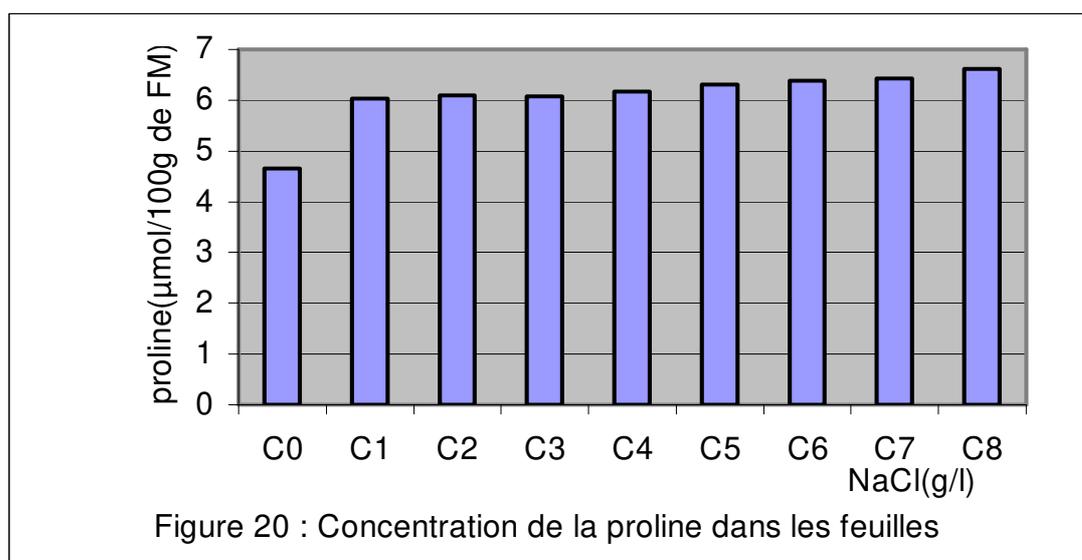
L'accumulation de la proline dans les feuilles de l'*Atriplex halimus* après 30 jours à partir des plantes stress *in-vitro* sont présentés dans le tableau 22.

Nous remarquons qu'à 30 jours de développement des vitro-semis que la concentration de la proline est significativement importante. Cette concentration est de l'ordre de 6,38 ; 6,43 et 6,61 $\mu\text{mol}/100\text{g}$ de MF respectivement pour les concentrations C6,C7,C8 (30, 35 et 40 g/l de NaCl) ; alors qu'elle n'est qu'à 4,66 $\mu\text{mol}/100\text{g}$ de MF pour le témoin.

Tableau : 22 Concentration de la proline dans feuilles après 30 jours de développement.

Concentrations Explants	C0	C1	C2	C3	C4	C5	C6	C7	C8
Moy	4,66	6,03	6,09	6,07	6,17	6,30	6,38	6,43	6,61
E.T. \pm	1,54	0,10	0,06	0,12	0,15	0,03	0,06	0,06	0,06
G.H.	B	A	A	A	A	A	A	A	A

D'après la figure 20, nous constatons que la teneur de la proline dans les feuilles augmente avec l'augmentation en sel.



L'analyse statistique a montré qu'il existe une différence significative sur la concentration de la proline chez l'*Atriplex halimus*

1 . 2 . 2 . Accumulation de proline dans les tige

La proline suit une évolution dans les tiges pour les différentes concentrations de sel.

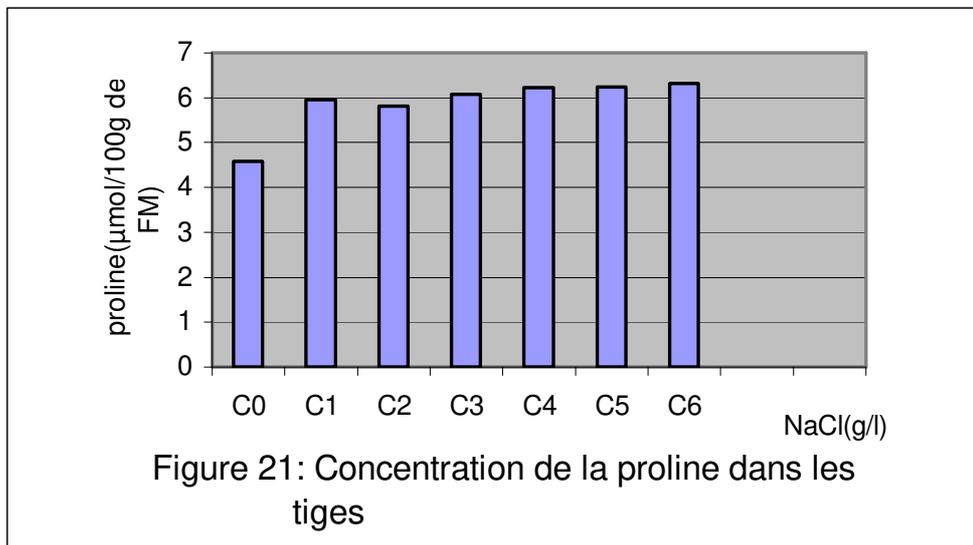
Les résultats de la teneur en proline, à 30 jours de développement de la plante, sont présentés dans le tableau 23.

Tableau 23 : Concentration de la proline dans les tiges après 30 jours de développement

Concentrations Explants	C0	C1	C2	C3	C4	C5	C6
Moy $\mu\text{mol}/100 \text{ mg de MF}$	4,58	5,95	5,8 2	6,07	6,22	6,24	6,31
E.T. \pm	1,20	0,15	0,4 3	0,03	0,03	0,07	0,06
G.H.	B	A	A	A	A	A	A

La figure 21 montre que la concentration C8 donne la plus grande valeur qui est de 6,31 $\mu\text{mol}/100 \text{ mg de MF}$ de proline.

Nous constatons par ailleurs que la teneur en proline des vitro-semis, augmente progressivement dans les tiges avec l'augmentation du sel.



D'après l'analyse statistique, il existe une différence hautement significative du facteur « sel » sur la concentration de la proline au niveau des tiges.

1.2.3. Accumulation de la proline dans les racines

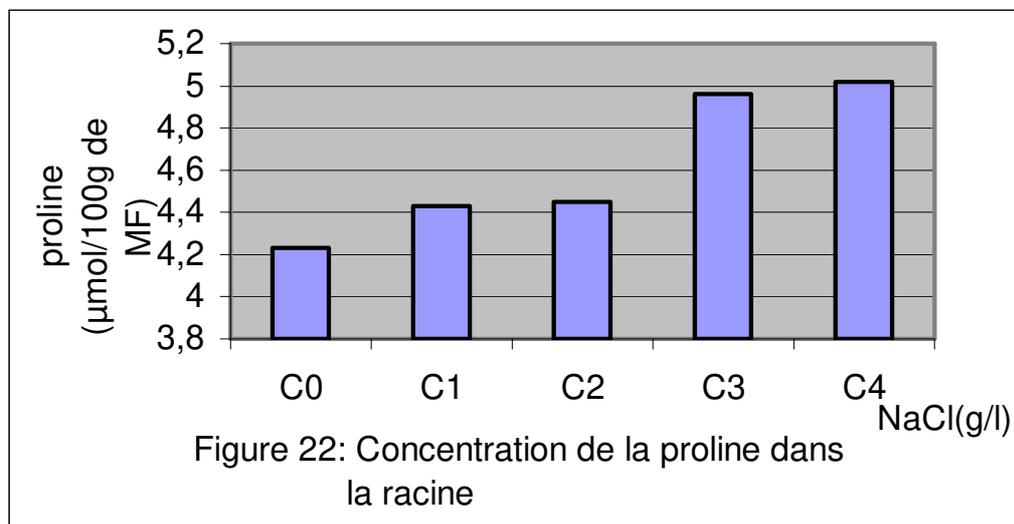
Après 30 jours de développement, nous remarquons l'accumulation de la proline est proportionnelle aux concentrations croissantes de NaCl.

La valeur la plus élevée est obtenue pour la concentration C₄ (20g/l de NaCl) et la plus faible pour le témoin C₀ et qui est de 4,23µmol/100mg de MF (tableau 22).

Tableau : 24 Concentration de la proline dans les racines après 30 jours de développement

Concentrations Explants	C ₀	C ₁	C ₂	C ₃	C ₄
Moy $\mu\text{mol}/100 \text{ mg de MF}$	4,23	4,43	4,45	4,96	5,02
E.T. \pm	0,25	0,23	0,04	0,03	0,03
G.H.	B	B	B	A	A

La figure 22 montre que l'accumulation de proline la plus élevée est de 5,02 $\mu\text{mol}/100 \text{ mg de MF}$ avec une concentration de 20 g/l de NaCl.



D'après l'analyse statistique, nous constatons que le facteur salinité, exerce une influence hautement significative sur la concentration de la proline.

1 . 2 . 4 . Discussion et conclusion

Les résultats obtenus montrent que la teneur en proline varie avec la concentration du sel. L'accumulation la plus élevée se retrouve au niveau des fortes concentrations pour les trois organes étudiés mais est légèrement plus importante au niveau des feuilles.

HIGAZY et al. (1995) montrent que l'évolution de la proline dans les plantes au cours de leur développement, varie en fonction de l'organe et de la concentration de NaCl. L'aptitude de la plante à accumuler de la proline est un indicateur de génotype tolérant aux différents stress (HANSON,1980).

VENKAMP et KOOT (1988), notent que l'accumulation de la proline en réponse à un stress est causée par l'augmentation de sa synthèse et que la source d'azote pour cet acide aminé peut provenir aussi des protéines foliaires.

GRENWAY et MUNNS (1980) considèrent que l'accumulation du composé azoté (proline), se produit lorsque la plante est en conditions défavorables

La particularité de l'accumulation de la proline pour les plantes hautement stressées du sel peut être une cause qui caractérise le développement de la tolérance à la salinité (PAQUIN,1977).

ERICSON et RAINS (1981) et ERICSON et ALFINITO (1984) montrent que les cellules de tabac stressées au sel, présentent une augmentation de la synthèse de proline et une induction d'une nouvelle protéine. La plupart des plantes accumulent de la proline dans leurs limbes foliaires lorsqu'elles sont soumises à l'action de stress (SINGH et al. ; 1973 et BELARIBI, 1990).

LESAIN (1960) explique que le transport de la proline s'effectue depuis les feuilles âgées vers les plus jeunes chez le chou.

STEWART et LARHER (1980) notent que l'accumulation de la proline au niveau des tissus est souvent accompagnée d'un flétrissement visible de la plante.

La teneur en proline dépend de la surface foliaire et peu de la taille de la plante (NEMMAR, 1983).

STEWART et LEE (1974) indiquent que la proline intervient dans la régulation de la pression osmotique au niveau du cytoplasme.

HANSON (1980) mentionne que l'accumulation de la proline est un simple caractère accidentel dû à une conséquence de stress.

BOUCAUD et BILLARD (1979) ont montré, que lorsque la concentration en NaCl est de 129 mM, il y a augmentation de l'activité glutamine synthétase.

De nombreuses études admettent que les espèces tolérantes notamment les halophytes accumulent des quantités importantes de sodium

Selon PAQUIN (1977), la synthèse de cet acide aminé (proline) est localisée dans le collet chez la luzerne exposée au froid.

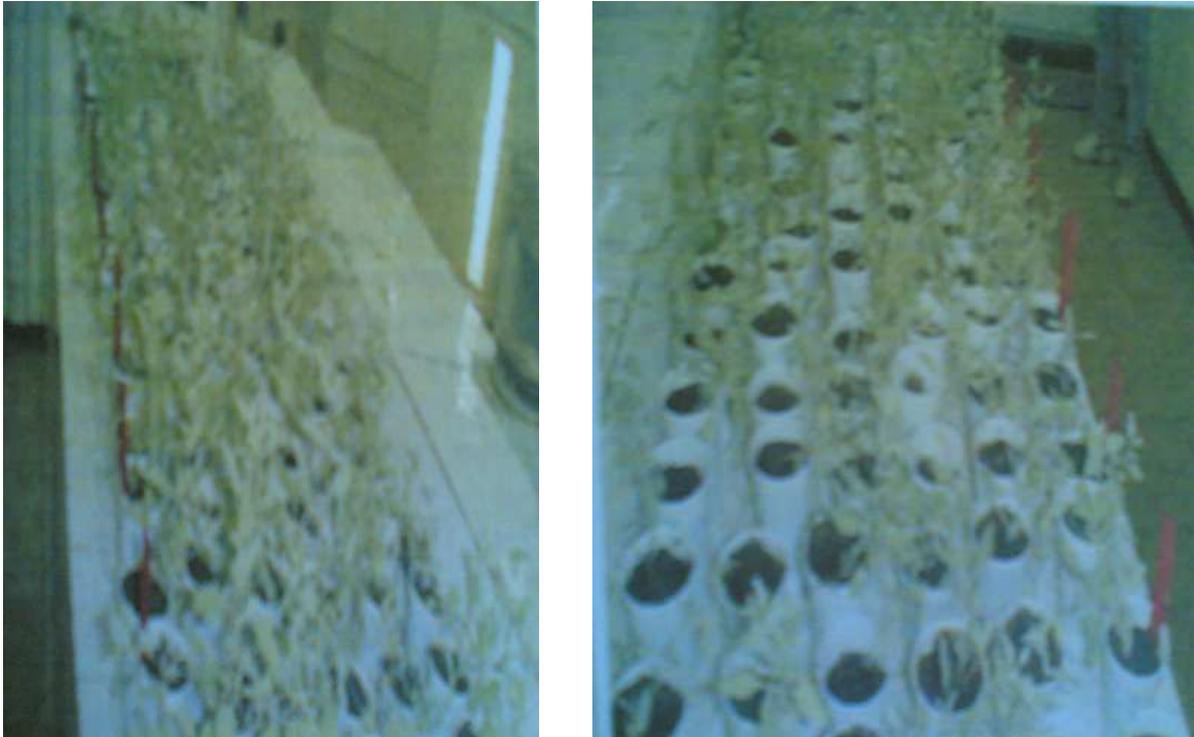
Nous remarquons que l'accumulation de la proline est moins importante dans les racines que dans les tiges et les feuilles.

STEWART (1981) note une compartimentation de la proline dans les feuilles et une forte accumulation sous l'effet de haute salinité avec des teneurs nettement moins importantes dans les racines.

Nous remarquons dans les tiges des plantes stressées, des teneurs en proline très voisines à celles des feuilles. Cette teneur en proline reste toujours élevée dans les milieux les plus concentrés.

D'après PASSIOURA (1981), le système racinaire est le plus efficace en condition de stress.

PLANCHE 13



**Plantes d'Atriplex obtenues après un mois de culture in-vivo
Avec différentes concentrations en NaCl.**

2 - Effet de salinité sur la croissance de l'*Atriplex halimus* en culture *in vivo*

Cette étude porte sur l'influence du NaCl sur la croissance des plantules cultivées *in- vivo* ainsi que la variation de la proline sous l'effet du sel.(planche 13)

2 . 1 . Effet du sel sur la croissance des plantules

Afin d'évaluer la croissance des plantules, nous avons pris comme critère, le nombre de paires de feuilles et la longueur de la tige.

2 . 1 . 1 . Nombre de paires des feuilles

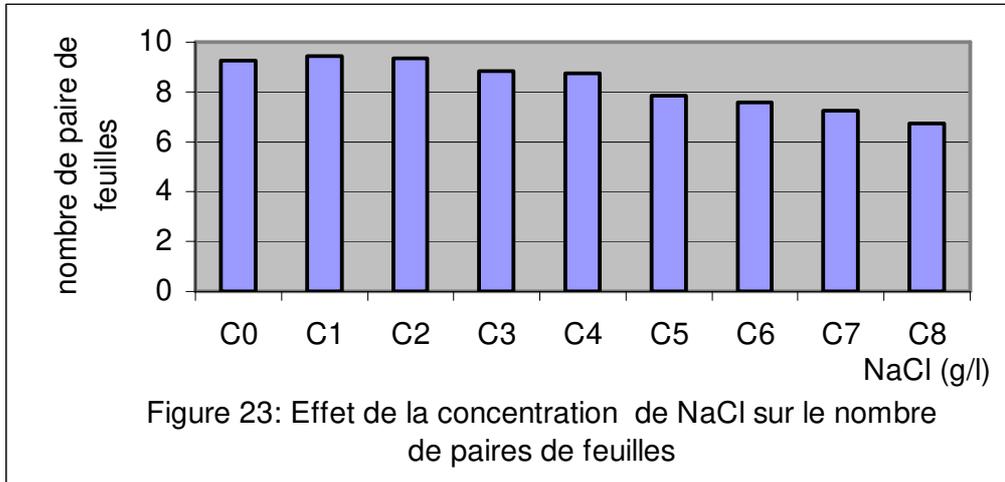
Après un mois de culture, nous avons procédé au dénombrement des feuilles.

D'après le tableau 25, nous constatons que les concentrations, C1 (5g/l de NaCl) et le témoin C0 présentent le nombre de paires de feuilles le plus élevé avec les valeurs respectivement de 9,42 et 9,25 paires de feuilles ; alors que les valeurs les plus faibles (1,81 et 1,01 paires de feuilles) sont obtenus par les concentrations C7 et C8 (35 et 40 g/l de NaCl).

Tableau 25 : Nombre de paires des feuilles

Concentrations Explants	C ₀	C ₁	C ₂	C ₃	C ₄	C ₅	C ₆	C ₇	C ₈
Moy	9,25	9,42	9,33	8,83	8,75	7,83	7,58	7,25	6,75
E.T. ±	1,22	1,44	1,37	1,19	0,97	0,83	0,67	0,87	0,75
G.H.	A	A	A	AB	AB	BC	C	C	C

D'après la figure 23, nous remarquons que la concentration C1 (5g/l de NaCl) stimule la production foliaire, mais à partir de 20g/l de NaCl, cette production diminue.



L'analyse statistique montre une différence significative entre les différents traitements de NaCl.

Lors de l'expérimentation, nous avons observé la présence d'un dépôt de sel au niveau de la surface foliaire. Ce dernier est bien visible au niveau des plantes soumises aux concentrations C7 et C8 (35 et 40 g/l de NaCl).

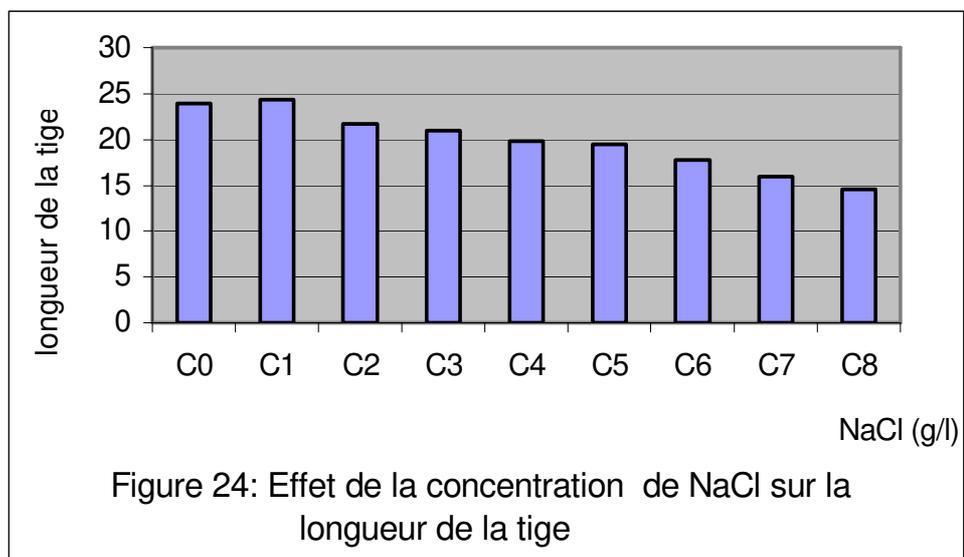
Un léger jaunissement se manifeste également chez les feuilles de base et s'accompagne de chute.

2 . 1 . 2 . Longueur de la tige

D'après les résultats obtenus, l'allongement le plus important est donné par la concentration C1 et le témoin avec respectivement des valeurs de 24,33 et 23,88 cm. Les concentrations C7 et C8 donnent les valeurs les plus faibles qui sont de 1,99 et 1,80 cm.

Tableau 26 : Longueur de la tige

Concentrations Explants	C ₀	C ₁	C ₂	C ₃	C ₄	C ₅	C ₆	C ₇	C ₈
	Moy	23,88	24,33	21,71	21,00	19,83	19,46	17,75	15,95
E.T ±	3,94	4,16	2,17	1,54	1,90	1,70	2,09	2,15	2,02
G.H.	A	A	B	B	BC	BC	CD	DE	E



La concentration C1 (5g/l de NaCl) stimule la longueur des tiges mais à partir de la concentration C4 (20g/l deNaCl) l'allongement des plantes diminue (Planche 14).

L'augmentation du NaCl dans le milieu ralentit le développement des tiges mais les plantes arrivent à survivre même à 40g/l (figure 24).

L'analyse statistique révèle une différence hautement significative entre les différentes concentration de NaCl appliquées par rapport au témoin

2 . 1 . 3 . discussion et conclusion

D'après les résultats obtenus, la concentration 5g/l stimule le nombre de paires de feuilles et la longueur de la tige mais à partir de 15g/l, cette production est diminuée et au delà de 35g/l le sel devient nocif.

L'effet stimulateur des faibles doses a été étudié par plusieurs auteurs (ASHBY et BEADLE, 1957 ; BLACK, 1958 ; BROWELL, 1965 ; BLUMENTHAL et POLJAKOFF-MAYBER, 1968 ; GALE et POLJAKOFF-MAYBER,1970 ; BENREBIHA , 2001).

KAPLAN et GALE (1972), observent une croissance et une rentabilité de l'eau meilleure en présence de NaCl, cela est dus selon BIGOT et BINET(1979), à une conductivité hydrique des racines et à une résistance des feuilles à la diffusion importante des gaz.

Selon MAZLIAK(1981), à partir de 10g/l de NaCl, la croissance et l'allongement des plantules sont ralentis. Cette réduction semble être due à la présence élevée de sodium dans le milieu, qui bloque l'assimilation de certains éléments nutritifs nécessaires au développement des tiges par le phénomène d'antagonisme.

PLANCHE 14



Aspect morphologique de plantules d'*Atriplex* développées pendant un mois en culture *in-vivo* en présence de différentes concentrations en NaCl (0 à 35 g/l de NaCl).

AUGE et al. (1989), montrent que les concentrations élevées de NaCl provoquent une forte réduction de la surface foliaire. Cette réduction semble être liée à la forte pression osmotique du milieu (SHABALA et NEWMAN, 2000).

Les concentrations salines, trop fortes dans le milieu, provoquent une altération de la nutrition minérale, en particulier, vis à vis des transporteurs ioniques cellulaires. Le sodium entre en compétition avec le potassium et le calcium, et les chlorures avec les nitrates, les phosphates et les sulfates (AJMAL KHAN, 2000).

WINICOV (1998), note également que l'assimilation du carbone par la plante serait affectée par la salinité à cause d'une réduction de l'indice foliaire plutôt que du taux de photosynthèse.

Selon les travaux de SLAMA (1987), les feuilles accumulent les deux ions (Na^+ et Cl^-) indépendamment. Il a aussi noté que l'aptitude à remettre en circulation dans le phloème le Na^+ qui atteint la feuille, est en relation positive avec la sensibilité des plantes au NaCl.

L'augmentation de sel induit une réduction de l'absorption de certains éléments nutritifs, comme l'azote, ce dernier favorise la végétation (AUGE et al., 1986). Ceci est constaté également par ZID et BOUKHRIS (1977), il y a une diminution de l'azote au niveau des feuilles par l'augmentation de sel qui provoque une diminution des feuilles chez l'*Atriplex halimus*.

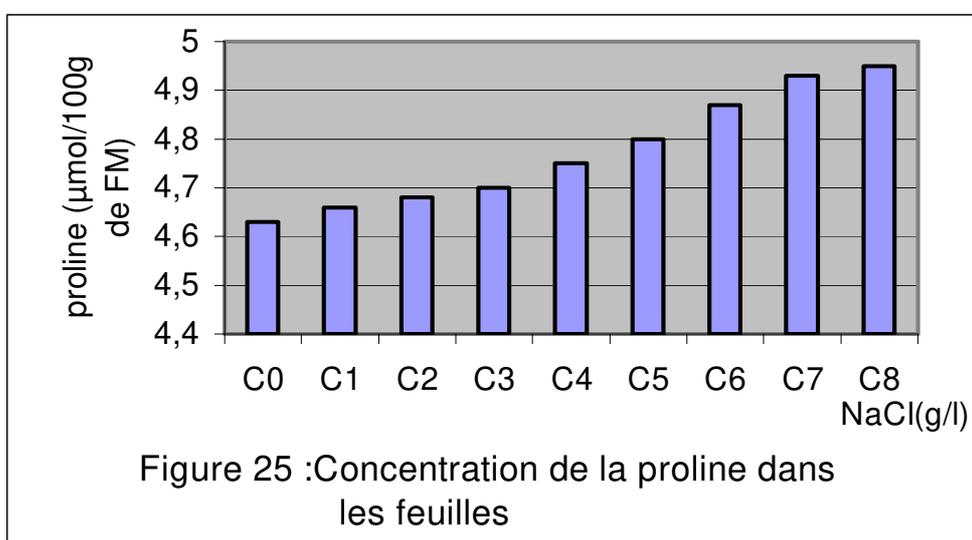
Nous avons observé la présence d'un dépôt de sel au niveau de la surface des feuilles des plantes soumises aux concentrations 35 et 40g/l de NaCl. D'après MOZAFAR et GOODIN (1970), la résistance à la salinité est attribuée à la présence de poils vésiculeux (thricomes) qui couvrent les surfaces foliaires et renferment de grandes quantités de sel.

2.2. Accumulation de la proline chez l'*Atriplex* en culture *in-vivo*

Les essais ont été réalisés, pour suivre l'évolution de la teneur en proline sous stress salin chez l'*Atriplex halimus* après 30 jours de développement en culture *in-vivo* ; deux organes ont été retenus, les feuilles et les tiges.

2.2.1. Accumulation de la proline dans les feuilles

Les moyennes d'accumulation de la proline dans les feuilles d'*Atriplex halimus* après 30 jours à partir des plantes stressés figurent au niveau du tableau 27.



D'une manière générale, après 30 jours de développement des plantes ; nous remarquons que la teneur en proline augmente progressivement dans les feuilles (Figure 25). L'accumulation de la proline est très nette à la concentration de 40g/l de NaCl (4,95µmol).

Tableau 27 : Concentration de la proline dans les feuilles après 30 jours de développement

Concentrations Explants	C ₀	C ₁	C ₂	C ₃	C ₄	C ₅	C ₆	C ₇	C ₈
Moy	4.63	4.66	4.68	4,70	4,75	4,80	4,87	4,93	4,95
E.T. ±	0,02	0,01	0,00	0,02	0,00	0,01	0,01	0,01	0,01
G.H	G	F	EF	E	D	C	B	A	A

L'analyse statistique montre que les différentes concentrations de NaCl ont une influence hautement significative sur la concentration de la proline.

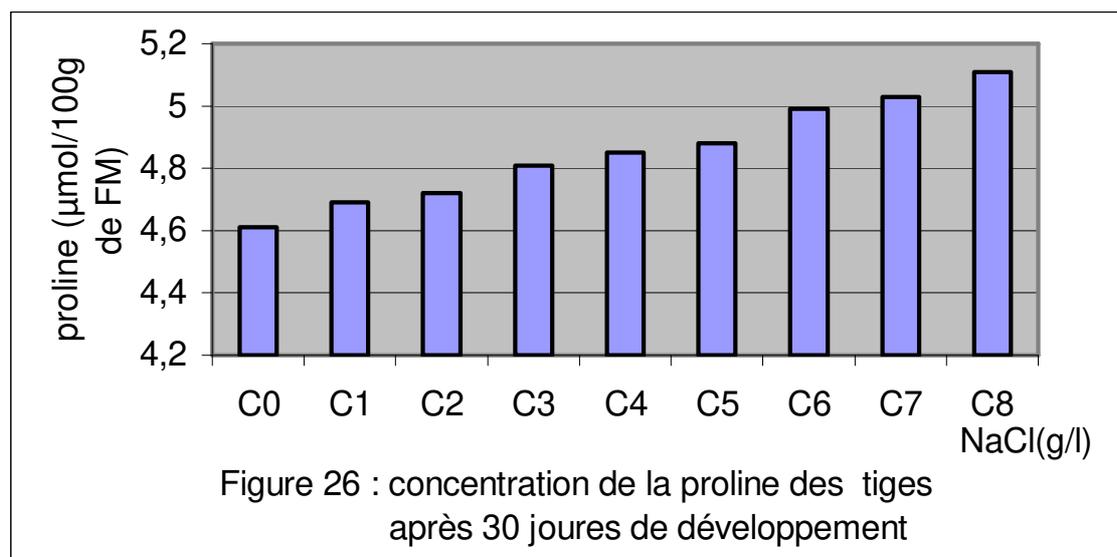
2 . 2 . 2 . L'accumulation de proline dans les tiges

Les résultats de l'accumulation dans les tiges après un mois de culture sur des plantes stressées *in-vivo* nous montrent que les concentrations 40g/l et 35g/l de NaCl (C8 et C7) donnent les valeurs les plus élevées qui sont respectivement de 5,11 et 5,03 μ mol.

Tableau 28 : concentration de la proline dans les tiges après 30 jours de développement

Concentrations Explants	C0	C1	C2	C3	C4	C5	C6	C7	C8
Moy	4.61	4.69	4.72	4,81	4,85	4,88	4,99	5.03	5.11
E.T. ±	0,04	0,02	0,02	0,01	0,02	0,06	0,02	0,01	0,01
G.H.	E	D	D	C	C	C	B	B	A

D'après la figure 26, nous constatons que la teneur en proline des plantules augmente progressivement avec l'augmentation de la concentration du NaCl dans le milieu.



L'analyse statistique montre que le facteur salinité exerce une influence hautement significative sur la concentration de la proline dans les tiges.

2 . 2 . 3 . Discussion et Conclusion

Les résultats obtenus montrent que la proline s'accumule dans les plantes exposées au stress salin et varie selon les organes. La concentration en proline, que ce soit, au niveau des feuilles ou des tiges, augmente en fonction de la concentration du NaCl ; les valeurs les plus importantes sont obtenues avec les concentrations 35g/l et 40 g/l.

Cette aptitude de la plante à accumuler de la proline est un indicateur de génotype tolérant aux différents stress (HANSON,1980 ;TAYLOR, 1996).

Chez les halophytes, la présence de NaCl dans un milieu entraîne une accumulation de certains solubles qui jouent un rôle osmotique dans le cytoplasme ; il s'agit de glucides solubles, d'acides organiques ou de composés azotés. Parmi ces composés, on peut citer la proline.

Selon RUDOLPH et al.(1986) ; SANTORO et al.(1992) ; la proline protège les membranes et les protéines contre les différents effets des hautes concentrations en ions inorganiques. Elle contribue également à l'ajustement osmotique (WYN JONES et al.,1977 ; BINZEL et al., 85, 87,88 ; KETCHUM et al.,1991 ; BOHNERT et al.,1995).

L'accumulation de la proline dans les feuilles est en étroite relation avec la salinité du milieu et une accumulation du Na⁺.

Selon HU et al.(1992), chez *Vigna aconitifolia*, il y a un gène codant pour l'enzyme la pyrroline 5 carboxylate synthétase est fortement exprimée au niveau des feuilles des plantes soumises à un stress salin. D'après YOSHIBA et al.(1997), cette enzyme est un précurseur de la biosynthèse de la proline.

GREENWAY et MUNNS (1980) considèrent que l'accumulation du composé azoté se produit lorsque la plante est en conditions défavorables.

STEWART et LARHER (1980) notent que cette accumulation de proline au niveau des tissus est souvent accompagné d'un flétrissement visible de la plante.

3 - Effet de la salinité sur le développement des cals

Cette étude porte sur l'effet du stress salin sur le développement des cals. Le milieu MURASHIGE et SKOOG a été utilisé avec comme auxine le 2-4D et cytokinine la Kinétine. Les concentrations en NaCl sont : 5, 10 et 15 g/l de NaCl.

3 . 1 . Effet du sel sur le pourcentage des cals

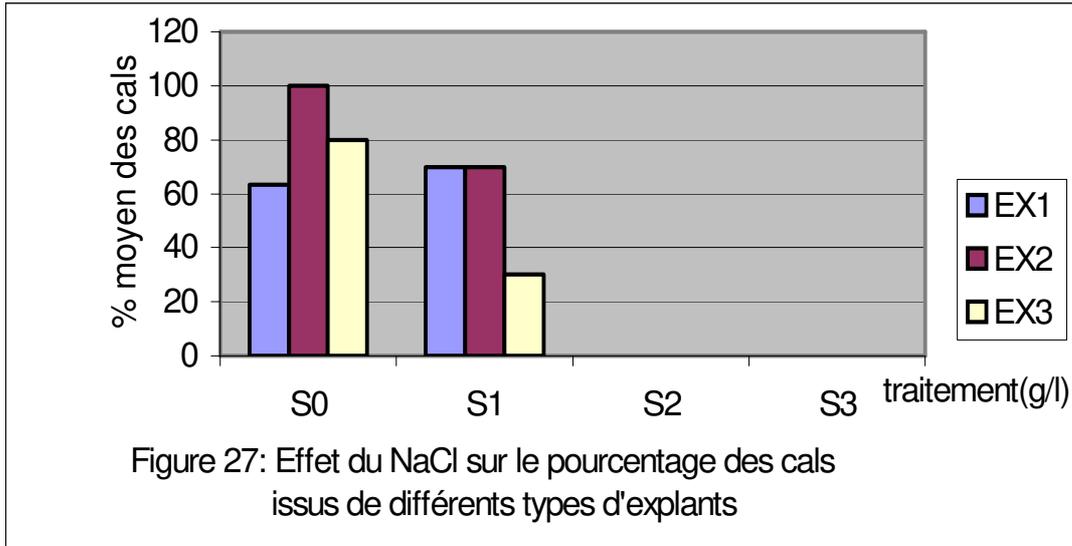
D'après le tableau 30, le pourcentage moyen des cals diffère selon le type d'explant. La valeur la plus élevée est obtenue par les feuilles (50%), et la plus faible par les racines (27%).

Quant aux concentrations, le meilleur pourcentage est obtenu par la concentration C0 (le témoin) qui est de 81,1%. Les concentrations C2 et C3 n'ont pas permis aux différents types d'explants d'exprimer leur pouvoir callogène.

Tableau 29 : Effet du NaCl sur le pourcentage des cals issus de feuilles (EX1), d'entre-nœuds (EX2) et de racines (EX3)

Concentration Explants	EX1	EX2	EX3	Moyenne F1
C0	63.33 ± 19.32	100.00 ± 0.00	80.00 ± 0.00	81.11 ± 10.48
C1	70.00 ± 16.33	70.00 ± 0.00	30.00 ± 0.00	56.67 ± 8.86
C2	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00
C3	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00
Moyenne F2	48.33 ± 11.80	50.00 ± 0.00	27.50 ± 0.00	Moyenne Générale 37.65

Le meilleur pouvoir callogène est obtenu par les entre-nœuds et les racines sur le milieu C0 (témoin) avec les valeurs respectivement de 100% et 80% (Figure 27).

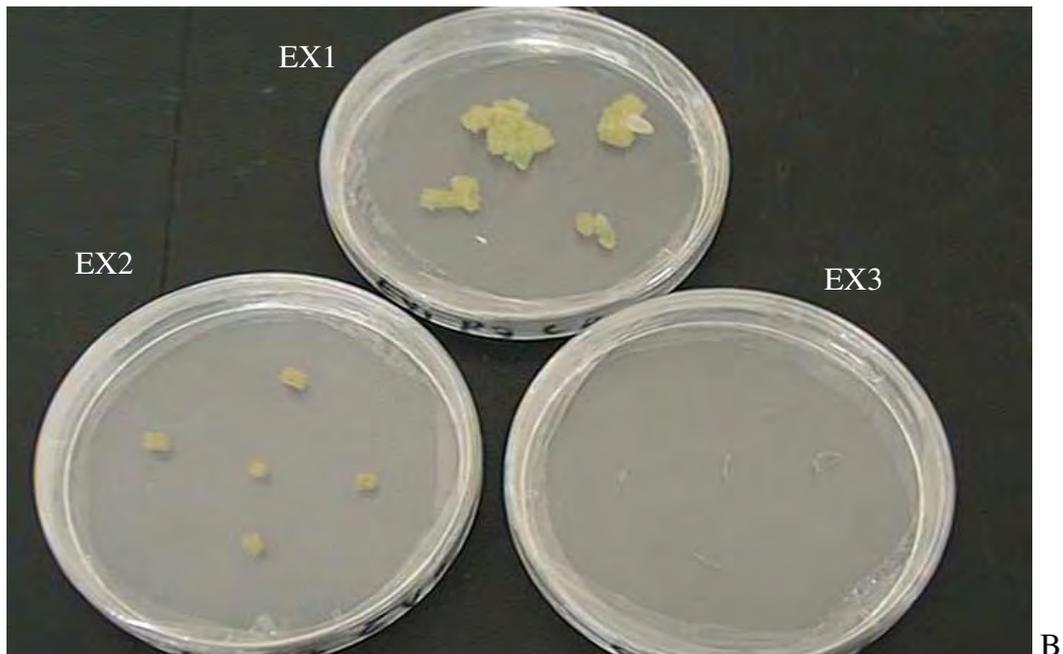


L'analyse de la variance montre que les différentes concentrations en NaCl et les différents types d'explants exercent une différence très hautement significative sur le pourcentage des calcs.

3 . 2 . Effet du sel sur la couleur et la texture des calcs

Les calcs obtenus après un mois de culture présentent des caractéristiques morphologiques variées.(planche 15)

PLANCHE 15



**Aspect morphologique de cals développées pendant un mois
En absence (A) ou en présence (B) de 5 g/l de NaCl.**

- EX1 : Cals obtenus à partir de fragments de feuilles.**
- EX2 : Cals obtenus à partir de fragments d'entre-nœuds.**
- EX3 : Cals obtenus à partir de fragments de racines.**

Tableau 30 : Effet du NaCl sur la couleur et la texture des cals issus de feuilles (EX1), d'entre-nœuds (EX2) et de racines(EX 3)

<i>Concentrations</i>		C0	C1	C2	C3
Explants					
<i>Feuilles</i>	COULEUR	Vert clair à Blanc	Vert clair	-	-
	TEXTURE	Noduleuse	Noduleuse	-	-
Entre-nœuds	COULEUR	Vert clair à Blanc	Beige à brune	-	-
	TEXTURE	Noduleuse	Granuleuse (ferme)	-	-
Racines	COULEUR	Beige	Beige à brune	-	-
	TEXTURE	Noduleuse	Granuleuse (ferme)	-	-

Les explants issus des feuilles, le milieu C0 (témoin) et C1 donnent des cals de couleur vert clair à blanc et de structure noduleuse, caractéristique des cals non embryogènes.

Quant aux entre-nœuds, le milieu C0 (témoin) donne des cals vert clair à blanc à structure noduleuse alors que le milieu C1 donne des cals de couleur beige à brune à texture granuleuse et de consistance ferme.

Concernant les racines, le milieu C0 donne des cals de couleur beige à texture noduleuse caractéristique des cals embryogènes.

Les milieux C2 et C3 n'ont pas permis aux trois types d'explants de développer des cals.

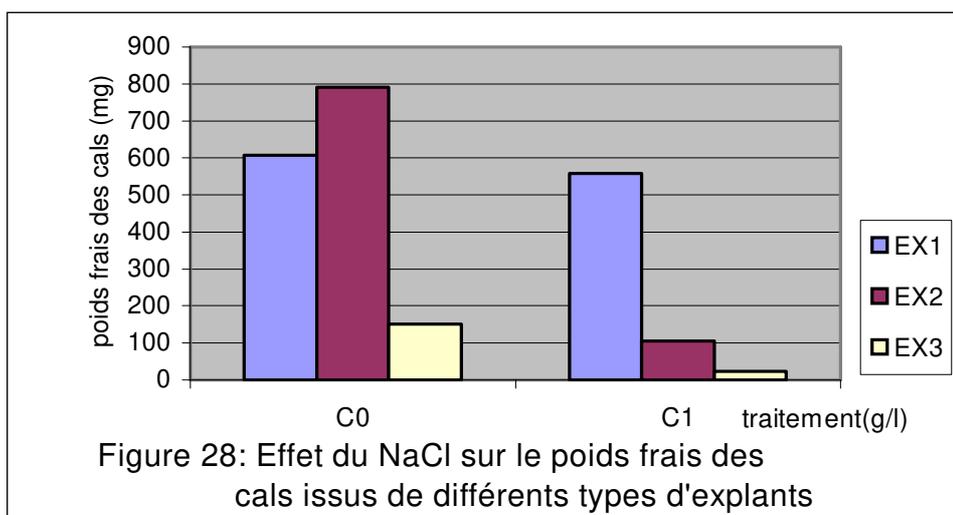
3.3. Effet du NaCl sur le poids frais des cals

Le poids frais le plus élevé est obtenu sur le milieu C0 (témoin), par les entrenœuds (790,50 mg), puis les feuilles (606,58 mg) et le poids le plus bas est donné par le milieu C1 soit 23,73mg.

Tableau 31 : Effet du NaCl sur le poids frais des cals.

Explants Concentration	EX1	EX2	EX3	Moyenne F2
C0	606.58 ± 87.21	790.50 ± 249.43	150.62 ± 41.33	515.90 ± 145.05
C1	557.98 ± 104.42	105.73 ± 13.75	23.73 ± 4.56	229.15 ± 57.17
F1	582.28 ± 91.72	448.12 ± 168.42	87.18 ± 28.03	Moyenne Générale 372.52

Les concentrations C2 et C3 n'ont pas permis aux différents types d'explants d'exprimer leur pouvoir callogène (Fig.28).



D'après l'analyse de la variance, les différentes concentrations en NaCl appliquées sur les trois types d'explants révèle une différence très hautement significative sur le poids frais des cals.

3 . 4 . Discussion et conclusion

Les résultats obtenus montrent que la réponse des cals à la présence de NaCl dans le milieu de culture varie, selon la concentration saline utilisée.

La concentration C2 a permis aux fragments de feuilles, d'entre-noeuds et de racines d'exprimer leurs pouvoir callogène.

Par contre il n'y eu aucune callogénèse sur les milieux C2 et C3 ; alors que les plantules d'Atriplex en culture *in vitro* résistent à des niveaux de salinité plus élevés.

Selon BADJII et al.(1998), les cals n'ont pas le même comportement que les organes dont ils sont issus.

Chez la vigne, BOUQUET et al., 1985 ont pu obtenir une callogénèse sur milieu de culture contenant jusqu'à 15g/l de NaCl.

Alors que chez d'autres espèces, la sélection des cals au NaCl, a permis d'obtenir des souches cellulaires tolérant de fortes concentrations en

sel et de régénérer des plantes ayant des niveaux de tolérances supérieurs à celui de la plantes- mère (MARTHUR et al.,1980 ; NARBOR et al.,1980 ; McHUGHEN et SWATZ,1984 ; BHASKABAN et al.,1986).

4 – Conclusion

Les résultats obtenus ont montré que quel que soit le paramètre étudié (nombre de paire de feuilles, longueur de la tige et de la racine principale).

La concentration 5g/l de NaCl stimule la croissance mais dès que la concentration dépasse 15g/l, la croissance des plantules est réduite.

En culture *in- vitro*, la présence des fortes concentrations donne des résultats plus faibles par rapport au témoin (0g/l de NaCl) mais il n'y a aucune mortalité, le sel devient nocif à partir de 35g/l de NaCl.

L'étude de diverses concentrations de sel sur la croissance des plantules *in-vivo* révèle que la concentration 5g/l de NaCl stimule la croissance des plantules. Nous avons remarqué qu'à des niveaux de salinité élevée (20 à 40g/l de NaCl) il y a une inhibition de la croissance.

Pour le nombre de paires de feuilles, nous pouvons retenir que même en présence de fortes concentrations de NaCl, il y a une production foliaire mais à partir de 20g/l de NaCl, le nombre de paires de feuilles diminue significativement.

Concernant la longueur de la tige, le meilleur résultat a été obtenu avec la concentration de 5g/l, alors que pour les fortes concentrations il y a une réduction de la croissance de la tige.

Les résultats obtenus en culture *in-vitro* et *in-vivo* montrent que la proline s'accumule dans les plantes exposées au stress salin et varie dans les organes (feuilles et tiges) avec l'âge de la plante et augmente lorsque la concentration en sel s'élève.

Nous avons remarqué que la concentration en proline des plantes stressées est presque similaire au niveau des feuilles que des tiges.

Aussi, nous avons noté une induction de la callogenèse malgré l'absence d'hormone de croissance qui est plus forte pour les concentrations de 0 à 20g/l de NaCl, mais partir la de 25g/l la production de cals devient faible.

Concernant l'effet de la salinité sur le développement des cals, il y a une divergence de comportement physiologique entre la culture cellulaire et la plante entière. Seule la concentration 5g/l de NaCl a permis aux différents types d'explants d'exprimer leur aptitude à la callogenèse.

CONCLUSION GENERALE

La multiplication végétative de l'*Atriplex halimus* par culture *in-vitro* est sans conteste envisageable, comme l'on montré les résultats obtenus.

Les différents essais de nutrition minérale à l'aide des milieux de culture de MURASHIGE et SKOOG, GAMBORG, GAUTHERET, HELLER ,et WIHITE ont permis de définir le milieu GAMBORG comme le meilleur milieu de culture pour la prolifération cellulaire. Quant aux macroéléments de WHITE et GAUTHERET, ils ne paraissent pas adaptés à la culture *in-vitro* de l'*Atriples halimus*.

Après une phase d'initiation sur le milieu GAMBORG, on peut envisager d'utiliser le milieu de MURASHIGE et SKOOG, qui semble favorable au développement des racines.

L'utilisation des substance de croissance comme l'AIA, dans le milieu de culture de GAMBORG, soit de MURASHIGE et SKOOG, donnent des résultats différents. Pour mettre en évidence l'action de cette substance de croissance et l'éventuelle action limitante des éléments minéraux, il conviendrait de faire d'autres essais en modifiant les concentration en AIA.

Nous avons noté l'effet positif d'un apport de 5g/l de NaCl sur la morphogenèse de l'*Atriplex halimus* (nombre de paire de feuilles, longueur de la tige principale et de la racine) mais à partir de 20g/l de NaCl la croissance des différents organes diminue considérablement ; mais au delà de 40g/l il y a mort des plantules.

Comme nous l'avons vu, l'*Atriplex halimus* ne nécessite pas obligatoirement d'apport hormonale pour les différentes étapes de la morphogenèse et de la callogenèse. Toutefois pour améliorer le rendement de formation des cals, les essais 2-4D - Kinétine ont donné de bons résultats (100%).

Pour ce qui est de l'embryogenèse somatique, des résultats positifs ont été enregistrés ; sur le milieu de culture de GAMBORG seul, puis additionné de 2-4D - Kinétine. Nous pouvons envisagé un ensemble d'expériences qui nous permettraient d'augmenter le rendement de la production en embryons somatiques à partir de calcs obtenus en milieux solides.

L'embryogenèse somatique apparaît comme une alternative intéressante pour la propagation de l'*Atriplex halimus*.

Donc il faut choisir avec soin les conditions de culture et le milieu nutritif dont la composition doit changer à chaque étape de l'organogenèse (développement de bourgeons, multiplication, allongement , enracinement).

Les principaux risques des cultures *in-vitro* sont les altérations chromosomiques des plantes au cours de leur développement. Cela conduit à cloner les individus. Le clonage *in-vitro* est une technique particulièrement adaptée à la sauvegarde de la diversité génétique des espèces naturelles.

Cette diversité génétique se retrouve *in-vitro* car l'on observe des résultats différents sur un même milieu de culture. Il semble donc nécessaire, pour les expériences de comparaison, de travailler sur du matériel végétal provenant d'un clonage d'individus ayant des caractéristiques particulières.

Il serait donc intéressant de compléter ce travail par des coupes histologiques et des études biochimiques.

Une recherche de génétique, en faisant appel à des technique de biologie moléculaire s'impose également afin d'établir une carte génétique de l'*Atriplex halimus*.