



REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de
La Recherche Scientifique
Université Mouloud MAMMERY de Tizi-Ouzou
Faculté des sciences Biologiques et des sciences Agronomiques
Département de Biologie



Mémoire

De fin d'études

En Vue de l'Obtention du
Diplôme de MASTER en biologie
Option : Génétique et amélioration des plantes

Thème :

Culture in vitro et cytogénétique de l'olivier
Olea europea L. chez la variété Chemlal.

Présenté par :

M^{elle} SOUDANI Selma.

Dirigé par Le professeur :

YAKOUB-BOUGDAL. S

CO-promoteur : BAIK. N

Devant le Jury :

Président : M^{me} BOUDIAF. M

M.C.A (UMMTO)

Examinatrice : M^{me} HAMIDOUCHE. Z

M.C.A (UMMTO)

Examinatrice : M^{elle} MOHAMED OUALI.D

M.A.A (UMMTO)

Année : 2015/2016.

Remerciements

Je tiens à remercier Dieu tout puissant qui m'a accordé la patience, la volonté et la force pour mettre au point ce modeste travail.

Je remercie le Professeur Yakoub-Bougdal S pour m'avoir confié son Laboratoire de Culture in-vitro (CIV), pour son initiation à la CIV en conditions stériles et de m'avoir laissé une grande liberté d'action tout en étant toujours présente pour les discussions, les corrections ainsi que la vérification du bon déroulement du travail. Pour cela, je tiens à lui exprimer ma reconnaissance.

Je tiens à exprimer vivement ma reconnaissance ainsi que mes remerciements à M^r Baïk.N doctorant à l'Université Houari Boumediene d'Alger pour son initiation à la cytogénétique, pour tout le soutien qu'il m'a apporté le long de ce parcours, pour les efforts qu'il a fournis afin d'enrichir mon travail, pour sa présence et son déplacement d'Alger pour assurer le bon déroulement de ma partie cytogénétique.

Je remercie également les membres du jury d'avoir trouvé le temps de lire attentivement mon travail et de m'avoir honoré de leur présence durant ma soutenance : La présidente M^{me} Boudiaf M. Maître de conférences de classe A à l'Université Mouloud Mammeri de Tizi-Ouzou, les examinatrices : M^{me} Hamidouche Z. Maître de conférences de classe A à l'Université Mouloud Mammeri de Tizi-Ouzou et M^{elle} Mohamed Ouali D. Maître assistante de classe A à l'Université Mouloud Mammeri de Tizi-Ouzou.

Mes remerciements vont aussi à l'ingénieur de Laboratoire M^{elle} Abrous pour son encouragement durant les moments difficiles, à M^{elle} Touati pour ce qu'elle m'a appris en CIV, ainsi qu'à M^r Ferraguig pour ses conseils et son encouragement.

Une mention spéciale à ma famille et mes amis qui ont fait preuve de beaucoup d'écoute et de disponibilité, participant aussi à rendre ce mémoire plus pertinent.

Dédicaces

C'est avec profonde gratitude et sincère mots que je dédie ce modeste travail de fin d'études,

A ceux qui ont sacrifié leur vie pour illuminer la mienne.

A ma source de tendresse, de noblesse et d'affection.

A vous mes chères parents, que Dieu vous prête bonheur et longue vie.

A mon frère Anis, mes sœurs Aya et Nada, avec mes souhaits de bonheur de santé et de succès.

A tous les membres de ma famille.

A mes professeurs qui m'ont aidé durant tout mon cursus.

A mes amis de la Promotion Génétique et amélioration des plantes.

A tous ceux qui ont contribué de près et de loin à l'élaboration de cet humble travail.

Liste des figures

Figure 1 : Répartition de l'olivier dans le monde	3
Figure 2 : Répartition géographique des variétés d'oliviers de l'Afrique du nord.....	4
Figure 3 : Taxonomie du genre <i>Olea</i> (Oleaceae).....	5
Figure 4 : Les principales parties de l'Olivier <i>Olea europea</i> L. adulte.....	6
Figure 5 : Développement du système racinaire de l'olivier	7
Figure 6 : Fleur d'olivier ouverte	9
Figure 7 : Coupe schématique du fruit (drupe)	10
Figure 8 : Cycle végétatif annuel de l'olivier.....	11
Figure 9 : Chromosome métaphasique.....	16
Figure 10 : Présentation schématique des différents types de chromosome	17
Figure 11 : Les différentes phases de la méiose.....	19
Figure 12: Olives avant la récolte.....	20
Figure 13: Olives récoltées en Décembre 2015	20
Figure 14: <i>Olea europea</i> L. var. Chemlal	21
Figure 15: Stérilisation du matériel dans une étuve à 127°C	22
Figure 16: Stérilisation du matériel végétal sous une hotte à flux laminaire horizontal.....	22
Figure 17: Graines mises à imbiber dans une chambre de culture thermostatée	23
Figure 18 : Hotte à flux laminaire horizontale préalablement nettoyée.....	25
Figure 19 : Réalisation de la double incision en conditions stériles	25
Figure 20: Embryon d' <i>Olea europea</i> ensemencé sur le milieu de culture MS ₁₀ (1962).....	26
Figure 21: Extraction de la plantule ensemencée sur le milieu MS ₁₀	26
Figure 22: Plantules présentant des racines de différentes tailles	27
Figure 25: Boutons floraux de petite taille.....	28

Figure 26: Boutons floraux de grande taille.....	28
Figure 27: Représentation graphique de pourcentage de germination, de contamination et de nécrose des embryons d'olivier variété Chemlal, ensemencés sur le milieu MS ₁₀	32
Figure 28: Développement des embryons d'olivier <i>Olea europea</i> (Var. Chemlal), sur le milieu MS ₁₀ (Laboratoire CIV, Université Mouloud Mammeri, Tizi-Ouzou, 2016).....	33
Figure 29: Plantules dépassant huit jours de culture sur MS ₁₀	34
Figure 30: Explants éliminés de l'expérimentation.....	34
Figure 31: Micrographies de quelques cellules en division	35
Figure 32: Dessin de la plaque métaphasique	36
Figure 33: Micrographies de quelques cellules mères de grain de pollen (CMP) en division.....	39

Liste des tableaux

Tableau 1 : Composition du milieu Muraschige et Skoog (MS) (1962) en macroéléments, microéléments et en vitamines	24
Tableau 2 : Les paires chromosomiques et les chromosomes homologues du cytotype diploïde ($2n=2X=46$) de l'olivier (<i>Olea europaea</i> L.) var. Chemlal	37
Tableau 3 : Nombre chromosomique ($2n$), niveau de ploïdie, formule caryotypique, indices d'asymétrie intrachromosomiques (A1, CVci) et interchromosomique (A2, CVcl) de l'olivier (<i>Olea europaea</i> L.) var. Chemlal	38

Liste des abréviations

CIV : Culture in-vitro.

MS : Murashige et Skoog.

UV : Ultras violet.

m : Métacentrique.

sm : Submétacentrique.

t : Télécentrique.

st : Subtélécentrique.

CMP : cellule mère du grain de pollen.

II.a : Bivalents en anneau.

Pchr : pont de chromatine.

Ex : Exine.

In : intine.

Sommaire

Remerciements	
Dédicaces	
Liste des figures	
Liste des tableaux	
Liste des abréviations	
Introduction	1

Chapitre I. Généralités

1. Origine et expansion de la culture de l'olivier	3
2. Air de répartition de l'olivier	3
2.1. Dans le monde	3
2.2. En Algérie	4
3. Caractéristiques	4
3.1. Caractéristiques botaniques	4
3.1.1. Systématique	5
3.2. Caractéristiques morphologiques	6
3.2.1. Description générale de l'arbre	6
3.2.2. Système racinaire	7
3.2.3. Système aérien.....	8
3.2.3.1. Tronc	8
3.2.3.2. Branches	8
3.2.3.3. Rameaux.....	8
3.2.3.4. Feuilles	8
3.2.3.5. Inflorescences et fleur	8
3.2.3.6. Fruit	9
4. Caractéristiques physiologiques	10
4.1. Cycle végétatif annuel de l'olivier	10

4.1.1. Repos hivernal.....	10
4.1.2. Floraison.....	10
4.1.3. Pollinisation.....	10
4.1.4. Nouaison et grossissement du fruit	11
4.1.5. Maturation et maturité.....	11
5. Culture in vitro (CIV).....	12
5.1. Définition	12
5.2. Historique	12
5.3. Avantages de la culture in-vitro	12
5.4. Inconvénients de la culture in-vitro.....	13
5.5. Techniques de réalisation de la culture in-vitro	13
5.5.1. Conditions d'asepsie	13
5.5.2. Milieu de culture	13
5.5.2.1. Sels minéraux	13
5.5.2.1.1. Macroéléments	14
5.5.2.1.2. Microéléments	14
5.5.2.2. Substances organiques.....	14
5.5.2.2.1. Source du carbone	14
5.5.2.2.2. Vitamines	14
5.5.2.2.3. Acides aminés	14
6. Cytogénétique.....	15
6.1. Mitose et nombre chromosomique chez les plantes.....	15
6.1.1. Différentes phases de la mitose	15
6.1.1.1. Prophase	15
6.1.1.2. Métaphase.....	15
6.1.1.3. Anaphase	15
6.1.1.4. Télophase	15

6.1.2. Morphologie et structure du chromosome métaphasique.....	16
6.1.3. Variation du nombre des chromosomes chez les plantes	17
6.2. Meïose et appariement chromosomique.....	17
6.2.1. Meïose I (division réductionnelle)	17
6.2.1.1. Prophase I.....	17
6.2.1.1.1. Leptotène	18
6.2.1.1.2. Zygotène.....	18
6.2.1.1.3. Pachytène	18
6.2.1.1.4. Diplotène	18
6.2.1.1.5. Stade diacinèse	18
6.2.1.2. Métaphase I	18
6.2.1.3. Anaphase I.....	18
6.2.1.4. Télophase I.....	19
6.2.2. Meïose II (division équationnelle)	19

Chapitre II. Matériel et méthodes

Partie I. Culture in-vitro	20
1. Matériel végétal.....	20
2. Matériel de laboratoire	21
3. Protocole expérimental.....	21
4. Technique expérimentale	22
4.1. Condition d'asepsie totale	22
4.2. Imbibition du matériel végétal	23
4.3. Préparation du milieu de culture	23
4.4. Ensemencement des embryons.....	24
4.5. Les racines obtenues par culture in-vitro.....	26
Partie II. Cytogénétique.....	28

1. Matériel végétal.....	28
1.1. Les boutons floraux.....	28
1.2. Les racines obtenues par culture in-vitro	28
2. Matériel de laboratoire	28
3. Protocole expérimental.....	28
3.1. Etude de la méiose.....	29
3.2. Etude de la mitose	29
4. Technique expérimentale	29
4.1. Traitement	29
4.2. Fixation.....	29
4.3. Stockage	30
4.4. Hydrolyse	30
4.5. Coloration.....	30
5. Montage et observation.....	31

Chapitre III. Résultats et discussion

1. Influence du milieu de base MS ₁₀ sur la germination des embryons de l'olivier <i>Olea europea</i> L.	32
2. Etude cytogénétique	35
2.1. Etude de la Mitose	35
2.1.1 Dénombrement chromosomique	35
2.1.2 Etude des caryotypes et établissement des idiogrammes	35
2.1.3 Etudes de l'asymétrie des chromosomes.....	38
2.2 Etude des meioses polliniques.....	38
3. Discussion	40
Conclusion.....	42

Références bibliographiques

Résumé

Introduction

Introduction

L'olivier symbole de paix et de pérennité grâce à une longévité hors du commun, il fait partie de la vie des civilisations méditerranéennes depuis très longtemps. Il a toujours répondu à de nombreux besoins essentiels du quotidien avec notamment l'huile produite à partir de son fruit qui est l'une des huiles les plus prisées en raison de ses qualités nutritives, cosmétiques et thérapeutiques. Il est considéré donc comme étant une plante aromatique et médicinale, réservoir de composés naturels aux effets bénéfiques.

En Algérie l'olivier constitue la principale espèce fruitière plantée, et plus particulièrement en Kabylie où se concentrent les deux tiers du verger oléicole national.

Malheureusement, la branche oléicole algérienne ne cesse de se dégrader et cela est dû aux vergers caractérisés par une grande hétérogénéité ainsi qu'à la production faible et irrégulière qui est liée au vieillissement des oliviers (40% d'olivier, dans les vergers nationaux ne produisent plus), ainsi que les pertes dues aux incendies et aux multiples maladies qui l'atteignent (Trad et al., 2008).

Pour faire face à ces problèmes, l'Algérie a été attirée par l'application des biotechnologies afin de moderniser le système de recherche agronomique.

Dans ce cadre il est intéressant d'étudier la multiplication in-vitro de l'espèce végétale *Olea europaea* L.) var. Chemlal afin de résoudre les problèmes rencontrés avec les méthodes de multiplication classiques.

La cytogénétique fait le lien entre la cytologie et la génétique. Elle regroupe un ensemble de méthodes de laboratoire permettant d'affiner l'étude de la taille, de la forme et du nombre des chromosomes en mitose et en méiose dans les populations naturelles et expérimentales (Jahier et al., 1992).

Les études cytogénétiques sur l'olivier sont peu nombreuses. Les premières investigations par les énumérations chromosomiques, sur toutes les espèces du genre *Olea* : *O. europaea* (ssp. *europaea* et ssp. *cuspidata*), *O. capensis*, *O. paniculata*, *O. dioica* et *O. salicifolia*, ont révélé un nombre chromosomique diploïde de $2n=2x=46$ (Green et Wickens., 1989). Suite aux études du génome par la cytométrie en flux et les marqueurs moléculaires (SSR) du complexe d'olivier (*Olea europaea*), (Besnard et al., 2008), ont pu mettre en évidence des nouveaux nombres chromosomiques polyploïdes de $2n=4x=92$ (tétraploïde) et $2n=6x=115$ (hexaploïde) chez les deux sous espèces *cerasiformi* et *maroccana* respectivement.

L'objectif principal de notre travail est d'évaluer la diversité génétique par une approche cytogénétique basée sur l'étude du nombre chromosomique, l'établissement des caryotypes et leurs caryogrammes correspondants, l'étude des comportements des chromosomes dans les méioses polliniques de cette variété locale de l'olivier, (*Olea europaea* L.) var. Chemlal échantillonnée dans la région de la Kabylie. Afin de connaître, la structure génétique, améliorer la gestion et la conservation des ressources génétiques de cette espèce en Algérie.

Outre que l'introduction et la conclusion, le manuscrit est structuré en trois parties :

Dans la première partie, nous décrirons cette espèce et exposerons quelques notions sur la culture in-vitro (CIV) et la cytogénétique.

Dans une deuxième partie, nous présenterons le matériel végétal utilisé et les méthodes expérimentales appliquées.

Une troisième partie, est consacrée aux résultats de régénération des embryons par culture in-vitro, l'étude caryologique appréhendée par des dénombrements chromosomiques, par la réalisation des caryotypes et des caryogrammes (idiogrammes) ainsi que les appariements chromosomiques au cours de la méiose pollinique.

Chapitre I :

Généralités

1. Origine et expansion de la culture de l'olivier

L'olivier a une origine très ancienne. Son apparition et sa culture remonteraient à la préhistoire ; mais nous ne pouvons déterminer avec certitude la voie de son expansion, progressive et intermittente au cours du temps (Loussert et Brousse, 1978).

La culture de l'olivier a parait-il commencé vers 4800 Av.J en Chypre (Loukas et Rimbas in Ennajeh, 2008).L'origine de l'espèce n'est pas bien établie, toutefois on suppose qu'elle soit de l'Asie mineure ; ensuite elle a diffusé vers l'Afrique du Nord, la péninsule Ibérienne et le reste de l'Europe (Denney et Eachern in Ennajeh, 2008).

DE CANDOLLE pense que la plante est originaire de Syrie, c'est la thèse la plus fréquemment retenue. De là l'expansion de la culture oléicole se fit d'Est en Ouest et se répandit dans tout le Bassin Circum-Méditerranéen (Loussert et Brousse, 1978).

2. Air de répartition de l'olivier

2.1. Dans le monde

La culture de l'olivier est répartie sur les cinq continents occupant une surface totale d'environ 10 Millions d'hectares. Mais elle reste surtout prédominante dans la zone Méditerranéenne où on trouve 95% des 900Millions d'oliviers cultivés dans le monde (Fig.1) (Simantirakis in Ennajeh, 2008).

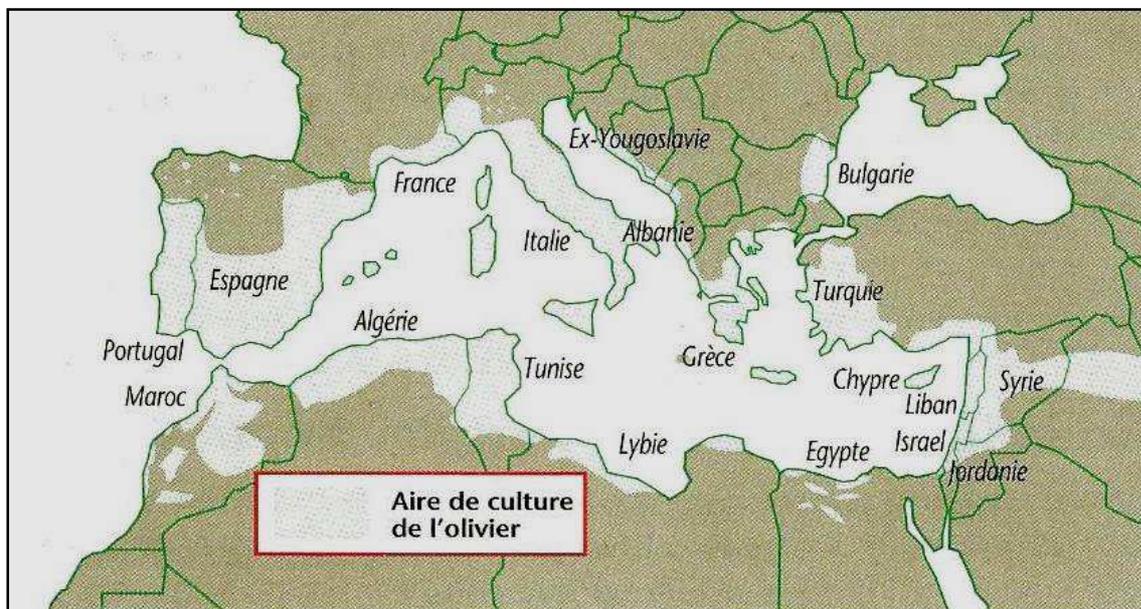


Figure 1 : Répartition de l'olivier dans le monde (Argenson et *al.*, 1999).

2.2. En Algérie

La surface oléicole en Algérie atteint les 310 000 ha, auxquels il faut rajouter 110 000 ha qui sont entrés en production à partir de 2008 (Bensemmane, 2009).

L'oliveraie algérienne se répartit sur trois régions l'Est, l'Ouest et le Centre qui est la région la plus importante à l'échelle nationale du fait qu'elle s'étale sur une superficie d'environ 110 200 ha (Fig.2), répartie entre les wilayas dont on trouve plusieurs variétés citant la variété Azeradj, Limli, Bouchouk, Sigoise et la variété Chemlal. Cette dernière est essentiellement cultivée en Grande Kabylie et représente environ 40% des oliviers cultivés en Algérie (Loussert et Brousse, 1978).

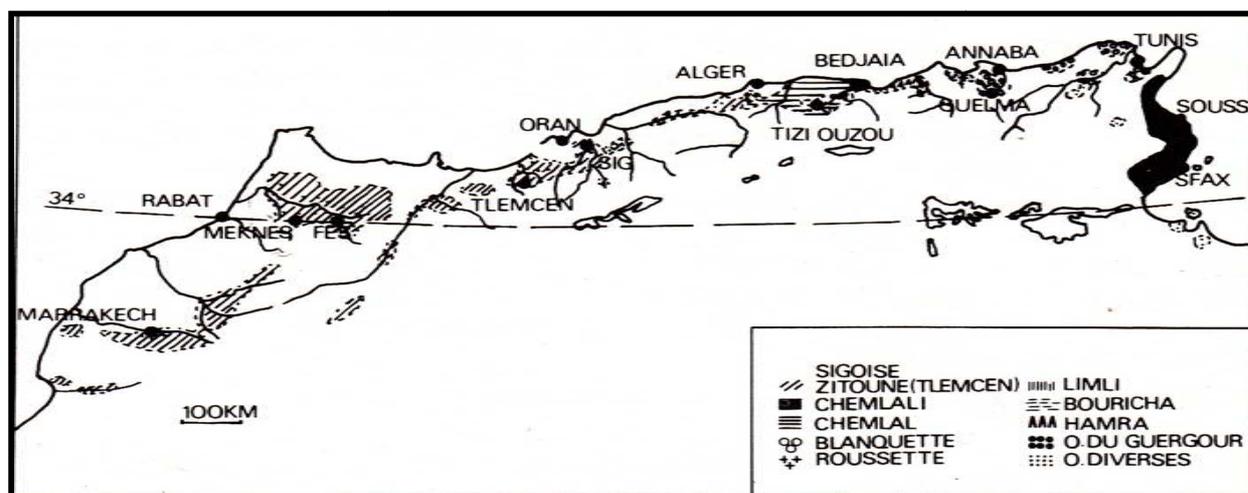


Figure 2 : Répartition géographique des variétés d'oliviers de l'Afrique du nord (Loussert et Brousse, 1978).

3. Caractéristiques

3.1. Caractéristiques botaniques

L'olivier appartient à la famille des Oléacées (Argenson et *al.*, 1999).

L'espèce *Olea* a longtemps été subdivisée en deux sous-espèces :

- *Olea europaea* L. subsp. *europaea* ou olivier cultivé, constitué par un grand nombre de variétés améliorées, multipliées par bouturage ou par greffage.
- *Olea europaea* L. subsp. *oleaster* (Hoffm. et Link.) Fiori, qui est parfois classé comme une variété botanique de l'espèce *Olea europaea* L. var. *sylvestris* Mill. ou comme une espèce à part entière *Olea oleaster* (Hoffm. et Link.).

Un plan général de la classification systématique des Oléacées est reproduit sur la figure 3.

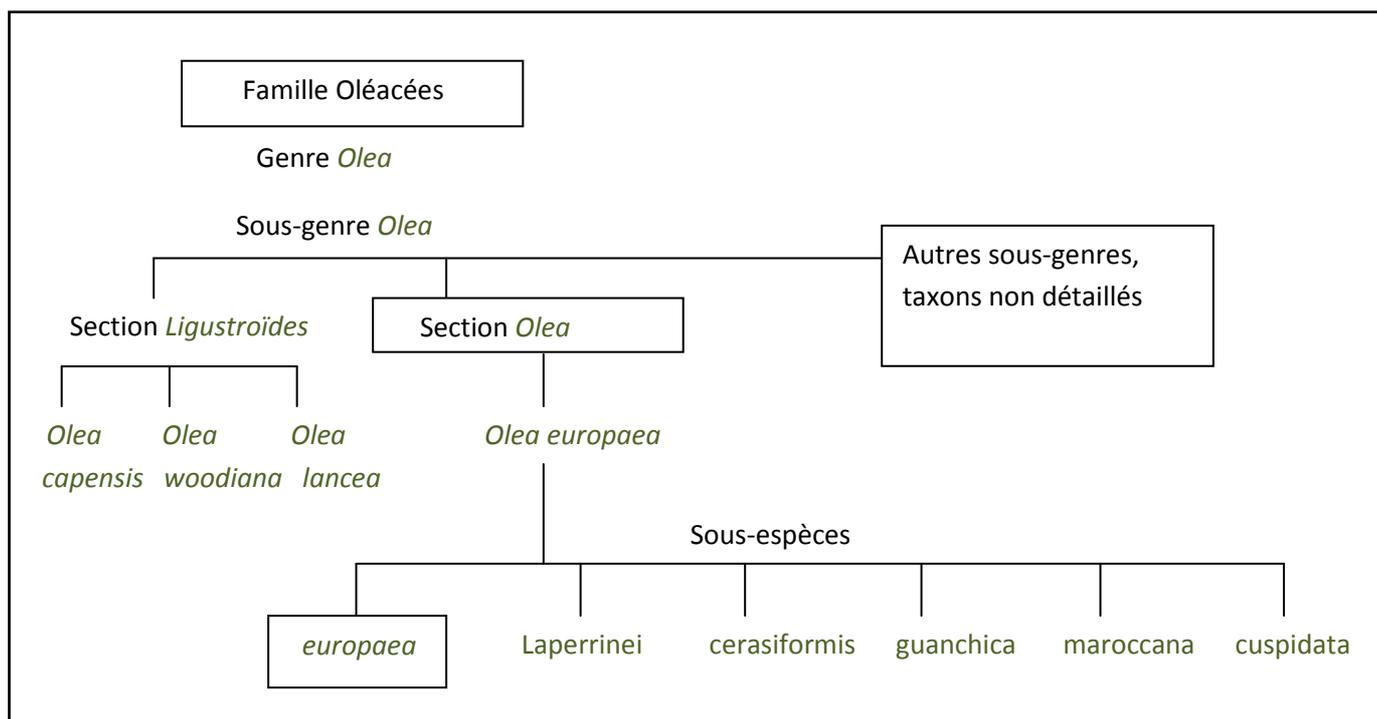


Figure 3 : Taxonomie du genre *Olea* (Oleaceae) (Breton et *al.*, 2006).

3.1.1. Systématique

D'après la systématique APG, la hiérarchie taxonomique de l'olivier est la suivante :

Embranchement	: Spermaphytes.
Sous-embranchement	: Angiospermes.
Classe	: Dicotylédones.
Sous-classe	: Asteridae.
Ordre	: Lamiales.
Famille	: Oleacées.
Genre	: <i>Olea</i> .
Espèce	: <i>Olea europaea</i> .
Série	: Sativa.

3.2. Caractéristiques morphologiques

3.2.1. Description générale de l'arbre

L'olivier est un arbre à feuillage persistant dont les dimensions et la forme varient avec les conditions climatiques, la hauteur peut atteindre 12 à 15m (Argenson et *al.*, 1999).

C'est un arbre très résistant, qui continue à pousser et à produire des olives même avec un tronc creux et complètement déformé par l'âge (Polese, 2009).

Si le tronc disparaît par vieillissement, les rejets se développant à sa base assureront sa pérennité et redonneront un nouvel arbre (Loussert et Brousse, 1978).

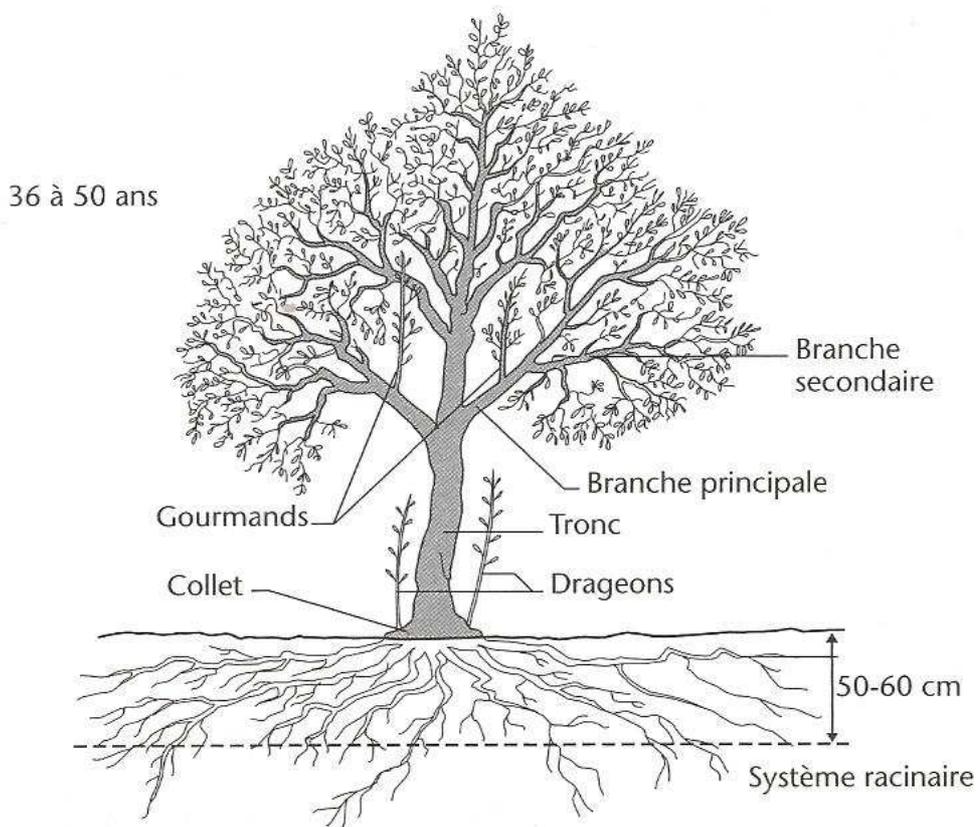
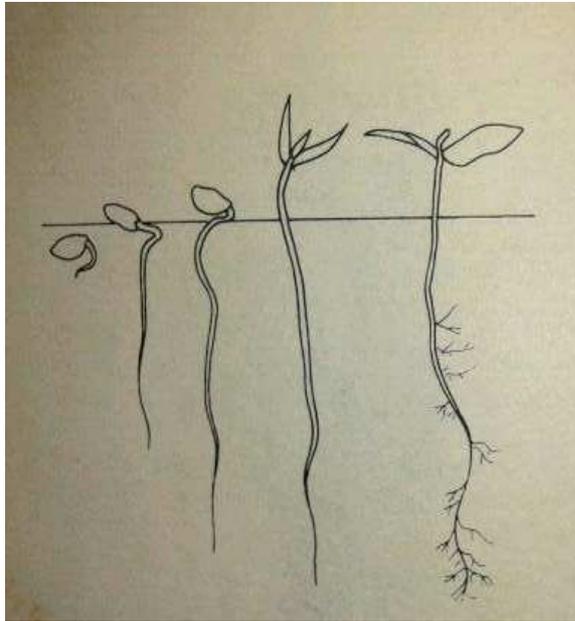


Figure 4 : Les principales parties de l'Olivier *Olea europea* L. adulte (Argenson et *al.*, 1999).

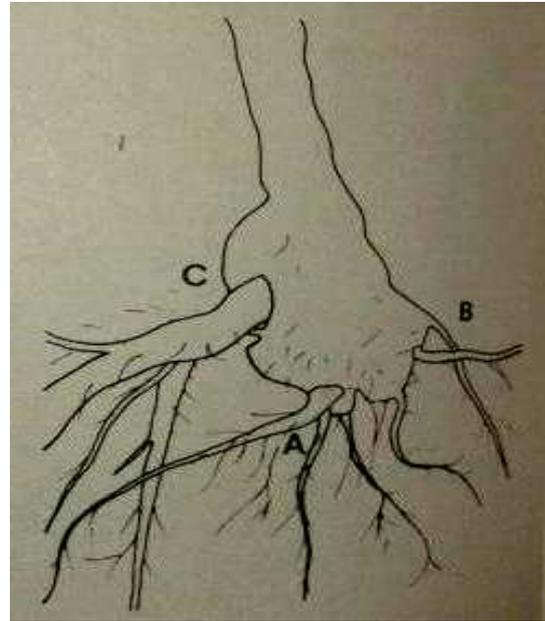
3.2.2. Système racinaire

Le développement du système racinaire de l'arbre est surtout fonction des caractéristiques physico-chimiques du sol. En fait, l'olivier adaptera son système racinaire à la profondeur du sol, suivant sa texture et sa structure (Loussert et Brousse, 1978).

Les jeunes plants issus de boutures présentent un système racinaire très développé avec trois ou quatre racines dominantes, pourvues d'un important chevelu (Fig.5) (Argenson et *al.*, 1999).



(1)



(2)

Figure 5 : Développement du système racinaire de l'olivier (Loussert et Brousse, 1987).

1) Germination du noyau d'olivier.

2) Evolution du système racinaire d'un olivier de semis :

A- Système racinaire à la plantation.

B- Système racinaire secondaire.

C- Nouvelle racine émise à partir des excroissances du collet (souchet)

3.2.3. Système aérien

3.2.3.1. Tronc

Le tronc des jeunes arbres est droit et circulaire. Avec le vieillissement, il se forme en donnant naissance à des cordes. La hauteur du tronc varie d'une zone de culture à une autre (Argenson et *al.*, 1999). Il peut atteindre 3 à 5 mètres de hauteur et même 12 mètres et plus s'il est laissé à l'état sauvage (Boyer, 2000).

3.2.3.2. Branches

Ce sont de grosses ramifications destinées à former la charpente de l'arbre dont on distingue deux types :

- **Les branches mères** ou également appelées **charpentières maîtresses** qui prennent naissance sur le tronc.
- **Les branches sous-mères** ou **sous-charpentières** se développent sur les charpentières en portant les rameaux feuillés et les rameaux fructifères (Loussert et Brousse, 1978).

3.2.3.3. Rameaux

Les rameaux sont des pousses feuillées de longueur de quelques dizaines de centimètres suivant la vigueur de l'arbre et de la variété. Ils sont délimités à leur base par un entre-nœud très court (Loussert et Brousse, 1978).

3.2.3.4. Feuilles

Les feuilles sont dites « opposées ». Leur pétiole est court. Elles sont étroites, allongées, enroulées sur les bords, coriaces. Elles mesurent 3 à 8 cm selon la variété. La face supérieure, vert foncé ou vert-gris luisant, est recouverte d'une épaisse cuticule ; la face inférieure, de couleur argentée, est couverte d'un duvet de petits poils qui peuvent retenir la plus infime quantité d'humidité. Elles restent en place environ 3 ans et se renouvellent donc par tiers tous les ans (Polese, 2009).

3.2.3.5. Inflorescences et fleurs

L'olivier produit deux sortes de fleurs, une parfaite qui contient les deux sexes male et femelle et une staminée (Bernie et *al.*, 2006).

Les inflorescences sont de type grappes longues et flexueuses, pouvant comporter de 4 à 6 ramifications secondaires (Loussert et Brousse, 1978). Les fleurs sont blanches, toutes petites rassemblées en grappes (Anginot et Isler, 2003) à l'aisselle des feuilles (Polese, 2009). Elles sont régulières, généralement hermaphrodites, avec une formule florale très simple,

4 sépales + 4 pétales + 2 étamines + 2 carpelles (Fig.6) (Loussert et Brousse, 1978).



Figure 6 : Fleur d'olivier ouverte (Soudani, 2016. Serre de M^{me} Yakoub-Bougdal, Complexe Biomédical, Université Mouloud Mammeri, Tizi-Ouzou, 2016).

A : Anthères.

B : Pétale.

C : Fleur.

3.2.3.6. Fruit

Le fruit est une drupe charnue, ellipsoïde, à noyau. Sa forme est très variable suivant les variétés. L'olive est généralement allongée et ovale, son diamètre est compris entre 1 et 3 cm (Argenson *et al.*, 1999).

L'épicarpe reste très attaché au mésocarpe (pulpe). A maturation, il passe de la couleur vert tendre, à la couleur violette ou rouge puis à la coloration noirâtre (Loussert et Brousse, 1978). La coloration se fait de l'extérieur vers l'intérieur du fruit (Anginot et Isler, 2003).

L'endocarpe (noyau) fusiforme est très dur portant une série de sillons longitudinaux. Il se divise en deux loges inégales et ne renferme qu'une seule graine à albumen : l'amandon (Argenson *et al.*, 1999).

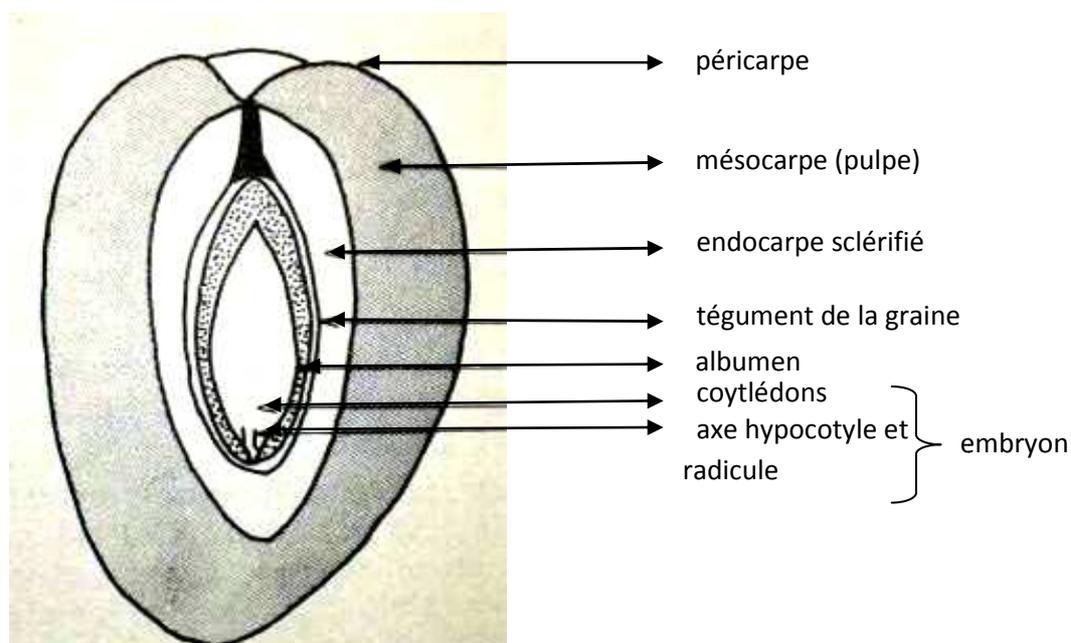


Figure 7 : Coupe schématique du fruit (drupe) (Loussert et Brousse, 1978).

4. Caractéristiques physiologiques

4.1. Cycle végétatif annuel de l'olivier

Le cycle annuel de développement est en étroite relation avec les conditions climatiques de l'année et de la région

4.1.1. Repos hivernal

C'est une période de ralentissement de l'activité végétative, qui s'étale de novembre à février (Loussert et Brousse, 1978). Les premiers travaux de HARTMANN (1953) in LOUSSERT et BROUSSE (1978), ont mis en évidence l'action des basses températures. En effet, la floraison et la fructification sont directement proportionnelles à la quantité de froids hivernaux enregistrés (Fig 8-A).

4.1.2. Floraison

La floraison est l'épanouissement complet de la fleur. Elle se déroule en Mai-Juin, chez l'olivier lorsque les conditions de température et d'humidité sont favorables (Argenson et *al.*, 1999). (Fig 8- B,C).

4.1.3. Pollinisation

Pour une bonne fécondation des fleurs, la distance de dispersion du pollen doit être voisine de 150 à 200 m pour une durée de vie de quelques jours (Argenson et *al.*, 1999).

4.1.4. Nouaison et grossissement du fruit

Après la fécondation, l'ovaire se développe et grossit, on dit que le fruit est noué. La nouaison des olives dépend des conditions climatiques. Le taux de nouaison stable est atteint 6 à 7 semaines après la pleine floraison (Argenson et *al.*, 1999) (Fig 8- D, E, F).

4.1.5. Maturation et maturité

Chez l'olive on considère en général deux phases ou deux types de maturations : la maturation verte, caractérisée par une diminution des chlorophylles, et la maturation noire par l'apparition des anthocyanes (Argenson et *al.*, 1999).

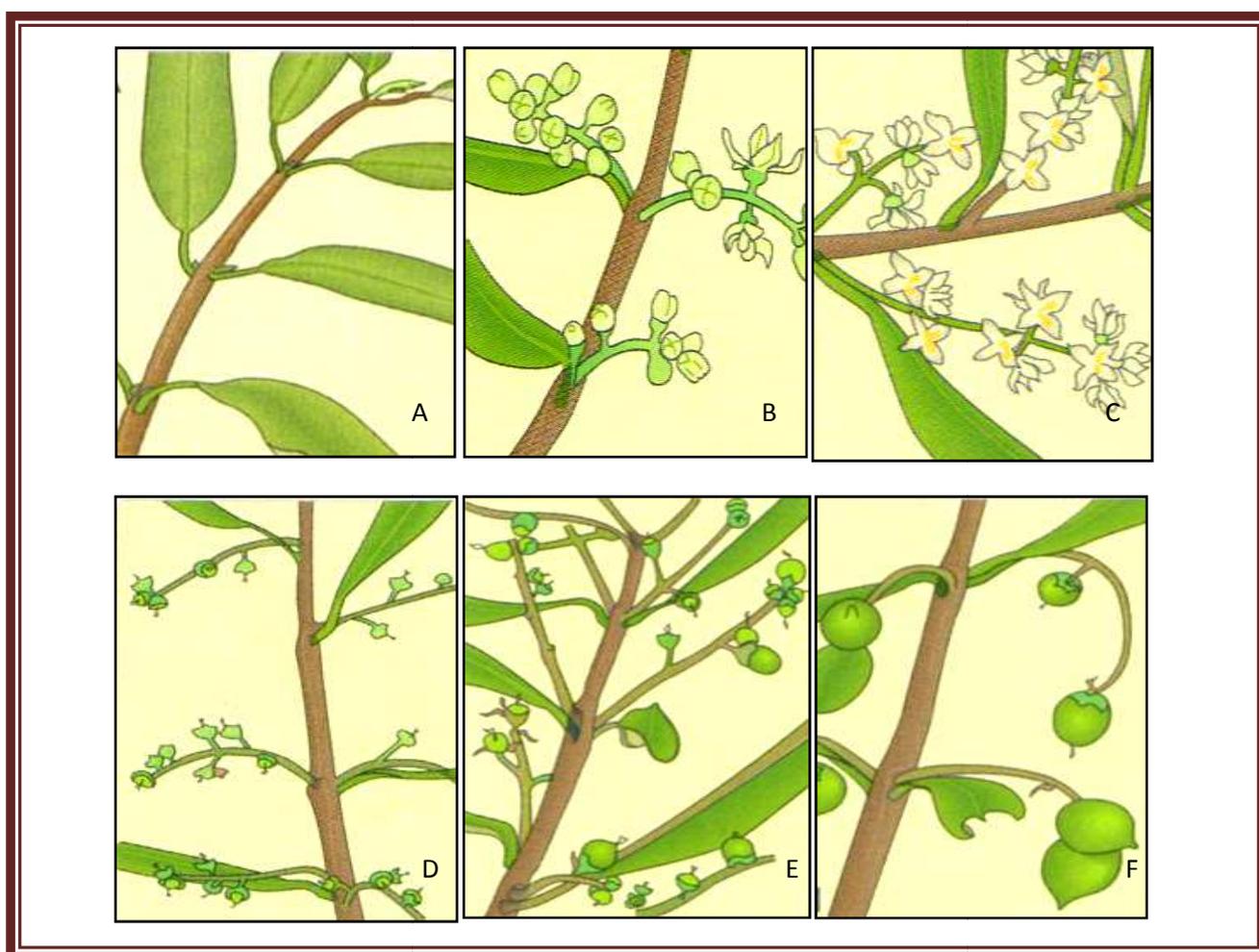


Figure 8 : Cycle végétatif annuel de l'olivier (Argenson et *al.*, 1999).

5. Culture in vitro (CIV)

5.1. Définition

La culture in vitro ou micropropagation de plantes sont des cultures d'explants de plantes, de cellules sur un milieu nutritif artificiel, en conditions stériles, dans un environnement contrôlé et dans un espace réduit. C'est donc une méthode pour maintenir et cultiver indéfiniment des plantes sur des milieux nutritifs artificiels (Zryd, 1988). Les techniques de culture in vitro doivent toutes leur extension au premier principe de la propagation des végétaux : la totipotence, dont les cellules indifférenciées sont capables de se développer en plante entière. Concept énoncé par HABERLAND en 1902, est à l'origine même du fondement de la culture in vitro (Auge et *al.*, 1989).

5.2. Historique

Les premières tentatives pour maintenir en survie des organes vivants isolés datent de plus de 130 ans (Auge, 1989). La multiplication in vitro est basée sur le concept de totipotence cellulaire ; Ce concept énoncé au début de ce siècle (1902) mentionne l'autonomie de la cellule végétale et sa propriété à produire une plante entière. Elle possède toute l'information génétique nécessaire à régénérer une plante entière sous les conditions favorables à son développement. Cette hypothèse énoncée dès 1902 par HABERLAND, ne sera démontrée qu'en 1950 par STEWARD et son équipe, lorsqu'ils obtiendront les premiers « embryons artificiels » ou embryons somatiques à partir de cellules de carottes qui évolueront par la suite en jeunes plantules (Auge et *al.*, 1989; Zryd, 1988 ; Margara, 1989 ; Boxus, 1995). Depuis la culture in vitro a connu plusieurs étapes décisives qui ont permis de mettre au point des techniques de plus en plus performantes grâce aux travaux de plusieurs chercheurs comme Nobecourt, White Hilderbrandt, Murashige et Skoog, particulièrement après la découverte des régulateurs de croissance végétale qui révolutionnèrent la culture in vitro (Vasil, 2008).

5.3. Avantages de la culture in vitro

La production de vitro plants pouvait se substituer à la méthode de microbouturage avec les avantages suivants :

- la possibilité de conservation de ressources végétales et faire une banque de génotypes et réaliser ainsi des plantations en dehors de la période de croissance (Lê et *al.*, 2002).
- l'amélioration des conditions sanitaires par les techniques de cultures in vitro souvent associées à l'éradication des viroses (Sibi, 1981).
- la propagation végétative des espèces qui ne présentent pas ces capacités en conditions classiques (Sibi, 1981).
- la multiplication rapide, est due à l'augmentation de diffusion cellulaire par ces techniques (Yakoub-Bougdal, 1984 ; Smith *et al.*, 1985 ; Collet et LÊ, 1988).
- la facilité de leur transport d'une région à l'autre ou d'un pays à l'autre.

5.4. Inconvénients de la culture in vitro

Le principal inconvénient de la culture in vitro est le risque de l'érosion génétique (Zryd, 1988). Cependant la culture in vitro connaît d'autres inconvénients :

- la vitrification, certains accidents non prévisibles au départ peuvent intervenir au cours de la culture in vitro, comme les malformations dues à un déséquilibre hormonal.
- la perte de caractères intéressants : la production répétée d'un grand nombre de plantes uniformes, clones qui peuvent provoquer la perte de caractères nécessaires.
- l'acclimatation, le passage à des conditions de culture normales est parfois délicat. En effet, durant son séjour in vitro la plante est à l'abri du stress.
- l'apparition d'anomalies génétiques : certains cas d'hyperfloraison, perte de sexualité chez certaines espèces, apparition d'organes anormaux : représentent «la variation somaclonale».

5.5. Techniques de réalisation de la culture in vitro

5.5.1. Conditions d'asepsie

L'asepsie est la première condition pour la réussite d'une culture, ce qui implique une stérilisation des tissus, un prélèvement aseptique ainsi que la réalisation des conditions permettant le maintien à l'abri des contaminations microbiennes et fongiques (Yakoub-Bougdal, 2005).

5.5.2. Milieu de culture

Un milieu de culture est une solution aqueuse comprenant des sels minéraux, des substances organiques, et éventuellement des régulateurs de croissance, cette solution est solidifiée par la gélose (Auge et *al.*, 1989 ; Yakoub-Bougdal et *al.*, 2000).

5.5.2.1. Sels minéraux

Les milieux de culture sont différents essentiellement par leur concentration en sels, les exigences de ces derniers varient avec l'espèce, la nature du tissu et son état physiologique mais aussi avec le mode de culture et le type d'organogenèse. Parmi les éléments nécessaires à la vie de la plante, on distingue généralement les macroéléments et les microéléments «oligoéléments» (Margara, 1989 ; Yakoub-Bougdal et *al.*, 1998).

5.5.2.1.1. Macroéléments

Ils sont généralement utilisés en grande quantité, de l'ordre de 50 à 400 mg/l. Le carbone (C), l'oxygène (O) et l'hydrogène (H) constituent près de 95% de la matière sèche. Les macroéléments nécessaires à la croissance sont : l'azote (N), le phosphore (P), le potassium (K), qui entrent dans la constitution des protéines et des acides nucléiques.

Le magnésium (Mg), le soufre (S) et le calcium (Ca) interviennent dans le maintien de l'équilibre entre cations et anions dans la plante (Margara, 1989).

5.5.2.1.2. Microéléments

Ils jouent un rôle essentiel dans les mécanismes enzymatiques comme activateurs ou constituants des coenzymes. Les principaux sont : le fer (Fe), le cuivre (Cu), le zinc (Zn), le manganèse (Mn). A ces éléments sont associés le nickel (Ni), l'iode (I) et l'aluminium (Al). Le fer est apporté sous forme chélatée (Fe-EDTA) pour éviter sa précipitation (Margara, 1989).

5.5.2.2. Substances organiques

5.5.2.2.1. Source du carbone

Pour la culture in vitro, les sucres remplissent deux fonctions principales dans le milieu de culture : source d'énergie car la plante n'est pas encore arrivée à satisfaire ses besoins énergétiques et le maintien du potentiel osmotique des tissus (Zryd et al., 1988). En général, le saccharose constitue la meilleure source de carbone, mais on peut dans un cas particulier utiliser d'autres sources tels que le galactose et le lactose (Téoulé, 1993).

5.5.2.2.2. vitamines

En culture in vitro certaines vitamines sont favorables aux croissances des tissus (Téoulé, 1993). De ce fait, il n'est pas exclu que le manque de certains d'entre-elles puisse être un facteur limitant du phénomène d'organogenèse (Margara, 1989). Les vitamines les plus fréquemment utilisées sont : la thiamine HCL, la pyridoxine, la biotine, le pantothénate de calcium et le myo-inositol autrement dit des vitamines de groupe B (Gautheret, 1977).

5.5.2.2.3. Acides aminés

Ils sont apportés au milieu de culture, soit en mélange ou individuellement dans le but de favoriser l'organogenèse et la prolifération des cals (Margara, 1989).

6. Cytogénétique

Les analyses cytogénétiques visent à établir le nombre chromosomique, le niveau de ploïdie et l'établissement des caryotypes au cours de la mitose et de la méiose, afin de développer les stratégies de maintien et d'exploitation des ressources phytogénétiques (Mujeeb-Kazi et al, 2007).

6.1. Mitose et nombre chromosomique chez les plantes

La mitose est l'ensemble des étapes que traverse une cellule au cours de la division cellulaire, après une longue phase de synthèse d'ADN, appelée interphase (Fig. 9), (Albert, 2009).

6.1.1. Différentes phases de la Mitose

6.1.1.1. Prophase

Au cours de cette phase le noyau devient volumineux, Les chromosomes sont filamenteux et ont deux chromatides liés par leur centromère, ainsi l'appareil mitotique est mis en place avec Le cytoplasme, où il y a un début de formation du fuseau achromatique à partir d'un diplosome (paire de centrioles), qui sont disposées en deux points opposés par rapport au centre du noyau.

6.1.1.2. Métaphase

Elle se caractérise par :

La condensation maximale des chromosomes, le groupement et la migration des chromosomes sur la plaque équatoriale, la séparation des deux chromatides sauf au niveau du centromère et l'obtention de chromosomes de forme particulière (**en X**).

6.1.1.3. Anaphase

Elle se distingue par :

Le clivage des centromères, la séparation des deux chromatides de chaque chromosome et la migration des chromatides sœurs vers chaque pôle de la cellule

6.1.1.4. Télophase

Elle se caractérise par :

La décondensation des chromatides réparties en deux lots identiques pour redonner la chromatine ainsi que la reconstitution de l'enveloppe nucléaire et réapparition du nucléole.

6.1.2. Morphologie et structure du chromosome métaphasique

D'après Callen (2005), le chromosome métaphasique est constitué d'une zone de constriction primaire dénommée centromère qui est un point de liaison des deux chromatides sœurs, qui contient le kinétochore, centre d'organisation des microtubules responsable de la fixation des chromosomes au fuseau mitotique lors de la mitose (Fig.10).

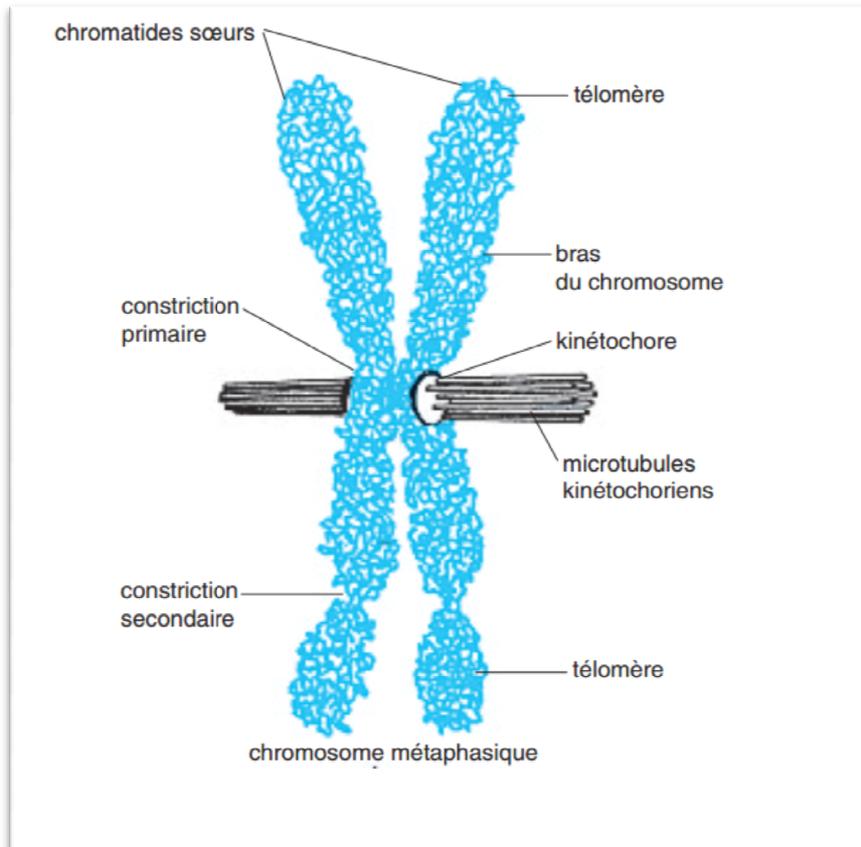


Figure 9 : chromosome métaphasique (Callen, 2005)

La position du centromère permet de distinguer quatre types de chromosomes (Fig. 11) :

- Chromosomes acrocentriques: le centromère est plus proche de l'une des deux extrémités (les télomères) le bras court est très bref.
- Chromosome télocentrique : présente un centromère très proche de ses télomères.
- Chromosomes sub-métacentriques: le centromère est presque en position centrale ; les chromatides de ce chromosome présentent des bras de longueur inégale (un petit bras « p » et un long bras « q »).
- Chromosomes métacentriques : le centromère est en position centrale (Position médiane) ce qui lui donne des bras de longueur à peu près égale.

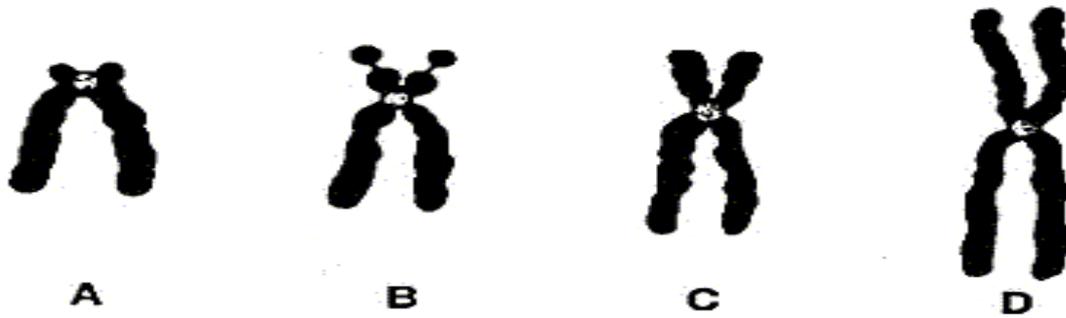


Figure 10 : Présentation schématique des différents types de chromosome (A : acrocentriques B: télacentrique, C : sub-métacentriques et D: métacentriques).

6.1.3. Variation du nombre de chromosome chez les plantes

La variation chromosomique est très répandue chez les plantes. Elle contribue souvent à des barrières génétiques ou flux génique qui existent entre les espèces, donc joue un rôle très important dans la diversification des espèces (Levin, 2000). Selon Gorenflot et Raicu (1980), le nombre de chromosomes et la teneur en ADN montrent une très grande variabilité chez les plantes à fleurs (spermaphytes). Le cas par exemple de l'espèce *Haplopappus gracilis* présente un nombre chromosomique de $2n=4$, tandis que le *Graptopetalum pachyllum* à $2n=540$ et l'exemple de *Lilium henry* qui possède 25 fois plus d'ADN qu'*Arabidopsis thaliana*.

6.2. Méiose et appariement chromosomique

La méiose est un processus qui se déroule au niveau des cellules germinales, au cours duquel il ya différenciation des gamètes mâles et femelles à (n) chromosomes. Elle implique la succession de deux divisions consécutives du noyau, à une seule phase de réplication de son ADN (Hebert, 1988).

Selon ce même auteur, la méiose (Fig. 12) se divise en :

6.2.1. Méiose I (Division réductionnelle)

6.2.1.1. Prophase I

C'est la plus longue phase, elle comporte cinq stades successifs

6.2.1.1.1. Leptotène

Individualisation des chromosomes qui comportent 2 chromatides

6.2.1.1.2. Zygotène

Début de l'appariement des chromosomes homologues par la mise en place du complexe synaptonémal. Ce phénomène d'appariement est appelé Synapsis, il se fait par les Kinétochores et concerne tous les chromosomes.

6.2.1.1.3. Pachytène

Dans ce stade, nous observons un raccourcissement des chromosomes qui deviennent plus épais. Ensuite, chaque paire de chromosomes homologues appariés en bivalent dont chaque bivalent comportant quatre chromatides est appelé tétrade.

6.2.1.1.4. Diplotène

Les chromosomes homologues se séparent, mais cette séparation n'est pas totale car les deux chromosomes homologues restent associées en un ou plusieurs points appelés chiasmas au niveau desquels deux des quatre chromatides s'entrecroisent et font ainsi le crossing-over.

6.2.1.1.5. Diacinèse

La condensation maximale des chromosomes, où chaque bivalent adopte une configuration particulière suite d'une rotation qui dispose les deux homologues dans des plans qui sont alternativement perpendiculaires les uns aux autres, entre les chiasmas successifs. A ce stade disparaissent les complexes synaptonémaux.

6.2.1.2. Métaphase I

Cette phase se distingue par la disparition de l'enveloppe nucléaire et le nucléole, la disposition des bivalents sur la plaque équatoriale, la mise en place d'un fuseau de division analogue à l'appareil mitotique ainsi que la disposition des centromères de chaque bivalent de part et d'autre de la plaque équatoriale à égale distance de celle-ci.

6.2.1.3. Anaphase I

Elle se caractérise par une séparation des chromosomes homologues au niveau des chiasmas et la migration de chacun des deux homologues de chaque bivalent vers un pôle.

6.2.1.4. Télophase I

Selon les cas ; il y a reconstitution d'un noyau interphasique selon un processus analogue à la télophase de mitose, ou bien amorce immédiate de la seconde division de la méiose.

6.2.1. Méiose II (Division équationnelle)

Elle est semblable à une mitose ordinaire, rien que les chromosomes clivés sont dupliqués au cours de la prophase I.

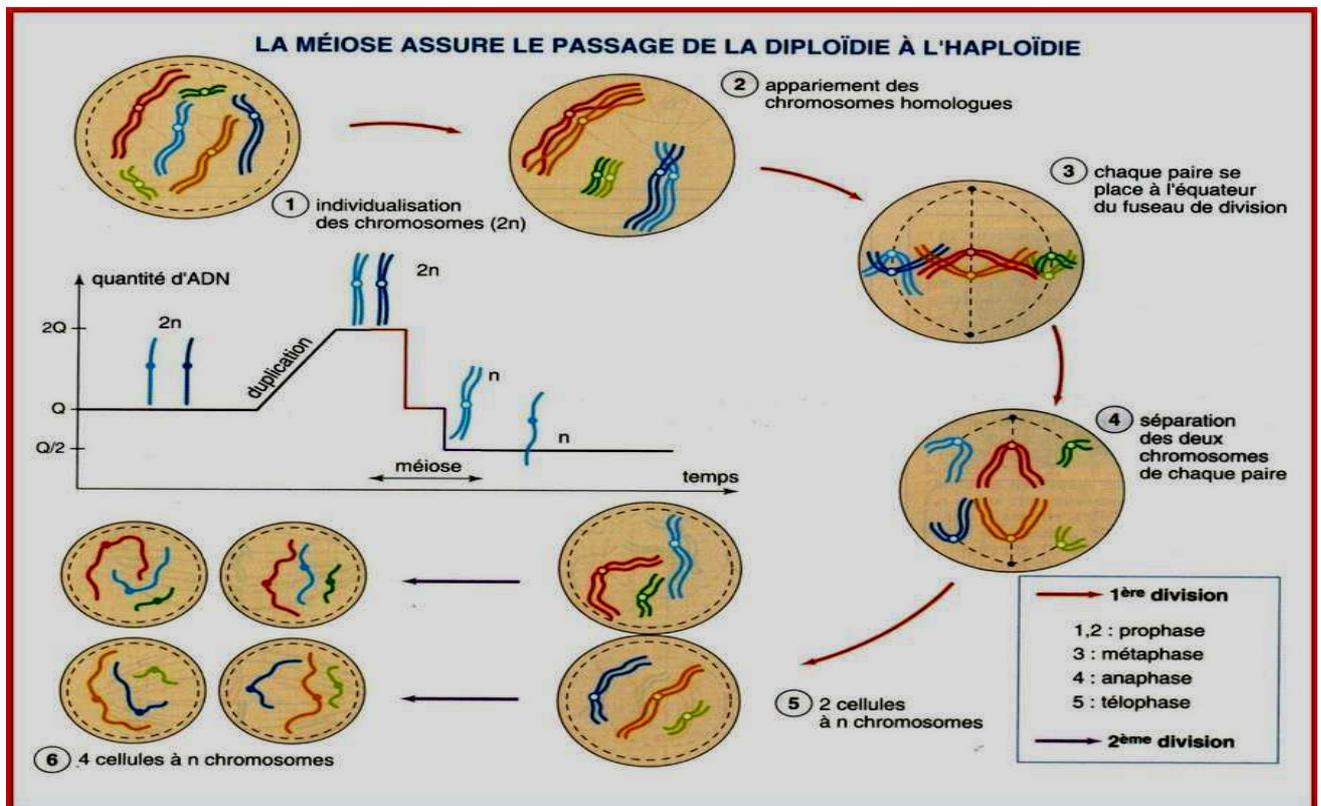


Figure 12 : Les différentes phases de la méiose (Hebert E, 1988).

Chapitre II :

Matériels et méthodes

Partie I. Culture in-vitro

1. Matériel végétal

La figure 13 montre des olives sur l'arbre adulte. Les olives sont récoltées en Décembre 2015 (fig.14), d'une manière aléatoire sur différents oliviers âgés d'une dizaine d'années dans la région de Sanana, Commune de Drâa-El-Mizan, Wilaya de Tizi-Ouzou.



Figure 12 : Olives avant la récolte (Soudani, 2015).



Figure 13 : Olives récoltées en Décembre 2015.

Une fois récoltées, les graines sont débarassées de leur pulpe (fig.15), nettoyées. Séchées et conservées dans des bocaux.



Figure 14 : *Olea europea* L. var. Chemlal. D'après Yakoub-Bougdal (2005) ; (a) : Fruit ; (b) : Graine avec l'endocarpe lignifié ; (c) : Graine contenant l'embryon.

2. Matériel de laboratoire

Une hotte à flux laminaire horizontal équipée d'U.V, chambre de culture, étuve, autoclave, distillateur, Bec benzène, plaque chauffante pourvue d'un agitateur, balance analytique d'une précision au 10 millième de gramme (0,0001), balance électronique, pinces droites longues et courtes, scalpel, pissette, verrerie (béchers, erlens meyer, tubes à essai, pipettes graduées) notant aussi les boîtes de pétri utilisées durant l'expérimentation sont de 7cm de diamètre et 1cm de hauteur, papier kraft, film alimentaire, papier aluminium, coton et papier buvard.

3. Protocole expérimental

Le protocole expérimental consiste à la mise en germination des embryons d'olivier (*Olea europea* var. chemlal, après stérilisation et imbibition, dans le milieu de base MS₁₀ (Murachige et Skoog). Après la germination, les racines obtenues en culture in-vitro vont être excisées puis utilisées en cytogénétique.

4. Technique expérimentale

4.1. Condition d'asepsie totale

La stérilisation est la condition la plus importante pour la réalisation de la culture in-vitro. Pour cela tout le matériel utilisé est stérilisé soigneusement pour éviter le maximum de contaminations (Fig.17).



Figure 15 : Stérilisation du matériel dans une étuve à 127°c .

Les graines de l'olivier sont débarrassées de leur noyau (endocarpe lignifié), puis lavées à l'eau courante additionnée d'un détergent commercial. Elles sont ensuite trempées dans l'alcool 70°, puis désinfectées avec une solution d'hypochlorite de Na, suivies de trois rinçages dans de l'eau distillée stérile (Fig.18).



Figure 16 : Stérilisation du matériel végétal sous une hotte à flux laminaire horizontal.

4.2. Imbibition du matériel végétal

L'imbibition est une étape qui permet une séparation aisée de l'embryon de sa graine. Elle se déroule sous une hotte à flux laminaire horizontal.

Nous préparons les boîtes de pétri pour l'imbibition, en les tapissant de coton et de papier buvard, imbibées d'eau distillée stérile et mises à l'autoclave pour la stérilisation.

Nous plaçons 5 graines par boîte de pétri (fig.19), qui seront scellées avec du film transparent puis elles sont mises dans la chambre de culture réglée à $25^{\circ}\text{C} \pm 2$.

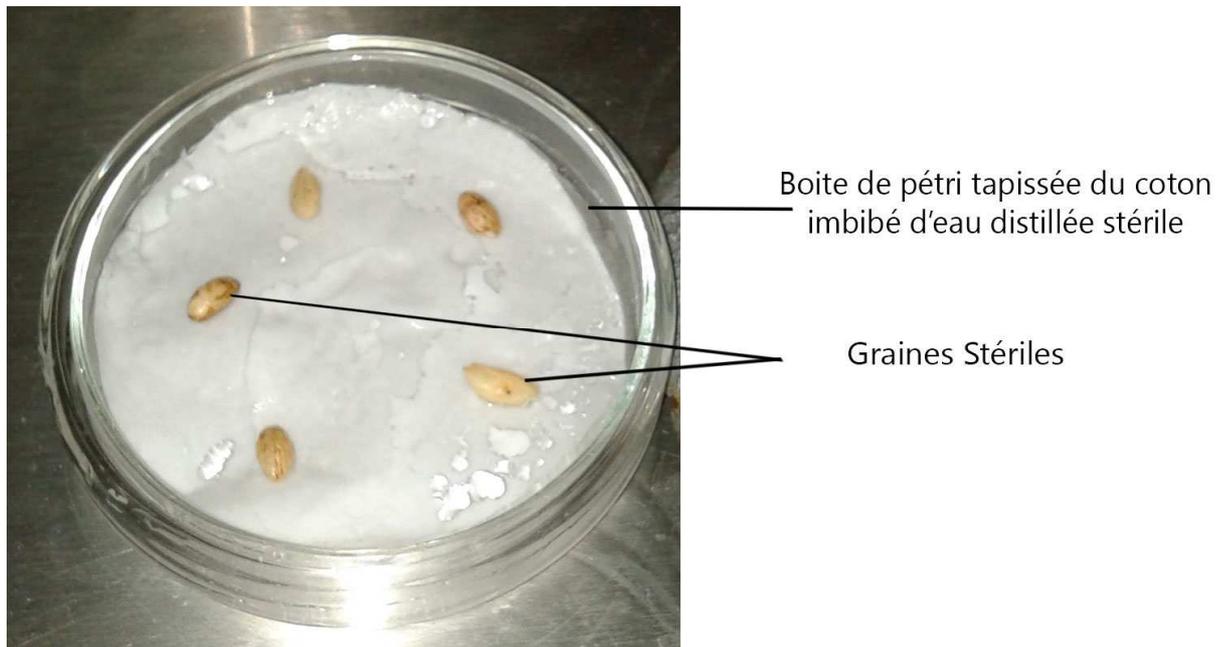


Figure 17 : Graines mises à imbiber dans une chambre de culture thermostatée.

4.3. Préparation du milieu de culture

Nous avons démarré avec le milieu de culture MS₁₀ (milieu de base) pour la mise en germination des embryons d'olivier. Ce milieu fait partie du projet de collaboration de l'Université Pierre et Marie Curie (Paris VI), depuis 2009.

Ce milieu de culture est un milieu nutritif artificiel constitué principalement d'eau, de sels minéraux (macroéléments, microéléments), d'éléments organiques (saccharose ou glucose), de vitamines où toutes ces solutions sont solidifiées avec de la gélose (agar). Le tableau 1 constitue les éléments composant le milieu MS₁₀.

Tableau 1 : Composition du milieu Muraschige et Skoog (MS) (1962) en macroéléments, microéléments et en vitamines (Yakoub, 2016).

Macroéléments mg/l	MS (1962)	Microéléments mg/l	MS (1962)	Vitamines mg/l	MS (1962)	Solution de fer chélate (mg/l)	MS (1962)
CaCl ₂ .2H ₂ O	332,02	CoCl ₂ , 6H ₂ O	0,025	Glysine	2	Na ₂ EDTA	40,5
KH ₂ , PO ₄	170	CuSO ₄ , 5H ₂ O	0,025	Inositol	100	FeSO ₄ .7H ₂ O	27,85
KNO ₃	1900	ZnSO ₄ , 7H ₂ O	8,6	Acide nicotinique	0,5		
MgSO ₄ .7H ₂ O	180,54	H ₃ BO ₄	6,2	Pyridoxine	0,5		
NH ₄ NO ₃	1650	KI	0,83	Thiamine	0,1		
		MnSO ₄ , 4H ₂ O	16,9				
		Na ₂ MoO ₄ , 5H ₂ O	0,25				

Le milieu de culture est réparti dans des tubes à essai qui sont ensuite scellés avec du coton hydrophile et couverts du papier aluminium afin d'éviter toutes contaminations.

4.4. Ensemencement des embryons

L'ensemencement doit se réaliser sous une hotte stérile préalablement nettoyée (fig.20). Après imbibition des graines, nous avons extrait les embryons grâce à une double incision de la partie radiculaire de la graine (Yakoub-Bougdal, 2005) (fig.21). Les embryons à leur tour sont ensemencés dans des tubes à essai contenant 20ml du milieu de culture (MS₁₀) (fig.22), puis transférés dans une chambre de culture réglée à 25±2°c.

Pendant cette étape, nous avons effectué 5 essais et le nombre d'embryons ensemencés à chaque essai est de 24.



Figure 18 : Hotte à flux laminaire horizontale préalablement nettoyée.

1 : Pinces et scalpels stériles couverts du papier, 2 : Bécher contenant de l'alcool 70°, 3 : Eau distillée stérile, 4 : Béchers stériles, 5 : boîtes de pétri stériles, 6 : film alimentaire stérile, 7 : Boîtes de pétri contenant les graines, 8 : Tubes à essai avec le milieu de culture, 9 : Pissette remplie de l'alcool 70°, 10 : Bec benzène.



Figure 19 : Réalisation de la double incision en conditions stériles.



Figure 20 : Embryon d'*Olea europaea* ensemencé sur le milieu de culture MS₁₀(1962).

5. Les racines obtenues par culture in-vitro

Les plantules d'*Olea Europea* obtenues par culture in-vitro (fig.23) présentent des racicules qui seront utilisées en cytogénétique. La taille des racicules varie de 0,5 à 2 Cm (Fig.24).

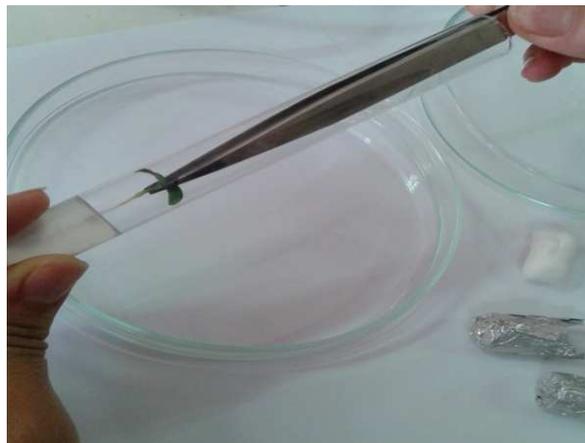


Figure 21 : Extraction de la plantule ensemencée sur le milieu MS₁₀.

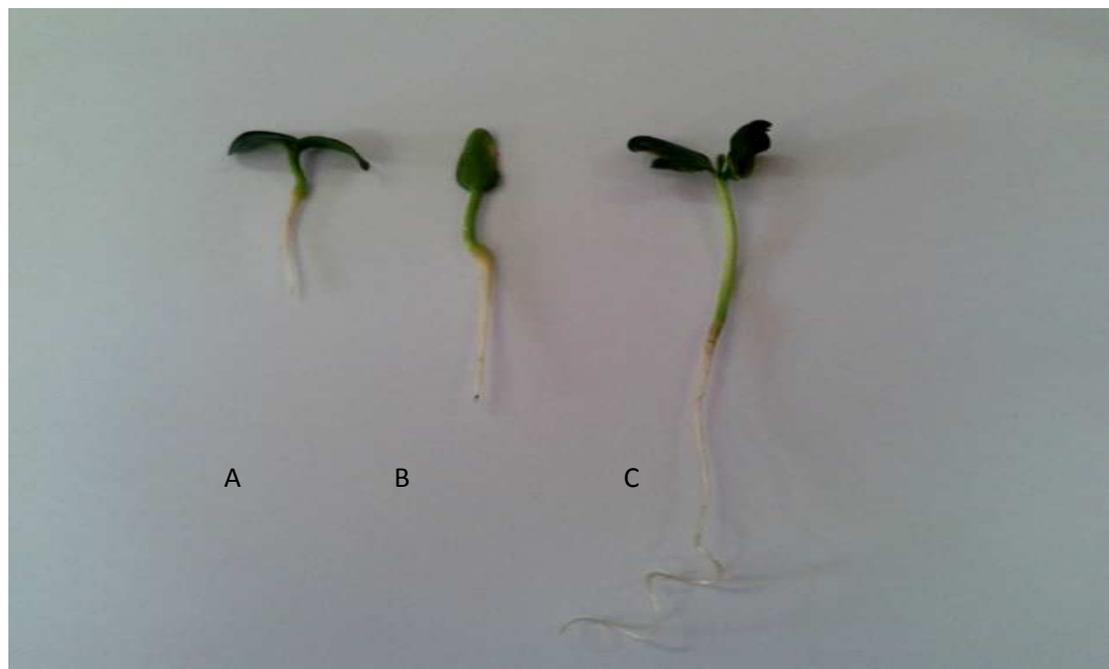


Figure 22 : Plantules présentant des racines de différentes tailles.

A : plantule après 4 jours d'ensemencement sur le milieu MS_{10} .

B : plantule après 8 jours d'ensemencement sur le milieu MS_{10} .

C : plantule après 20 jours d'ensemencement sur le milieu MS_{10} .

Partie II. Cytogénétique

1. Matériel végétal

Le matériel végétal est constitué, des boutons floraux de l'olivier (*Olea europea* L.) variété Chemlal échantillonnés dans la serre de M^{me} Yakoub-Bougdal, Complexe biomédical, Université Mouloud Mammeri, Tizi-Ouzou, 2016. Ainsi que des racines de différentes tailles des plantules de la même variété cultivée in-vitro.

1.1. Les boutons floraux

Les boutons floraux utilisés sont de différentes tailles, petits (Fig. 25) et grands (Fig. 26) prélevés sur des jeunes individus d'olivier (*Olea europea* L.) en floraison avant l'anthèse, au début de la deuxième quinzaine du mois d'avril de l'année 2016.



Figure 25 : Boutons floraux de petite taille.

Figure 26 : Boutons floraux de grande taille.

1.2. Les racines

Les radicules utilisées sont obtenues par culture in-vitro d'*Olea europea* L.

2. Matériel de laboratoire

Nous avons des pilluliers de différentes tailles, béchers, boîtes de pétri, erlens meyer, pinces de cytologie, bistouri, seringues, élastiques, compresses, lames, lamelles, tubes eppendorf, gants en latex, pipettes graduées, bain marie.

3. Protocole expérimental

Afin de procéder à l'analyse cytogénétique, les mitoses somatiques ainsi que les méïoses polliniques ont été analysées.

3.1. Etude de la méiose

Les méioses polliniques sont observées dans les jeunes anthères prélevées au niveau des boutons floraux des individus d'olivier en floraison.

3.2. Etude de la mitose

Les mitoses somatiques sont observées dans les méristèmes racinaires en croissance active des jeunes plants d'olivier obtenus par CIV.

4. Technique expérimentale

La technique utilisée est celle de Jahier et al, (1992) en suivant les étapes suivantes :

4.1. Traitement

➤ Dans le cas des boutons floraux

Les boutons floraux utilisés dans cette expérimentation sont répartis dans deux piluliers différents en fonction de la taille : boutons floraux de grande taille et de petite taille (Annexe. 4).

Le traitement se fait avec une solution de Carnoy (Ethanol-chloroforme-acide acétique 6/3/1 v/v) pendant 48 h à température ambiante où les boutons floraux sont répartis dans deux piluliers différents selon leur taille (Annexe. 5)

➤ Dans le cas des racines

Après la germination, les racines seront rincées à l'eau distillée (Annexe. 6), puis réparties en deux: des racines de 0.5 à 2cm traitées par immersion avec une solution de α -bromonaphtalène pendant 16h à 4°C (Annexe. 7), d'autres racines sont traitées avec 8-hydroxyquinoline pendant 24h à 4°C (Agent mitoclasique qui empêche la formation du fuseau achromatique) (Annexe. 8).

4.2. Fixation

- Après 16h de traitement avec α -bromonaphtalène, nous effectuons un rinçage à l'eau distillée pour éliminer l'excès de produit, puis fixation à l'acide acétique 90% pendant 30 minutes(Annexe. 9).
- Après 24h de traitement avec 8-hydroxyquinoline, nous effectuons un rinçage à l'eau distillée, puis fixation à l'alcool-acétique (3/1) durant 16h à 4°C (Annexe. 10).

4.3. Stockage

➤ **Dans le cas des boutons floraux**

Après 48h de traitement au Carnoy, on enlève le produit en le versant dans un bécher (Annexe. 11), puis stockage des boutons floraux dans l'alcool 70° à 4°C (Annexe. 12). Ils peuvent être conservés pendant une longue période.

➤ **Dans le cas des racines**

Après fixation, les racines sont rincées à l'eau distillée puis stockées dans l'alcool 70° à froid (Annexe. 13), elles peuvent être conservées pendant une longue période .

4.4 . Hydrolyse

➤ **Dans le cas des boutons floraux**

Après conservation dans l'alcool 70°, nous effectuons 2 rinçages à l'eau distillée de 5 minutes chacun. L'hydrolyse à été réalisée dans une solution d'Hcl 1N au bain marie à 60°C pendant 10 minutes .

➤ **Dans le cas des racines**

Après stockage dans l'alcool 70°, nous effectuons deux rinçages de 5 minutes chacun à l'eau distillée afin d'éliminer l'excès de l'alcool.

L'hydrolyse a été réalisée dans une solution d'Hcl 1N, au bain marie à 60°C, pendant 10 minutes (Annexe. 14-15).

4.5. Coloration

➤ **Dans le cas des boutons floraux**

Après l'hydrolyse à l'Hcl 1N, nous effectuons un rinçage à l'eau distillée, puis coloration à la Fuschine pendant 1 heure à l'obscurité, à température ambiante. La Fushine se fixe sur les groupements aldéhydes libérés par l'Hcl et colore les chromosomes en rose.

➤ **Dans le cas des racines**

Une fois hydrolysées, les racines sont rincées à l'eau distillée afin d'éliminer l'excès de l'Hcl, puis colorées dans une solution de Fuschine pendant 30 à 60 minutes à l'obscurité, à température ambiante (Annexe. 16) .

5. Montage et observation

➤ Dans le cas des boutons floraux

Une fois les boutons floraux colorés, nous effectuons un rinçage à l'eau distillée (Annexe. 17) et à l'aide de deux seringues on extrait les anthères, on les place sur les lames puis on réalise des squaschs (Technique qui consiste à écraser les préparations à l'aide d'une allumette).

Les observations sont faites au microscope photonique au grossissement $\times 40$

➤ Dans le cas des racines

Après rinçage à l'eau distillée pour éliminer l'excès du colorant (Annexe. 18), les extrémités racinaires colorées en rouge vif sont coupées et montées entre lames et lamelles ; puis, on réalise des squaschs pour écraser les préparations à l'aide d'une allumette (Annexe. 19).

Les observations sont faites au microscope photonique au grossissement $\times 40$. Les meilleures préparations qui présentent des chromosomes bien individualisés sont conservées.

Chapitre III :

Résultats et discussion

1. Influence du milieu de base MS₁₀ sur la germination des embryons de l'olivier *Olea europea* L.

Le pourcentage de germination, de contamination ainsi que le taux de nécrose des embryons d'olivier variété Chemlal, obtenus sur milieu de base MS₁₀ sont traduits sous forme d'un histogramme (Fig.27) où nous avons enregistré un optimum de 75,35% de taux de germination.

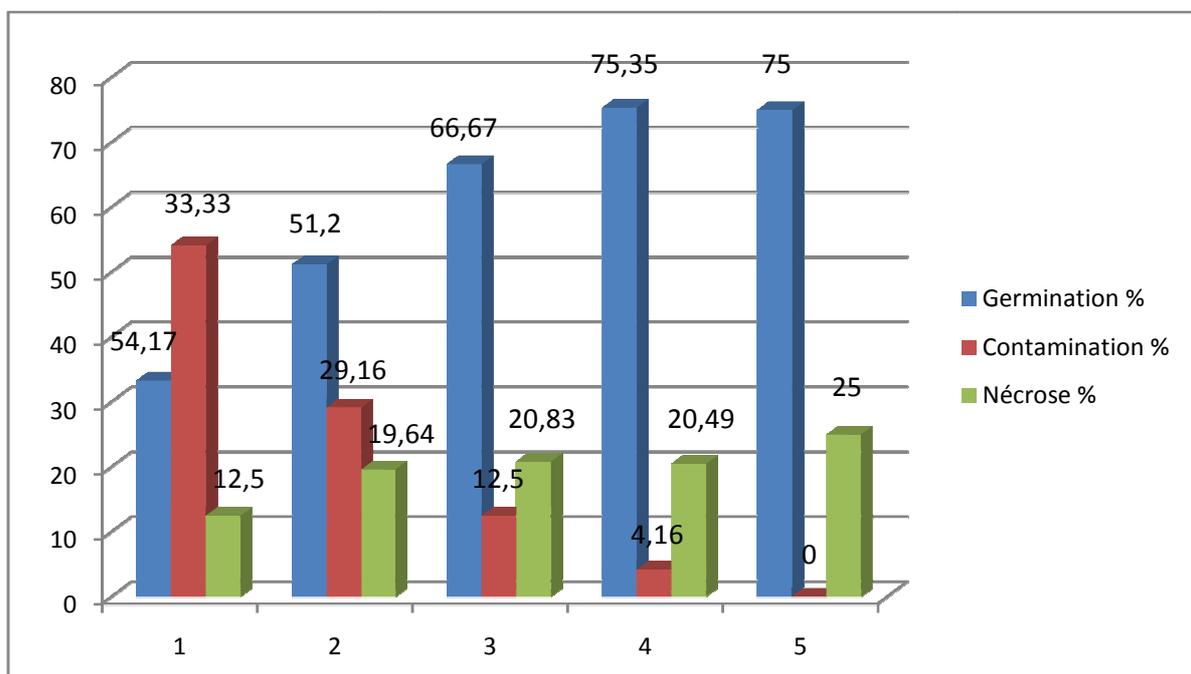


Figure 27 : Représentation graphique de pourcentage de germination, de contamination

Au bout de 3 jours nous notons un verdissement des feuilles cotylédonaire ainsi qu'un début d'allongement de la racine, au 4^{ème} jour nous observons l'ouverture des cotylédons.

À partir du 8^{ème} jour, nous observons une plantule bien développée avec une partie supérieure contenant une paire de feuilles et une partie inférieure avec une racine de 0,5 à 1Cm (Fig.28).

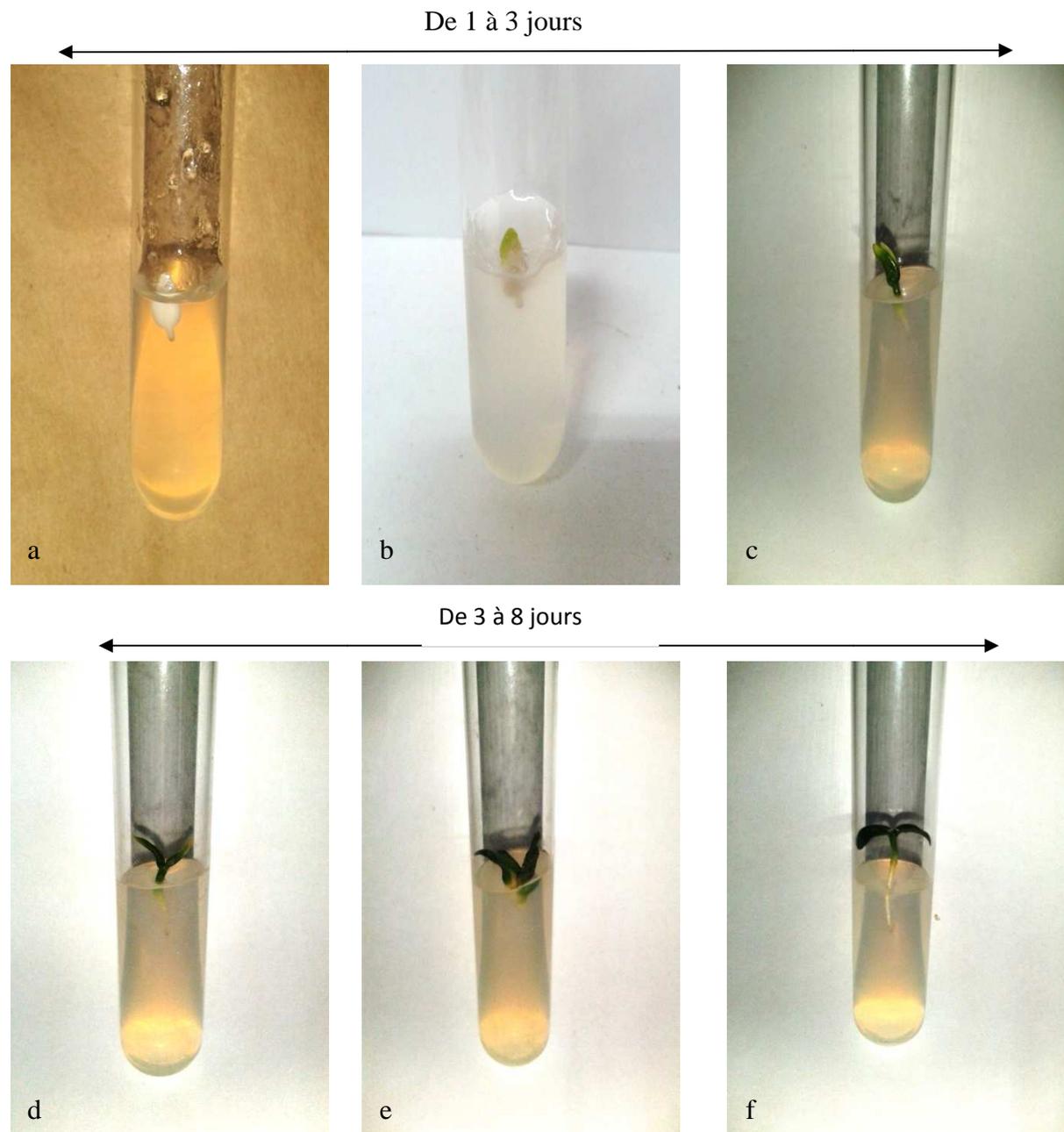


Figure 28 : Développement des embryons d'olivier *Olea europea* (Var. Chemlal), sur le milieu MS₁₀ (Laboratoire CIV, Université Mouloud Mammeri, Tizi-Ouzou,

a : Embryonensemencé sur le milieu de base MS₁₀.

b : Début de verdissement des cotylédons après 2 jours de culture sur MS₁₀.

c : Début d'ouverture des cotylédons ainsi que la percée de radicule après 3 jours de culture sur MS₁₀.

d : Ouverture complète des cotylédons après 4 jours de culture sur MS₁₀.

e : Développement de la partie aérienne après 5 jours de culture sur MS₁₀.

f : Jeune plantule après 8 jours de culture sur MS₁₀.

Les plantules dépassant 8 jours de culture sont aussi utilisées dans l'expérience (Fig. 29).

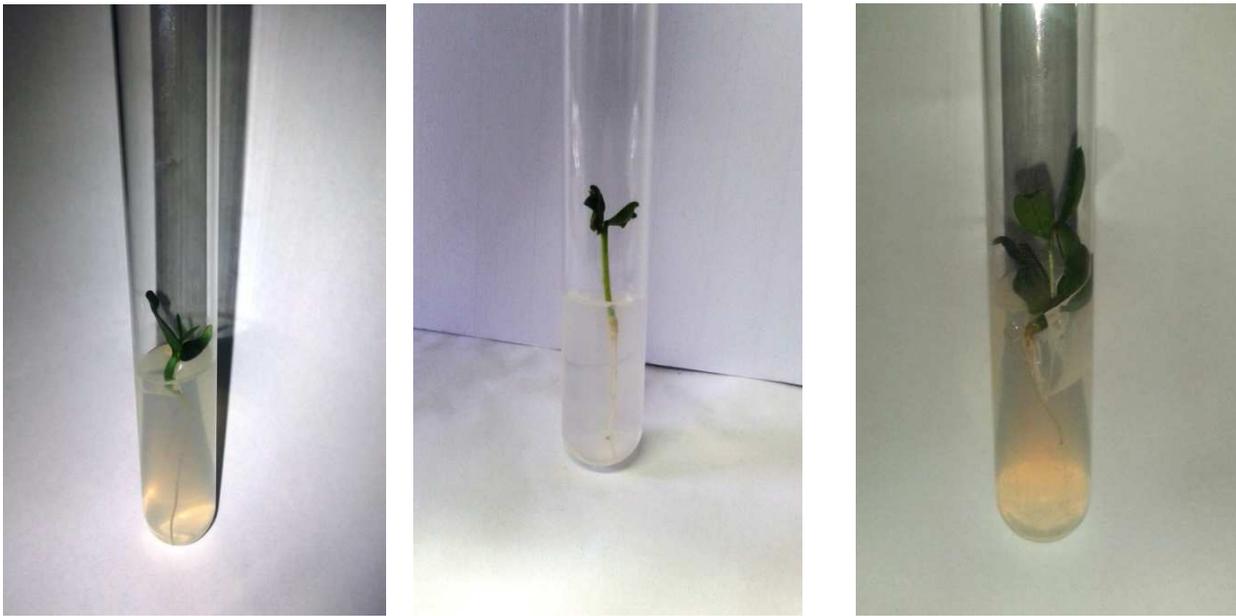


Figure 29 : Plantules dépassant 8 jours de culture sur MS₁₀.

a : Allongement de la racine après dix jours de culture sur MS₁₀.

b : Allongement de la partie aérienne et de la racine après quinze jours de culture sur MS₁₀.

c : Développement de la partie aérienne après dix-huit jours de culture sur MS₁₀.

Les plantules contaminés et les embryons nécrosés sont éliminés de l'expérience (Fig.30). Les contaminations rencontrés durant l'expérience sont d'allure cotonneuse peuvent être dues à un champignon.

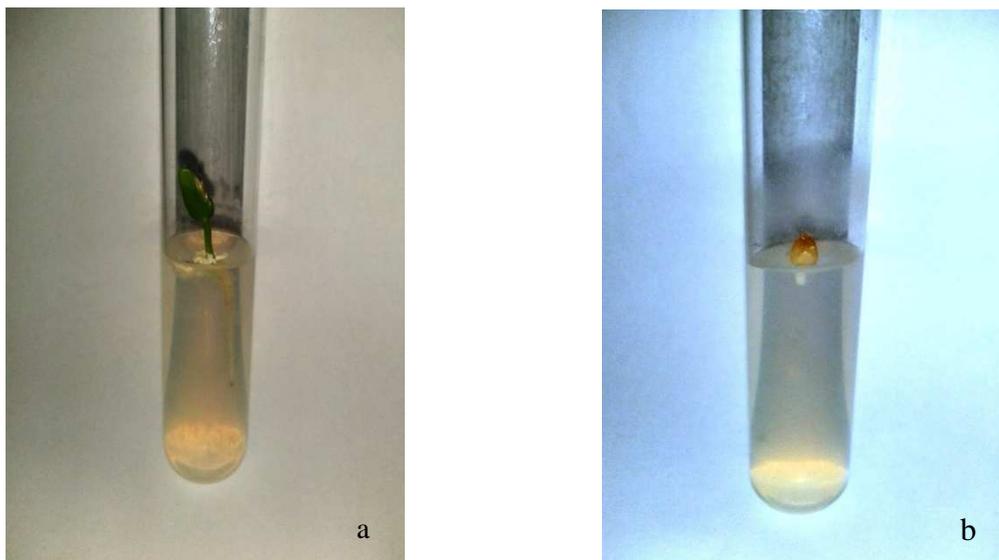


Figure 30: Explants éliminés de l'expérience ; (a) : jeune germination contaminée ; (b) : embryon nécrosé (Laboratoire de CIV, Université Mouloud Mammeri, Tizi-Ouzou, 2016).

2. Etude cytogénétique

2.1 Etude de la mitose somatique

2.1.1. Dénombrement chromosomique

L'étude des cellules en mitose du méristème racinaire, nous a permis d'observer les phases suivantes (Fig.31) :

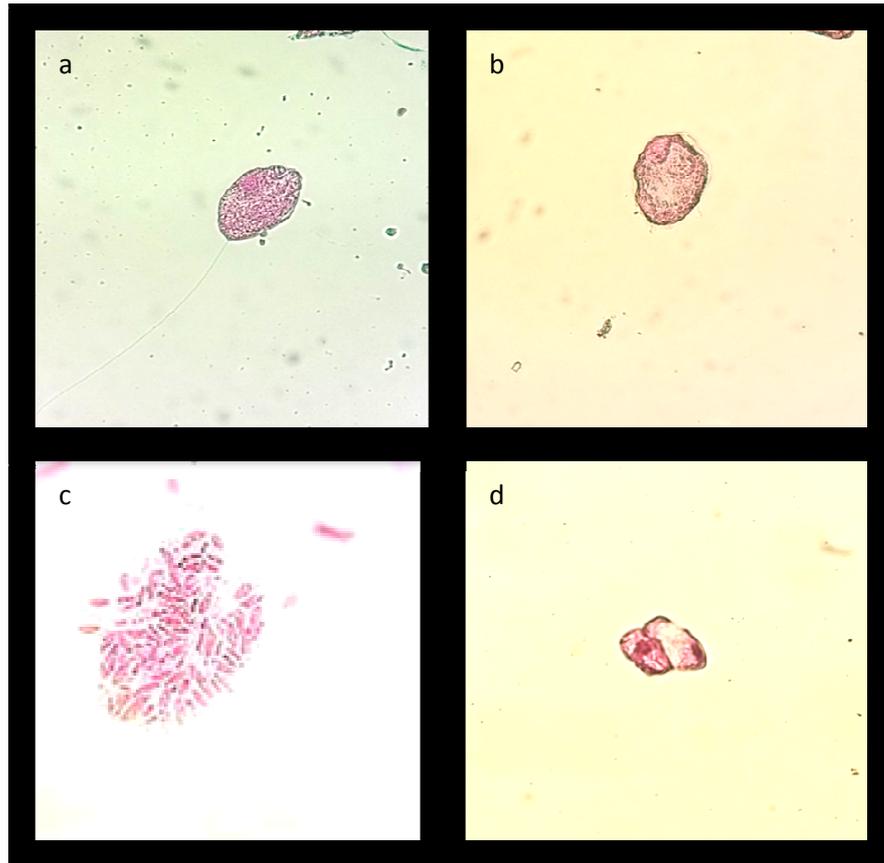


Figure 31 : Micrographies de quelques cellules en division : a-Interphase, b-Prophase, c-Plaques métaphasiques, d-Télophase.

Le dénombrement chromosomique est effectué sur les cellules au cours de la Mitose, les numérations effectuées nous ont permis d'établir le nombre chromosomique de $2n=46$.

2.1.2. Etude des caryotypes et établissement des idiogrammes

Les caryotypes et les caryogrammes (Fig.32) sont établis à partir des mesures effectuées sur les chromosomes de la plaque métaphasique sélectionnée ($2n=46$), à l'aide du logiciel : **Ideokar 1.2 software package version 2015**. Les mesures obtenues ainsi que les paires chromosomiques définies, sont reportées sur le tableau 2.

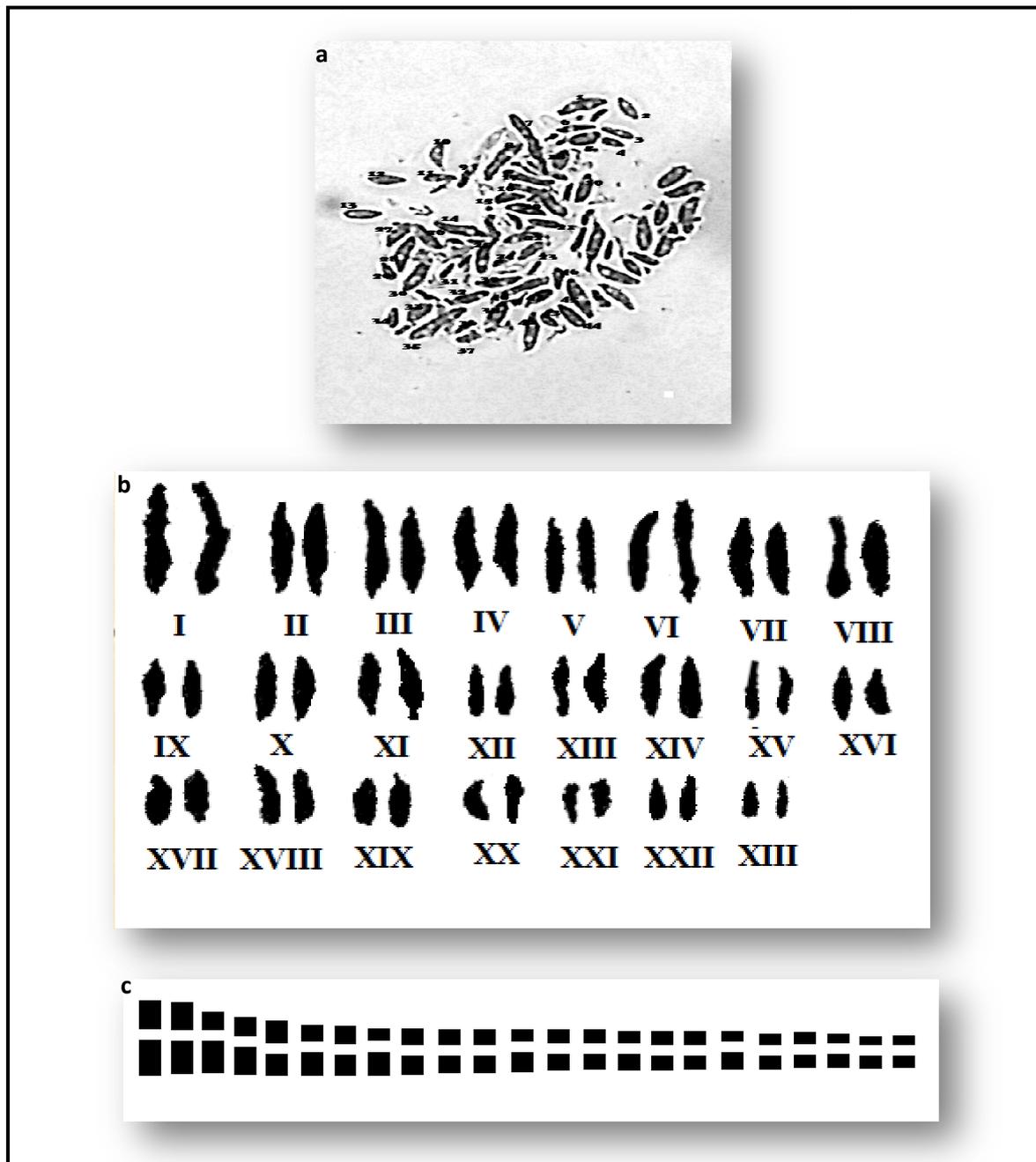


Figure 32 : Dessin de la plaque métaphasique (a), caryotypes (b) et Idiogramme (c).

Tableau 2 Les paires chromosomiques et les chromosomes homologues du cytotype diploïde ($2n=2X=46$) de l'olivier (*Olea europaea* L.) var. Chemlal.

Paires chromosomiques	Chromosomes homologues	Moyenne BC	Moyenne BL	Moyenne LT	Moyenne (R)	Moyenne IC	Type chromosomique
Paire I	16	4,57	7,03	11,60	3,15	38,50	Métacentrique
	35						
Paire II	42	5,18	6,05	11,23	3,05	46,00	Métacentrique
	45						
Paire III	8	4,93	6,17	11,11	3,01	44,00	Métacentrique
	30						
Paire IV	14	4,07	6,54	10,62	2,88	38,50	Métacentrique
	28						
Paire V	7	4,81	5,55	10,37	2,81	46,50	Métacentrique
	21						
Paire VI	25	4,32	5,68	10,00	2,71	43,00	Métacentrique
	40						
Paire VII	1	4,69	5,06	9,75	2,64	47,50	Métacentrique
	26						
Paire VIII	17	3,45	5,43	8,89	2,41	39,50	Métacentrique
	38						
Paire IX	12	2,22	6,17	8,39	2,28	26,00	Sub- métacentrique
	13						
Paire X	19	3,21	4,81	8,02	2,18	40,00	Métacentrique
	20						
Paire XI	27	2,83	5,18	8,02	2,17	35,50	Sub- métacentrique
	39						
Paire XII	3	2,84	4,69	7,53	2,04	37,00	Sub- métacentrique
	11						
Paire XIII	9	3,70	3,70	7,40	2,01	50,00	Métacentrique
	10						
Paire XIV	23	3,33	3,95	7,28	1,97	45,00	Métacentrique
	44						
Paire XV	6	3,21	3,95	7,16	1,94	44,00	Métacentrique
	24						
Paire XVI	2	2,96	3,70	6,66	1,81	44,00	Métacentrique
	15						
Paire XVII	5	2,83	3,70	6,54	1,77	43,00	Métacentrique
	33						
Paire XVIII	22	2,96	3,21	6,17	1,67	48,00	Métacentrique
	32						
Paire XIX	18	2,59	3,46	6,04	1,64	42,50	Métacentrique
	41						
Paire XX	43	2,34	3,58	5,92	1,61	39,00	Métacentrique
	46						
Paire XXI	36	2,22	3,08	5,31	1,44	41,00	Métacentrique
	37						

Paire XXII	29	2,34	2,83	5,18	1,41	45,00	Métacentrique
	34						
Paire XXIII	4	2,10	2,84	4,93	1,34	41,50	Métacentrique
	31						

2.1.3 Etude de l'asymétrie des chromosomes

Les indices d'asymétries intra-chromosomique et inter-chromosomique de (Romero-Zarco, 1986) (A1 et A2), et de (Paszko, 2006) (CVci et CVcl) sont utilisés pour évaluer les variations de la taille et l'évolution des chromosome du caryotype établi. Les résultats sont regroupés dans le Tableau 3.

Tableau 3 Nombre chromosomique (2n), niveau de ploïdie, formule caryotypique, indices d'asymétries intrachromosomique (A1, CVci) et interchromosomique (A2, CVcl) de l'olivier (*Olea europaea* L.) var. Chemlal.

cytotypes	Nombre chromosomique (2n)	Formule caryotypique	CV ci	CV cl	A1	A2
Diploïde	46	20m+3sm+0st+0t	14,38	31,89	0,24	0,31

2.2. Etude des méïoses polliniques

L'observation des cellules mères de grain de pollen (CMP) nous a permis de repérer les différents stades de la méïose (Fig. 33). La configuration méiotique , ainsi que l'étude des comportements chromosomique ont été etbli à la prophase I, au stade Diacinèse comme suite : treize bivalents appariés en anneau (**II.a**) et dix autres paires ont un appariement droit (**II.d**). Une anomalie a été également détectée par la présence de pont achromatique dans une cellule au stade Anaphase I.

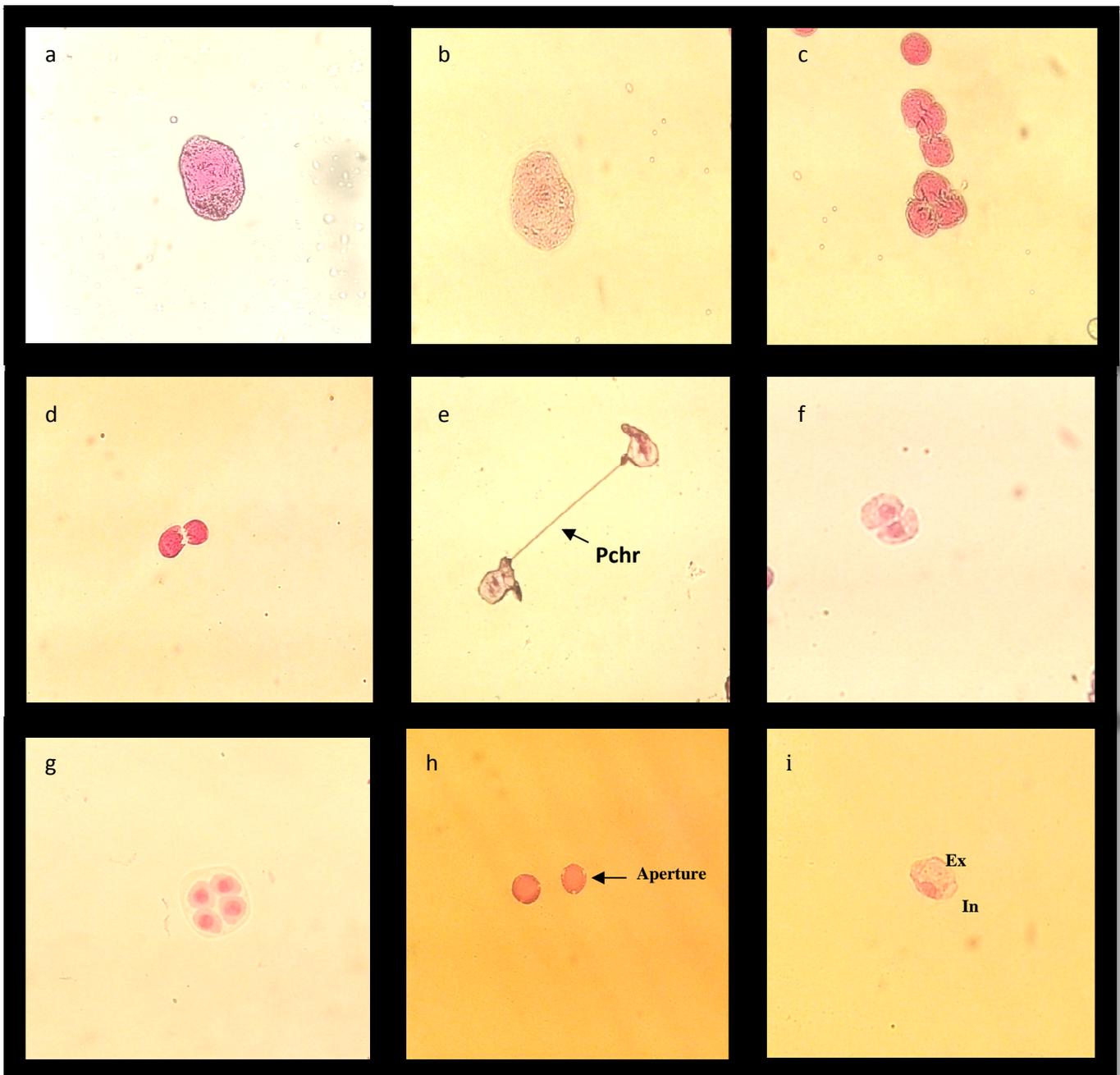


Figure 33 : Micrographies de quelques cellules mères de grain de pollen (CMP) en division : a-Interphase, b-Prophase I (**13 II.a** + **10 II.d**) , c-Metaphase I, d-Anaphase I, e-Anaphase I (**Pchr** : pont de chromatine), f-Telophase I (Diade) , g-Telophase II (Tetrade), h-jeunes grains de pollen (avec 3 apertures), i-Grain de pollen mûr (**Ex** : exine et **In** : intine).

3. Discussion

Le travail réalisé pendant l'expérimentation est démarré par la mise en germination in-vitro des embryons d'*Olea europea* sur un milieu MS₁₀ dans le but d'obtenir des plantules possédant une racine de 0,5 à 2cm de longueur. Ensuite, ces racines nous ont servi pour la réalisation de l'étude cytogénétique de l'olivier.

Le milieu MS₁₀ est caractérisé par la présence des teneurs élevées en ions K, Mg reconnus par leurs effets bénéfiques qui conduisent à une bonne croissance des plants. Ces effets sont signalés par certains auteurs (David et al., 1978 ; Bornmun, 1983 et Margara, 1978 ; Atta, 2008).

Notant aussi que N et K⁺ sont des éléments importants dans le milieu MS₁₀ selon Angebert et al., 2001, le manque de N et K⁺ donne des racines blanches et faibles avec un nombre réduit chez le cerisier.

L'étude cytogénétique par les observations des mitoses somatiques des cellules méristématiques a montré que les échantillons de l'olivier (*Olea europaea* L.) étudiés ont un nombre chromosomique de $2n=46$. Ce résultat est en accord avec celui trouvé par plusieurs auteurs (Green et Wickens, 1989 ; Bitonti et al., 1999 ; Minelli et al., 2000 ; Baali-Cherif et Besnard, 2005), sur d'autres variétés sauvages et cultivées de l'olivier (*Olea europaea*).

Par la technique de la cytométrie en flux et par l'utilisation des marqueurs moléculaires SSR, Besnard et al, (2008) ont démontrés pour la première fois et avec certitude, que chez le complexe d'olivier (*Olea europaea* L.) il existe trois niveaux de ploïdie avec le nombre chromosomiques de base ($x=23$) : $2n=2x=46$ correspond aux sous espèces diploïdes : *europaea*, *laperrinei*, *guanchica* et *cuspidata*. $2n=4x=92$ correspond à la sous espèce tétraploïde *Cerasiformis* et $2n=6x=138$ correspond à la sous espèce hexaploïde *maroccana*. En déduit de cela que nos échantillons de l'olivier de la variété Chemlal seraient diploïdes ($2n = 2x = 46$).

Les données caryologiques ont montré que les échantillons étudiés de l'olivier (var Chemlal) sont caractérisés par un caryotype symétrique avec abondance des chromosomes Métacentrique, et on note l'absence totale des chromosomes sub-télocentrique et télocentrique. Selon Stebbins, (1971), les caryotypes qui sont constitué de chromosomes homogènes de même type, sont primitifs ou traditionnels, n'ont pas subi de mutation et ont conservé la totalité de leur génome. Tandis que l'étude cytogénétique des variétés d'olivier cultivés en Europe par l'hybridation in situ en fluorescence (FISH), a montré que les chromosomes ont subi des réarrangements, révélés par les profils d'hybridations, cependant leurs génomes ont subi de fortes modifications exprimées par la perte d'une quantité importante de l'information génétique (Minelli et al., 2000).

L'analyse des chromosomes dans les cellules mères des grains de pollens (CMP) a révélé que l'appariement des chromosomes en Prophase I est uniquement en bivalents (droit et en anneau). Certaines cellules montrent en outre une anomalie qui est la présence de ponts de chromatine, les autres anomalies de la méiose ne sont pas observées, ce qui rend la méiose régulière chez cette variété étudiée. A travers une étude de la méiose de variétés d'olivier issues de l'Iran, plusieurs anomalies ont été détectées, tels que les chromosomes retardataires et les divisions asynchrones ce qui traduit la méiose irrégulière (Sheidai et al, 2008).

Conclusion

La grande importance de l'olivier (*Olea europaea* L.) var Chemlal dans l'alimentation a suscité l'utilisation de nouvelles techniques biotechnologiques qui constituent actuellement d'importantes voies pour la multiplication et l'amélioration génétique des espèces végétales, en particulier de l'olivier variété Chemlal, qui est considérée la principale variété à huile cultivée essentiellement en grande Kabylie pour son huile d'excellente qualité.

Les résultats obtenus dans notre étude montrent que le milieu MS (Murashige et Skoog, 1962) présente un taux de régénération élevé. En effet, la germination et la croissance sont assurées par la présence de tous les sels minéraux, plus précisément les éléments de N, K⁺ et P.

L'étude cytogénétique, effectuée sur les méristèmes racinaires et les jeunes boutons floraux, afin d'étudier respectivement, les mitoses somatiques et les méiose polliniques, de l'olivier (*Olea europaea* L.) var. Chemlal échantillonnés dans la région de la Kabylie, nous a permis de déterminer un nombre chromosomique diploïde ($2n=2x=46$), le caryotype primitif et la méiose régulière pour cette variété locale.

Sur la base de la caractérisation des caryotypes et des caryogrammes par les différents paramètres caryométriques cette variété est caractérisée par un génome primitif, ayant des chromosomes moins évolués qui n'ont pas subi de réarrangements, ce qui leur permet de conserver la totalité de l'information génétique tels que les gènes d'intérêt. Cette variété constitue un potentiel très important dans l'amélioration des cultivars modernes d'olivier par le transfert de gènes de résistance à certaines maladies et aux contraintes environnementales.

En perspectives, pour une meilleure caractérisation génétique il faut établir des programmes de conservation de la biodiversité notamment de cette variété, il serait préférable d'utiliser, pour les travaux ultérieurs, d'autres techniques qui seront plus efficaces, tel que :

- d'élargir l'échantillonnage à d'autres individus et à différentes localités.
- d'ajouter des phytohormones comme la Gibbérélline(GA₃) qui permet d'accélérer la germination.
- d'utiliser des techniques appropriées tel que la cytogénétique moléculaire (l'hybridation in situ, FIH, GIH etc.) qui nous permet de construire la carte physique chromosomique des gènes d'intérêt.
- de tenter d'identifier des marqueurs moléculaires (RFLP, RAPD, ISSR...) de la variété étudiée afin d'évaluer la diversité génétique au sein des individus de cette variété.

Références bibliographiques

- ALBERT M., JEAN F. (2009).** Biologie de la cellule, 4ème édition.
- ATTA R. (2008).** Composantes cellulaires et moléculaires de la régénération des méristèmes caulinaires chez *Arabidopsis thaliana* L. (heynh). Thèse de doctorat de l'Université Pierre et Marie Curie (Paris VI), Pp : 3-33.
- ANGINOT P., ISLER F. (2003).** L'olive de l'arbre à la table. Ed. Libris. France, Pp : 44.
- ANGEBERT C., BELHASSAN I., BRAINCON A. (2001).** Quelle est l'influence de la composition chimique du milieu sur la croissance des racines des plantes ?. www.TPE.htm.com.
- ARGENSON C., RÉGIS S., JOURDAIN J.M., VAYESS P. (1999).** L'olivier. Ctifl. Paris, 204 pages.
- AUGE R., BEAUCHESNES G., BOCCON-GIBOD J., DECOURTYE B., DIGAT B., JALOUZOT R., MINIER R., MORAND J-Cl., REYNORD J.P., STRULLU D.G., VIDALIE H. (1989).** La culture in vitro et ses applications horticoles. Ed. Lavoisier, Pp: 1,3.
- BENSEMMANE A. (2009).** Développement du secteur de l'huile d'olive en Algérie. 1^{er} forum Méditerranéen de l'oléiculture. Alger. Doc. N°4, Pp:23.
- BESNARD G., GARCIA-VERDUGO C., RUBIO DE CSAS R., TREIER UA., VRGAS P. (2008).** Polyploidy in the Olive Complex (*Olea europaea*): Evidence from Flow Cytometry and Nuclear Microsatellite Analyses. *Annals of Botany*. 101(1),Pp: 25,30.
- BERNIE G., FORRESTER S., GREY D. (2006).** Botanica Encyclopédie de botanique et d'horticulture plus de 1000 plants du monde entier .Ed.Place victores 1020 P.
- BAALI-CHERIF D., BESNARD G.(2005).** High genetic diversity and clonal growth in relict populations of *Olea europaea* subsp. *laperrinei* (Oleaceae) from Hoggar. Algeria. *Annals of Botany*. 96,Pp: 823,830.
- BRETON C. (2006).** Reconstruction de l'histoire de l'olivier et de son processus de domestication, Thèse de doctorat. Paris.
- BRETON C., MENDIL F., PINATEL C., BERVILLE A. (2006).** De l'olivier à l'oléastre. Origine et domestication de *Olea europaea*. L. Dans le bassin méditerranéen, Cahiers agricoles. Vol.15 n°4, Pp : 329, 336.
- BITONTI MB., COZZA R., CHIAPPETTA A., CONTENTO A., MINELLI S., CECCARELLI M.(1999).** Amount and organization of the heterochromatin in *Olea europaea* and related species. *Heredity*. 83,Pp: 188,195.
- BOXUS P. (1995).** Multiplication végétative, micropropagation et embryogenèse somatique in Biotechnologies végétales. Bv 93. Ed. Cned. Aupelf-Uref 191p.

BORNMUN CH. (1983). Possibilities and constraints in the regeneration of trees from cotyledonary needles of *Picea abies* in vitro. *Physiol. Plant.*57,Pp: 5,16.

CALLEN D F. (2005). FBXO31 is the chromosome. *Cancer Res* 65,Pp: 11304, 11313.

COLLET G F., LÊ C L . (1988).Micropropagation de porte-greffes de pommier et de poirier .Enracinement in vitro de *Pyrus malus* L.(M25,26,27,MM106 ,M9 type jork) et *Cydonia oblonga* Mill.(A) .Revue suisse Vitic .Arboric ,Hortic .Vol 20(2), Pp :131, 138.

DAVID HK., ISEMUKALI K., DAVID A. (1978). Obtention de plants de pin maritime (*Pinus pinaster* Soland) à partir de brachyblastes ou d'apex caulinaire de très jeunes sujets cultivés in-vitro.C.R. Acad . Sci. 287,Pp : 245, 248 .

ENNAJEH M. (2008).L'olivier (*Olea europea* L.) et la sécheresse, Comportement écophysiological et mécanismes d'adaptation. Thèse de doctorat .Université Tunis El Manar.Gabès (Tunisie) .Pp:12-13.

GUIGNARD J.L. (2004). Abrégé, botanique, systématique moléculaire. Paris 12^{ème} .Ed. Masson, Pp : 209, 228.

GREEN PS., WICKENS GE. (1989). The *Olea europaea* complex. In: Tan K, Mill RR, Elias TS, editors. The Davis and Hedge Festschrift. Edinburgh: Edinburgh University Press, Pp: 287, 299.

GORENFLOT R., RAICU P. (1980). Cytogénétique et évolution. Paris : Masson.

GAUTHERET R.J. (1977). La culture des tissus et des cellules des végétaux. Ed. Masson S.A. Paris 6^{ème} , Pp: 20, 30.

HEBBERT E. (1988). Génétique : cours, exercices et annales corrigées. Atlan :Eds, R.

JAHIER J., CHEVRE AM., DELOURME R., EBER F., TANGAY AM. (1992). Techniques de cytogénétiques végétales .Alger : INRA éditions, p 5, 6,184.

LÊ C L., Thomas D., NOWBUTH L . (2002).Conservation des Pommes de terre in vitro et caractérisation des variétés cultivées en suisse. Suisse Agric 34(3), Pp:133,136.

LEVIN DA. (2000). The origin, expansion, and demise of plant species. Oxford University Press, New York, New York, USA.

LAVEE S., NAVERO D.B., BONGI G., JARDAK T., LOUSSERT R., MARTIN G.C., TRIGUI A. (1997).Encyclopédie mondiale de l'olivier. 1^{ère} Ed. COI.MADRID (Espagne), Pp: 61-62.

LOUSSERT R., BROUSSE G. (1987).L'olivier, Techniques agricoles et productions méditerranéennes. Ed.G.P.Maisonneuve et Larose. Paris ,Pp : 1-2,51-52,59-60,63-64,94-95.

MUJEEB-KAZI A., ALVINA G., FAROOQ M., ASHRAF M. (2007). cytogenetics of some triticum aestivum and t. turgidum × aegilops variabilis intergeneric hybrids and their derived amphiploids. pak.jor.bot. 39(2),Pp: 415, 420.

MINELLI S., MAGGINI F., GELATI MT., ANGIOLILLO A., CIONINI PG. (2000). The chromosome complement of *Olea europaea*L.: characterization by differential staining of the chromatin and *in-situ* hybridization of highly repeated DNA sequences. Chromosome Research. 8, Pp: 615,619.

MARGARA J. (1989).Bases de multiplication végétative : Les méristèmes et l'organogenèse. Ed.INRA. Paris 262p.

MARGARA J. (1978). Mise au point d'une gamme de milieux minéraux pour les conditions de la culture in-vitro.C.R.Acad. Sci.8,Pp : 654,661 .

POLESE J M. (2009). Olivier pas à pas. Ed. Édisud, Aix-en-provence, Pp:9,11.

SHEIDAI M., PARSIAN H., VAEZI-JOZE S., NOORMOHMADI Z. (2008). Chromosome Pairing and Chiasma Formation in Some Olive (*Olea europaea* L.) Cultivars of Iran. Cytologia. 73 (3),Pp: 269,274.

SIBI M. (1981). Hérité de variants épigéniques obtenus par culture des tissus in vitro chez les végétaux supérieurs .Thèse Doct. ès Sci ; Univ Paris Sud, Orsay, 280 p.

STEBBINS, GL.(1971). Chromosomal evolution in higher plants. Ed Arnold. London, 216p.

TRAD RAIS M., SIFI S., XANTHOULIS. (2008). Valorisation des eaux usées traitées pour l'irrigation de complément de l'olivier (*olea europea* L.). Effets sur les comportements végétatif et productif de l'arbre et sur la qualité sanitaire des fruits Symposium international « agriculture durable en régions méditerranéennes ». Agdumed. Rabat (Maroc).Pp, 142,155.

TÉOULÉ E. (1993). Biotechnologie et Amélioration des plantes in Biotechnologie Seriban R. Ed TEC &DOC ,Pp : 565, 589.

VASIL A.J.K., DANIEL M.C., CONGER B.V. (2008).Ultrastructural analysis of somatic embryo initiation. Developement and polarity establishment from mesophyll cells of (*Dactylis Glomerata*). In-vitro cellular and developmental Biology plant V 36.

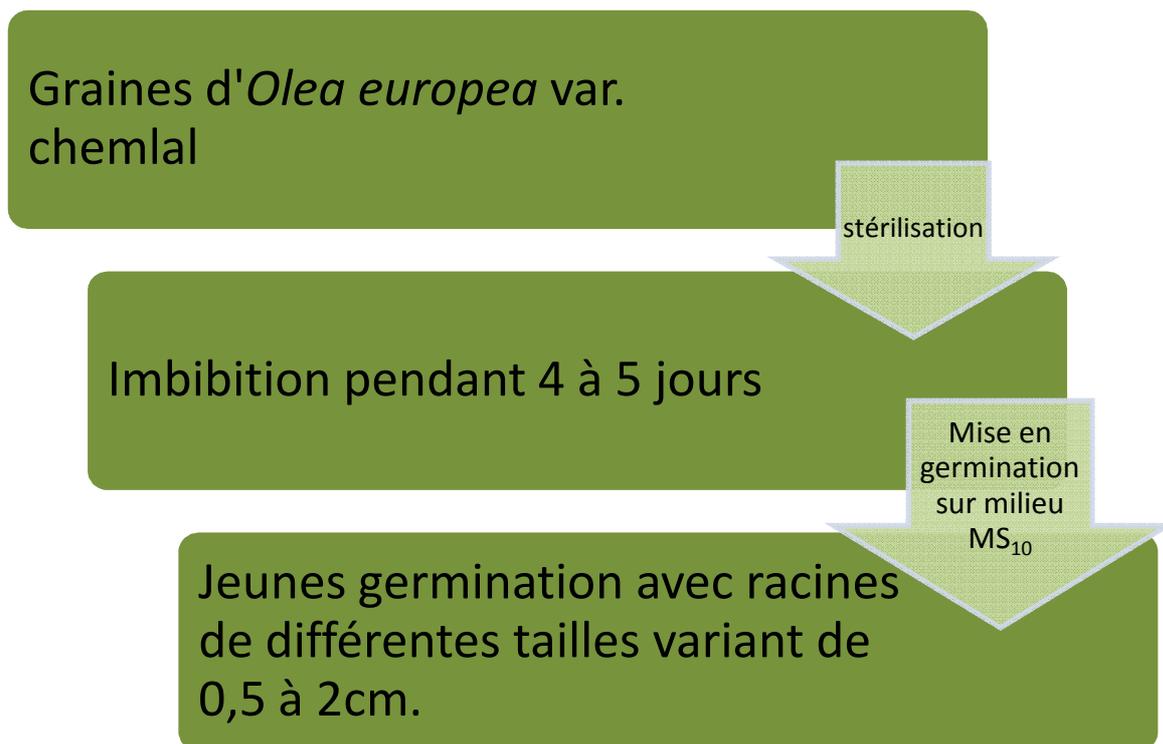
YAKOUB-BOUGDAL S. (2005). Morphogenèse in vitro du palmier dattier (*Phoenix dactylifera* L.) et de l'olivier (*Olea europea* L.) var Chemlal. Thèse de doctorat d'état : Biologie végétale. Université Mouloud Mammeri. Tizi Ouzou, Pp : 190.

YAKOUB-BOUGDAL S., SEMADI A., HAMLAT M., LOUERGUIOUI A., BONALY J.(2000). Rhizogenèse et microboutures de l'olivier (*Olea europea* L.) var Chemlal. Sciences et technologie, N 14, Pp : 129-133.

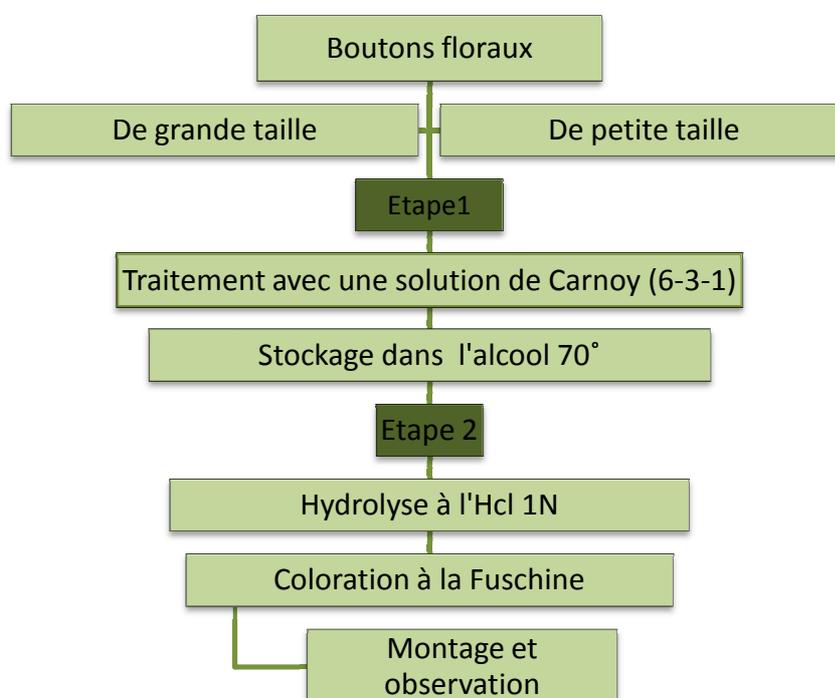
YAKOUB-BOUGDAL S., HAMLAT M., BONALY J.(1998). Potentialités organogènes des embryons d'olivier (*Oles europea* L. Var Chemlal). Sciences et technologie, N 9, Pp :89-92.

YAKOUB-BOUGDAL S. (1984). Etude des radiations rouges sur des méristèmes et sur des embryons en culture in-vitro chez la Palmier dattier (*Phoenix dactylifera* L.). Approches quantitatives. D.E.A. Université Pierre et marie curie (Paris VI), Pp: 58.

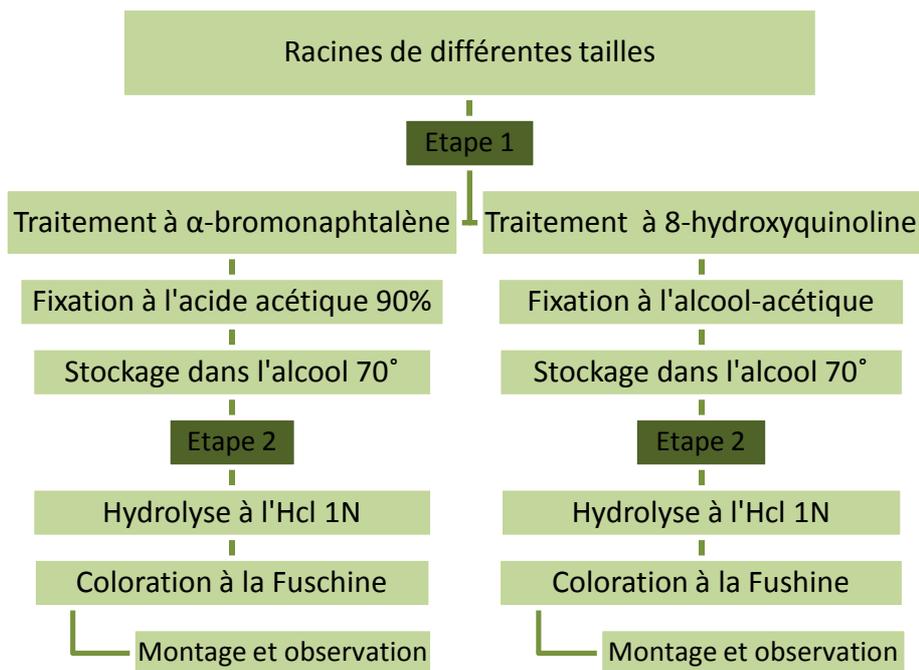
ZRYD J.P. (1988). Culture des cellules, Tissus et Organes Végétaux. Ed. Press. Polytechniques Romandes .Suisse, 308p.



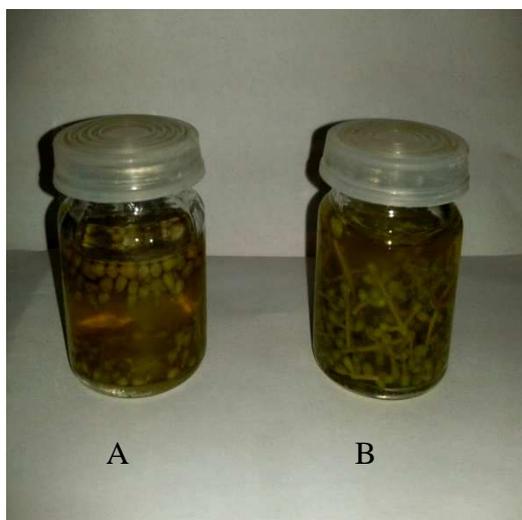
Annexe 1 : Schéma présentant les différentes étapes du protocole expérimental de la CIV.



Annexe 2: Protocole des différentes étapes de l'étude de la méiose.



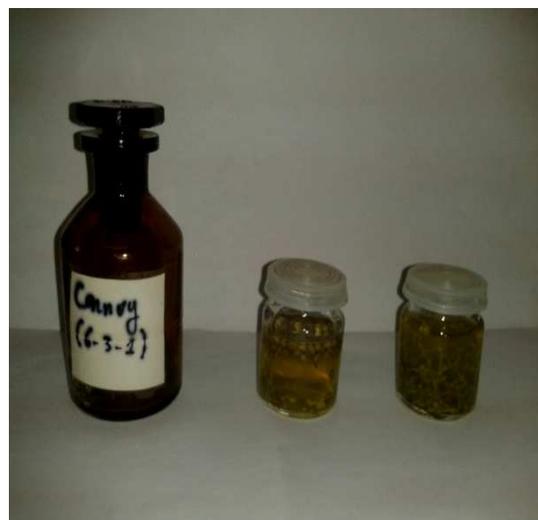
Annexe 3: Protocole des différentes étapes de l'étude de la mitose.



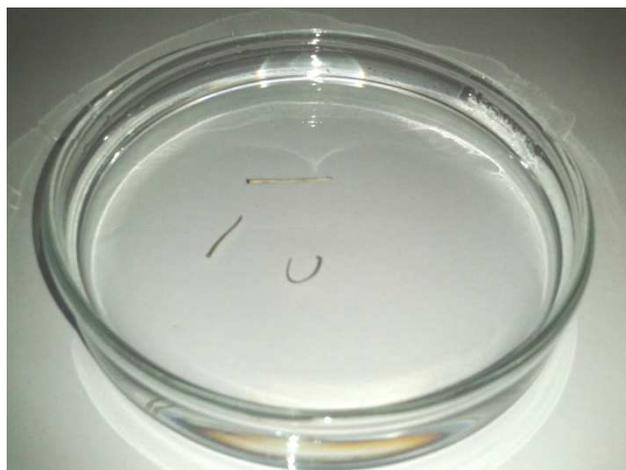
Annexe 4 : Boutons floraux.

A : De grande taille.

B : De petite taille.



Annexe 5 : Traitement avec le Carnoy (6/3/1).



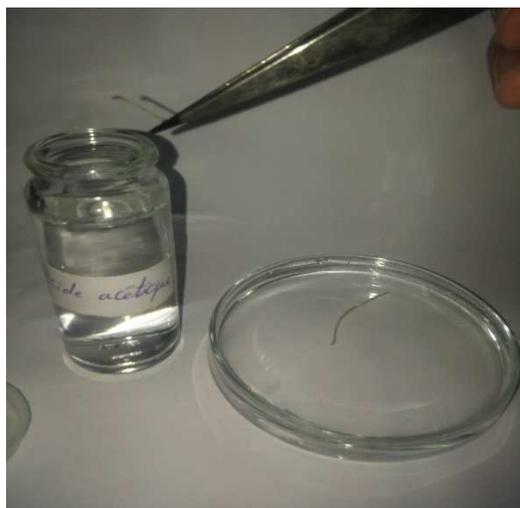
Annexe 6 : Rinçage des racines avant traitement.



Annexe 7: Solution de α -bromonaphtalène.



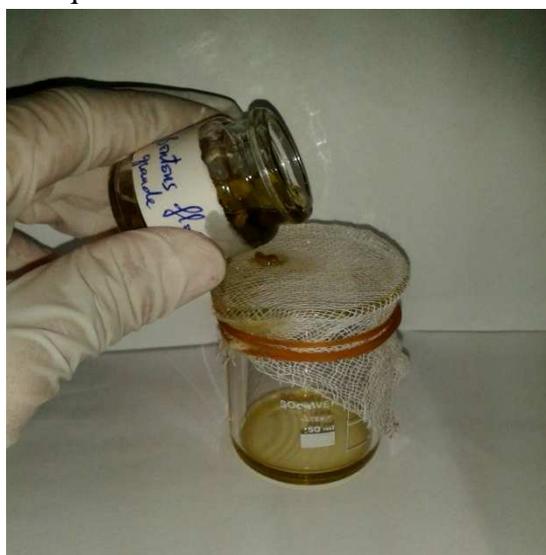
Annexe 8: Traitement des racines avec le
8-hydroxyquinoline



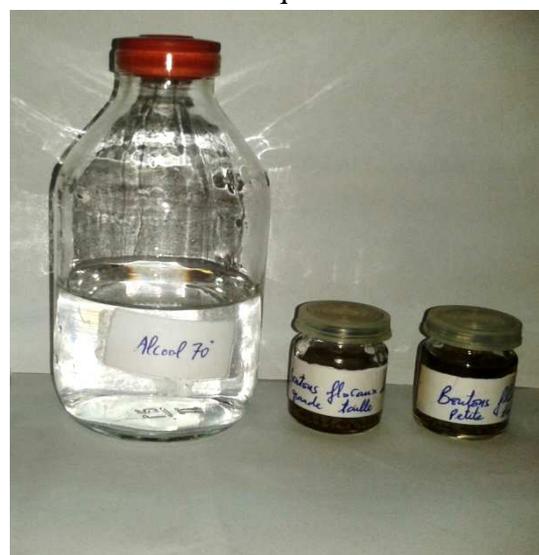
Annexe 9 : Fixation des racines dans l'acide acétique



Annexe 10 : Fixation des racines dans l'alcool acétique .



Annexe 11: Filtrage des boutons floraux



Annexe 12 : Stockage des boutons floraux dans l'alcool 70°.



Annexe 13 : Stockage des racines dans l'alcool 70°.



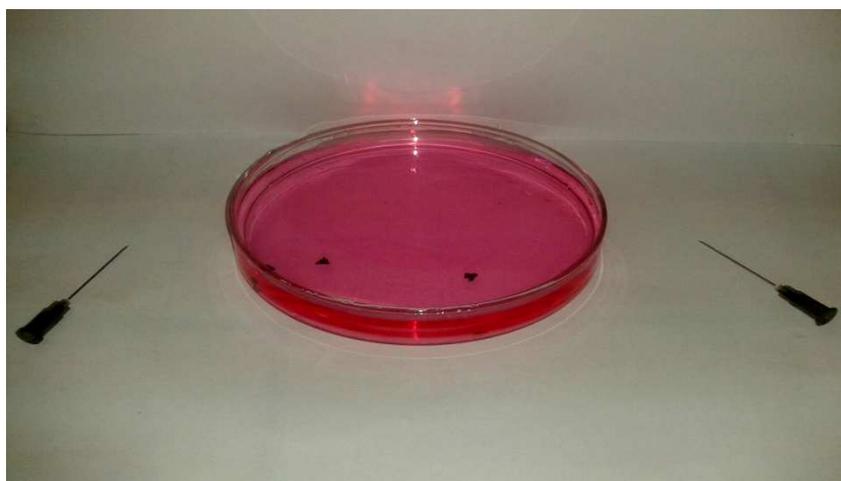
Annexe 14 : Introduction des racines dans de l'HCl 1N.



Annexe 15 : Hydrolyse des racines au bain-marie.



Annexe 16 : Introduction des racines dans des tubes eppendorf contenant de la Fushine .



Annexe 17 : Rinçage des boutons floraux .



Annexe 18 : Rinçage des racines



Annexe 19: Réalisation de la technique du squasch à l'aide d'une allumette.

Résumé

L'olivier (*Olea europea* L.), un arbre connu et utilisé depuis l'antiquité. Il paraît avoir été l'un des premiers arbres cultivés par l'homme. Malheureusement, sa production est menacée de temps à autre par des facteurs climatiques (pluviosité insuffisante, les maladies d'une manière générale et les viroses en particulier ainsi que les maladies bactériennes et les insectes). La biotechnologie avec ces nombreux outils tels que la culture in-vitro offrent une alternative pour la revalorisation de cette espèce. L'usage de technique de régénération d'une plantule à partir d'un embryon d'olivier ensemencé sur le milieu MS (Murashige et Skoog, 1962) montre des résultats bien définis d'une germination rapide et conforme. Nos travaux expérimentaux réalisés dans le Laboratoire de culture in-vitro, situé au complexe Biomédical, Faculté de médecine, Université Mouloud Mammeri de Tizi-Ouzou sous la direction de Professeur Yakoub-Bougdal S., consistent à régénérer in-vitro l'olivier (*Olea europea* L.) var Chemlal à partir de la mise en germination des embryons sur le milieu MS (Murashige et Skoog, 1962).

Dans le cadre de la caractérisation cytogénétique, quelques échantillons de cette variété sont analysés par l'étude des mitoses somatiques et les méiose polliniques. Les énumérations chromosomiques ont révélées un seul nombre majeur ($2n=2x=46$). L'analyse caryologique des plaques métaphasiques, montre que cette espèce est caractérisée par un caryotype primitif (traditionnel) avec une abondance de chromosomes métacentriques. Les appariements chromosomiques au stade diacinèse (Prophase I), montrent que la méiose est régulière avec la présence uniquement des bivalents et l'absence d'anomalies tel que les univalents et les chromosomes retardataires. Les résultats obtenus au cours de ce travail, montrent l'intérêt de l'étude cytogénétique et caryologique dans l'évaluation et la valoriser des ressources phylogénétiques des variétés traditionnelles afin d'établir les programmes d'amélioration et de sélection végétale.

Mots clés : *Olea europea*. var Chemlal- Régénération in-vitro - Caryotype – Méiose- Diversité génétique - Kabylie.

Abstract

The olive tree (*Olea europea* L.), known and used since antiquity. It appears to have been one of the first trees grown by man. Unfortunately, his production is threatened from time to time by climatic factors (poor rainfall, diseases in general and particularly viral and bacterial diseases and insects). Biotchnologie with the many tools such as in-vitro culture offer an alternative to the revaluation of this species. The use of a seedling regeneration technique from an olive tree planted embryo on MS medium (Murashige and Skoog, 1962) shows a well defined and consistent fast germination results. Our experimental work in the laboratory culture in-vitro complex located in Biomedicine, University Mouloud Mammeri Tizi-Ouzou under the direction of Professor S. Yakoub-Bougdal, are to regenerate in vitro olive var. *Chemlal* from the germination of embryos on MS medium. As part of the cytogenetic characterization, some samples of this variety are analyzed by the study of somatic mitosis and meiosis pollen. Chromosomal enumerations have revealed one major number ($2n = 2x = 46$). The karyological analysis of metaphase plates shows that this species is characterized by a primitive karyotype with an abundance of metacentrics. The chromosome pairing at diakinesis (prophase I) show that meiosis is regular with only the presence of divalent and the absence of defects such as the univalent and lagging chromosomes. The results obtained in this work show the interest of the cytogenetics and karyological in assessing and valuing of plant genetic resources of traditional varieties to establish improvements and plant breeding programs.

Keywords : *Olea europea* L. var. *Chemlal* - Regeneration in vitro - Karyotype – Meiose - Genetic diversity - Kabylia.