

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE
MINISTRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA
RECHERCHE SCIENTIFIQUE

Université Mouloud Mammeri de Tizi-Ouzou
Faculté des Sciences Biologiques et des Sciences Agronomiques
Département des Sciences Biologiques



Projet de fin d'études

En vue de l'obtention du diplôme de Master en Science Biologiques

Spécialité : Génétique et Amélioration des plantes

Thème

Evaluation " *in vitro* " de l'effet de différentes concentrations de 2.4D (Acide 2,4-dichlorophénoxyacétique) sur les embryons immatures du blé tendre (variétés Djanet et Sahel) et de *Triticum monococcum*.

Présenté par :

M^{elle} BELKACEMI ZAHIA

M^{elle} MOHAMMED MARICHE THINHINENE

Devant le jury :

M^r METNAB .

M.A.A à U.M.M.T.O.

Président

M^{me} TALEBK.

M.C.B à U.M.M.T.O.

Promotrice

M^{me} DJENNADIC.

Chargé de la recherche à l'INRA

Co-promotrice

M^r HARGASH.

M.A.A. à U.M.M.T.O.

Examinateur

M^{me} BOUAZIZ H.

M.A.A. à U.M.M.T.O.

Examinatrice

PROMOTION 2014-2015

Remerciements



Remerciements

Nous tenons à remercier Dieu tout puissant de nous avoir donné la force le courage et la patience pour mener à terme ce travail.

Nous exprimons nos remerciements et profonde gratitude :

*A notre promotrice **M^{me} TALEB TOUDERT K.** Maitre de conférences à l'université Mouloud Mammeri de TiziOuzou, pour l'honneur qu'elle a fait de nous encadrer et diriger ce travail, ainsi que pour son aide, et ses conseils.*

*A notre co-promotrice **M^{me} DJENNADI C**, chargée de recherche et chef de projet à l'INRA d'Alger, pour son encadrement, ses orientations le long de notre partie expérimentale.*

Nos vifs remerciements vont aussi à :

***M^r METNA B.** Maitre Assistant Classe A à l'Université Mouloud Mammeri de Tizi-Ouzou, pour l'honneur que vous nous avez fait de présider ce jury ainsi que pour toute l'aide que vous nous avez apportée lors de l'analyse statistique malgré les innombrables tâches que vous avez.*

***M^r HARGAS H.** Maitre Assistant chargé de cours Classe A à l'Université Mouloud Mammeri de Tizi-ouzou, et **M^{me} BOUAZIZ H.** Maitre Assistante chargé de cours Classe A à l'Université Mouloud Mammeri de Tizi-ouzou, pour l'honneur que vous nous faites d'examiner ce travail.*

*A **M^r AMMARA., M^r BACHIRI H. M^{me} LAMIA** et **M^{me} NADJAH** Ingénieurs de laboratoire à l'INRA, nous sommes très reconnaissantes pour votre aide inestimable, vos conseils, et votre intérêt pour notre travail.*

*A **M^r FERRAGUIGN.** et **M^r BAIK N.** doctorant de Mouloud Mammeri, merci pour votre aide et vos conseils.*

*A tout le personnel de la bibliothèque de département Biologique et Agronomique
A tous les enseignants qui ont contribué à notre formation de la première année à ce jour.*

A tous nos amis de la promotion 2014-2015 qui nous ont soutenues et encouragées tout le long de ce trajet.

Dédicaces

Après ce long chemin, ALHAMDO LI ALLAH, enfin la lumière, un rêve se réalise.

Je dédie cet ouvrage à mes grands-parents :

- *Mes défunts grand -mère " FADHEMA" et grand père " SAAD" (QUE ALLAH LES ACCUEILLE DANS SON VASTE PARADIS)*
- *Ma grand-mère "HADDA" que Allah la protège et lui donne une longue vie pleine de Bonheur et de joie, mon grand-père " BACHIR" (que ALLAH l'accueille dans son vaste paradis)*

Je dédie ce modeste travail à ma famille, notamment :

- *A celle qui m'a comblée d'amour, d'affection et d'encouragements pour que Je devienne la femme que je suis aujourd'hui .merci beaucoup maman " RACHIDA" je t'aime à en mourir.*
- *A mon père " SAID" qui a sacrifié tout ce qu'il avait de plus cher pour que je garde le sourire et devienne une femme fière.*
- *A mon grand frère " AMOKRANE" qui est pour moi un exemple merci DADY pour tout, sa femme " SAFIA" et a sa petite fille mon trésor adoré " RYM".*
- *A ma très chère et unique sœur que j'aime beaucoup " ANYA " et son mari " YOUNES" et ses petits anges qui me comblent de joie " MANEL" et " WISSEM".*
- *A mon petit frère mon jumeau adoré le petit gogos qui m'a beaucoup aidé " AGHILES" je t'adore.*
- *A ma cher binôme "ZAHIA" qui m'a supportée et soutenue le long de ce travail, je n'ai rien à dire? je te souhaite tout le bonheur, dans ta petite famille avec ton cher époux RACHID et à toute ta famille qui m'a accueillie chaleureusement, a nana MALIKA surtout a ton papa et tes chers sœurs "Noura, Fazia, Naima, Samia, Karima" merci beaucoup.*
- *Je dédie aussi ce travail a toute ma grande famille, mes tantes et mes oncles, merci pour tout.*

A toutes les personnes qui m'ont aidée a M' MAHIA KARIM que je remercie beaucoup et à mes copines de lycée mira et lilya , à tiziri et silia de tadmaït, à Ali habib , Riad, Lyamine , Hayat et à toutes les personnes qui m'ont aidée de près ou de loin.

Tinhinane

Dédicaces

Je dédie ce travail a la lumière qui éclairé ma vie à toi ma Mère, sache que je t'aime à en mourir, que DIEU prolongera ta vie à l'infini, peut être te rendrai- je un jour un peu de ce que tu ma fait.

A mon père bien aimé, sache bien que tu es la lune qui éclaire mon obscurité, je t'aime très fort

*A ma moitié, à mon très cher époux qui ma soutenue et qui a été toujours a mes cotés
"RACHID"*

A mes chères sœurs que j'aime très fort, avec vous j'ai passé mon enfance mes moments de joie même de douleur a mes sœurs NOURA, NAIMA, FAZIA, SAMIA et notre petite nenecha KARIMA.

A mon seule frère FARID et sa femme HAKIMA et leur petite fille " CILINE"

A mes beau frère BACHIR, MOUHAMAD, BRAHIM ,AMIROUCH,

A tout mes neveux nièces qui sont la lune de notre vie " MEYAS , yanni, aya

a ma belle famille à mon père said sa femme fatima , malek , mourad , et farida , karim et sa femme linda et ses enfants " louinas" et " lola".

Un grand merci a tout la famille MARICHE que je remercie pour leurs bon accueil tata RACHIDA, dada SAID ainsi que amokrane, safia , anya, aghiles que dieu vous protège, a toi tina merci pour tout ,avec vous je n'ai pas sentis les moments difficiles,

Zahia

Liste des figures

Figure 1 : Lieux d'origine et de diffusion de Blé à travers le monde (Vilmorin, 1880)p3

Figure 2. Origines génétiques des différentes espèces de blés (Feldman et Sears, 1981)p4

Figure 3: Morphologie des épis (a) et d'un épillet (b) de blé tendre (INRA, 2015)p6

Figure 4: schéma de l'appareil reproducteur du blé (SOLTNER, 2005)p7

Figure 5: caryopses observés (face ventrale et dorsale) sous microscope photonique grossissement x40 (INRA, 2015)p8

Figure 6: schéma expliquant la totipotence des cellules végétales (Morot-Gaudry Jean-François, 2009)p10

Figure 7: Schéma expliquant les différentes étapes de la callogénèsep11

Figure 8: balance hormonalep14

Figure 09: localisation du site d'étudep18

Figure 10 : Disposition des pots dans la serre semi-contrôlée p20.

Figure 11 : Décortication des épis et conservation des grains dans des boîtes de Pétri p21.

Figure 12 : préparation du milieu de cultures et répartition du milieu de culture p23

Figure 13 : Stérilisation du matériel végétal p24.

Figure 14 : Les étapes de dissection des grains immatures p25.

Figure 15 : Ensemencement des embryons dans le milieu de culture

Figure 16 : boîtes ensemencées contaminées p26.

Figure 17 : Néoformations des embryons observés sous microscope photonique (G :40×10) p27.

Figure18: cals repiqués

Figure19: l'acclimatation des plantules issues des embryons immature p29.

Figure20 : Différentes phases du développement des embryons de blé tendre sur le milieu MS ½ p31

Figure 21: les différents types des cals observés sur les différents milieux utilisés (M1, M2, M3) p32.

Figure 22 : variété de couleurs observées sur les cals p33

Figure 23 : la régénération de plantules vertes à partir de calcs embryonnaires p34

Figure. 24:Effet de la concentration en 2.4-D, sur le taux de germination zygotique dans les milieux M1, M2 et M3p35

Figure. 25:Effet de la concentration en 2.4-D, sur le taux de les calcs non régénéré dans M1, M2 et M3p36

Figure 26 : Effet de la concentration en 2.4-D, sur le taux des calcs régénérés dans M1, M2 et M3p37

Figure 27 : Analyse de la variance de l'effet des milieux sur la germination et le nombre de calcs totauxp38

Figure 28 : Résultats de l'analyse de l'effet la variance des milieux sur les calcs non régénérés et calcs régénérés p40.

Figure 29 : Analyse de la variance de l'effet de la variété sur la germination et le nombre total des calcp41

Figure 30 : Analyse de la variance de l'effet de la variété sur la régénération et calcs non regenerép41

Figure 31 : Résultats de l'analyse de la variance de l'effet de l'interaction milieu variété sur la germinationp44

Figure 32 : Résultats de l'analyse de la variance de l'effet de l'interaction milieu, variété sur le nombre total de calcp45.

Figure 33 : résultats de l'analyse de la variance de l'interaction milieu, variété sur le nombre de calcs non régénérés p46

Figure 34: Effet de l'interaction milieu, variété sur la régénération de calcp47.

Listes des tableaux

Tableau 01 : caractéristiques et abréviations adoptées des variétés testées.

Tableau 02: Réponses induites par les milieux M1, M2 et M3 sur les variétés testé.

Tableau 3 : la Composition de milieu culture de Murashige et Skoog., 1962.

Tableau 04 : Composition de milieu culture de régénération 1902 modifié de Wang et Chen (1983).

Tableau 5 : variance de germination.

Tableau 6 : facteur milieu pour la germination.

Tableau 7 : interaction variété –milieu pour la germination.

Tableau 8: variance de nombre total de cals.

tableau 9: milieu pour le nombre total de cals.

Tableau 10 :interaction variété milieu pour le nombre total de cals.

Tableau 11: variance de cals non régénéré .

Tableau 12: variété pour le nombre total de cals.

Tableau 13 : milieu pour le nombre total de cals.

Tableau 14: interaction variété milieu pour le nombre total de cals.

Tableau 15 : variance de régénération.

Tableau 16 : variété pour la régénération.

Tableau 17 : milieu pour la régénération.

Tableau 18 : interaction variété milieu pour la régénération.

Tableau 29 : table de **STUDENT**

Sommaire

INTRODUCTION.....	1
CHAPITRE I: Données bibliographique	
1. Généralités sur les blés	3
1.1. Origines génétique et géographique du blé tendre (<i>Triticum aestivum</i>)	3
1.2. Classification botanique	6
1.3. Descriptions morphologique	6
1.3.1. Appareil végétatif	6
1.3.1.1. La tige	6
1.3.1.2. Les feuilles	7
1.3.1.3. Le système racinaire	7
1.3.2. Appareil reproducteur	7
1.3.2.1. Structure du grain de blé tendre	8
2. Application des Biotechnologies en amélioration des plantes	10
2.1. Culture <i>in vitro</i>	10
2.1.1. La totipotence et la dédifférenciation cellulaire	10
2.1.2. La callogénèse	11
2.1.3. L'organogenèse	12
2.2. Culture d'embryons	13
2.2.1. Croissance et survie des embryons	13
2.3. Choix des milieux de culture	14
2.4. Composition du milieu de culture de murashige et skoog (1962)	15
2.4.1. Sels minéraux	15
2.4.2. Sucres	16
2.4.3. Vitamines et acides aminés	16
2.4.4. Régulateurs de croissances	16
2.4.5. Substances gélifiantes.....	16
2.5. Intérêt de la culture <i>in vitro</i>	16
2.6. Inconvénients de la culture <i>in vitro</i>	17
2.7. Condition de culture.....	17
2.7.1. Température	17
2.7.2. Lumière	18

CHAPITRE II: Matériel et méthodes

1. Localisation du site d'étude	19
2. Matériel végétal	20
2.1- Le semis	20
2.2-Prélèvement des épis	21
3. Mise en culture des grains	22
3.1. Milieu de culture	22
3.1.1. Composition du milieu d'induction	22
3.1.2 Préparation des milieux de culture	23
3.2. Stérilisation	24
3.3. Stérilisation du matériel végétal	24
3.4. Dissection et ensemencement des explants	25
4. Suivi des cultures	26
4-1.Observation et description des formations obtenues	27
5- Régénération	27
5.1 - Repiquage des cals	27
6. Acclimatation	28
7. Analyse statistique	29

CHAPITRE III: Résultats et discussion

1. Caractérisation morphologique	31
2. Effets du 2.4D sur les différentes réponses.	35
A. Effet de la concentration en 2.4D sur la germination dans différents milieux de culture M1, M2 et M3.	35
B. Effet de la concentration en 2.4D sur les cals de différentes variétés de blé. 36	
C. Effet de la concentration en 2.4-D, sur le taux des cals régénérés dans M1, M2 et M3.	37
3. Analyses statistiques	38
3.3. Effet de l'interaction milieu variété sur la germination, callogénèse et régénération 38	
3.3.1. Effet de l'interaction milieu variété sur la germination	38
3.3.2. Effet de l'interaction milieu variété sur le nombre totale des cals	39
3.3.3. Effet du milieu variété sur les cals non régénéré	40
3.3.4. Effet du milieu variété sur la régénération de cals	41
DESCUSSION	42

CONCLUSION ET PERSPECTIVES 44

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUE 46

ANNEXE

RESUME

Introduction

Les céréales occupent à l'échelle mondiale une place primordiale dans le système agricole. Elles sont considérées comme une principale source de nutrition humaine et animale (Slama *et al.*, 2005). Selon la FAO, (2007) leur production atteint 2001.5 Mt/an.

De 1930 à 1970 le monde a connu une augmentation importante dans les rendements des cultures notamment celle des céréales, grâce à l'application des principes de la génétique et de la cytogénétique dans le domaine de l'amélioration des plantes (Khush, 1999).

Les espèces céréalières aussi bien annuelles que pérennes, recèlent de nombreux caractères agronomiques intéressants (Bommineni et Jauhar, 1997) c'est ainsi que l'hybridation interspécifique et intergénérique a joué un rôle crucial dans l'amélioration des céréales, par l'introduction dans différents cultivars, de nombreux traits désirables, à partir des espèces apparentées (Miller, 1987 ; Doebley, 1990). Les cellules et les tissus des plantes monocotylédones étaient récalcitrants à la régénération *in vitro*, et à la transformation par le biais d'*Agrobacterium* (Repellin *et al.*, 2001). En conséquence, les premières céréales transgéniques n'ont vu le jour qu'à la fin des années 1980 (Rhodes *et al.*, 1988 ; Toriyama *et al.*, 1988 ; Zhang et Wu, 1988).

Les céréales ont une faible réponse aux techniques de la culture *in vitro* en comparaison avec les dicotylédones. En effet, seuls les tissus immatures ou les cellules d'un certain âge peuvent être induits pour une meilleure régénération (Repellin *et al.*, 2001).

Les méthodes d'amélioration des plantes sont nombreuses mais l'objectif est unique à savoir l'obtention de nouvelles variétés plus productives, plus tolérantes à la sécheresse et plus résistantes aux différentes contraintes telles que les maladies. Parmi ces techniques, la culture d'embryons *in vitro*, par l'utilisation de milieux de culture synthétiques comme le milieu de Murashige et Skoog (MS) (1962), et le milieu de Wong et chen (1984).

Notre étude s'inscrit dans le cadre du programme d'amélioration variétale du blé tendre par l'utilisation des techniques de culture d'embryons initiés par le ministère de l'agriculture. Ces embryons sont issus de croisements entre des variétés locales et introduites, L'objectif visé est d'optimiser la technique de culture d'embryons pour tester l'effet du 2.4D sur milieu Murashige et Skoog (MS 1/2) à différentes concentrations sur trois variétés de blé (sahel, Djanet et *T.Monococcum*). Notre essai a été réalisé à l'INRAA, au laboratoire de physiologie végétale et amélioration des plantes ce travail a été en collaboration avec les

travaux de biomoléculaire à fin d'arrivé a réalisé le but globale d'accélééré les cycles de reproduction.

Notre travail est subdivisé en trois chapitres. Dans le premier chapitre nous avons abordé les données bibliographiques relatives au blé tendre et à la culture *in vitro*.

Dans le deuxième chapitre nous avons relaté le matériel et les méthodes utilisées.

Dans le troisième chapitre, nous avons exposé les résultats obtenus et leur discussion, et nous avons terminé par une conclusion et les perspectives d'étude.

Chapitre I

Données bibliographiques

1. Généralités sur les blés

1.1. Origines génétique et géographique du blé tendre (*Triticum aestivum*)

La découverte du blé remonte à 15000 ans avant Jésus-Christ dans la région du croissant fertile, vaste territoire comprenant, la vallée du Jourdain et les zones adjacentes de Palestine, de la Jordanie, de l'Iraq, et la bordure Ouest de l'Iran (Feldman et Sears, 1981 ; Mouellef, 2010). C'était à une époque où l'homme pratiquait déjà la cueillette et faisait ses débuts comme agriculteur. Cette période coïncidait avec un épisode climatique sec, aboutissant à l'arrêt du mode de vie de 'chasseur cueilleur', engendrant la domestication progressive des plantes, associée à la création des premières communautés villageoises (Wadley et Martin, 1993).

Selon Doussinault et *al.*(2001) le Croissant Fertile est le centre d'origine du blé qui diffusait vers le Nord-Ouest par les plaines côtières du bassin méditerranéen et à travers les Balkans, puis en suivant la vallée du Danube pour arriver à la vallée du Rhin, entre environ 5000 et 6000 ans avant J.C. Les restes archéologiques montrent que le blé a atteint l'Ouest de l'Europe 5000 ans environ avant J.C. D'après Feldman(2001), en Afrique, la route la plus ancienne gagna l'Égypte depuis 6 000 ans et se poursuivit vers le Soudan et l'Éthiopie au sud, et vers la Libye à l'Est. A partir de la Grèce et de la Crète, certains blés rejoignirent également la Libye, d'autres en provenance du sud de la péninsule Italienne et de la Sicile vers la Tunisie, l'Algérie et le Maroc (**Figure 1**).



Figure 1 : Lieux d'origine et de diffusion du Blé à travers le monde (Vilmorin, 1880)

L'espèce de cette époque lointaine, *Triticummonoccucum*, est l'un des ancêtres des blés actuels. Le genre *Triticum*, se subdivise, en fonction du niveau de ploïdie, en trois groupes: diploïde, tétraploïde et hexaploïde, avec respectivement 14, 28 et 42 chromosomes (Harlan, 1971). Ces trois groupes sont représentés, respectivement, par *Triticummonococcum* L., *Triticumturgidumssp durum* L. et *Triticumaestivum* L. Le génome de ces espèces est organisé en une série basique de 7 chromosomes ($X = 7$ chromosomes), qui, au cours de l'évolution, a gardé une certaine homologie (synténie), malgré la spéciation chez la famille des Poaceae (Ahn et al., 1993).

Les espèces de blé tirent leur origine génétique de croisements naturels entre *Triticummonococcum*, *Triticumurartu* et des espèces sauvages apparentées appartenant à *Aegilops* (*Aegilops speltoïdes*). *Triticummonococcum* et *Triticumurartu* sont les premières formes de céréales cultivées, elles sont de constitution génomique $2n = 14$. Ainsi le génome A vient de *Triticumurartu*, alors que le génome B vient de *Aegilops speltoïdes*. Ces deux génomes, ensemble, forment la constitution génomique du blé dur (*Triticumdurum* Desf.).

Le croisement entre l'espèce *Triticumdurum* de constitution génomique AABB et *Aegilops tauschii* de constitution génomique DD, donna naissance à l'espèce *Triticumaestivum* de constitution génomique AABBDD (Feldman et Sears, 1981). Kihara (1944) a été le premier à montrer que c'est *Aegilops tauschii* qui est le donneur du génome D du blé tendre. Le croisement entre *Triticumdurum* et *Aegilops tauschii* sp. *strangulata*, a eu lieu il y a plus de 7000 ans (Dvorak et al., 1998). **(Figure 2)**

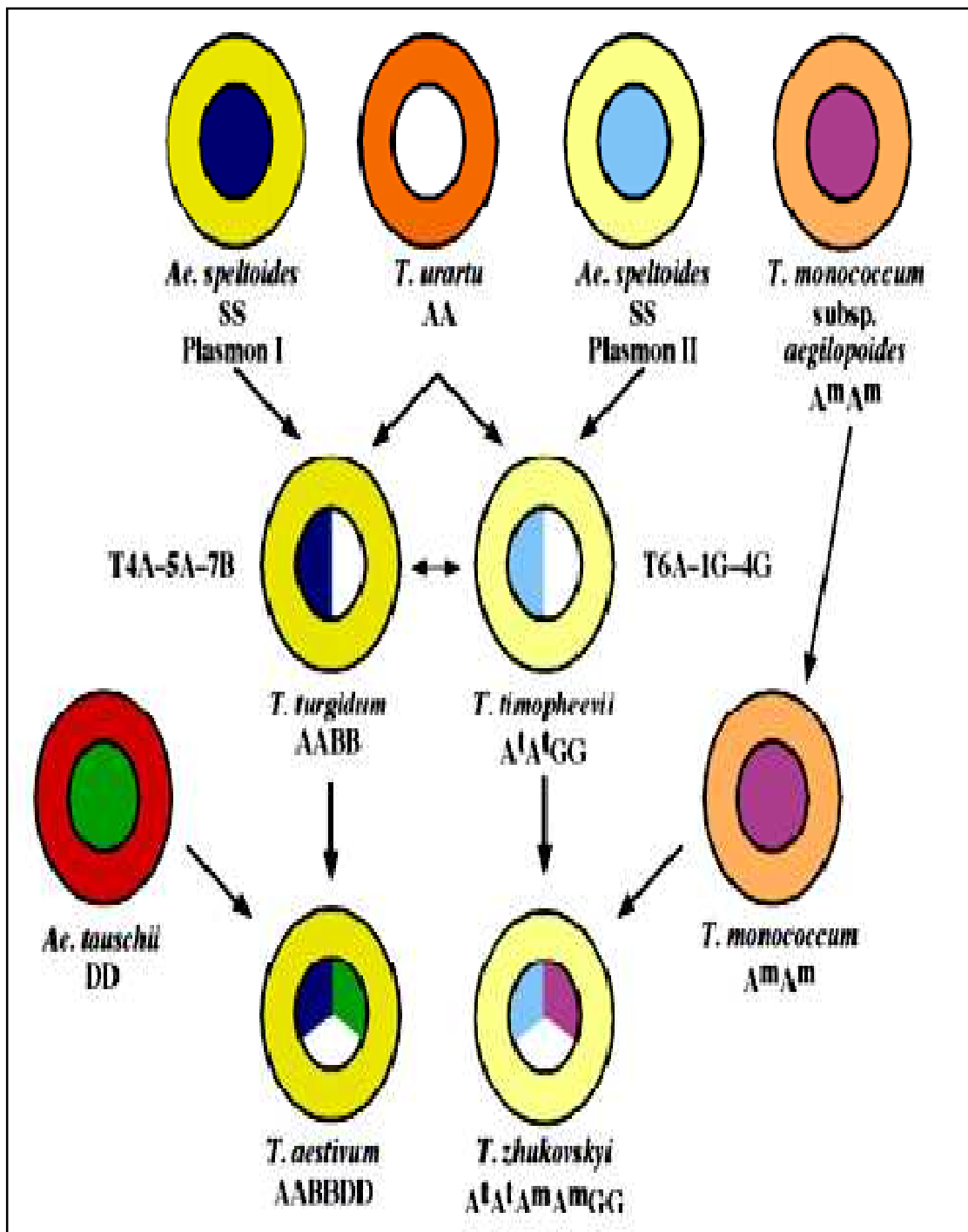


Figure 2. Origines génétiques des différentes espèces de blés (Feldman et Sears, 1981).

1.2. Classification botanique :

Cronquist (1981) a classé le blé comme suit:

Règne:Plantae

Division:Magnoliophyta

Classe:Liliopsida

Ordre :Commelinidae

Famille:Poaceae

S/Famille:Triticeae

Tribu:Triticeae

S/Tribu:Triticinae

Genre:*Triticum*

Espèce:*Triticumaestivum L.*

1.3. Descriptions morphologique:

Les appareils végétatif et reproducteur du blé sont décrits ci-dessous.

1.3.1. Appareil végétatif :

D'après Soltner (2005), L'appareil végétatif est constitué de différentes talles émises depuis le plateau de tallage à la base de la plante. Chaque talle se compose d'une tige, une gaine, un limbe foliaire et un bourgeon axillaire et porte à son sommet un épi formé de rangées d'épillets situés de part et d'autre du rachillet. Un épillet regroupe plusieurs fleurs à l'intérieur de deux glumes.

1.3.1.1. Tige

La tige est creuse et formée d'entre-nœuds, séparées par des nœuds. Chaque nœud est le point d'attache d'une feuille. La hauteur de la tige varie selon les espèces, les variétés, et les conditions de culture (Soltner, 1990).

1.3.1.2. Feuilles

Les feuilles sont alternes, longues, étroites et à nervures parallèles. Chaque feuille comprend deux parties : une partie inférieure enveloppant l'entre-nœud correspondant à la gaine, et une partie supérieure, le limbe. À la base du limbe se trouve deux oreillettes plus ou moins embarrassantes, velues chez le blé tendre (*Triticum aestivum* L.) (Soltner, 1990).

1.3.1.3. Système racinaire

La racine est de type fasciculé et assure deux fonctions : l'ancrage de la plante au sol et son alimentation en eau et en éléments minéraux (Boulal et al., 2007).

1.3.2. Appareil reproducteur

Chez le blé, le type d'inflorescence est un épi (**figure:3a**), constitué d'un ensemble d'épillets (**figure:3b**). Les fleurs sont attachées sur le rachillet (rameau partant de l'axe principal de l'inflorescence) (Boulal et al., 2007).

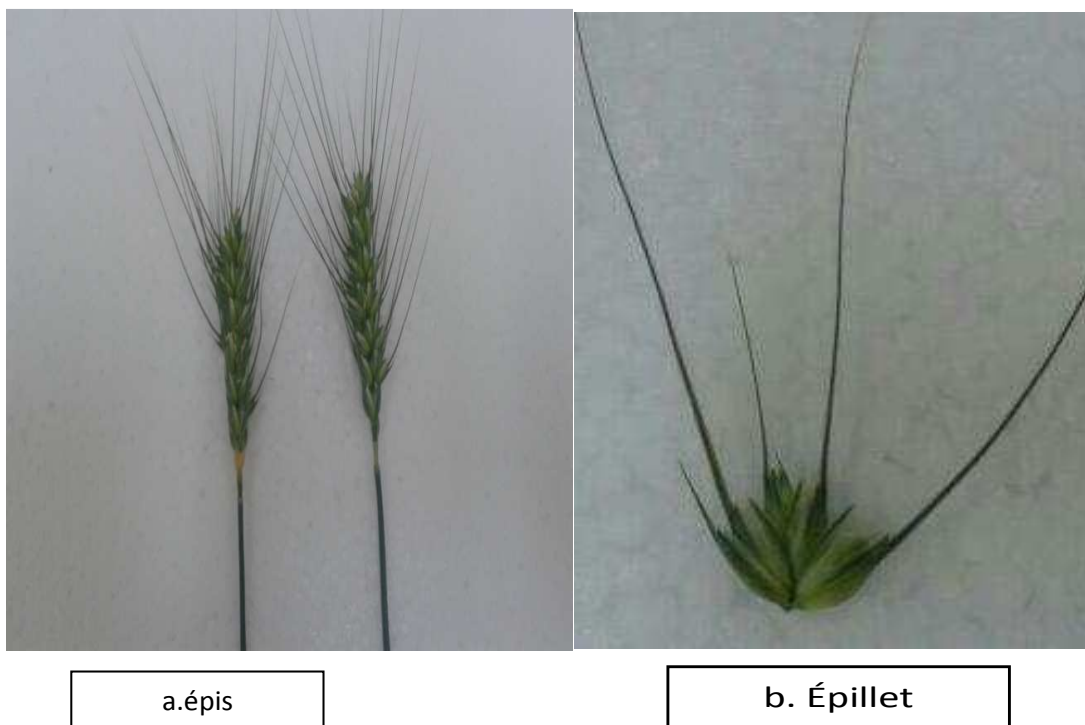


Figure 3: Morphologie des épis (a) et d'un épillet de blé tendre (b) (INRA, 2015)

La fleur est dite cléistogame, c'est-à-dire que, le plus souvent, les pollens sont relâchés avant que les étamines ne sortent. L'autofécondation est le mode de reproduction le plus fréquent (autogamie) (Bogard, 2011) (**Figure 4**).

L'embryon est constitué d'un scutellum (ou cotylédon), qui sécrète des enzymes qui dissolvent l'amidon de l'albumen pour nourrir l'embryon. Au cours de la germination une coléoptile, qui devient la première feuille à la germination et qui enveloppe les feuilles subséquentes émerge. Parallèlement une coléorhize apparaît pour loger la première racine ou la radicule.

La structure des grains de diverses céréales est assez semblable les différentes parties composant un grain de blé est illustré par la **figure 4**.

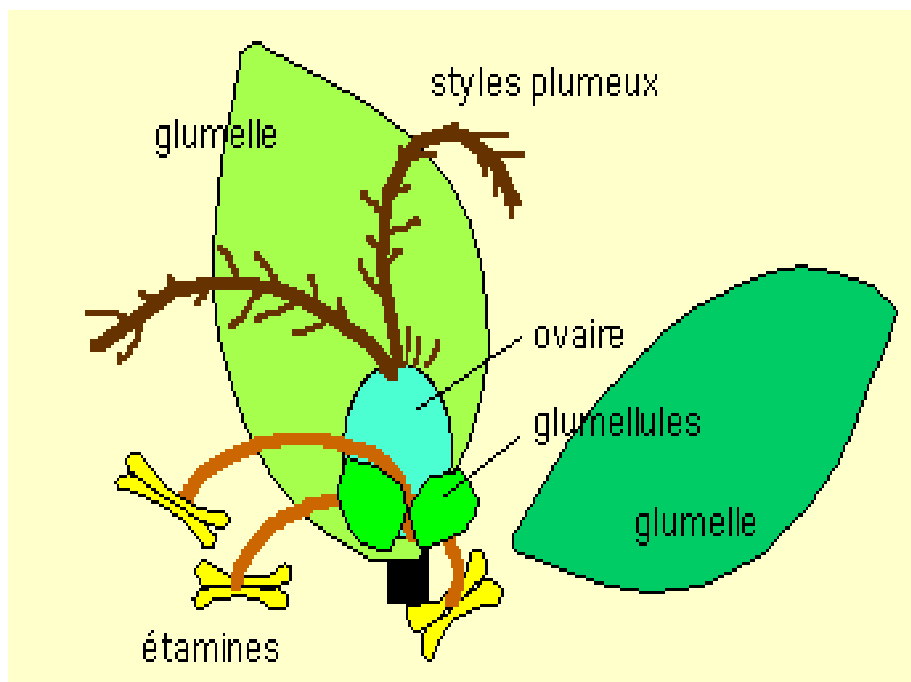


Figure 4:schéma de l'appareil reproducteur du blé (SOLTNER, 2005)

1.3.2.1. Structure du grain de blé tendre

Physiologiquement, le grain des poacées est un caryopse blanc ou roux, ovoïde, pesant de 35 à 45 mg (le grain est soudé aux parois de l'ovaire) jouant le rôle d'un fruit renfermant une graine, (cotylédon qui représente 82 à 85% du grain) (GODON, 1991).

Le caryopse montre une face dorsale (arrière) et une face ventrale (avant), un sommet et une base. La face ventrale est creusée d'un profond sillon qui s'allonge du sommet à la base. Le

caryopse est surmonté d'une brosse et l'embryon est situé au bas de la surface dorsale(**figure**



Figure 5: caryopses observés sous microscope photonique (face ventrale et dorsale) grossissement x40 (INRA, 2015).

L'espèce *Triticumvulgare* est composée de trois parties essentielles l'enveloppe, l'amande farineuse et le germe. Chacune de ces parties est formée de réseaux très complexes qui font encore l'objet de nombreuses recherches (CHEFTEL et CHEFTEL, 1977).

2. Application des Biotechnologies en amélioration des plantes

L'amélioration regroupe aujourd'hui, l'ensemble des procédés biologiques et biotechnologiques qui permettent au sélectionneur de bien choisir sa stratégie d'action en utilisant au mieux les ressources génétiques et les matériels disponibles, c'est la culture « *in vitro* », Le clonage, l'haplo-diploïdisation. La fusion de cellules et le transfert de gènes constituent des techniques nouvelles et complémentaires aux méthodes conventionnelles qui permettent dans leur synergie, une plus grande efficacité pour introduire une nouvelle diversité génétique (Demarley et Sibi, 1989; Bonjean et Picard, 1990).

2.1. Culture *in vitro*

La culture *in vitro* est une technique de production cellulaire permettant la conservation en survie, la prolifération voire même l'obtention d'organismes entiers, *in vitro*, à partir d'un fragment de tissu appelé *explant*, prélevé sur l'organisme qu'on souhaite multiplier, dans des conditions contrôlées (Auge *et al.*, 1989 ; Simonin, 2006) et dans les conditions d'aseptie totale afin que le développement de l'explant ne soit pas gêné par la présence de bactéries ou de champignons (Zryd, 1988).

La multiplication *in vitro* trouve son fondement dans le concept de " totipotence cellulaire " énoncé dès 1902 par HABERLANDT, et démontré par STEWARD et son équipe en 1958, lorsqu'ils obtinrent les premiers " embryons artificiels " appelés " embryons somatiques " à partir de cellules de carotte qui ont évolué par la suite en jeunes plantules (Auge *et al.*, 1989).

2.1.1. Totipotence et dédifférenciation cellulaire

Les cellules végétales, prélevées sur un organe d'une plante, possèdent la capacité de régénérer un individu complet identique à la plante mère (Margara, 1984., Cooper, 1999). Cette technique montre que chaque cellule somatique contient toute l'information nécessaire à l'élaboration d'une plante entière aussi complexe soit-elle (Luttage *et al.*, 1992). Ce phénomène est appelé la totipotence cellulaire. (**figure 6**) .

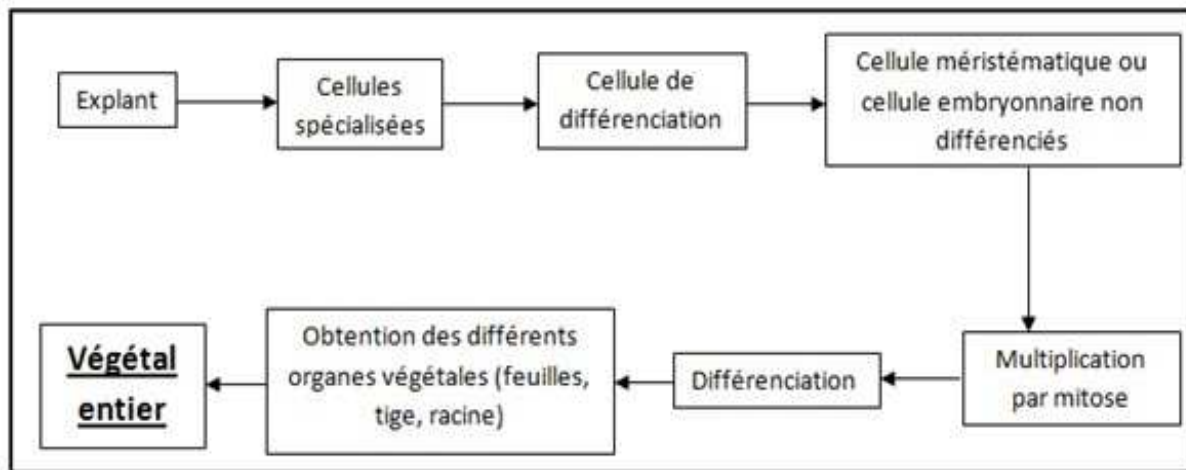


Figure 6: schéma expliquant la totipotence des cellules végétales (Morot-Gaudry Jean-François, 2009)

La totipotence repose sur l'aptitude à la dédifférenciation (Cooper ,1999) qui est un phénomène caractéristique des cellules végétales. Ces dernières sous certaines conditions, perdent leurs caractères différenciés et retrouvent leurs états méristématiques (Margra,1984, Luttge et al.,1992). Cet événement leur permet de se redéfiner et donner différents types de cellules spécialisées (Cooper,1999) . Toutefois la dédifférenciation ne peut affecter que les cellules qui ne sont pas trop spécialisées (margara,1984) et dont la différenciation n'a pas entraîné la dégénérescence du cytoplasme (Buvat,1965).L'exploitation de cette caractéristique propre aux végétaux a ouvert la voie à de nombreuses applications en génétique et en amélioration des plantes (Dubois,1989)

2.1.2. Callogenèse

Les cellules végétales mises en culture dans un milieu de culture contenant des substances nutritives et des hormones, se divisent, et prolifèrent indéfiniment en produisant une masse de cellules relativement indifférenciées appelées cal (Margra,1984;Albert et al .,1989). En effet sous l'action des hormones de croissances contenues dans un milieu de culture les cellules subissent une dédifférenciation et acquièrent un pouvoir mitotique ce qui abouti a l'augmentation du volume des explants dans un premier temps puis à la formation d'un cal (Ighilhariz et al.,2008). Les cals sont susceptibles d'être conservés indéfiniment par repiquage,mais ils peuvent aussi être utilisés à n'importe quel moment pour régénérer de manier indirect ,rapidement et en grande quantité des plantes entières (Zryd,1988)(figure 7).

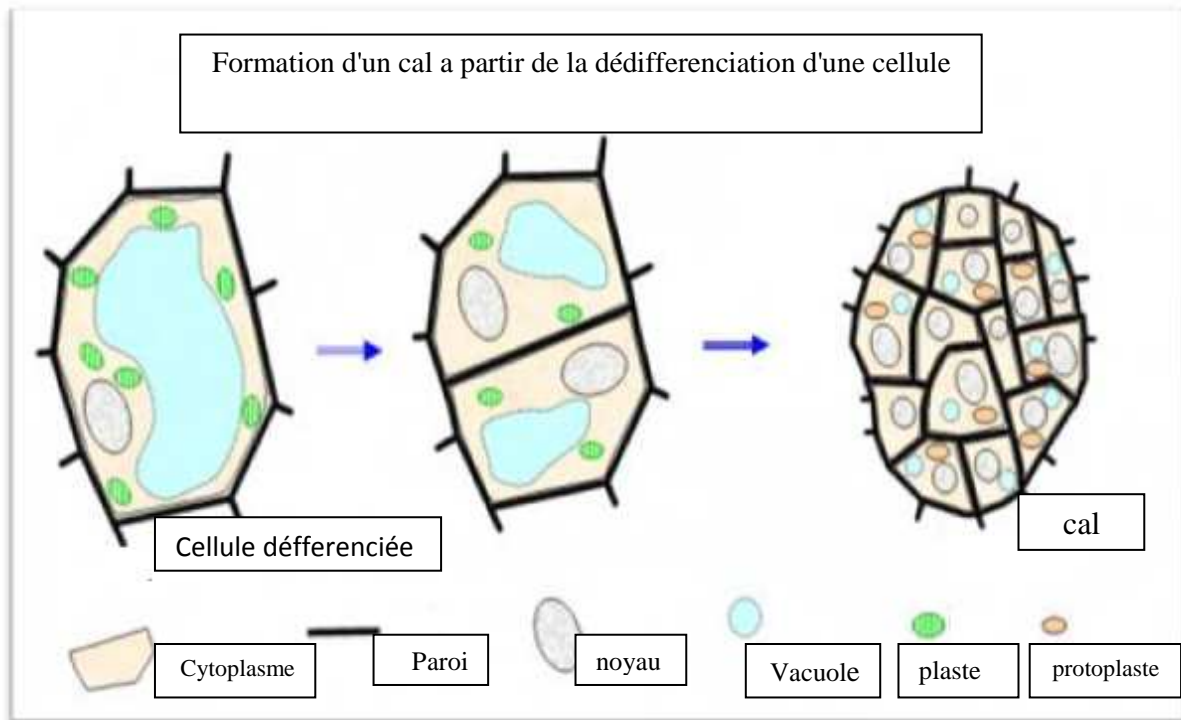


Figure 7: Différentes étapes de la callogénèse

2.1.3. L'organogénèse

L'organogénèse consiste à la formation de nouveaux organes, Elle est la base fondamentale de la multiplication végétative qui s'appuie sur la formation de nouveaux méristèmes (Margra, 1984). Elle peut être réalisée selon deux voies:

- voie directe, qui conduit à la morphogénèse directe de la tige (la caulogénèse) ou de racines (Rhizogénèse) ou des embryons (embryogénèse somatique). Elle donne ainsi naissance à des plantules viables, qui peuvent être acclimatées progressivement au milieu naturel (Margara, 1984).
- voie indirecte, qui passe d'abord par une callogénèse et dont l'organogénèse, suite à des repiquages, apparaît plus tardivement (Margara, 1984; Zryd, 1988).

Pour doubler le nombre de chromosomes à $2n$, un traitement à la colchicine est réalisé en métaphase afin d'inhiber la formation du fuseau achromatique. Ce processus permet de restaurer la fertilité et de fixer les caractères sélectionnés (Maciejewski, 1991).

Ce processus d'obtention de plantes haploïdes à partir de cellules gamétiques puis haploïdes doublés, est appelé « Haploïdie » (Picard, 1995). De ce fait, un haploïde possède le

nombre gamétique de chromosomes (Bonjean et Picadr, 1990). Ce sont donc des « plantes sans père » (gynogénèse) ou des « plantes sans mère » (androgénèse) (Demarly et Sibi, 1989).

Selon Pelletier (1998) cité par Teoule (1999), Le taux de production d'haploïdes chez le blé est satisfaisant. Des haploïdes doubles sont intégrés dans les programmes de sélection et des variétés dérivées.

2.2. Culture d'embryons

L'embryon lui-même est le résultat du développement qui a suivi la formation du zygote issu de la fusion des deux gamètes parentaux. Le patrimoine héréditaire de l'embryon est la réunion des facteurs géniques apportés par chacun des deux gamètes parentaux.

Par ailleurs, avec la découverte des hormones de croissance et le développement des techniques de morphogénèse *in vitro*, l'environnement naturel de l'embryon est bien connu mais devient de plus en plus complexe à cause des interactions des substances chimiques et de leurs interventions sur le développement de l'embryon et la morphogénèse en général.

2.2.1. Croissance et survie des embryons

La technique de culture d'embryon s'est beaucoup améliorée ces dernières années. Un des critères qui permet d'apprécier cette évolution est la taille minimale de l'embryon qu'il est possible de cultiver (Monnier, 1995). Hanning (1904) cultivait des embryons de 2 millimètres de long sur un milieu relativement simple, l'amélioration des conditions de culture a permis de cultiver avec succès des embryons de 500µm (La rue, 1938).

Généralement, lorsque des embryons de différentes longueurs sont excisés et déposés sur un milieu nutritif, il est possible de constater que la survie des embryons augmente avec leur taille. En effet, lorsqu'un embryon a plus de 200µm, il n'est pas influencé par les conditions de culture (Monnier., 1995).

Les embryons doivent disposer d'une source de sucre (généralement, le saccharose s'est révélé être la meilleure source énergétique). De nombreux auteurs ont montré que la concentration de saccharose doit être plus élevée que la concentration employée ordinairement dans les milieux utilisés pour la culture des tissus. C'est ainsi que Rietsema et al. (1953) ont montré que la survie varie de façon importante avec la concentration en saccharose.

De nombreux auteurs ont ajouté au milieu de culture des extraits de plantes. Cette idée vient principalement du fait que l'embryon croît à l'intérieur de la graine par assimilation

de l'endosperme. C'est ainsi que Li (1934) ajouta au milieu de culture un extrait de l'endosperme qui stimula considérablement le développement des embryons en culture.

Les effets du lait de coco sur les embryons de *Datura* ont souvent été rapportés. D'autre part Veen (1963) et Raghavan et Torrey (1964) ont montré que les cytokinines et les auxines sont susceptibles d'augmenter la survie des embryons en culture.

Il est observé que le taux de survie des embryons cultivés *in ovo* est toujours plus important que celui des embryons isolés. Bien qu'il ne soit pas possible de cultiver des embryons isolés de 25 µm, ces derniers survivent toujours dans des ovules cultivés *in vitro*. Dans ce cas le taux de survie arrive à 40% (Monnier., 1984).

2.3. Choix des milieux de culture

Le choix du milieu de culture est arbitraire dans la culture *in vitro*. Selon Monnier (1995) la croissance et la survie des embryons sont considérablement affectés par la composition minérale du milieu.

Le processus de croissance, développement des plantes est en grande partie étroitement lié à la composition du milieu de production.

La plupart des auteurs commencent par essayer le milieu MS (Murashige et Skoog., 1962) qui est généralement le plus utilisé lorsqu'il s'agit d'organogenèse, d'embryogenèse et de callogenèse. Il est caractérisé par sa composition en éléments minéraux nécessaires aux différentes activités du métabolisme cellulaire (Kirkby et Mengel., 1979). Le fer constitue un élément essentiel pour la croissance des embryons. Ils constituent la classe la plus importante pour l'induction de cals. En effet, l'initiation des cultures n'est possible que si le milieu contient des concentrations relativement importantes d'auxine. L'auxine synthétique la plus efficace est probablement le 2,4-D, cependant d'autres auxines ont été utilisées comme l'ANA et AIA... (Vian and Phillips., 1978).

Les cytokinines, dont l'existence dans la plupart des végétaux a été mise en évidence par Skoog et al. (1966) sont utilisées maintenant couramment pour les cultures des tissus. Elles ont cependant, montré des cas d'inhibition.

Bien que les auxines et les cytokinines soient souvent considérées comme antagonistes, leur utilisation simultanée a parfois un effet synergique sur certains processus physiologiques. Skoog et Millier (1957) ont montré qu'une prédominance d'auxines favorise le développement

racinaire. Le rapport auxine/cytokinine détermine le devenir des tissus en culture ; C'est la notion de balance hormonale (figure:8).

Chaque hormone induit la formation d'un organe de la plante. En effet, les Cytokinines entraînent la formation des bourgeons, les Auxines entraînent la formation des racines. Et lorsque les quantités d'auxine et cytokinine sont égales y'a une division cellulaire indifférenciée.

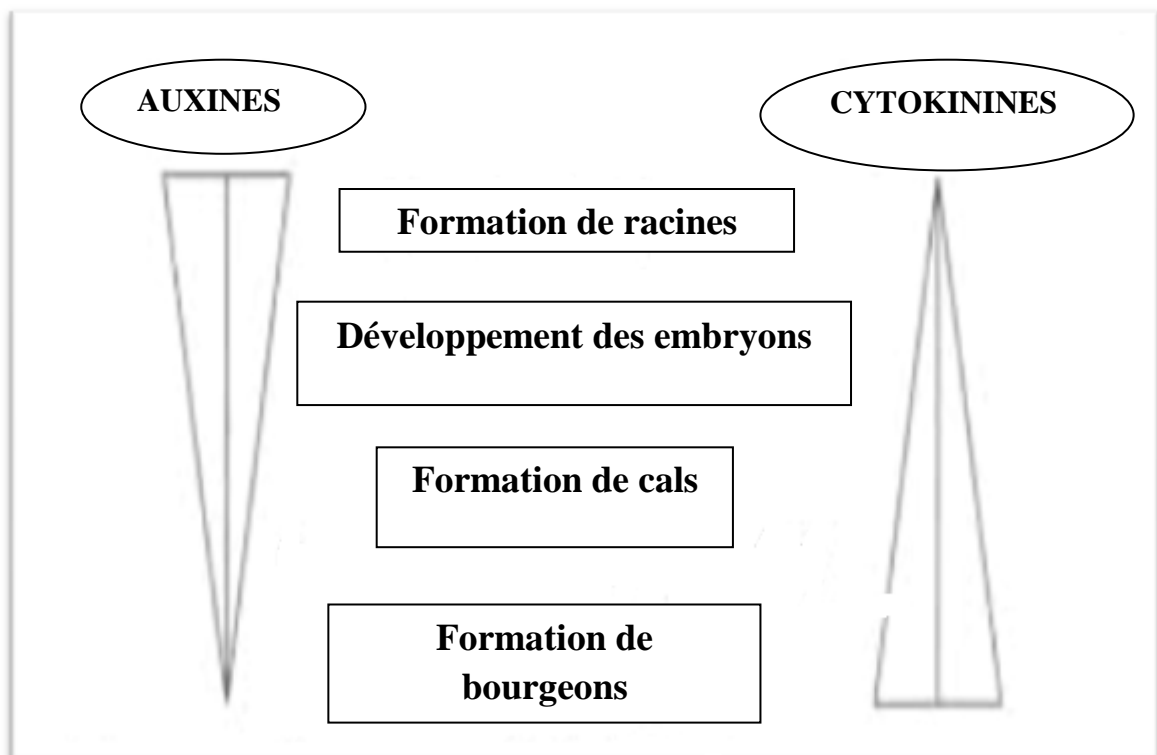


Figure 8: balances hormonales

2.4. Composition du milieu de culture de murashige et skoog (1962) (Annexe 1)

Les éléments contenus dans la solution nutritive sont énumérés ci-dessous et les quantités préconisées sont détaillées en Annexe I.

2.4.1. Sels minéraux

Composés de macro et de micro éléments : les solutions mères préparées doivent être stockées au froid (2°C) et à l'obscurité, pour une durée limitée.

L'équilibre minéral mis au point par Murashige et Skoog (1962) a été défini à partir de travaux sur la croissance des cals de tabac cultivés *in vitro*. Il permet de bons résultats pour beaucoup de culture (embryons, méristèmes).

2.4.2. Sucres

Le saccharose constitue en général la meilleure source de carbone il est apporté à différentes concentrations selon le milieu utilisé. Le passage à l'autoclave provoque une altération des sucres par hydrolyse mais ceci ne présente pas d'inconvénients sur le plan de la croissance.

2.4.3. Vitamines et acides aminés

Les vitamines utilisées sont : la Thiamine-HCL, la Pyridoxine-HCL, la Glycine et l'acide Nicotinique. Il a été démontré par plusieurs chercheurs, que l'emploi de diverses vitamines dans un milieu de culture favorise le développement des cultures *in vitro* Boccon-gibod (1980). Comme il peut être long et fastidieux de peser les produits nécessaires à chaque préparation du milieu, l'utilisation des solutions mères dont les ingrédients sont incorporés au préalable est recommandée (Jensen., 1977 ; Anonyme., 1999 et Shama., 1999).

2.4.4. Régulateurs de croissances

Ces substances sont utilisées à des doses faibles qui varient selon le milieu, mais sont d'une importance considérable (Norstog., 1961).

Plusieurs régulateurs de croissances sont dégradables par la lumière en solution aqueuse comme la KI, d'autres sont dégradés par la chaleur comme l'NAA, mais certains sont stables à 120° C tel que l'NAA, le 2.4-D, le BAB.

Les régulateurs de croissances ne sont pas solubles dans l'eau. Ils sont préalablement solubilisés dans des solvants appropriés.

2.4.5. Substances gélifiantes

La substance gélifiante utilisée est l'agar qui est une substance extraite des algues marines appelées agar-agar ou gélose, elle se dissout à 100° C, et donne un gel transparent au-dessous de 40° C.

2.5. Intérêt de la culture *in vitro*

La culture *in vitro* des tissus offre des avantages incontestables pour la pratique de la multiplication végétative :

Elle permet une production d'un grand nombre de plantes génétiquement homogènes en un laps de temps court, ce qui offre un grand avantage pour le reboisement rapide des plantations qui pourraient être ravagées par des parasites ou des catastrophes naturelles (Boxuset *al.* 1995).

La culture *in vitro* des méristèmes permet l'obtention de plants sains à partir de plants virosés (Auge *et al.*. 1989 : Evans. 1989 : Simonin. 2006) ce qui donne un grand espoir pour le sauvetage de variétés menacées de disparition. En plus Les cultures peuvent être conservées au froid, ce qui facilite ainsi la constitution de « Banque de gènes » (Margara, 1984).

La culture *in vitro* permet l'obtention de plantes présentant des caractères agronomiques intéressants restés silencieux dans les conditions naturelle (Dubois, 1989 : Evans., 1989).

La technique de la culture *in vitro* offre à l'horticulture des applications extrêmement nombreuses grâce à l'organogenèse (Margara, 1984 : Ziyd, 1988).

2.6. Inconvénients de la culture *in vitro*

Malgré ses avantages, la culture *in vitro* des tissus peut présenter quelques risques : Les plantes obtenues par la culture des méristèmes sont indemnes de virus mais ne sont pas devenues résistantes à ces derniers et les individus issus d'un même méristème peuvent être recontaminés, une situation qui rend plus aiguë le problème de l'érosion génétique. Risque de dérive génétique suite au passage ou l'emploi de certains régulateurs de croissance à des concentrations élevées. En effet un déséquilibre hormone peut provoquer des modifications aléatoires sur des chromosomes et permet l'obtention de variants différents de la plante mère par leur morphologie ou physiologie (Margara, 1984).

Le coût du plant *in vitro* est plus élevé que celui d'une bouture obtenue classiquement. Il demande une main-d'œuvre spécialisée qui représente environ 60% à 70 % du prix de revient (Boxus *et al.*, 1995).

2.7. Condition de culture

La température et la lumière sont les facteurs extrinsèques les plus importants en culture *in vitro*.

2.7.1. Température

La température des Chambers de culture est habituellement réglée de façon constante à 22 ± 25 C°. Cependant, la température réelle des tissus à l'intérieur des récipients de culture

peut être supérieure de 2° à 4° C, c'est pourquoi il est préférable de régler la température de la chambre à 2° C au-dessous de celle désirée. Pour favoriser la callogenèse la plupart des auteurs utilisent des températures de $22 \pm 3^\circ\text{C}$ en général.

2.7.2. Lumière

Elle peut stimuler la prolifération et la croissance des cals. Elle pourrait aussi contribuer à leur formation (Briggs., 1964). De façon générale, le début de croissance nécessite une faible intensité lumineuse. Pour les tissus cultivés à l'obscurité, la photosynthèse n'est pas une activité nécessaire, puisque l'énergie est fournie sous forme de glucide.

Chapitre II

Materiels et méthodes

Matériel et méthodes

L'objectif de notre travail consiste à accélérer les cycles de reproduction et améliorer la qualité et la quantité de trois cultivars de blé tendre à travers la culture *in vitro* des embryons immatures dans un milieu de culture (MS) à différentes concentrations de 2,4-D

1. Localisation du site d'étude

Notre expérimentation a été réalisée au niveau de la division biotechnologie et amélioration des plantes à l'Institut National de Recherche Agronomique d'Algérie (INRAA) au sein de la station de recherche Mehdi Boualem située au sud-ouest d'el Harrach dans la partie orientale de la Mitidja (figure 09).



Figure 09: localisation du site d'étude.

2. Matériel végétal

Pour nos essais, nous avons utilisé trois variétés de blé, deux de blé tendre (*Triticum aestivum*) de variété Sahel l'autre de variété Djanet et un *Triticum monococcum* .

Notre choix a été motivé par les caractéristiques intéressantes qu'offrent ces espèces. Elles sont indiquées dans le tableau 3.

Tableau 1 : caractéristiques et abréviations adoptées aux variétés testées.

Variété	Caractéristiques	abréviation
Sahel	Résistance au stress biotique Bon rendement	S
Djanet	Résistance au stress biotique Bon rendement	J
<i>Triticum monococcum</i>	Bonne qualité technologique Résistance au stress biotique	T

2.1- Le semis

Le semis des graines a été mené dans des pots en plastique

Nous avons mélangé un substrat contenant deux volumes de terre et un volume de sable.

Nous avons ensuite mis quatre (4) graines par pot.

Le semis a été conduit dans une serre contrôlée.

Nous tenons à signaler que nous avons réalisé trois (3) semis échelonnés sur trois (3) dates de 10 à 15 jours d'intervalle les dates sont mentionnées ci-dessous:

Le 05. 02.2015 ;

Le 28.02.2015 ;

Le 15. 03.2015

L'essai a été conduit sous serre semi contrôlée (annexe 2) dans les conditions suivantes : température 20° C le jour et 15°C la nuit et une humidité comprise entre 60 et 80 % (figure 10).



Figure 10 : Disposition des pots dans la serre semi-contrôlée .

2.2-Prélèvement des épis

11 semaines après la date du semis, les épis sont prélevés au stade laitieux.

Ils sont ébarbés puis décortiqués. Les graines récupérées sont déposées dans des boîtes de pétri codées puis stockées à 4 °c jusqu'à la mise en culture (figure11).

Le nombre de grains prélevés de chaque variété est 300grains.



Figure 11 : Décortication des épis et conservation des grains dans des boîtes de Pétri

3. Mise en culture des grains

Pour la mise en culture, les embryons immatures ont été cultivés sur le milieu Murashige et Skoog (1962) avec trois combinaisons hormonales à savoir :

M1 : MS 1/2 ;

M2 : MS1/2 à 2.4-D, 2ml ;

M3 : MS1/2 à 2.4-D ,10ml.

L'utilisation de ce milieu MS (Murashige et Skoog., 1962) a été citée dans de nombreux travaux comme favorables à la réponse à l'instant de Buyser et Henry-1986, Picard 1980 et Chu et Hill-1988 . Pour la régénération des cals c'est le milieu Wang et Chen (1984) qui a été utilisé (annexe 3, figure 37).

3.1. Milieu de culture

3.1.1. Composition du milieu d'induction (Annexe01)

Pour la préparation des milieux d'induction, des solutions mères de macroéléments et microéléments ont été préparées (25 et 100 fois concentré) Les solutions mères contiennent des vitamines tels que la Thiamine, la Pyridoxine et l'acide Nicotinique.

Le fer sous forme de Fe EDTA et FeSO₄·7H₂O solubilisé dans de l'eau distillée et préparé à une concentration de 100 fois.

Les régulateurs de croissance utilisés dans les différents milieux sont de l'acide abscissique BAB , 2,4D (2,4 dichlorophénoxyacétique) et l'auxine acide naphthalène acétique (NAA). L'acide abscissique est solubilisé dans l'alcool à une concentration finale de 1ml/l. Pour l'acide naphthalène acétique (ANA), le solvant utilisé est l'alcool absolu à une concentration finale de 2ml/l et pour le 2.4D on a ajouté 2ml/l dans le milieu M2 et 10 ml/l pour le M3.

Ces solutions sont stockées à + 4°c et à l'abri de la lumière (verrerie teintée). Elles se conservent et restent actives durant 5 mois pour les solutions mères et 4 semaines pour les vitamines.

3.1.2 Préparation des milieux de culture

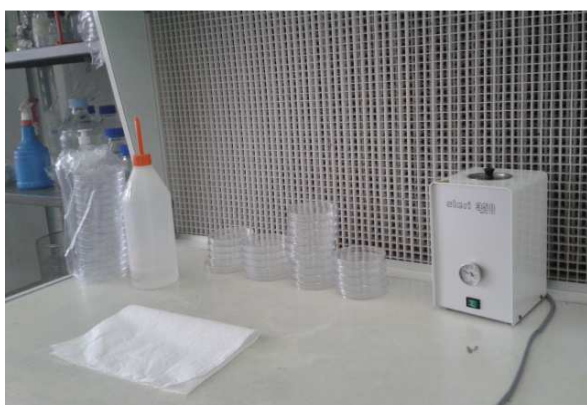
Les milieux d'induction et de régénération sont préparés à partir des solutions mères. Les solutions mères sont prélevées comme suit :

Le volume des différents éléments (macro et micro) le sucre, le fer et l'agar est ramené à 900ml avec l'eau distillée. Le mélange est dissout à l'aide d'un agitateur sur une plaque chauffante jusqu'à ébullition à 100°C (figure 12 a). Le volume a été ramené à 1000ml après avoir ajouté les vitamines (la Thiamine, la Pyridoxine, l'acide Nicotinique) et les hormones (NAA .BAB ET 2.4D) par l'ajout de la différence avec l'eau distillée. Le pH est ajusté à 5.8 avec une base (NAOH) ou un acide (HCL) par l'utilisation du pH mètre (figure 12 b). Le milieu va être stérilisé par autoclavage et coulé dans des boites de Pétrie après refroidissement (40°C) sous la hotte (annexe 4, figure 38) afin d'éviter toute contamination (figure 12 c, d) .



a :Milieu de culture sur un agitateur magnétique

b :Ajustement au PH mètre



c ,d :Répartition du le milieu de culture dans des boites de Petri sous la hotte.

Figure 12 : Etapes de la préparation du milieu de culture.

3.2. Stérilisation

Avant chaque mise en culture les pinces (courtes et fines), les scalpels ainsi que le papier peline sont stérilisés à l'étuve (annexe 4 ,figure 40) pendant 4 heures à une température de 160°C. Lors de la mise en culture les instruments sont stérilisés avec le stérilisateur à billes (annexe 4, figure 41) à chaque manipulation.

Avant la mise en culture des embryons, la hotte à flux laminaire est allumée pendant une heure et désinfectée avec de l'alcool à 70° (annexe 5).

3.3. Stérilisation du matériel végétal

Les grains de blé tendre sont trempés dans un bain d'eau de javel (annexe 6) à (8⁰) pendant 10 min sous agitation. Ils subissent un bain d'alcool à 70⁰ pendant 10 min puis sont rincés à l'eau distillée stérile (soient trois (3) bains de rinçage à l'eau distillée stérile dans des conditions d'aseptie rigoureuses) (figure 13).

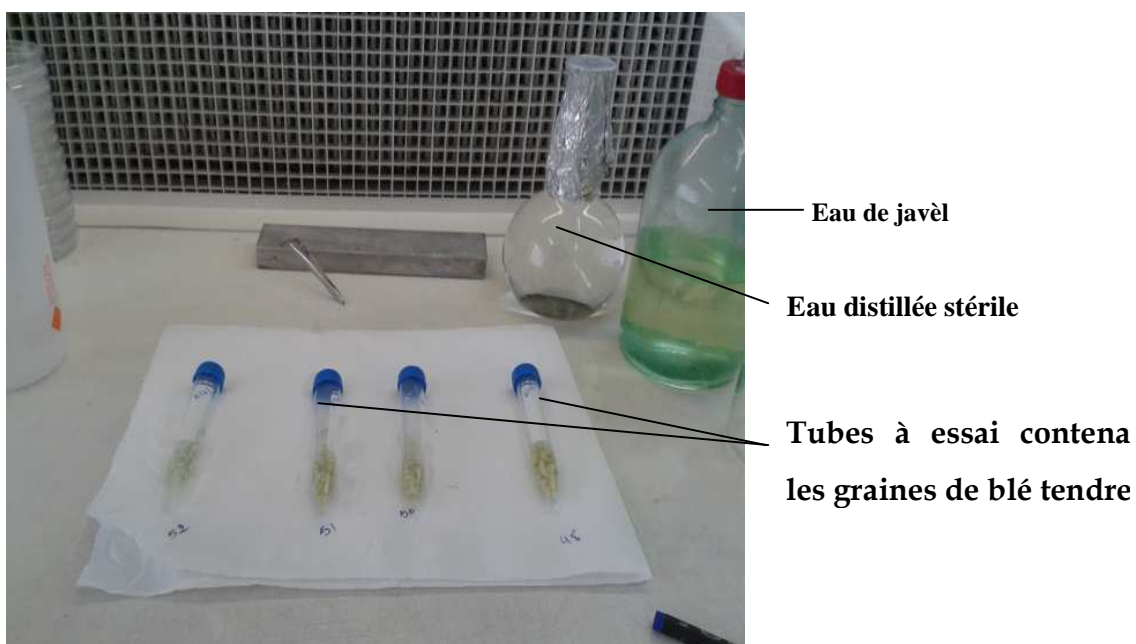


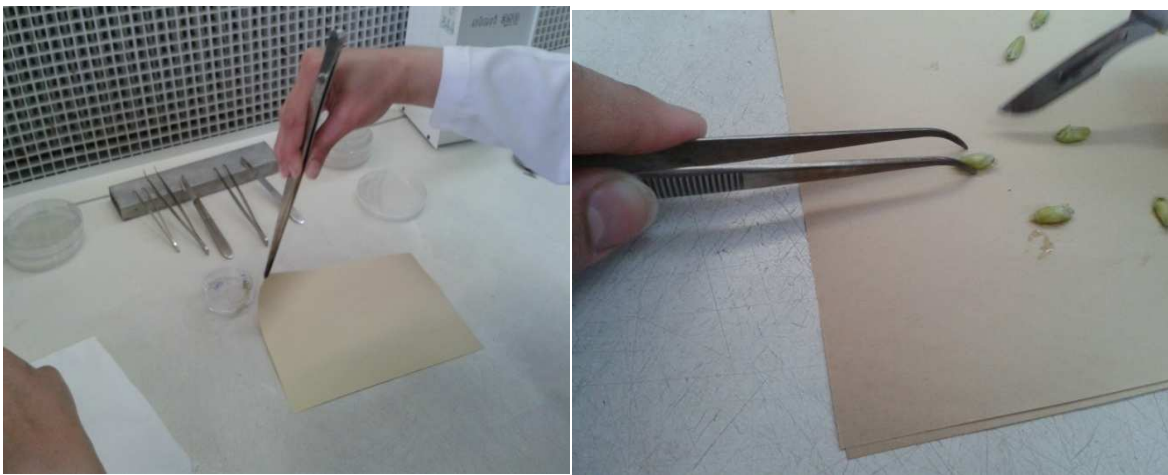
Figure 13 : Stérilisation du matériel végétal.

3.4. Dissection et ensemencement des explants

La dissection des caryopses se fait sous la hotte (figure 14). Une incision dans le tégument, sur la partie dorsale est pratiquée (figure14 b). L'embryon est prélevé soigneusement au bout du scalpel est déposé avec précaution sur le milieu de culture, de sorte que le scutellum soit en contact avec le milieu de culture (figure14c).

Les embryons sont disposés de part et d'autre à raison de dix embryon par boîte de pétri afin d'éviter tout risque de contamination (figure15).

Les boîtes de Pétri sont ensuite scellées avec du parafilm. Elles sont placées dans une chambre de culture (annexe 7) à l'obscurité, à une température de $(25\pm 2) ^\circ \text{C}$.



a : Préparation de la hotte pour la dissection.

b : Position du caryopse pour la dissection.

c : Prélèvement de l'embryon.

Figure 14 : Etapes de dissection des grains immatures.

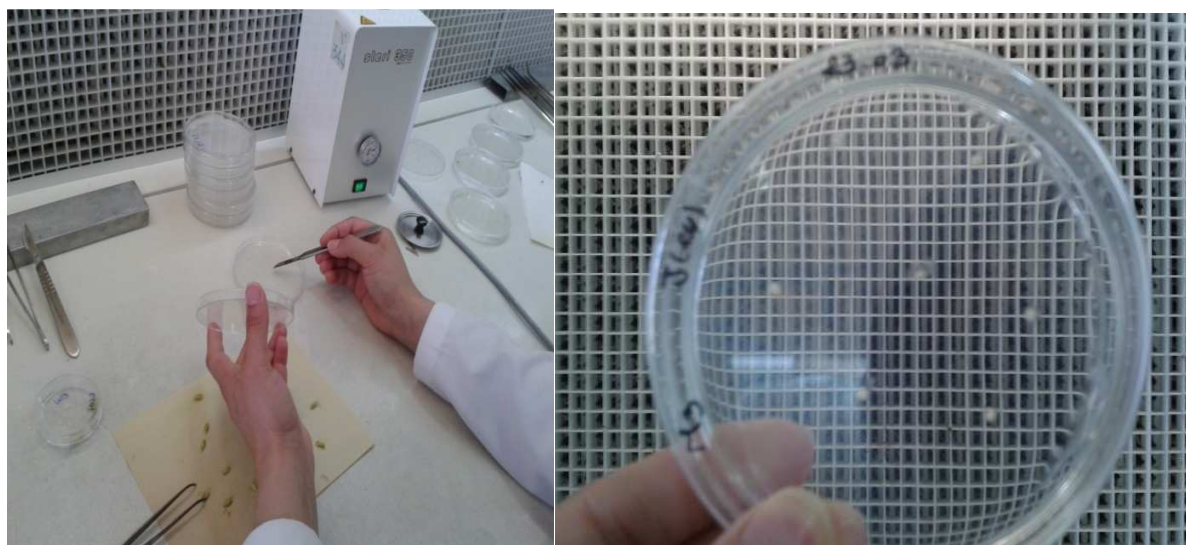


Figure 15 : Ensemencement des embryons dans le milieu de culture.

4. Suivi des cultures

Tous les trois jours les boites ensemencées sont vérifiées et celles contaminées éliminées.

Ainsi avons-nous estimé le taux de contamination par la formule suivant :

$$\% = (\text{Nombre. d'embryons Perdu} / \text{Nombre d'embryons Initial}) \cdot 100$$

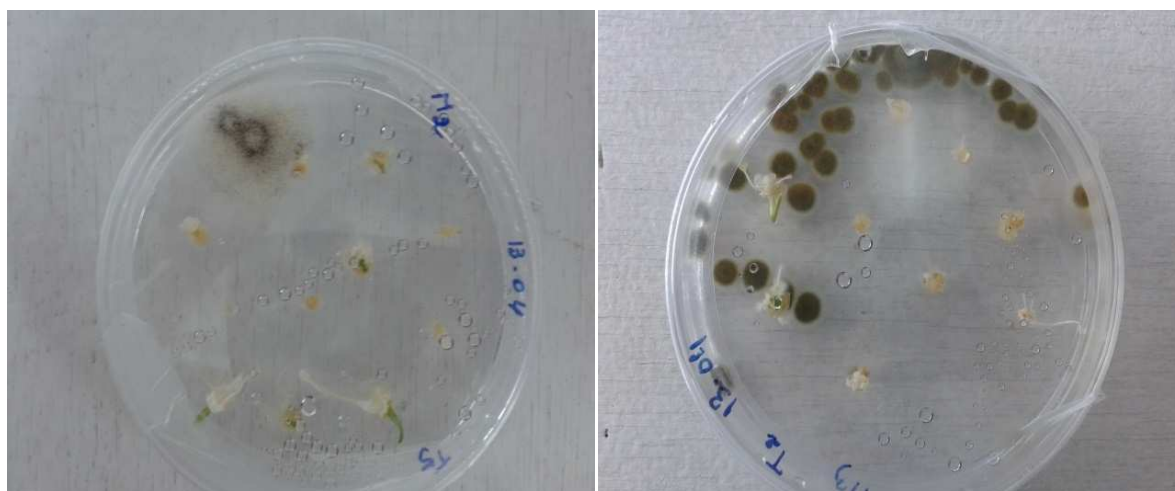


Figure 16 : Boites ensemencées contaminées.

4-1. Observation et description des formations obtenues

Trois à quatre (03 à 04) semaines environ après la mise en culture des embryons, nous avons observé l'apparition des premières néoformations (figure 19a et 19b). Nos observations ont été effectuées au microscope optique $\times 40$ (annexe 8) doté d'un adaptateur et d'un appareil à photos ainsi qu'à la loupe binoculaire (G : 10×2).

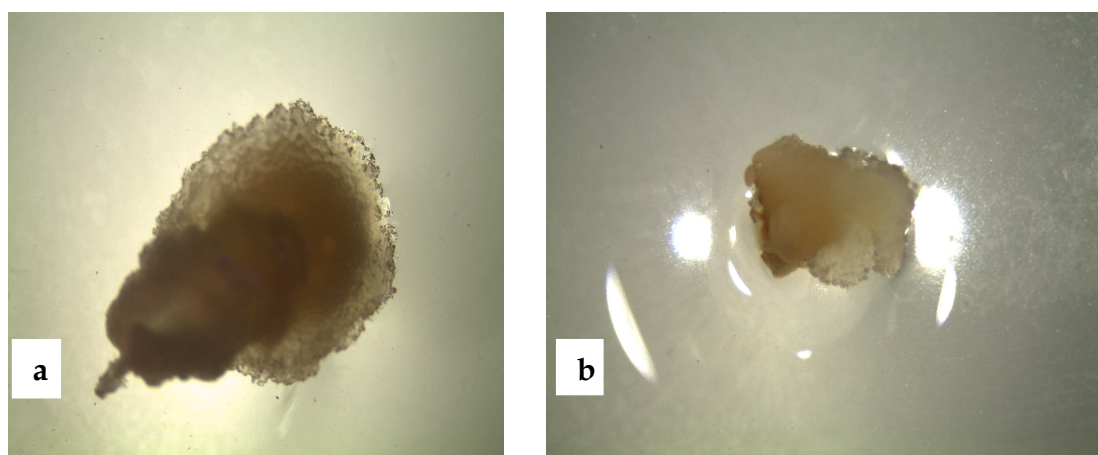


Figure 17 : Néoformations des embryons observés sous microscope photonique (G : 40×10).

5- Régénération :

Au bout de 5 à 6 semaines de culture les formations zygotique obtenues, sont transférées dans le milieu de régénération. Les conditions sont identiques à celles de la phase d'induction soient une température ambiante de $25 \pm 1^\circ\text{C}$ et à la lumière.

5.1 - Repiquage des cals

Le premier repiquage a pour but d'éliminer les embryons ayant induit des cals nécrosés et ne garder ainsi que ceux qui sont capables de fournir de véritables cultures de tissus. Il peut donc être considéré comme un prélèvement de second ordre.

La conduite des manipulations doit toujours être guidée par le souci de ne pas transporter

des germes dans les milieux neufs qui peuvent contaminer certaines parties de l'explant (Figure18).



Figure18 : cals repiqués.

6. Acclimatation

Les plantules issues des cultures en boîtes de Pétri, doivent être soigneusement débarrassées du milieu de culture par rinçage à l'eau (figure19 a ,b ,c).

Les plantules sont placées individuellement dans des pots contenant un mélange constitué de deux tiers ($2/3$) de sable et un tiers ($1/3$) de terreau. Les pots (figure19 d) sont maintenus dans une atmosphère humide au laboratoire dans le souci de reconstituer les conditions d'une serre.



a :Plantule en boîte de Pétri **b** :Rinçage des plantules **c** :Plantule après rinçage



d :La plantation

Figure19 : Acclimatation des plantules issues des embryons immatures.

7. Analyse statistiques

L'ensemble des résultats obtenus lors de nos essais (annexe 3) ont été soumis à une analyse de la variance à deux critères de classification en utilisant le test (ANOVA) avec le logiciel stat-box version 6. A cette analyse fait suite le test de Newam et keuls qui permet de classer les différents moyennes dans différents groupes homogènes.

Chapitre III

Résultats et discussion

900 embryons des trois cultivars (Djanet, sahel et *T.monococcum*) notées V1, V2 et V3 de blé tendre prélevés et mis en culture dans 3 milieux de culture notés M1, M2 et M3 ont montré des réponses différentes concernant leur germination, le nombre de cal formé et leur régénération.

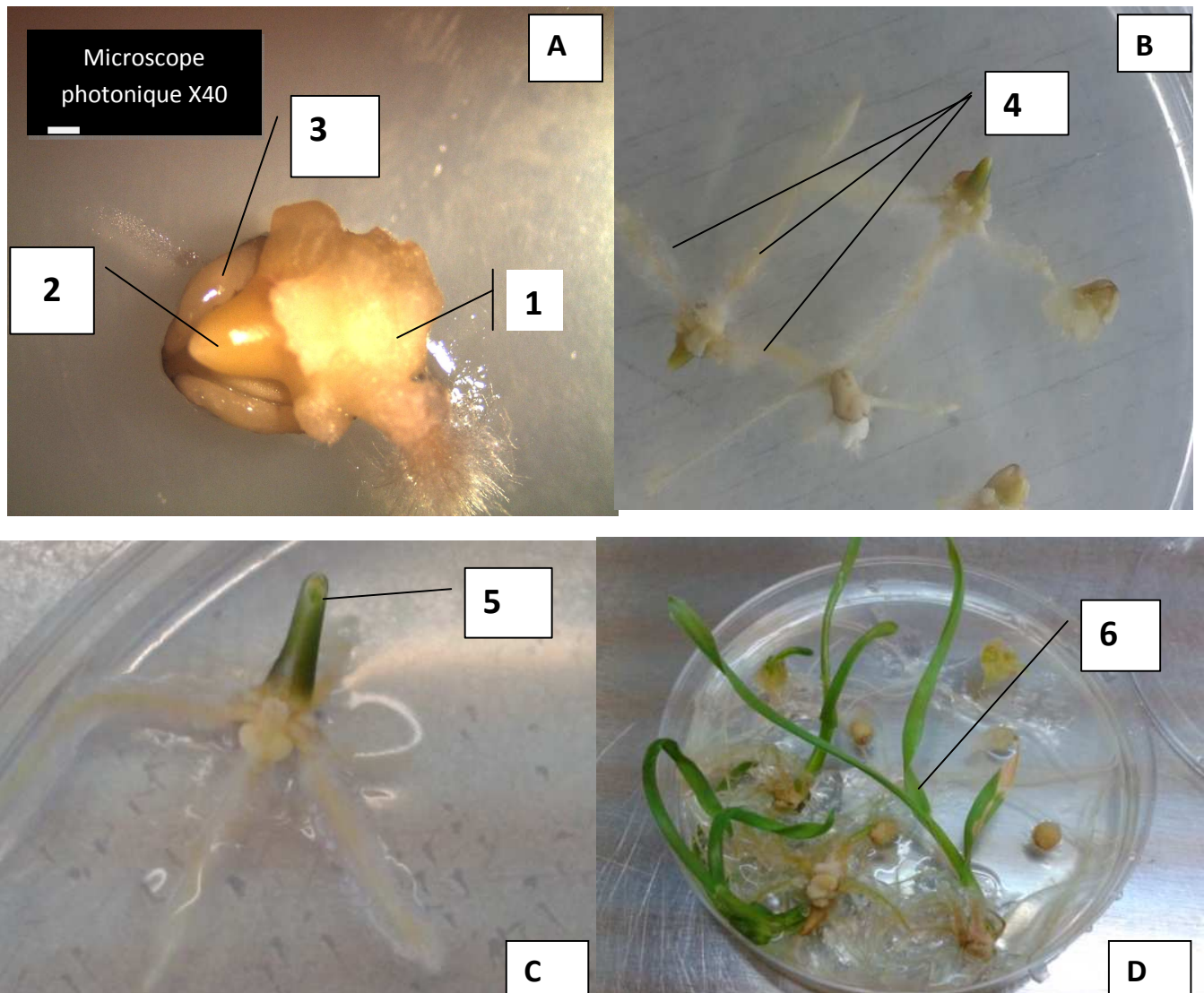
L'ensemble de ces réponses est noté dans le tableau 3.

Tableau 3: Réponses induites par les milieux M1, M2 et M3 sur les variétés testé.

Variétés	Réponses observé	Milieux		
		M1	M2	M3
V1	Embryons	100	100	100
	Germination	25	17	00
	Nombre total de cals	41	43	76
	Nombre de cals non régénères	25	37	96
	régénération	16	06	07
V2	Embryons	100	100	100
	Germination	23	23	00
	Nombre total de cals	57	39	70
	Nombre de cals non régénères	49	33	44
	régénération	8	6	26
V3	Embryons	100	100	100
	Germination	48	14	00
	Nombre total de cals	26	58	85
	Nombre de cals non régénères	8	16	37
	régénération	18	42	48

1. Caractérisation morphologique

Deux semaines après la mise en culture des embryons immatures dans le milieu (MS 1/2) nous avons observé un début de germination (A) qui est caractérisé par un gonflement de l'embryon de coléorhize puis apparition de racines (B), apparition de la partie aérienne verte à partir de la coléoptile (C) et enfin le développement complet de la plantule (D).



1: Coléorhize

2: Coléoptile

3: Embryon

4: racines principales et racines adventives

5: première feuille

6: plantule

Figure 20 : Différentes phases du développement des embryons de blé tendre sur le milieu MS 1/2.

Une induction de la callogénèse chez les explants immatures des trois variétés a apparu en seulement trois jours. Ce phénomène pourrait être due à la fragilité de leurs structures membranaires qui permet ainsi une pénétration rapide de l'auxine.

Selon les milieux et les variétés utilisées, les cals issues sont différentes par la couleur qui varie du blanc au jaune au marron foncé (cals nécrosés) et la texture (figure 22). Ainsi, l'aspect des cals change en fonction du milieu de culture et des conditions d'incubation (annexe.1, Tableau 4). Le milieu M3 contenant le 2.4 D à 10mg/L a donné un taux élevé de cals compacts blanchâtres (A). Dans les milieux M1 et M2 nous avons observé surtout des cals chlorophylliens (B). Le milieu de culture contenant 2mg/l de 2.4D a favorisé l'apparition des cals rhizogènes chez les différentes variétés (C) (Figure 21).

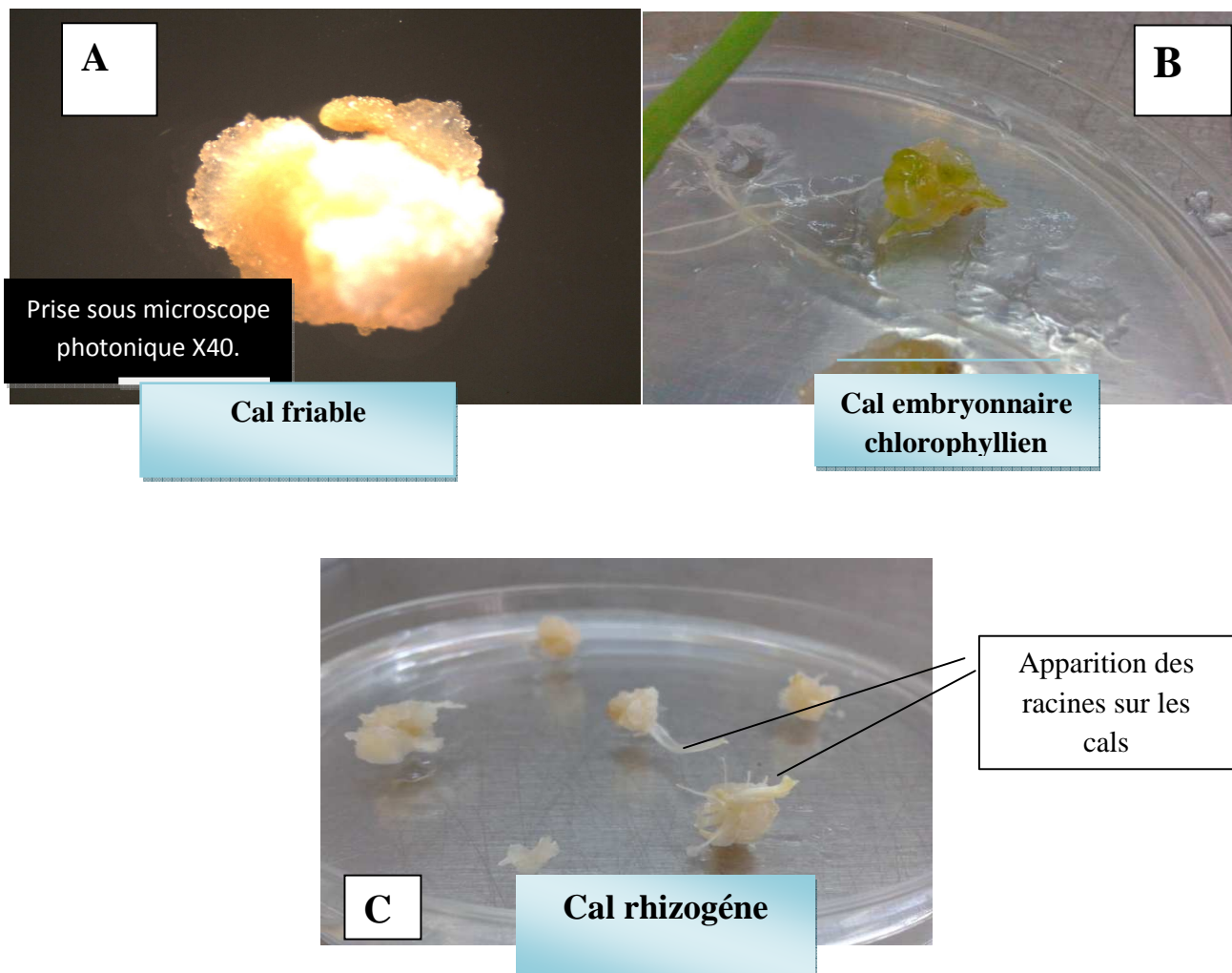
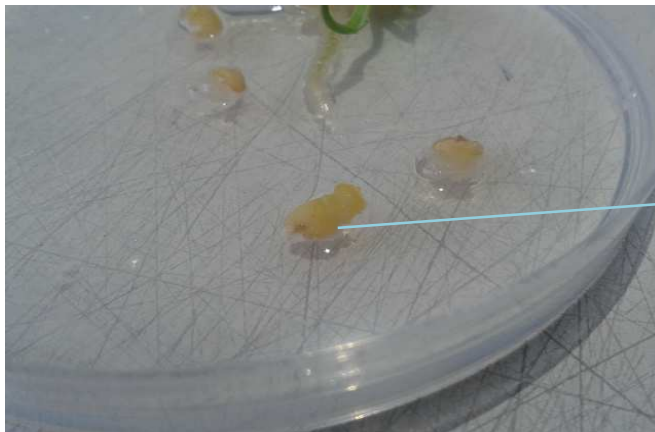


Figure 21: Différents types de cals observés sur les différents milieux utilisés (M1, M2, M3).

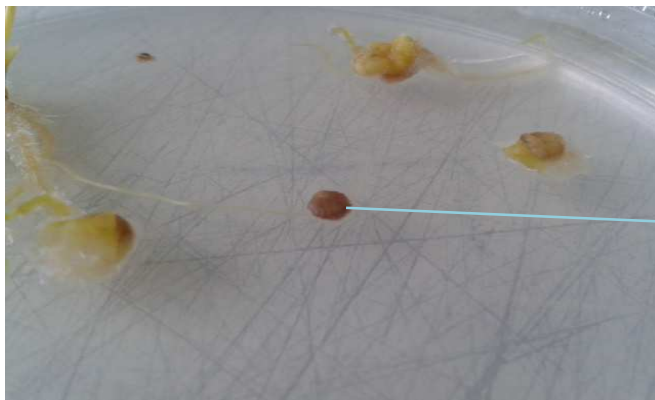
- **Cals nécrosés (Brunissement):** c'est une entrave récurrente et difficile à éviter. Elle se manifeste par un changement de couleur du cal qui atteint d'abord la surface de la coupe en contact avec le milieu, puis s'étend sur la totalité du cal.



**Cal friable
Blanchâtre**



**Cal jaunâtre
Hyper hydrique**

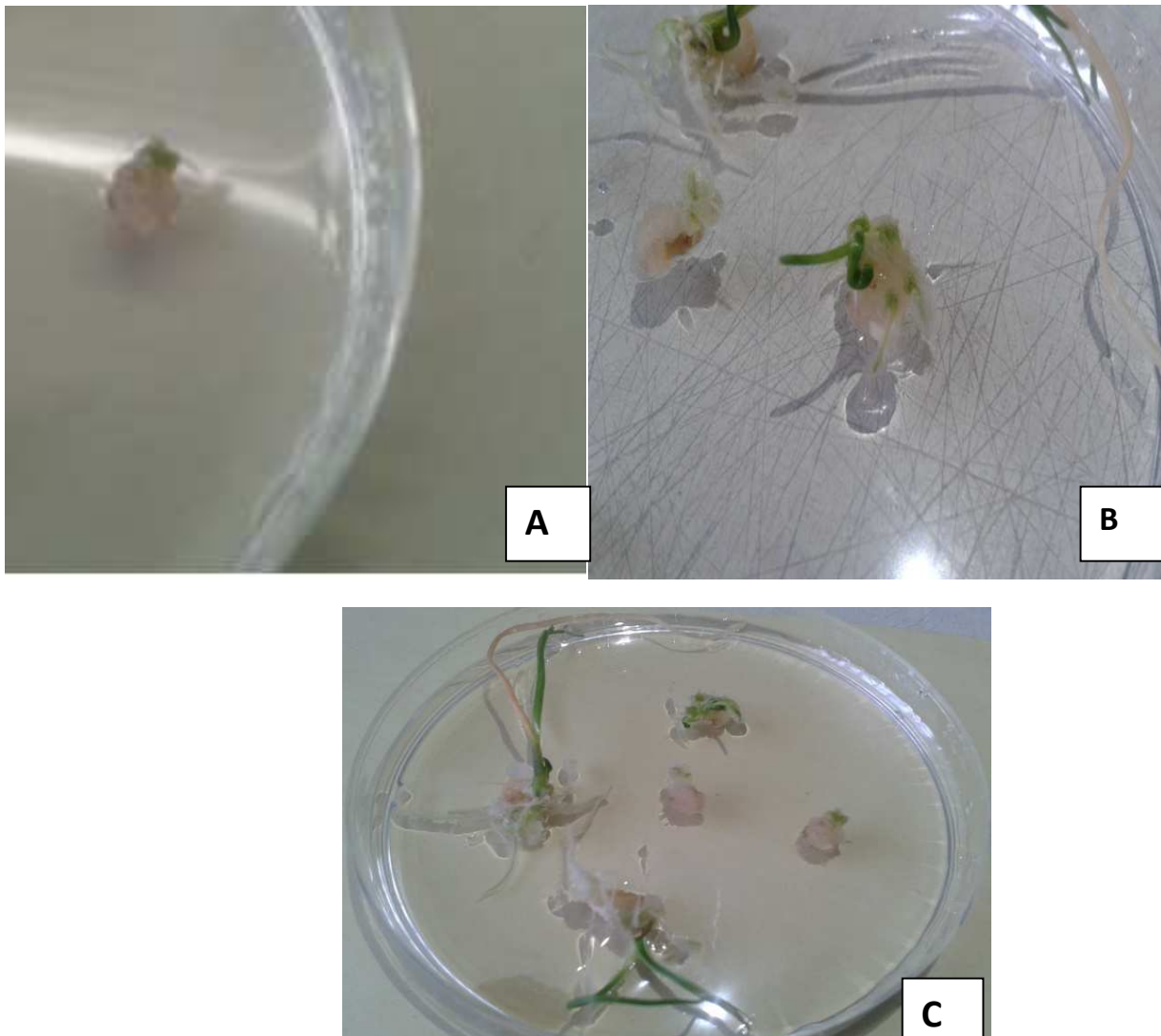


Cal nécrosé

Figure 22 : Différentes teintes variété de couleurs observées sur les cals.

Un mois après la mise en culture, les cals embryonnaires (A) ont été transférés dans un milieu de régénération mis au point par wang et chen (1984). Une semaine après transfert nous

avons observé une régénération de jeunes pousses vertes (B) et deux semaines après nous avons de petites plantules (C) (figure.23).



A: une semaine après repiquage des cals

B: deux semaines après repiquage des cals

C: trois semaines après repiquage des cals

Figure 23 : Régénération de plantules vertes à partir de cals embryonnaires.

2. Effets de 2.4D sur les différentes réponses

A. Effet de la concentration en 2.4D sur la germination dans différents milieux de culture M1, M2 et M3

Les résultats de l'analyse de la variance sont groupés dans le tableau 6 (annexe 3) et les résultats obtenus montrent que la diminution de la concentration en 2.4-D s'accompagne d'une augmentation de la germination zygotique. Mais cette augmentation est plus ou moins importante selon le cultivar considérés sont matérialisés par les graphes de la Figure 24.

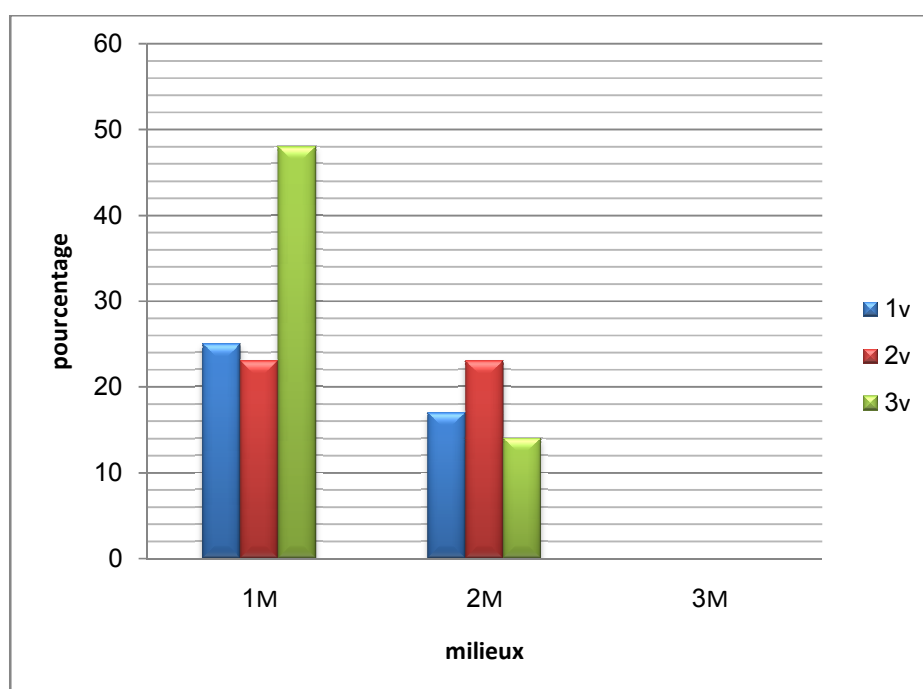


Figure . 24- Effet de la concentration en 2.4-D, sur le taux de germination zygotique dans les milieux M1, M2 et M3.

Chez la variété sahel les taux de germination zygotiques plus élevés sont obtenus dans le milieu M1 avec un taux de 25%. Dans les milieux M2 et M3, ces taux sont respectivement de 17% et 0%. Quant à la variété Djanet, le pourcentage le plus élevé (23 %) a été enregistré sur les milieux M1 et M2, alors que sur le milieu M3 aucune germination n'a été observée.

Chez *T.monococcum* 48% de germination a été notée sur le milieu M1 et des taux respectifs de 14 % et 0% ont été enregistrés sur les milieux M2 et M3.

Le rapport auxine/cytokinines jouerait un rôle capital dans les phénomènes de callogénèse et organogénèse. En effet, une diminution du taux de germination zygotique a été enregistrée chez les trois variétés, à la suite de l'augmentation du 2.4-D.

Le rapport entre les auxines et les cytokinines endogènes varierait selon le cultivar, ce qui expliquerait les différences et les tendances observées des taux de germination zygotique occasionnées par l'ajout de 2.4-D. Les variétés Djanet et *T.monococcum* présentent une bonne aptitude à la culture *in vitro* contrairement à sahel qui serait moins propice.

Les fortes concentrations en 2.4-D ont tendance à diminuer le taux de germination zygotique. L'addition de la 2.4-D au milieu de culture entraîne une augmentation du rapport auxine/cytokinine, ce qui favorise un développement morphogénétique (embryogenèse somatique)

B.Effet de la concentration en 2.4D sur les cals de différentes variétés de blé.

Les taux de cals non régénérés enregistrés dans les milieux d'induction MS1/2 à différentes concentrations de 2.4D sont représentés sur la figure 25.

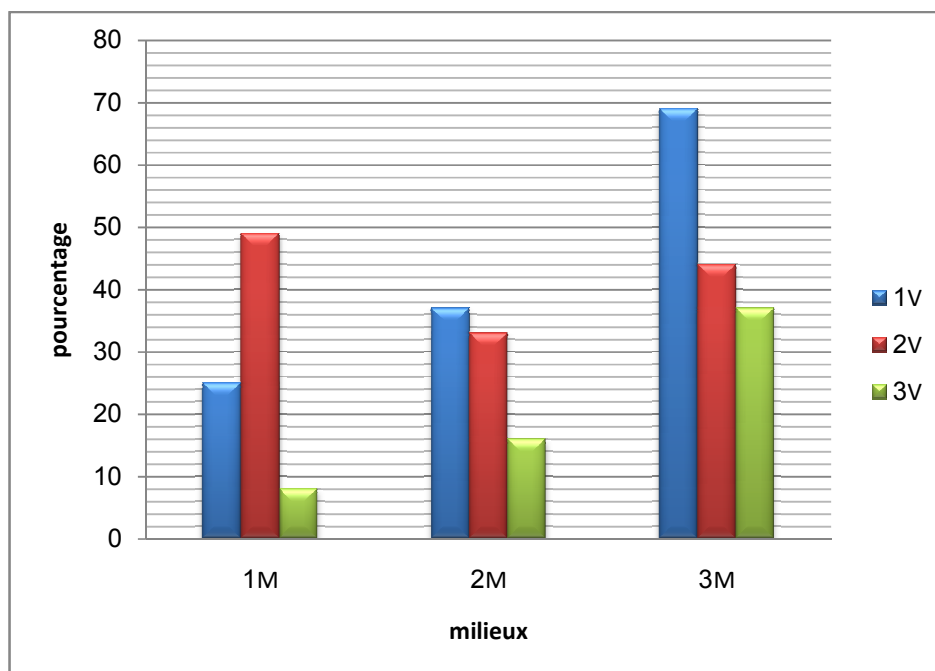


Figure 25.- Effet de la concentration en 2.4-D, sur le taux de cals non régénéré dans M1, M2 et M3.

L'augmentation de la concentration en 2.4-D à 10ml/l se répercute globalement sur l'augmentation du taux de callogénèse. Cependant, cet impact diffère selon la variété, ce taux est respectivement de l'ordre de 69% chez sahel, 44% chez Djanet, et 37% chez *T.monococcum*.

Chez les variétés sahel, *T.monococcum* et Djanet, les taux de callogénèse commencent à diminuer à partir de la concentration 2ml/L., avec des taux respectifs de 37%, 33% et 16%.

Le taux de callogénèse dans le milieu MS1/2 atteint 25% et 49% Et 8 % respectivement chez les variétés sahel, Djanet et *T.monococcum*.

Ces résultats s'expliqueraient par le rétablissement d'un équilibre entre auxines et cytokinines, favorable à la division cellulaire.

C. Effet de la concentration en 2.4-D, sur le taux de cals régénérés dans M1, M2 et M3.

La présence de 2.4-D à trois concentrations différentes a un effet sur le pourcentage de cals embryogènes (Figure 26).

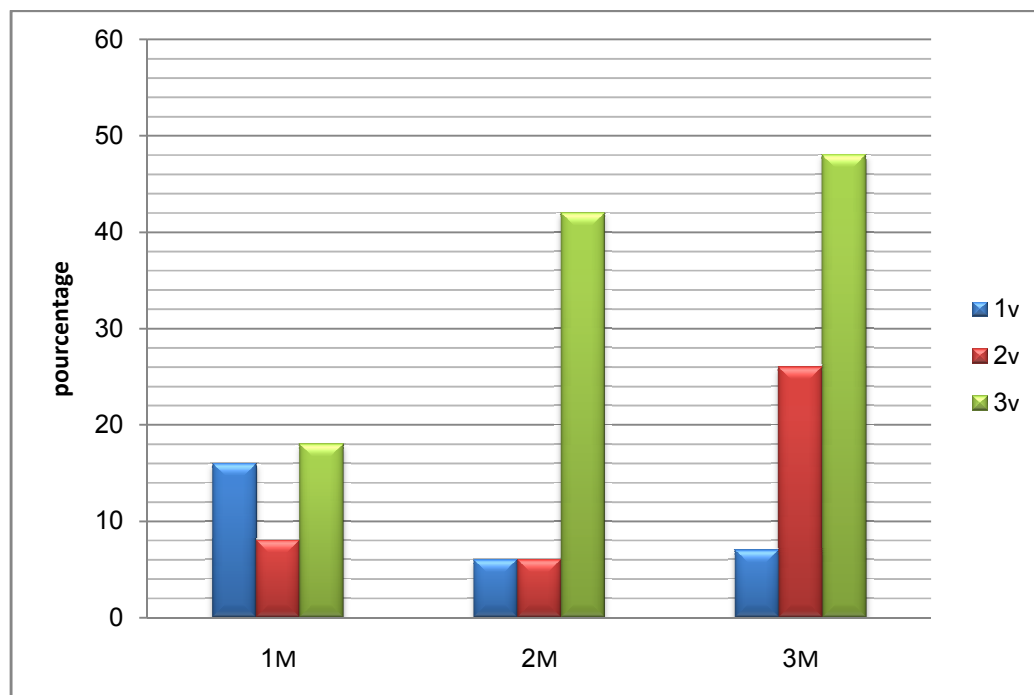


Figure 26 : Effet de la concentration en 2.4-D, sur le taux de cals régénérés sur les milieux M1, M2 et M3.

Le traitement des embryons avec du 2.4D a entraîné une régénération non négligeable des cals de *T.monococcum* et ce sur les milieux de culture utilisés. Des proportions de 18%, 42% et 48% ont été enregistrées respectivement sur les milieux M1, M2 et M3.

Dans le cas des variétés Sahel et Djanet nous avons relevé les mêmes résultats avec 6% de régénération sur M2. Quant au milieu M3 nous avons noté un taux de 26% pour la variété Djanet bien plus important que celui obtenu avec la variété Sahel qui n'est que de 7%. Il en est de même pour le milieu M1 qui s'est révélé bien plus favorable pour la variété Djanet avec 16% de cals régénérés contre un taux représentant deux fois le taux enregistré avec la variété Sahel soit 8%.

3. Analyse statistique

3.3. Analyse des résultats d'effet interaction milieu variété sur la germination, callogénèse et régénération

3.3.1. Effet de l'interaction milieu, variété sur la germination

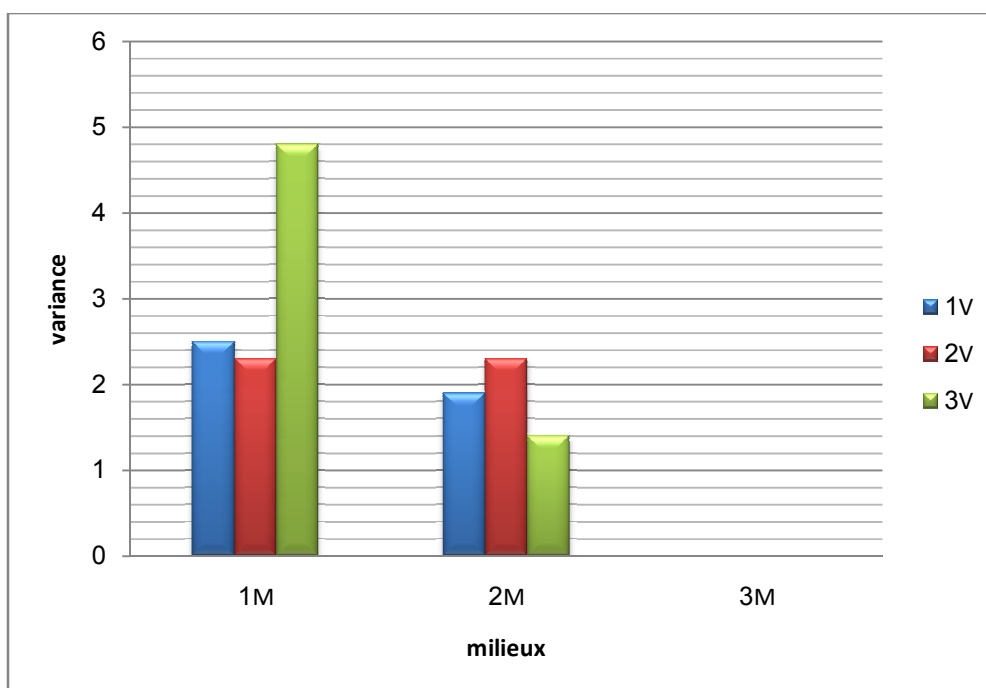


Figure 27 : Résultats de l'analyse de la variance de l'effet de l'interaction milieu variété sur la germination.

Les résultats de l'analyse de la variance à deux critères de classification ont montré que l'interaction milieux, variétés a un effet significatif sur le taux de germination avec une P value = 0,011 ($p < 0.05$) (tableau 6 ,annexe 9).

Le test de Newman et keuls a permis de classer les moyennes on quatre groupes homogènes (V3 M1= 4,8) dans le groupe A , (V1V2, M1M2 = 2,5) dans le groupe B ,(V1V2,M3=1,9) dans le groupe C et (V1M3= 0) dans le groupe D (tableau 8 ,annexe 9).

3.3.2. Effet de l'interaction milieu, variété sur le nombre total de cals

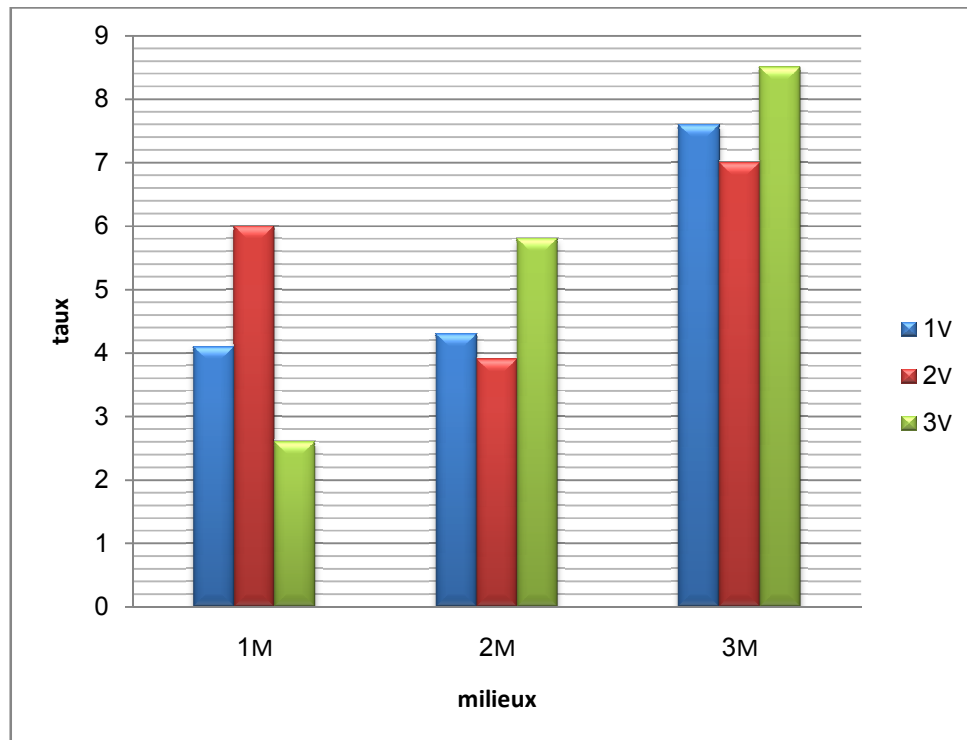


Figure 28 : Résultats de l'analyse de la variance de l'effet de l'interaction milieu, variété sur le nombre total de cals.

Les résultats de l'analyse de la variance à deux critères de classification a montré que les milieux étudiés ont affecté d'une manière très hautement significative le nombre de cals induits avec une P value = 0,0005 (tableau 9 , annexe 9).

Le test de Newman et keuls a permis de classer les moyennes on cinq groupe homogènes (V3M3=8.5) dans le groupe A , (V1M3=7.6) dans le groupe B,(V2M1= 6) dans le groupe C ,(V2M2 = 4.3) dans le groupe D,(V3V1 = 2.6) dans le groupe E (tableau 11 , annexe 9).

3.3.3. Effet du milieu, variétés sur les cals non régénérés

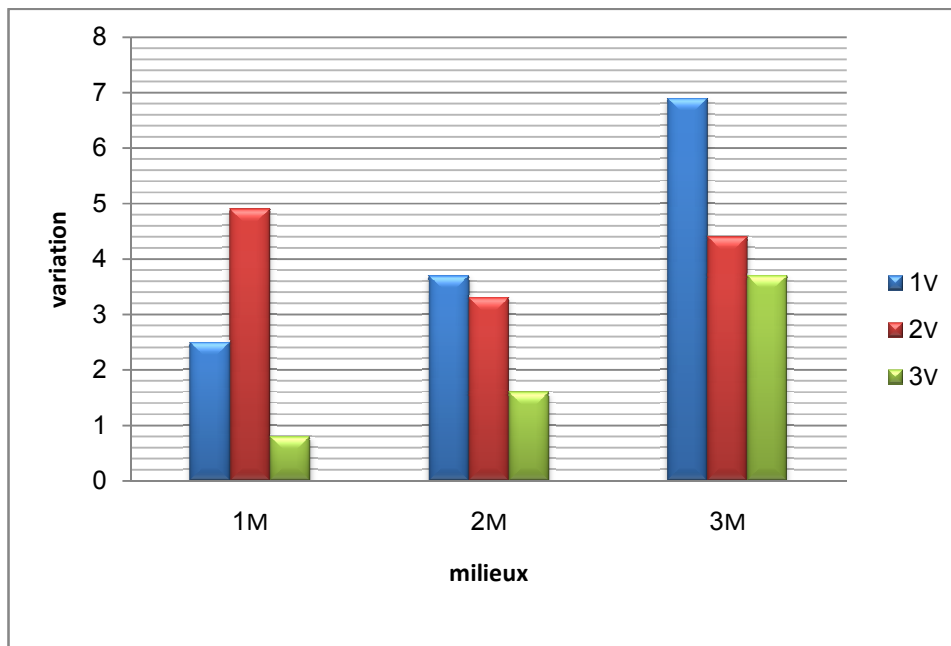


Figure 29 : résultats de l'analyse de la variance de l'interaction milieu, variété sur le nombre de cals non régénérés.

Les résultats de l'analyse de la variance à deux critères de classification a montré que l'interaction milieu, variété étudiée ont affecté d'une manière très hautement significative le nombre de cals non régénérés à P value = 0,0024 les cals non régénérés (tableau 12 ,annexe 9).

Le test de Newman et keuls a permis de classer les moyennes on six groups homogènes (V1M3=6.9) dans le groupe A, (V2M1=4.9) dans le groupe B,(V1M2= 3.7)dans le groupe C, (V1M1= 2.5) dans groupe D , (V3M2 =1.6) dans le groupe E,(V3M1= 0.8) dans le groupe F (tableau15 , annexe 9).

3.3.4. Effet de l'interaction milieu variété sur la régénération des cals

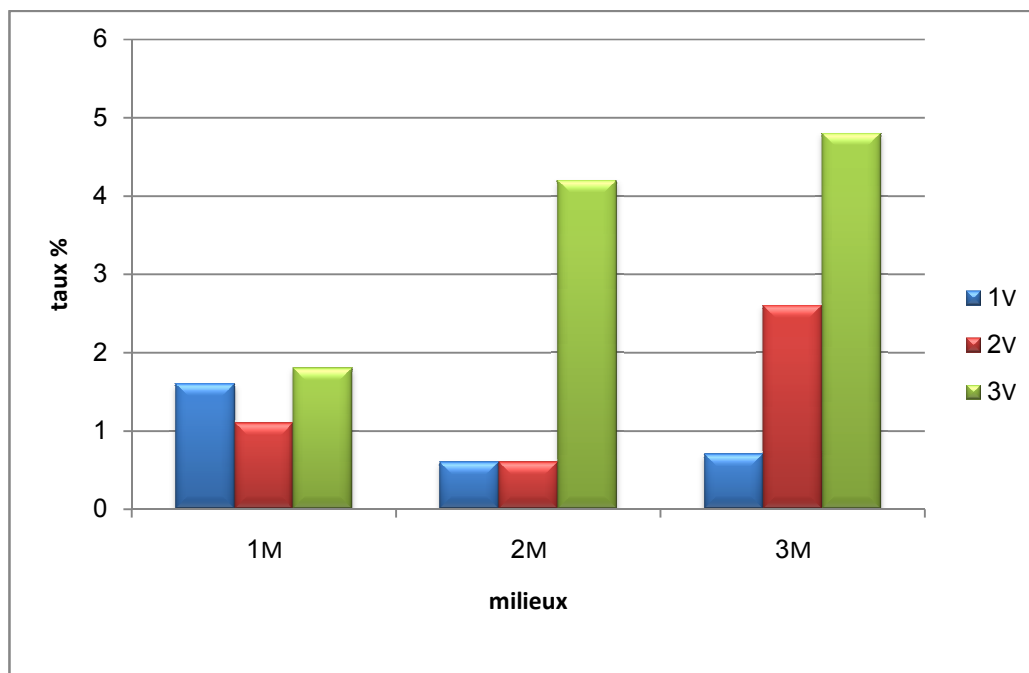


Figure 30: Effet de l'interaction milieu variété sur la régénération de cals.

Les résultats de l'analyse de la variance à deux critères de classification ont montré que l'interaction milieu, variété étudiée ont affecté d'une manière très hautement significative la régénération de cals à P value = 0,00002 (tableau 16 , annexe 9).

Le test de Newman et keuls a permis de classer les moyennes en quatre groupes homogènes (V3M3 =4.8) dans le groupe A , (V2M3=2.6) dans le groupe B , (V3M1= 1.8) dans le groupe C ,(V1M3= 0.7) dans le groupe D (tableau 19 , annexe 9).

L'utilisation de la culture des embryons immatures des trois variétés de blé tendre sahel, Djanet *T.monococcum* nous a permis d'éviter la phase de maturation de la graine, cela permet ainsi de réaliser plusieurs générations par an, ce qui a été montré par les travaux de (Mzouri., Amssa., 2002) sur Amélioration de l'embryogenèse somatique à partir d'embryons immatures chez le Blé tendre (*Triticum aestivum*). D'autre part l'embryon immature de blé nous a aussi permis d'améliorer la callogénèse *in vitro*, ce qui est conforme avec les résultats de (Mzouri et al., 2002).

Dans le cas des embryons immatures et pour un milieu de culture donné, il est donc prévisible qu'on obtienne des réponses différentes, germination, qualité des cals et pouvoir de régénération, selon les trois variétés testées.

L'étude de la réponse des embryons zygotiques immatures a permis de distinguer deux types de cals, ceux qui présentent des structures chlorophylliennes, des tiges et des racines, et d'autres sont rhizogènes (amorphes) vitrifiés et qui n'ont régénéré que des racines. Ces résultats sont en accord avec les travaux de Felfoldi., Purnhauser (1992) sur des embryons immatures de blé tendre.

Les régulateurs de croissance interviennent dans le contrôle de la croissance et de la morphogénèse. Dans le cas des blé, le 2,4-D est souvent utilisé seul comme régulateur de croissance dans le milieu d'induction. L'ajout de 2.4D à différentes concentrations (2mg/l, 10mg/l) dans les milieux de culture (M2, M3) a permis l'induction d'une callogénèse et d'une organogénèse (relative à l'appariation de feuilles et racines) dans M2, alors que sur le milieu M3 nous avons obtenu un taux élevé de callogénèse avec inhibition de la germination d'embryons immatures, tandis que la mise en culture sur le milieu M1 (absence de 2.4D), ont montré une germination importante ce qui a été prouvé dans les travaux (Gonzalez., Friero., Jouve., 2001) sur le blé dur. Il ressort également que le problème de la germination se pose beaucoup plus aux faibles concentrations de 2,4-D, ce dernier améliore significativement la capacité embryogène et le taux de régénération.

Cependant, la concentration en 2.4D qui a engendré un effet maximal dépend de la variété qui nous a permis d'obtenir respectivement dans les milieux M2, M3 des taux de cals embryogènes de l'ordre de 43% et 76% chez Sahel, et 39% et 70% chez Djanet et de l'ordre de 58% et 85% chez *T. monococcum*. Ce qui est en accord avec les travaux de Gonzalez et al. (2001) qui en travaillant sur du blé dur.

Ces différences observées s'expliqueraient par les quantités endogènes en auxines et cytokinines et par les rapports entre ces régulateurs de croissance notamment auxine/cytokinines.

Plusieurs auteurs ont montré que la présence d'une cytokinine en combinaison avec le 2,4-D dans le milieu de callogenèse permet d'améliorer la qualité embryogène des cals et le pouvoir de régénération (Carman *et al.*, 1987 b ; Bhaskaran ., Smith, 1989 ; Hsissou, 1994 ; Bouiamrine, 1998). Mais la capacité embryogène d'un cal dépend souvent du génotype comme l'a affirmé Brown *et al.*, (1995) contrairement à nos résultats où la capacité embryogène dépend du milieu .

Conclusion et perspectives

L'utilisation de l'outil biotechnologique, fondé sur les techniques *in vitro* par embryogénèse, constitue sans doute le moyen le plus prometteur pour accélérer le cycle végétatif du blé via une régénération d'embryons immatures.

A travers ce travail, nous avons appliqué une méthodologie permettant la régénération, la croissance et le développement des cals et des vitroplants à partir d'embryons immatures de blé chez trois cultivars Sahel, Djanet et *T.monococcum*.

Au terme de notre travail de recherche, il a apparu clairement que l'addition de la 2.4D à forte concentration au milieu MS 1/2, a permis une forte callogénèse. En effet, les cals obtenus ont présenté des teintes variables allant du blanc au jaune et certains sont chlorophylliens pourvus de tige et de racines alors que d'autres sont amorphes pourvus de racines.

L'analyse de la variance à deux critères de classification a permis de montrer que le milieu de culture utilisé en l'occurrence le MS 1/2 à une concentration de 10 mg/l a affecté de manière très hautement significative la callogénèse à P value < 0,0001 .

L'ensemble des cultivars de blé ont eu des réponses approximativement semblables sur le milieu de culture utilisé quelque soit la concentration de 2.4D ajoutée.

L'étude statistique (ANOVA) a également montré un effet très hautement significatif de l'interaction milieu-cultivar aussi bien sur la germination, la régénération que la callogénèse, avec des P values respectives de 0,011, 0,0002 et 0,0005 .

Notre expérimentation nous a permis de définir, le milieu M3 à 10 mg/l comme déterminant de la callogénèse et qui optimise la capacité embryogène et le taux de régénération des cals issus des embryons immatures des trois cultivars de blé utilisés.

Notons que la germination et la régénération du blé à partir de culture d'embryons immatures est un travail d'envergure qui nécessite une durée d'un mois, une attention particulière, et des moyens de laboratoire et humains conséquents. Il serait souhaitable de continuer ce travail qui, notons le, n'est qu'une contribution à un vaste programme revêtant un intérêt particulier pour notre pays étant donné qu'il a attrait aux besoins alimentaires en blé, aliment de base de la population Algérienne. Pour cela , nous recommandons pour les travaux futurs d'essayer toutes les hormones auxiniques disponibles à des concentrations variables et de réaliser plusieurs repiquages.

Réaliser un dosage des hormones endogènes, pour déduire la balance hormonale exogène afin d'orienter l'organogenèse-c'est-à-dire la callogénèse, la rhizogénèse et la caullogénèse

Il est primordial de reprendre les conditions de culture les plus satisfaisantes dans nos travaux et les travaux déjà réalisés, et de travailler avec un effectif plus important.

References bibliographiques

1. **AUGE R. , BEAUCHESNE G., BOCCON -GIBOD., DECOURTYE L., DIGAT B. , JALOUZOT R . ,MINIER R.,MORAND .CL., REYNOIRDJ.P.,STRULLUD G et VIDALIE H.,1989.** La culture *in-vitro* et ses application horticoles. Ed Lavoisier 225p
2. **AHN S. , Adderso JA. , Sorrells ME. , Tanksley SD.**1993: Homologue relationships of rice, Wheat and maize chromosomes .Mol.Gen.Genet241.483-490
3. **BOCCON-GIBOD J., 1980.** Régénération du Crosne du Japon (*Stachys sieboldii* Miq.) par culture de méristème : multiplication et conservation *in vitro* des clones. *In* : Congrès sur l'application de la culture *in vitro* à l'amélioration des plantes potagères EUCARPIA section légumes, Versailles. 31-41.
4. **BOGARD M.**2011. Analyse génétique et écophysologique de l'écart à la relation teneur en protéines - rendement en grains chez le blé tendre (*Triticum aestivum* L.) *Thèse de Doctorat, Université d'Auvergne: 17P.*
5. **BOMMINENI V.R, JAUHAR P.P., 1996.** Regeneration of plantlets through isolated scutellum culture of durum wheat. Plant Sci. 116:197-203
6. **BOMMINENI V.R, JAUHAR P.P., 1996.** Regeneration of plantlets through isolated scutellum culture of durum wheat. Plant Sci. 116:197-203
7. **BOULAL H., ZAGHOUANE O., EL MOURID M. ET REZGUI S., 2007.** Guide pratique de la conduite des céréales d'automne (blés et orge) dans le Maghreb (Algérie, Maroc, Tunisie). Ed. TIGC, INRA, ICARDA, Algérie, 176 p.
8. **BONJEAN E. , PICARD P,** 1990 : les céréales à paille origine histoire économie et sélection Ed Soft Word : group ITM. Pp29-40.
9. **BROWN, R.C.D., 2008.** Microwave-assisted synthesis and antimicrobial activities of flavonoid derivatives. Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters **18**, 518-522.
10. **BOXUS P.,1995:** Multiplication végétative: micropropagation et embryogenèse somatique in biotechnologies végétales . BV 93, Ed CNED. AUPELF- UREF 191p

11. **BRIGGS W B ., 1964.** phototropism; in higher plants in physiology academic press :1; 223-271.
12. **BUVAT R 1965.** les bases cytologiques de la différenciation et de la dédifférenciation chez les plantes. Handbuch d.pflanzenphysiologie, Bd. XV/L, pp.100-145.
13. **CARMAN J.G., JEFFERSON N.E. & CAMPBELL W. 1987** Induction of embryogenic calli. II. Quantification of organic addenda and other culture variable effects. Plant Cell Tiss. Org. Cult. 10: 115-128
14. **CHEFTEL J.C. ., CHEFTEL H., 1976, (1992) (septième tirage),** *Introduction à la biochimie et à la technologie des aliments*, Tome I, Tech & Doc Lavoisier, Paris, 381pp.
15. **COOPER .G., M.1999.** La cellule: une approche moléculaire. Ed de boeck Université.706p
16. **CRONQUIST .A.1981;** An integrated system of classification of flowering plants. Columbia Univ.Press, New York.
17. **DE BUYSER, JA. 1998** Chlorophyllian, anthocyanic and albinos *Triticum durum* plants derived from isolated microspore culture. Dans : *Proceedings of the 9th International Wheat Genetics Symposium*, Vol. 3, Slinkard, A.E. (ed.), Saskatoon, 2-7 août, : 44-46.
18. **DEMARLY.Y ., SIBLM, 1989 :** Amélioration des plantes et biotechnologie. Ed JOHN LIBBEY, EUROTEXT Paris. 152p.
19. **DOUSSINAULT G., PAVOINE M., JAUDEAN B., JAHIER J., 2001.** Evolution de la variabilité génétique chez le blé. Dossier de l'environnement de l'INRA, N° 21. Station d'amélioration des plantes. pp : 91-103.
20. **DOVRAK J., 1988.** The origin of wheat chromosomes 4A and 4B and their genome reallocation *Triticum aestivum* L., Can, Genet, Cytol; 25. pp : 210- 214.

21. **DUBOIS J. 1989.** Biotechnologie et amélioration des plantes, plantes vivrier tropical .ED AUPELF-UREE Jhon Libbey Eurotext. Paris: 19-25
22. **FELDMAN M., SEARS. ER. 1981.** The wild gene resources of wheat. Sci. Am.244 : 98–109.
23. **FAO. 2007.** Perspective alimentaires. Analyse des marchés mondiales. <http://www.fao.org/010/ah864f/ah864f00.htm>. (31.5.2008/13:28).
24. **FELDMAN, M. 2001.** Origin of Cultivated Wheat. Dans Bonjean A.P. et W.J. Angus (éd.) The World Wheat Book: a history of wheat breeding. Intercept Limited, Andover, Angleterre,p 3-58.
25. **FELFOLDI K. & PURNHAUSER L. (1992)** Induction of regenerating callus cultures from immature embryos of 44 wheat and 3 triticale cultivars. Cer. Res. Com. 20: 3-
26. **GODON B., WILLM C., 1991.** Les industries de première transformation des céréales. Coll. Agro. Alimentaire. Lavoisier. pp : 78-91.
27. **GONZALEZ JM., E. Friero, N. Jouve. 2001.** Influence of genotype and culture medium on callus formation and plant regeneration from immature embryos of *Triticum turgidum* Desf. Cultivars. Plant Breeding, 120: 513-517.
28. **HANNING E., 1904.** Zur Physiologie pflanzlicher. Uber die Kultur von Cruciferen. Embryonen ausserhalb des embryosaks, Bot. Zeit. 62:45-80.
29. **IGHILHARAZ Z., BOUABDALLAH L.,BELKHDJA M.2008** .Influence Hormonale sur l'induction de la callogenese chez *Atrilex Harmus L.L* et *Atriplex canzscens*.European Journal of Scientific Research.vol 24No.2,pp211-218.
30. **JENSEN C.J., 1977.** Monoploïdes production by chromosome elimination. In :Reinert J.Bajaj Y.P.S. (Eds), applied and fundamental aspects of plant cell, tissue and organ culture. Springer, Berlin Heidelberg New York. 299-331.
31. **KHUSH, G.S. 1999.** Green Revolution: preparing for the 21st Century. Genome 42:646-655.

32. **KIRKBY J.M et MENGEL K.E., 1979.** Plant nutrition. Eds. McMillan. XYLondon-530p.
33. **LA RUE., 1938.** Longevity of plant cells in tissue cultures. Science. 87-240.
34. **LI T.T., 1934.** The development of the embryo of *Ginkgo biloba*. Sci . Rept. Nat . Tsing. Hua .Univ B2. 29-35.
35. **MACIEJEWSKI .J., 1991** : semences et plants, p : 35, 37,58.
36. **MARGARA F.,1989.** Bases de multiplication végétative : les méristèmes et l'organogenèse . Ed INRA Paris 262p.
37. **MONNIER M., 1984.** Survival of young immature *Capsella bursa-pastoris*. Moenc. Revue Cytol. Biol. Vég. 39:1-120. (These).
38. **MONNIER M., 1995.** Culture of zygotic embryos. In: THORP T.A. (Eds), *In vitro* embryogenesis in plants. Kluwer academic publishers, Dordrecht. Netherlands.117-153.
39. **MURASHIGE, T., SKOOG, F. 1962.** A revised medium for rapid growth and bioessays with tobacco tissue cultures.. *Physiol. Plant*, 15: 473–497
40. **MZOURI K., M. AMSSA ., BOUIAMRINE E.H., 2001.** Embryogenese somatique a partir d'embryons immatures de Ble tendre (*Triticum aestivum* L.) : eifel genotype. Acta Bot. Gallica, 148 (3), 215-225.
41. **NORSTOG K.J., 1961.** The growth and differentiation of cultured barley embryos. Amer. J. Bot. 48:876-884
42. **PELLETIER G. 1992** . Hormonal requirement and tissue competency for shoot organogenesis in tow cultivars of brassica napus.Physiol.Plant.84:521-530.
43. **PICARD E., 1984.** Contribution à l'étude de l'hérédité et de l'utilisation en sélection de l'haploidisation par androgenèse *in vitro* chez une céréale autogame:*Trtiticum aestivum* L. Thèse Doc Sci : Univ Paris-Sud Orsay 292p.

44. **RAGHAVAN V ., TORREY J.G., 1963.** Growth and morphogenesis of globular and older embryos of *Capsella* in culture, *Amer.J.Bot.*50:540-551.
45. **REPELLIN, A., BAGA, M., JAUHAR, P.P., CHIBBAR, R.N. 2001.** Genetic enrichment of cereal via alien gene transfer: New challenges. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 64: 159-183. Rhodes, C.A., Pierce, D.A.
46. **RIETSEMA J., SATINA S ., BLAKELEE A.F., 1953.** The effect of sucrose on the growth of of *Datura stamonium* embryo *in vitro*. *Amer. J .Bot.* 40: 538-545.
47. **SKOOG F ., MILLIER S., 1957.** La balance hormonale. *Sympo. Sco. Exp.*9:118-131.
48. **SLAMA A., BEN SALEM M., BEN NACEUR M., ZID E.D. 2005.** Les céréales en Tunisie : production, effet de la sécheresse et mécanismes de résistance. Institut national de la recherche agronomique de Tunisie (Inrat). Univ. Elmanar. Tunisie. (http://www.john-libbeyeurotext.fr/fr/revues/agro_biotech/sec/e-docs /00/04/11/2E/ telecharger.md).
49. **SOLTNER D.2005.** Les bases de la production végétale *24eme Ed : coll.sci et Tec Agri*, 77p.
50. **TEOULE. E, 1999 :** « Biotechnologies et amélioration des plantes ». 5U, K édition. Tec et Doc. 607-612.
51. **VEEN H., 1963.** The effects of various growth-regulators on embryo fact or necessary for the culture *in vitro*, *Acta Bot. Neerl.* 12:129-171.
52. **VIAN E., PHILLIP S., 1978.,UDVARDY J., SIVOK B., NEMET G., 1976.** Effect of naphthylacetic acid, 2,4,5- trichlorophenoxyacetic acid and 3,6-dichloro-o-anisic acid on nucleolytic enzymes in callus cultures from wheat root, *Z. Pflanzenphysiol.* 78:33-40. (Feldman et Sears, 1981 ; Mouellef, 2010).
53. **VILMORIN ANDRIEUX ; 1880.** Les meilleurs blés. Paris. In-fol., VIII-175 p., pl. en coul. Wheat for Kansas. » Kansas State University Agricultural Experiment Station.
54. **WADLEY G., MARTIN A. 1993.** The Origins of Agriculture, A Biological Perspective and New Hypothesis. *Australian Biologist* 6: 96-105.

55. **ZRYD J.P.,1988**: Culture de cellules , tissus et organes végétaux .Ed .Press.Polytechniques
Romandes Suisse 308p

Annexes

Annexe 1

Tableau 4 : Composition du milieu culture de Murashige et Skoog., 1962.

Groupe	Composition	Concentration dans un litre de milieu (mg/l)	Quantité prélevée		
Macroéléments	KNO ₃	23.75	40ml		
	NH ₄ NO ₃	20.62			
	CaCl ₂ ·2H ₂ O	5.5			
	MgSO ₄ · 7H ₂ O	4.62			
	KH ₂ PO ₄	2.12			
Micro éléments	H ₃ BO ₃	310	10ml		
	MnSO ₄ · 4H ₂ O	111.5			
	ZnSO ₄ · 7H ₂ O	430			
	CuSO ₄ · 5H ₂ O	1.25			
	CoCl ₂ · 6H ₂ O	1.25			
	NaMoO ₄ · 2H ₂ O	12.5			
	KI	41.			
Fer	FeSO ₄ · 7H ₂ O	3.7	10ml		
	Na ₂ EDTA · 2H ₂ O	2.78			
Vitamines	Nicotinic acid	0.1	1ml		
	Pyridoxine HCl	0.5			
	Thiamine HCl	0.5			
Hormone	NAN	0.2	M1	M2	M3
	BAB	1	1ml	1ml	1ml
	2,4-D	1	1ml	1ml	1ml
			0.00ml	2ml	10ml
Sucre		30g	30g		
Agent gélifiant	Agar agar	0.7g	7g		

- **Préparation de la solution mère de la macro et microéléments.**

Pour préparer une solution mère de chaque élément des micro-macros éléments, vitamine, hormone et fer on utilise la règle suivante :

$$V (\text{prélevé}) = \frac{V \text{ préparé}}{n}$$

V : volume.

n : facteur de dilution.

Exemple :

n =100.

V préparé= 50ml.

Pour préparer une solution mère de KCl (35mg).

$35 \times 100 = 3500\text{mg} = 3,5\text{g}$ de KCL.

Mettre **3,5g** de KCL dans une fiole et compléter jusqu'à **50ml** par l'eau distillé.

$$V (\text{prélevé}) = \frac{50}{100}$$

$$V (\text{prélevé}) = 0,5 \text{ ml/l}$$

Annexe 2



Figure 37: Serre semi contrôlée.

Annexe 3:

Tableau 5 : Composition du milieu de culture de régénération(1902) modifié par Wang et Chen (1984)

Groupe	Composition	Concentration dans un litre de milieu (mg/l)	Quantité prélevée
Macroéléments	KNO ₃	1000	50ml
	NH ₄ NO ₃	200	
	CaCl ₂ H ₂ O	100	
	MgSO ₄ 7H ₂ O	200	
	KH ₂ PO ₄	40	
Micro éléments	H ₃ BO ₃		5ml
	MnSO ₄ 4H ₂ O	8,4	
	ZnSO ₄ 7H ₂ O	8,6	
	CuSO ₄ 5H ₂ O	6,2	
	CoCl ₂ 6H ₂ O	0,5	
	Na ₂ MoO ₄ 2H ₂ O	0,025	
Fer	FeSO ₄ .7H ₂ O	3.7	10ml
	Na ₂ EDTA.2H ₂ O	2.78	
Vitamines	Nicotinic acid	0.1	1ml
	Pyridoxine HCl	0.5	
	Thiamine HCl	0.5	
Hormones	NAA	0,5	0,5
	KI	1,5	1,5
Sucre		30g	30g
Agent gélifiant	Agar agar	07g	07g
pH : 5,8			

Annexe 4 : Matériels de laboratoire utilisé



Figure 38. Hôte a flux laminaire



Figure 39. Matériel d'ensemencement



Figure 40. Étuve



Figure 41. Stérilisateur à billets

Annexe : 5 Préparation d'alcool 70°.

Pour obtenir l'alcool 70° on dilue l'alcool 96° par la règle trois suivante :

100ml d'alcool 96° \longrightarrow 40,85ml d'eau

250ml d'alcool 96° \longrightarrow X = ?

$$X = \frac{250}{100} * 40,85 = 102,125 \text{ ml d'eau ajout.}$$

Annexe 6 : Préparation d'eau de javel (Hypochlorite de calcium) à 12°.

Dans une éprouvette graduée de 01 litre on a complété par l'eau distillé le contenu de tube de l'eau de javel (250 ml) de 32° jusqu'à 660 ml, après on ajoute 2 à 3 gouttes de tween pour faciliter la pénétration de l'eau de javel à l'intérieur de matériel végétal expérimenté.

Annexe.7 : chambre de culture



Annexe .8 : microscope



Annexe 9 : Analyse statistiques

Tableau 6 : variance de germination

	S.C.E	DDL	C.M.	TEST F	PROBA	E.T.	C.V.
VAR.TOTALE	407,289	89	4,576				
VAR.FACTEUR 1	6,489	2	3,244	1,254	0,29063		
VAR.FACTEUR 2	155,022	2	77,511	29,954	0		
VAR.INTER F1*2	36,178	4	9,044	3,495	0,01108		
VAR.RESIDUELLE 1	209,6	81	2,588			1,609	95,25%

TEST DE NEWMAN-KEULS - SEUIL = 5%

Tableau 7 : facteur milieu
pour la germination

F2	LIBELLES	MOYENNES	GROUPES HOMOGENES		
1.0	M1	3,2	A		
2.0	M2	1,867		B	
3.0	M3	0			C

Tableau 8 : interaction variété –milieu pour la
germination

F1 F2	LIBELLES	MOYENNES	GROUPES HOMOGENES		
3.0 1.0	V3 M1	4,8	A		
1.0 1.0	V1 M1	2,5		B	
2.0 1.0	V2 M1	2,3		B	
2.0 2.0	V2 M2	2,3		B	
1.0 2.0	V1 M2	1,9		B	C
3.0 2.0	V3 M2	1,4		B	C
3.0 3.0	V3 M3	0			C
2.0 3.0	V2 M3	0			C
1.0 3.0	V1 M3	0			C

Tableau 9: variance dunombre total de cals

	S.C.E	DDL	C.M.	TEST F	PROBA	E.T.	C.V.
VAR.TOTALE	622,4	89	6,993				
VAR.FACTEUR 1	1,8	2	0,9	0,229	0,7988		
VAR.FACTEUR 2	214,067	2	107,033	27,195	0		
VAR.INTER F1*2	87,733	4	21,933	5,573	0,00057		
VAR.RESIDUELLE 1	318,8	81	3,936			1,984	35,85%

TEST DE NEWMAN-KEULS - SEUIL = 5%

tableau 10: milieu pour le nombre total de cals

F2	LIBELLES	MOYENNES	GROUPES HOMOGENES	
3.0	M3	7,7	A	
2.0	M2	4,667		B
1.0	M1	4,233		B

Tableau 11 : interaction var-milieu pour le nombre total de cals

F1	F2	LIBELLES	MOYENNES	GROUPES HOMOGENES			
3.0	3.0	V3 M3	8,5	A			
1.0	3.0	V1 M3	7,6	A	B		
2.0	3.0	V2 M3	7	A	B		
2.0	1.0	V2 M1	6		B	C	
3.0	2.0	V3 M2	5,8		B	C	
1.0	2.0	V1 M2	4,3			C	D
1.0	1.0	V1 M1	4,1			C	D
2.0	2.0	V2 M2	3,9			C	D
3.0	1.0	V3 M1	2,6				D

Tableau 12: variance de cals non régénéré

	S.C.E	DDL	C.M.	TEST F	PROBA	E.T.	C.V.
VAR.TOTALE	552,4	89	6,207				
VAR.FACTEUR 1	101,667	2	50,833	14,247	0,00001		
VAR.FACTEUR 2	97,067	2	48,533	13,603	0,00001		
VAR.INTER F1*2	64,667	4	16,167	4,531	0,00247		
VAR.RESIDUELLE 1	289	81	3,568			1,889	53,46%

TEST DE NEWMAN-KEULS - SEUIL = 5%

Tableau 13: variété pour le nombre total de calcs

F1	LIBELLES	MOYENNES	GROUPES HOMOGENES	
1.0	V1	4,367	A	
2.0	V2	4,2	A	
3.0	V3	2,033		B

Tableau 14 : milieu pour le nombre total de calcs

F2	LIBELLES	MOYENNES	GROUPES HOMOGENES	
3.0	M3	5	A	
2.0	M2	2,867		B
1.0	M1	2,733		B

Tableau 15: interaction var-milieu pour le nombre total de calcs

F1 F2	LIBELLES	MOYENNES	GROUPES HOMOGENES			
1.0 3.0	V1 M3	6,9	A			
2.0 1.0	V2 M1	4,9		B		
2.0 3.0	V2 M3	4,4		B		
3.0 3.0	V3 M3	3,7		B	C	
1.0 2.0	V1 M2	3,7		B	C	
2.0 2.0	V2 M2	3,3		B	C	
1.0 1.0	V1 M1	2,5		B	C	D
3.0 2.0	V3 M2	1,6			C	D
3.0 1.0	V3 M1	0,8				D

Tableau 16 : variance de régénération

	S.C.E	DDL	C.M.	TEST F	PROBA	E.T.	C.V.
VAR.TOTALE	332	89	3,73				
VAR.FACTEUR 1	118,467	2	59,233	35,435	0		
VAR.FACTEUR 2	23,4	2	11,7	6,999	0,00171		
VAR.INTER F1*2	54,733	4	13,683	8,186	0,00002		
VAR.RESIDUELLE 1	135,4	81	1,672			1,293	64,65%

TEST DE NEWMAN-KEULS - SEUIL = 5%

Tableau 17 : variété pour la regeneration

F1	LIBELLES	MOYENNES	GROUPES HOMOGENES	
3.0	V3	3,6	A	
2.0	V2	1,433		B
1.0	V1	0,967		B

Tableau 18 : milieu pour la regeneration

F2	LIBELLES	MOYENNES	GROUPES HOMOGENES	
3.0	M3	2,7	A	
2.0	M2	1,8		B
1.0	M1	1,5		B

Tableau 19 : interaction var-milieu pour la regeneration

F1 F2	LIBELLES	MOYENNES	GROUPES HOMOGENES		
3.0 3.0	V3 M3	4,8	A		
3.0 2.0	V3 M2	4,2	A		
2.0 3.0	V2 M3	2,6		B	
3.0 1.0	V3 M1	1,8		B	C
1.0 1.0	V1 M1	1,6		B	C
2.0 1.0	V2 M1	1,1		B	C
1.0 3.0	V1 M3	0,7			C
2.0 2.0	V2 M2	0,6			C
1.0 2.0	V1 M2	0,6			C

Résumé

Dans le but d'améliorer la capacité embryogène et le pouvoir de régénération des cals obtenus par culture d'embryons immatures qui dérivent de cultivars de Blé tendre à faible aptitude à la culture *in vitro*, de milieu de MS 1/2 à différentes concentrations de 2.4D, ont été testés. trois paramètres ont été pris en considération pour évaluer une éventuelle amélioration à la culture *in vitro*: les pourcentages de callogénèse, de germination zygotique, et de régénération. Les résultats obtenus montrent que le milieu MS 1/2 additionnés de 2.4D à des concentrations forte (2ml/L), diminuent le pourcentage de germination zygotique et améliorent le taux de cals embryogènes.

La concentration de (10ml/l) de 2.4D bloquent la germination zygotique et améliore fortement la callogénèse, la régénération et le nombre moyen de plantules/cals régénérant. Une interaction entre les génotypes et les milieux de culture testés est également enregistrée.

Mots clés : blé tendre (*Triticumaestivum*), embryons immatures, 2.4D (L'acide 2,4-dichlorophénoxyacétique), callogénèse, germination.

ABSTRACT

In order to improve the capacity and embryogenic callus regenerative power obtained by immature embryo culture derived varieties Wheat low capacity for *in vitro* culture, 1/2 MS media has different concentrations of 2.4D, were tested. Three parameters were taken into account in assessing any improvement to *in vitro* culture of callus percentages of zygotic germination and regeneration. The results obtained show that the 1/2 MS media supplemented with 2.4D at high concentrations (2ml / L), decrease the percentage of zygotic seed and improve the rate of embryogenic callus.

The concentrations (10 ml / l) of 2.4D block zygotic germination and significantly improve the callus, regeneration and the average number of seedlings / cal regenerating. An interaction between genotypes and tested culture media is also recorded.

Keywords:

Wheat (*Triticumaestivum*), immature embryos, 2.4D (2,4dichlorophenoxyacetic acid), callogenesis, germination