

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

UNIVERSITE MOULOUD MAMMERI DE TIZI-OUZOU
FACULTE DES SCIENCES BIOLOGIQUES ET DES SCIENCES AGRONOMIQUES
DEPARTEMENT DE BIOLOGIE ANIMALE ET VEGETALE



MEMOIRE DE MAGISTER

Spécialité : Biologie et écologie des populations et des communautés

Option : Interaction plantes-environnement

Présenté par :

M^{elle} : BENMAZARI Nadjat

**« Recherche des conditions adéquates pour la
micropropagation du cyprès du Tassili *Cupressus
dupreziana* A. CAMUS et étude préliminaire
des mycorhizes »**

Devant le jury :

M ^r KHELLOUCHE A.	Professeur	UMMTO	Président
M ^{me} YAKOUB-BOUGDAL S.	Professeur	UMMTO	Rapporteur
M ^{me} FORTAS Z.	Professeur	USTO	Examinatrice
M ^r Lourguioui A.	Maître de conférences	UMBB	Examineur
M ^{me} BOUHIREL L.	Chargée de cours	USTHB	Invitée

Remerciements

Mes remerciements sont d'abord destinés à ma promotrice **Madame YAKOUB-BOUGDAL S.**, Professeur à au département de biologie de l'Université de Tizi-Ouzou, de m'avoir fait confiance et accueillie dans son laboratoire. Je tiens à la remercier vivement pour toute l'attention qu'elle a portée à ce travail. Je ne saurais bien sur oublier de lui assurer ma gratitude pour m'avoir accompagnée sur ce chemin, de m'avoir guidée et enseignée le réflexes du bon chercheur. Mille mercis.

Je tiens à exprimer ma profonde reconnaissance à ma co-promotrice **Madame BOUHIREDL.** chargée de cours au département de Biologie de l'U.S.T.H.B pour m'avoir accueillie dans son laboratoire et chez elle, et d'avoir mis à ma disposition tous les moyens nécessaires pour la réalisation et la réussite de ce travail, de m'avoir accordé sa confiance et m'avoir guidée dans mes réflexions scientifiques tout au long de ce travail. Soyez assurée de ma profonde gratitude.

Je veux aussi adresser ma profonde reconnaissance aux membres du jury pour avoir accepté de consacrer leurs temps à l'examen de ce travail :

- A Monsieur **KELLOUCHE A.** Professeur à l'université de Tizi-ouzou, d'avoir accepté de présider ce jury et pour m'avoir fait l'honneur d'être membre du jury.
- A madame **FORTAS Z.** Professeur à l'université d'Oran, d'avoir accepté d'évaluer ce travail, et pour m'avoir fait l'honneur d'être membre du jury.
- A Monsieur **Lourguioui A.** Maître de conférences à l'université de Bouira, d'avoir accepté d'évaluer ce travail, et pour m'avoir fait l'honneur d'être membre du jury.

Je ne serais oublié, **Mr ALLILI N.** chargé de cours au département d'agronomie de l'université U.M.M.TO. pour son aide à la réalisation de la partie analyse statistique, sa disponibilité toute au long de la réalisation de ce travail, ces orientations et ces précieux conseils, qui il trouve en ces lignes le témoignage de mon grand respect et mes sincères remerciements.

Je tiens à remercier **Mme TALEB-TOUDERT K.** chargée de cours au département de biologie de l'université U.M.M.TO. pour sa rigueur scientifique et ses qualités humaines ainsi que ces conseils didactiques, ces nombreux encouragements et d'être toujours présente pour m'apporter son soutien moral et technique toute au long de la réalisation de ce travail.

Mes plus sincères remerciements s'adressent aussi à l'équipe de laboratoire de recherche de LRZDA, pour nous avoir ouvert les portes de leurs laboratoires en particulier **Mme BOUHIRED** et les deux ingénieurs de laboratoire **Mme NAILA**, **Mme KARIMA** pour leurs aides et disponibilités.

Sans oublier tout le personnel de recherche de L'I.N.R.F de Beraki et de Bainemsurtout **Mme LINDA** ; **Mme HAMIDA** ; **Mme SOUHILA** ; **Mme SAHLI** pour leurs aides.

Je remercie toutes les personnes qui m'ont aidée au cours de ce travail, réalisé au niveau des deux laboratoires de recherche : culture *in vitro* de Tizi-ouzou et LRZDA, en particulier **Mme BENSADOUK K** ; **Mr IRZIL S** ; **Mr OUSSAIDENE A** ; **Mr OUCHENE** ; **Mme DJEBLI F** ; **Mme BECHAR** ; **Mme FARIDA** ; **Mme BOUAZIZ- YAHYATENE H** ; **Mr GHOBRI D** ; **Mr AIBOUD K** ; **Mme KHOMERI L**, pour leur collaboration, leurs conseils et leur encouragement m'ont été très profitables et ont puissamment contribué à mener à bien cette étude.

Liste des abréviations

AIB	Acide indole butyrique
ANA	Acidanaphthalène acétique
BAP	6-benzylaminopurine
CM	Champignon mycorhizogène à arbuscule
CM	Carré moyen
CV_R	Coefficient de variation résiduelle
ddl	degré de liberté
DKW	Driver et Kuniyuki
DSE	Dark septa endophyte
EFSE	Endophytes foncé septa
Fobs	Fonction observée
Fthé	Fonction théorique
GA	Gamborg
HgCl₂	Bichlorure mercure
I.N.R.F	Institut National de la recherche Forestière
MA	Mycorhizes arbusculaires
MS	Murashige et Skoog
MS/2	Murashige et Skoog dilué
NaCl₂	Hypochlorite de Calcium
SCE	Somme des carrés des écarts
U.I.C.N	Union internationale de la conservation de la nature
U.V	Ultraviolet

Liste des tableaux	<u>Page</u> <u>age</u>
Tableau 1. Position systématique de cyprès du Tassili dupreziana. 2004).....	5
Tableau 2. Récapitulatif de quelques travaux de recherches en culture <i>in vitro</i> et de bouturage du Cyprès du Tassili utilisant la micropropagation.....	14
Tableau 3. Composition des milieux de culture testé en (mg/l).....	29
Tableau 4. Effet de l'agent désinfectant sur le développement des microboutures.....	39
Tableau 5. Le nombre d'élongation et de débourrement des deux types de microboutures ensemencées sur MS additionné de 0.4 (mg/l) de BAP.....	47
Tableau 6. Taux moyens de reprise par condition expérimentale.....	53
Tableau 7. Tableau d'analyse de la variance des taux de reprise.....	54
Tableau 8. Comparaison des hormones et de la taille des microboutures.....	55
Tableau 9. Relation entre l'élongation (x) et le débourrement (y).....	56

Liste des figures	page
Figure 1. Aire de distribution du cyprès de tassili.....	6
Figure 2: Cônes femelles du Cyprès de Tassili.....	8
Figure 3: La graine du cyprès Tassili.....	8
Figure 4 : Les strobiles mâles sont prêts à libérer le pollen (Flickr, 2004).....	8
Figure 5 : La structure, type de phyllotaxie et architecture de cyprès de Duprez.....	9
Figure 6 : Unité architecturale du Cyprès de tassil.....	10
Figure 7: Coupe transversale d'une ectomycorhize du sapin baumier	16
Figure 8 : Une ectendomycorhize formée par racine de <i>Larixsp</i> et le champignon E-strain.....	17
Figure 9 : Proposition du schéma général de la taxonomie des CMA classés dans le phylum des Glomeromycota, basée sur les séquences nucléotidiques du gène de la sous-unité ribosomale. Les 4 ordres de ce phylum sont montrés	18
Figure 10: Représentation schématique d'une MA	19
Figure 11 : (A)- type Arum : hyphe intercellulaire et arbuscule ; (B)-type Arum : formation d'une paire d'arbuscules dans deux cellules adjacentes. (C)- type Paris : formation d'enroulement d'hyphe et d'arbuscules intracellulaire ;(D)- type mixte Arum et Paris.....	20
Figure 12 : A)- Formation d'un sclérote dans une cellule du parenchyme corticale racinaire. B)- hyphes hyalins septés et hyphes mélanisésseptés d'endophyte présentant des exsudats racinaires.....	26
Figure 13 : Représentation de différents sites d'échantillonnage du Cyprès de Tassili.....	34
Figure 14 : Effet des milieux de culture sur le débourrement des microboutures adultes du cyprès du tassili <i>Cupressus dupreziana</i> A. Camus.....	40
Figure 15: Effet des milieux de culture sur le débourrement des microboutures issues de pieds juvéniles.....	42
Figure 16 : Effet de la balance hormonale 0,01(mg/l) d'AIB + 1 (mg/l) de BAP sur le développement des microbourures.....	44
Figure n°17: Développement des microboutures avec deux ramifications (2R) et plusieurs ramifications (PR) sur le MS à 0.4 (mg/l) BAP.....	49

Liste des planches page

Planche I: Comportement des microboutures du cyprès de tassili issues de pieds adultes, à 3 mois de culture sur les milieux MS, MS/2 et GA.....	41
Planche II: Comportement des microboutures juvéniles du cyprès du tassili après deux mois de culture.....	43
Planche III : Microboutures du cyprès du Tassili à deux ramifications ensemencées sur le MS additionné de 0.01 mg/l AIB + 1mg/l BAP.....	48
Planche VI : Microboutures du cyprès du Tassili à deux ramifications ensemencées sur le milieu MS à 0.4 mg /l de BAP.....	50
Planche V : Microboutures du cyprès du Tassili à plusieurs ramifications ensemencées sur milieu MS additionné de 0.4 mg/l de BAP.....	51
Planche VI : Organisation du système racinaire et recherche d'ectomycorhizes du cyprès de tassili <i>Cupressus dupreziana</i> A. Camus.....	66
Planche VII : Histo-anatomie de différentes coupes transversales de racines du <i>Cupressus dupreziana</i> A. Camus.....	67
Planche VIII : Histo-anatomie de différentes coupes transversales Et longitudinales de racines du <i>Cupressus dupreziana</i> A. Camus.....	68
Planche IX : Coupes Histo-anatomiques transversales et longitudinales de racines du <i>Cupressus dupreziana</i> A. Camus.....	69
Planche X : Coupes Histo-anatomiques et fragments racinaires écrasés.....	70
Planche XI : Fragments racinaires écrasés.....	71
Planche XII : Propagules isolées de la mycorrhizosphère des plantules du cyprès du tassili <i>Cupressusdupreziana</i> A. Camus	72
Planche XIII : Propagules isolées de la mycorrhizosphère du cyprès du tassili <i>Cupressusdupreziana</i> A. Camus.....	73

TABLE DES MATIERES	Page
DEDICACES.....	i
REMERCIEMENT	ii
RESUME.....	iii
LISTE DES ABREVIATIONS.....	iv
LISTE DES TABLEAUX	v
LISTE DES FIGURES.....	vi
LISTES DES PLANCHES.....	vii
TABLE DES MATIERES.....	viii
 INTRODUCTION GENERALE.....	 1
 CHAPITRE I : SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE	
1- HISTORIQUE DU CYPRES DE TASSILI.....	3
2 - GENERALITES SUR LE CYPRES DE DUPREZ.....	4
2.1- Position Taxonomique.....	4
2.2- Origine et répartition géographique.....	4
2.3- Caractéristique morphologique.....	6
2.3.1- Les organes aériens.....	6
2.3.2- Les rameaux.....	6
2.3.3- Les ramules.....	6
2.3.4- Les feuille.....	6
2.3.5- Les cônes	6
2.3.6- Les graine.....	7
2.3.7- Le pollen.....	7
2.4- Mode de croissance, phyllotaxie et type de feuilles.....	8
2.5- Système racinaire.....	10
2.6 - Caractéristique anatomiques.....	10
2.7 - Caractéristique Génétiques.....	11
3- MODES DE PROPAGATION DU CYPRES DU TASSILI.....	11
3.1- Multiplication sexuée.....	11
3.2- Multiplication végétative.....	11
3.3- Culture in vitro du cyprès du tassili	12
3.3.1- Modalités de propagation <i>in vitro</i>	12
3.3.1.1- Micropropagation.....	13
- Culture d'embryons.....	13
- Culture de segments nodaux	13

4- LES MYCORHIZES.....	15
4.1-Définition	
4.1.1-Les ectomycorhizes.....	15
4.1.2-Les ectendomycorhizes	
4.1.3-Les mycorhizes	
arbusculaires.....	174.1.3.1- Le cycle de
développement des CMA et formation de la mycorhize....	21
4.2- Rôle des mycorhizes dans la nutrition et la protection de la plante.....	22
4.3- Rôle des mycorhizes dans l'évolution des écosystèmes.....	24
4.4- Les mycorhizes et l'agriculture.....	25
5- LES ENDOPHYTES	25
CHAPITRE II- MATERIEL ET METHODES	
I-CULTURE IN VITRO	
1.MATERIEL VEGETAL.....	271.1-
Provenance du Matériel végétal	27
1.2- Types d'explants utilisés.....	27
2-DESINFECTION DU MATERIEL VEGETAL.....	272.1-
Techniques à base de bichlorure mercurique.....	27
2.2- Technique à base d'hypochlorite de sodium.....	27
3- MILIEUX DE CULTURE	28
3.1- Les milieux de cultures testés.....	28
3.2- Régulateurs de croissances utilisés.....	28
3.3-Stérilisation des milieux de culture.....	30
4- CONDITION DE CULTURE.....	30
5- ANALYSE STATISTIQUE.....	31
II-ETUDE DES MYCORHIZES	
1-DESCRIPTION DES STATIONS D'ETUDES DE L'INRF.....	33
2- METHODES DE PRELEVEMENT.....	34
3- MANIPULATION AU LABORATOIRE.....	35
4- COLORATION DES RACINES	
4.1-Technique de coloration au bleu de trypan.....	35
4.2- Technique histologique.....	36
5- EXTRACTION PAR TAMISAGE HUMIDE DES SPORES A PARTIR DU SOL..	37

CHAPITRE III : RESULTATS ET DISCUSSION

Partie I: CULTURE *IN VITRO*

1-Effet de la technique de désinfection.....	39
2- Influence des milieux de culture.....	40
2.1-Microboutures provenant d'arbres adultes.....	40
2.2- Microboutures provenant du matériel juvénile.....	42
3-Influence des balances hormonales et la taille de la microbouture.....	46
3.1- Réponses des microboutures à deux ramifications ensemencées sur milieu MS additionné de 0.01 (mg/l) d'AIB + 1 (mg/l) de BAP.....	46
3.2- Réponses des microboutures à plusieurs ramifications ensemencées sur milieu MS - Des microboutures à deux ramifications.....	47
- Des microboutures à plusieurs ramifications	47
4-Analyse statistique.....	53
4.1-Taux de réussite.....	53
4.2- Analyse de la variance.....	54
4. 3- Comparaison entre les milieux MS/2 et DKW	55
4.4- Effet des hormones et de la taille de la microbouture	55
4.5- Relation entre le nombre de rameau allongés et le bourgeonnement	56

Partie II: LES MYCORHIZES

1-Morphologie racinaire.....	57
2- Coupes histologiques.....	59
3- Observation et mise en évidence de l'infection mycorhizienne à arbuscules.....	60
3.1- Dans les coupes histologiques.....	60
3.2- Dans les fragments racinaires écrasés.....	60
4- Récolte du matériels fongique se trouvent dans la mycorhizosphère du cyprès du tassili.....	63

- CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES	74
---	----

-REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	76
-----------------------------------	----

INTRODUCTION

Le cyprès de tassili *Cupressus dupreziana* A.CAMUS est un résineux, appartenant à la famille des cupressaceae espèce originaire des régions endémiques du Tassili N'Ajjer. Actuellement ce résineux est en danger d'extinction, classé par l'U.I.C.N (Union internationale de la conservation de la nature) parmi les 12 espèces les plus menacées d'extinction. En effet, cette espèce résineuse, très résistante à la sécheresse connaît un dépérissement des plus rapides, on trouve 233 individus dans son aire d'origine (Abdoun, 1999). Ce conifère, considéré comme patrimoine national, reflète l'histoire de l'évolution des écosystèmes et du climat en région méditerranéenne en général et au Sahara central dans l'extrême sud Algérien en particulier.

Les scientifiques se sont rendu compte de l'érosion que subit cette espèce et des problèmes qu'elle rencontre dans son aire d'origine, essentiellement dû à l'action anthropique, au dysfonctionnement de son système reproducteur et au nombre très réduit de graines viables récoltées sur place (Lavauden 1926, Sayoud 1990, Pichot 2000, Abdoun et Dalichaouche 2001). En conséquence, ils ont opté pour la plantation ex-situ pour pallier à sa disparition et pour pouvoir l'étudier sans porter préjudice aux individus restants.

Pour faire face à ces différentes contraintes d'ordre anthropique et génique, la mise au point d'une technique moderne de production de plants s'avère une nécessité inéluctable pour le développement de la culture du cyprès de tassili. Les stratégies de sa propagation se sont donc orientées vers la technique de culture *in-vitro* des segments nodaux (microboutures), suite aux problèmes rencontrés dans notre laboratoire, en ce qui concerne la phase juvénile (embryons isolés) (Sayoud, 1990).

Outre la culture in-vitro, la mycorhization représente une alternative pour essayer de solutionner les problèmes auxquels est confronté le *Cupressus dupreziana* A.CAMUS.

En effet l'étude des mycorhizes du cyprès de tassili n'a jamais été abordée jusqu'à nos jours. Contrairement à celles effectuées sur deux autres espèces de cyprès, les *Cupressus sempervirens* (Chaffi, 1992) et *atlantica* (Duponnois *et al.* 2002, Ouahmane *et al.* 2007), chez lesquelles il a été mis en évidence de façon définitive la présence de mycorhizes arbusculaires (MA) et la dépendance de ces espèces à ce type de symbiose.

Ainsi, nous nous sommes proposés dans un premier temps de vérifier le système racinaire des arbres des arboreta de deux stations d'étude celles de l'INRF de Baraki et de l'INRF de Baïnem et de plantules de la pépinière de cette dernière station.

Depuis le début des années 90, des travaux ont été effectués pour essayer de maîtriser la multiplication *in vitro* du cyprès de tassili (Dallichaouche 1982 ; Sayoud 1990 ; Lebtahi 2009 ; Ioussaidene et Ouchène 2009....).

La culture *in vitro* se heurte à plusieurs problèmes liés principalement : à l'établissement des cultures aseptiques et donc contaminations microbiologiques, nécrose des bourgeons (Abousalim et Mantell, 1994) et surtout obtention de la rhizogénèse et l'acclimatation des vitroplants (Chatibi 1999). Les faibles taux d'enracinement *in vitro* ainsi que l'aspect qualitatif des racines adventives produites, souvent non fonctionnelles, rendent difficiles l'acclimatation et la reprise des vitro plants lors du passage en serre.

Compte tenu des problèmes et difficultés sus évoquées, nous avons abordé ce travail avec pour objectif principal l'établissement d'un protocole de micropropagation approprié pour la production de plants de qualité de cette espèce d'une part et identifier d'autre part le ou les type(s) de mycorhizes présente (es) dans son système racinaire. Ceci aurait comme intérêt plus tard leur application dans une meilleure reprise des vitro plants non seulement au cours de leur acclimatation mais aussi au cours de leur transplantation dans la nature. Pour cela une étude morpho-anatomique est réalisé en vue de caractériser les différents partenaires fongiques impliqués. Par ailleurs une tentative d'isolement de propagules présentes dans la mycorrhizosphère de cette espèce est effectuée.

Cette thèse est donc constituée de 2 parties :

- Une partie concernant la recherche de conditions adéquates pour la micropropagation du cyprès du tassili afin d'obtenir à partir de bourgeons végétatifs des plants conformes à la plante mère. Ceci à cause des problèmes liés à la variabilité des plantules issues des graines.
- La deuxième partie concerne l'identification du ou des type(s) de mycorhize (s) vivant en symbiose avec le cyprès de tassili d'une part et tentative d'isolement des espèces fongiques impliquées d'autre part.

4- LES MYCORHIZES

4.1-Définition

Le terme mycorhize d'origine grecque signifie champignon-racine (mukēs =champignons, rhiza=racine). Ainsi une mycorhize est une association entre la racine d'une plante et un champignon filamenteux. C'est donc l'ensemble qui constitue la mycorhize (Harley et Smith 1983).

Cette association mutualiste joue un rôle prépondérant dans le fonctionnement des écosystèmes végétaux. Elle est caractérisée par un échange bidirectionnel généralement bénéfique tant pour la plante photosynthétique que pour le champignon (Jakobsen, 1995). D'une part, la mycorhize satisfait les besoins du partenaire fongique en composés carbonés synthétisés par la plante hôte photosynthétique et d'autre part, elle permet à la plante hôte de bénéficier d'une meilleure nutrition minérale grâce au réseau d'hyphes extra-radiculaires constituant la phase extra matricielle qui s'étend bien au-delà de la zone du sol explorée par les racines, (Smith et Read, 1997).

Il existe plusieurs formes d'associations mycorhiziennes distinctes selon les structures formées par les espèces fongiques impliquées. On distingue sur cette base : les ectomycorhizes, les mycorhizes arbusculaires, les mycorhizes orchidoïdes, les mycorhizes éricoïdes, les mycorhizes monotropoïdes, les ectendomycorhizes et les mycorhizes arbutoïdes.

4.1.1-Les ectomycorhizes :

Ce type de mycorhize concerne 13 à 15% des plantes vasculaires et se rencontre chez une grande majorité des Gymnospermes et un grand nombre d'Angiospermes, Dicotylédones principalement chez les espèces ligneuses forestières. Les partenaires fongiques sont des champignons supérieurs généralement macroscopiques Ascomycètes et surtout Basidiomycètes (Harley and Smith, 1983; Smith and Read, 1997; Fortin *et al.*, 2008).

Les ectomycorhizes sont formées par trois composants essentiels : a) La gaine ou manteau fongique qui entoure les racelles en modifiant leur morphologie, ainsi les poils absorbants sont inexistants (Fig.7 : A,B), (b) Les hyphes entre les espaces des cellules subéreuses et des cellules périphériques du parenchyme cortical constituant le réseau de Hartig (Fig.7 : A), (c) un réseau d'hyphes extraradiculaires se développe à partir du manteau fongique dans la rhizosphère de façon très importante appelé réseau extramatriciel (Fig7 : C,D) (Mosse 1973 ; Smith and Read, 2000). Dans le réseau mycélien l'espèce fongique impliquée forme parfois des cordons mycéliens constitués d'hyphes accolés les uns aux

autres constituants des rhizomorphes associés ou non à des sclérotés, structure résultant de l'organisation d'hyphes mycéliens en pseudotissu (Fig.7 : F) (Peterson *et al.*, 2004). Ce réseau extramatriciel constitue une partie importante du système mycorhizien car il permet une exploration très étendue du sol et par la même occasion augmente la surface d'échange du système racinaire (Nicolson 1959 et Mosse 1981).

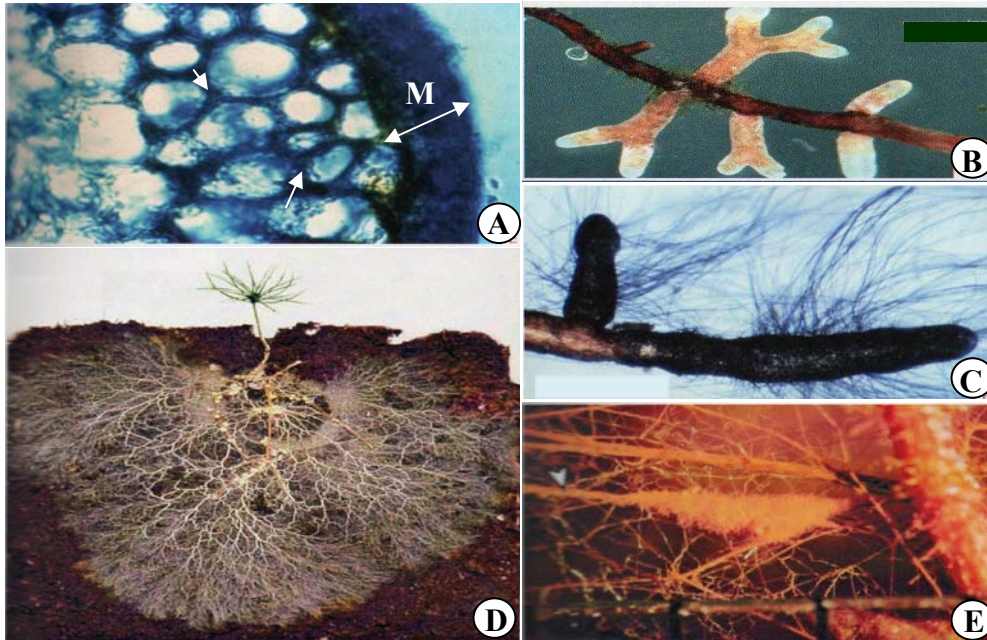


Figure 7: A)- Coupe transversale d'une ectomycorhize du sapin baumier coloré au bleu de trypan par la technique de Philips et Hayman, 1970: le manteau à l'extérieur (M) et le réseau de Harting (flèches). B)- ectomycorhize dichotomique du pin. C)- ectomycorhize simple noir formée par le *Cenococcum geophilum* (Fortin *et al.*, 2008). D) réseau extramatricielle (Read, 1984). E) formation d'un sclérote (tête de flèche) dans le rhizomorphe (Peterson *et al.*, 2004)

4.1.2- Les ectendomycorhizes :

Une ectendomycorhize présente à la fois les caractères structuraux des ectomycorhizes et des endomycorhizes. Cependant elles présentent une morphologie semblable à une ectomycorhize simple (Fig.8 : A) ou dichotomique. En effet il y a présence du manteau fongique relativement mince, du réseau de Harting et une formation de pelotons d'hyphes intracellulaires (Fig.8: B) Ce type de mycorhize a été observé principalement dans deux genres de la famille des pinacées *Pinus* et *larix* (Peterson *et al.*, 2004). Cependant Founoune (2001) les a également observés chez d'autres genres tels que *Casuarina*, *Eucalyptus*, *Populus*, *Quercus* et *Acacia* (principalement d'origine australienne),

Les champignons qui forment ce type de mycorhize sont pour certains, classés dans les ordres des Pezizales (*Wilcoxina*, *Sphaerospora*) et des Leotiales (*Phialophora*, *Chloridium*) de la classe des Ascomycètes. D'autres sont regroupés dans un groupe nommé E-strain dont on ne connaît pas les stades sexués (Peterson et al. 2004), raison pour laquelle certains les classent parmi les Deutéromycètes. (Fortin et al., 2008).

La plupart de ces espèces fongiques forment des ectomycorhizes, avec un certain nombre d'espèces de conifères et d'Angiospermes dicotylédones (Scales et Peterson, 1991a ; Yu et al., 2001). La phase extramatricielle est moins développée que celle des ectomycorhizes dans la mycorrhizosphère ((Peterson et al., 2004).

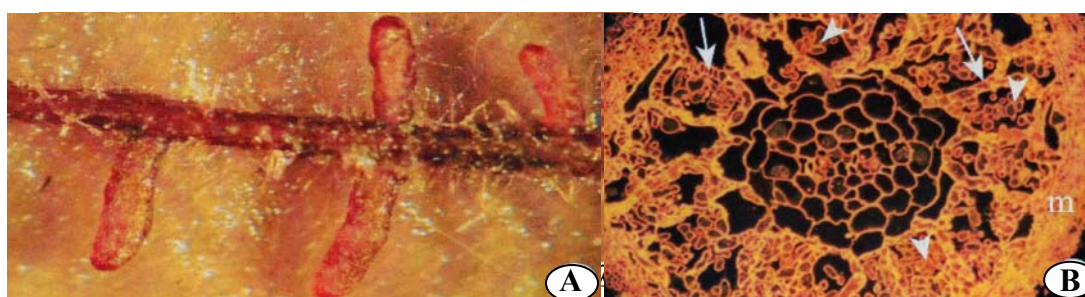


Figure 8 : A)- une ectendomycorhize formée par racine de *Larix sp.* et le champignon E-strain. B)- Coupe transversale dans une ectomycorhize de *Pinus sp.* Observée au microscope fluorescent. Le manteau (m), réseau de Hartig, peletons d'hyphes intramatricielle (tête de flèche) (Peterson et al., 2004).

4.1.3-Les mycorhizes arbusculaires:

Les mycorhizes arbusculaires (MA), sont appelées anciennement endomycorhizes à vésicules et arbuscules. C'est une association symbiotique ubiquiste, rencontrée de l'arctique aux tropiques et donc plus répandue dans le règne végétale. Elles sont présentes aussi bien dans le milieu naturel que chez les plantes cultivées, agricoles, horticoles ou forestières. On les rencontre même chez les plantes Cryptogames : Bryophytes et Ptéridophytes (Gerdemann, 1968; Harley et Harley, 1987 ; Fortin et al., 2008). Contrairement aux ectomycorhizes et ectendomycorhizes, les champignons impliqués ne provoquent pas de changement morphologique évident au niveau de la mycorhize. Cependant cette symbiose provoque un changement global sur tout le système racinaire (Berta et al., 1990 ; Hooker et al., 1992 ; Berta et al., 1995 ; Faidi, 1999).

La taxonomie des champignons mycorrhizogènes à arbuscules (CMA) ne reposait que sur la base de la description morphologique des spores et des sporocarpes permettant de les classer dans les Zygomycètes, dans l'ordre des endogonales, Famille des endogonacées

(Nicolsons et Gerdemann, 1968 ; Gerdemann et Trappe, 1974, Trappe et Gerdemann, 1979 ; Walker et Sanders, 1986 , Morton et Benny 1990 ; Koide et Mosse , 2004) Cependant, Une analyse phylogénétique beaucoup plus récente basée sur les séquences nucléotidiques du gène de l'ARN 18S de la petite sous unité ribosomal a permis de retirer le groupe des CMA du phylum polyphylétique Zygomycota et de les classer dans le phylum des Glomeromycota (Schüssler *et al.*, 2001b). Ainsi ils sont classés dans la classe des Glomeromycètes subdivisée en quatre ordres : Archeosporales, Diversisporales, Glomerales et Paraglomerales (Schüssler *et al.*, 2001a) (Fig.9), dont huit familles et treize genres. Le nombre exact d'espèces identifiées et classées dans le phylum n'est pas connu. (Rosendahl & Matzen, 2008). Cette classification est cependant actuellement contestée et il semblerait que les CMA appartiennent bien au groupe paraphylétique des Zygomycota (Lang & Hijri, 2009; Lee & Young, 2009).

Figure 9 : Proposition du schéma général de la taxonomie des CMA classés dans le phylum des Glomeromycota, basée sur les séquences nucléotidiques du gène de la sous-unité ribosomale. Les 4 ordres de ce phylum sont montrés (Schubler *et al.*, 2001).

Une MA est formée par trois composants essentiels : des structures fongiques inter et intra cellulaires dans le cortex racinaires et le mycélium extraracinaire constituant la phase extramatricielle, qui se développe de façon très importante dans le sol. (Fig.10 : A)(Smith et Read, 1997).

Le terme « arbusculaire » réfère à une structure microscopique formée d'un tronc et de nombreuses branches ramifiées dichotomiquement caractéristiques de ce type de mycorhize nommée arbuscule (Fig.10: B). Dans les premières assises cellulaires du cortex racinaire, des espèces de CMA forment des enroulements d'hyphes qui occupent tout le volume cellulaire (Fig.10 : C). D'autres CMA forment en plus des vésicules inter et intracellulaires. Ces dernières sont formées à l'extérieur des racines dans la mycorrhizosphère par quelques autres espèces (comme les espèces de *Gigaspora*) et sont alors appelées vésicules auxiliaires. Toutes les structures intracellulaires formées par les CMA sont entourées par la membrane plasmique de la cellule hôte qui augmente de façon très importante sa surface, en s'invaginant, constituant une membrane périarbusculaire (Bonfante et Perotto, 1995). A partir de la mycorhize la phase extramaticielle s'étend en un important réseau mycélien, envahissant le sol, dans toutes les directions pouvant atteindre, des kilomètres de longueur (Fortin *et al.*, 2008). c'est à ce niveau que se forme pour beaucoup d'espèces des spores.

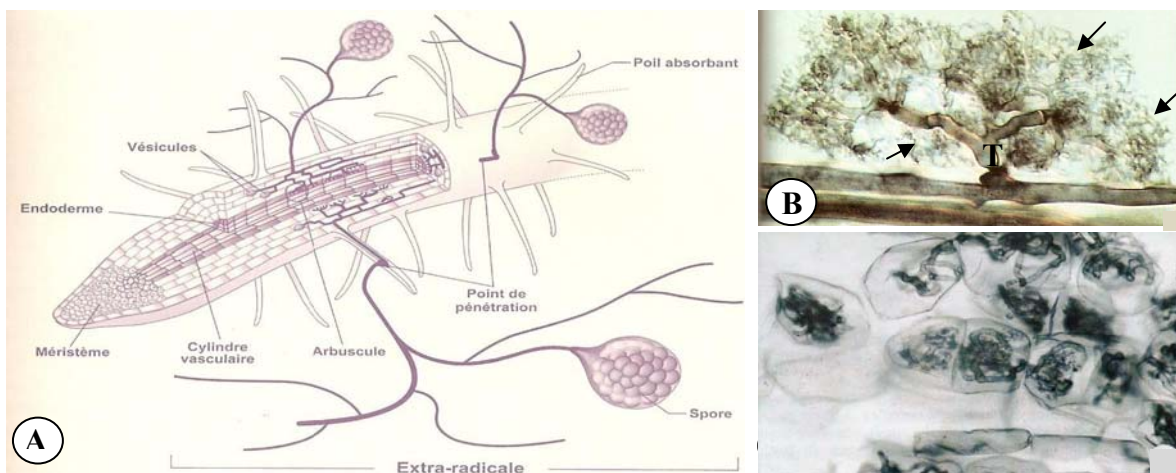


Figure 10: A) - Représentation schématique d'une MA (Fortin *et al.*, 2008).
 B) - Structure détaillée d'un arbuscule formé dans une racine de poireau (*Allium porrum*) (Brundrett *et al.*, 1984). C)- formation d'enroulement d'hyphe dans les cellules corticales de la racine de *Panax quinquefolius*. (Brundrett *et al.*, 1996)

Les mycorhizes à arbuscules développent deux types morphologiques de colonisation décrits pour la première fois par Gallaud en 1905 qu'il nomma type Arum et type Paris. Cependant elles sont abandonnées et considérées beaucoup plus tard par Brundrett et Kendrick, 1988 et Smith et Smith 1997 et généralisées plus récemment par d'autres auteurs Dickson 2004 Mayumi *et al.*, 2004 ...

Le type de la colonisation Arum est défini par un développement d'hyphes, dans l'espace intercellulaire du cortex racinaire à partir duquel il y a formation dans les cellules corticales

d'arbuscule comme structure terminale (Fig.11 : A), que nous nommons Arum A comme on peut avoir aussi formation d'une paire d'arbuscules dans deux cellules adjacentes (Fig.11 : B), que nous nommons Arum B.

Alors que le type morphologique colonisation Paris est défini par l'absence d'hyphe dans les espaces intercellulaires et une extension dans les cellules corticales avec formation d'enroulement d'hyphes et d'arbuscules en même temps (Fig.11 : C). Il est également possible d'avoir dans une même racine les deux types Arum et Paris. Dans ce cas il y a formation d'enroulement d'hyphes et d'arbuscules en même temps dans certaines cellules et des arbuscules des cellules adjacentes (Fig. 11 D), il s'agit alors de type mixte.

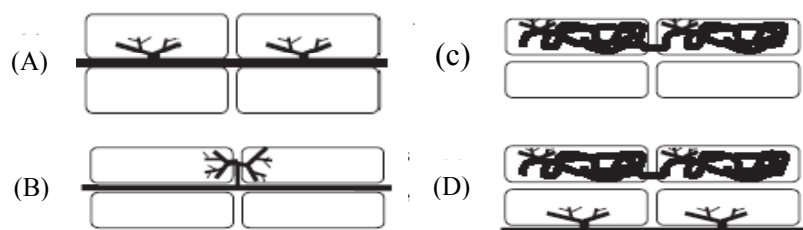


Figure 11 : (A)- type Arum A : hyphe intercellulaire et arbuscule ; (B)-type Arum B : formation d'une paire d'arbuscules dans deux cellules adjacentes. (C)- type Paris : formation d'enroulement d'hyphe et d'arbuscules intracellulaire ; (D)- type mixte Arum et Paris (Dickson, 2004).

Les chercheurs ont d'abord pensé que le type morphologique est lié en grande partie à l'espèce végétale (Brundrett Kendrick, 1988). Cependant, l'étude de Smith et Smith en 1997 a montré que le type morphologique dépend aussi de l'espèce fongique. D'autres études ont confirmées que pour une espèce végétale donnée, différents types de colonisation sont observées suite à l'inoculation par différentes espèces de CMA (Abbott, 1982 ; Cavagnaro *et al.*, 2001; Sanmazarro *et al.*, 2004).

4.1.3.1- Cycle de développement du CMA et formation de la mycorhize :

- Germination de la spore :

Les conditions physiques, chimiques et microbiologiques adéquates pour stimuler une spore en dormance et provoquer sa germination sont variables. Dans la nature, des interactions complexes entre plusieurs facteurs tels que le pH du sol, la température, l'humidité, les éléments nutritifs organiques et minéraux des racines, leurs exsudats et leur composition microbienne peuvent déclencher la germination de la spore.

Les exsudats racinaires et les composés volatiles tel que le CO₂ provenant de la respiration racinaire, peuvent déclencher la germination des spores et le début de croissance du tube germinatif. Dans certains cas les exsudats racinaires déclenchent également une croissance et un développement rapide des hyphes mycéliens qui ne peuvent se réaliser que lorsque la plante hôte n'est pas loin (Krishna, 2005 in Zeramdini 2008). Si après sa croissance le tube germinatif ne rencontre pas une racine compatible, sa croissance s'arrête et le filament dégénère (Duhoux et Nicole, 2004).

- Formation de l'appressorium:

Le développement de la symbiose commence au moment où l'hyphe contacte la racine de la plante hôte. Le contact est suivi d'une adhésion puis de la formation d'un appressorium à partir duquel se développera la phase intraracinaire du champignon (Smith and Read, 2008). Cette pénétration se fait par pression mécanique mais aussi par production d'enzymes hydrolytiques qui dégradent la paroi cellulaire de l'hôte (Gollotte et *al.*, in Martin). Entre le premier rattachement de l'hyphe sur la racine et la pénétration intercellulaire, il s'écoule généralement trois jours (Bécard et Fortin, 1988).

- Développement intraracinaire :

Une fois que le champignon pénètre dans la racine, soit par les cellules rhizodermiques directement ou par les poils absorbants ou les cellules subérifiées, l'hyphe colonise immédiatement les espaces intra- et intercellulaire du cortex externe.

Le développement intracellulaire du champignon est caractérisé par une production d'arbuscules (Krishna, 2005). Les arbuscules sont produits progressivement dans les assises cellulaires corticales les plus internes, ils constituent ainsi une très grande surface de contact où les deux partenaires sont très proches (Duhoux et Nicole, 2004). L'hyphe ne pénètre pas directement dans le protoplasme, puisque il est entouré comme toutes les structures fongiques intracellulaires par la membrane périarbusculaire. Au bout de deux jours l'arbuscule est bien développé dans le compartiment apoplastique de la cellule corticale (Smith and Read, 2008).

La durée de vie des arbuscules est de quelques jours ; après quoi ils dégénèrent, sans léser la cellule hôte. L'initiation, le développement et la disparition de l'arbuscule dure de quatre à quinze jours (Smith and Read, 2008).

Certaines espèces de CMA forment des vésicules après la résorption des arbuscules, elles sont produites à l'intérieur du cortex racinaire. Ce sont des structures de stockage lipidiques (Smith and Read, 2008). A ce stade la mycorhize est formée. Beaucoup d'espèces de CMA produisent aussi avant la formation des arbuscules, des enroulements d'hyphes intracellulaires, dans les assises périphériques du parenchyme cortical, et c'est dans les assises les plus internes de ce tissu que se forment les arbuscules.

- Développement de la phase extramatricielle:

A partir de la mycorhize les hyphes se développent très rapidement et intensivement dans le sol, constituant la phase extramatricielle (Bécard et Fortin, 1988).

Cette phase qui constitue la mycorrhizosphère joue un rôle primordial dans la symbiose. En effet, en se propageant et en colonisant un grand volume de sol, le mycélium extraracinaire acquiert des nutriments inaccessibles aux racines et les transfère vers les cellules hôtes (Fortin *et al.*, 2008). Cette phase permet aussi une colonisation de nouvelles racines de la même plante hôte ou d'autres plantes voisines. Dans certaines conditions, chez la plupart des espèces de CMA de nouvelles spores sont formées ce qui boucle le cycle de leur développement. Cependant chez quelques espèces les spores formées sont intraradiculaires.

La phase extramatricielle contribue aussi à la stabilité du sol en agglomérant les particules du sol, probablement par l'intermédiaire de glycoprotéines telle que la glomaline sécrétée par les hyphes fongiques. Cette protéine contribue directement au pool de la matière organique du sol (Purin et Rillig, 2007)

4.2 - Rôle des mycorhizes dans la nutrition et la protection de la plante :

D'après Fortin *et al.*, 2008, la présence des mycorhizes modifie et engendre généralement six fonctions principales : l'absorption des éléments minéraux, l'absorption de l'eau, l'activité hormonale, l'agrégation des sols, la protection contre les organismes pathogènes et la résistance aux stress environnementaux.

Les champignons mycorrhizogènes sont connus pour faciliter l'absorption de plusieurs éléments minéraux par les végétaux auxquels ils sont associés (Smith et Gianinazzi, 1988) notamment ceux qui sont peu mobiles et qui sont présents en faible quantité dans la solution du sol tels que : Le phosphore, le soufre, le potassium, le zinc, le calcium et le magnésium (Bouhired, 1984). D'après Plenchette (1982), la meilleure nutrition phosphatée des plantes mycorhizées est la conséquence de 2 mécanismes : une exploitation du sol par les hyphes

fongiques qui s'étendent au-delà de la zone d'épuisement de la plante et une absorption intense près de la racine, due à la plus grande surface absorbante des hyphes fongiques.

Certains travaux montrent que les MA assimilent une autre source de phosphore non utilisable par les plantes seules non mycorhizées (Bolan *et al.*, 1984, Bolan et Robson 1987)

Le réseau mycélien de la mycorrhizosphère solutionne le problème avec une exploration plus grande du volume du sol, ainsi la plante mycorhizée dispose de plus d'énergie pour fabriquer ses parties aériennes : tige, feuilles, fleurs et fruits (Fortin *et al.*, 2008).

Des travaux récents démontrent clairement que le mycélium fongique intervient en synergie avec les microorganismes du sol dans la décomposition de la matière organique, donnant ainsi accès à des éléments minéraux emprisonnés dans les résidus végétaux ou animaux (Fortin *et al.*, 2008).

L'amélioration de la nutrition hydrique des plantes est prouvée via cette matrice extra cellulaire qui explore un plus grand volume de sol (Smith et Read, 1997 ; Augé, 2001). En effet, le fin mycélium des champignons peut aller puiser l'eau dans de petits interstices et agrégats du sol qui ne sont pas accessibles aux racines.

La plante hôte résisterait semble-t-il au stress hydrique, par un signal déclenché par le champignon symbiotique permettant une fermeture plus rapide des stomates de sa partie aérienne (Fortin *et al.*, 2008).

Plusieurs auteurs ont démontré l'influence des champignons mycorrhizogènes sur la régulation endogène du métabolisme hormonal (Lapeyerie, 1982, Lapeyerie 1990). Chez les ectomycorhizes, les régulateurs de croissance à faible dose induisent des transformations morphologiques bien évidentes au niveau des racines. Chez les pinacées et les sapins, on observe des ramifications dichotomiques, l'importance des ramifications est proportionnelle aux quantités d'auxine que le champignon libère dans les tissus racinaires (Fortin *et al.* 2008). Les champignons mycorrhizogènes quand à eux tirent un grand profit des composés carbonés que la plante synthétise par le biais de la photosynthèse (Garbaye, 1988). D'après Fortin *et al.*, (2008) les injections d'auxine favorise le transfert des sucres de la racine vers le champignon.

De nombreux résultats indiquent par ailleurs, un effet bio protecteur des mycorhizes en réduisant ou même en inhibant l'effet de certains agents phytoparasites (Boullard, 1977, Smith, 1987). Les champignons mycorrhizogènes peuvent intervenir à deux endroits et par deux mécanismes pour protéger la plante contre les pathogènes : dans la mycorrhizosphère et dans les tissus de la racine.

Dans le premier mécanisme : dans la flore mycorrhizosphérique les micro-organismes sont confrontés à la compétition et à l'antagonisme, ce qui a pour effet d'établir une flore microbienne diversifiée et équilibrée. Les propagules des champignons pathogènes ne parviennent pas à proliférer et leur nombre reste toujours restreint. Par exemple les propagules des champignons qui causent la fusariose chez la tomate ou ceux qui provoquent la pourriture racinaire chez les œillets d'inde sont 3 à 10 fois moins nombreux dans la mycorrhizosphère que dans la rhizosphère des plantes non mycorrhizées.

Pour le second mécanisme : les plantes agressées par un agent pathogène réagissent en produisant des substances antibiotiques contre ces micro-organismes (Pfelger et Linderman, 1994 et Fortin *et al.*, 2008).

4.3 -Rôles des mycorhizes dans l'évolution et le fonctionnement des écosystèmes

Les mycorhizes les plus anciennes ont été trouvées dans le rhizome des premières plantes vasculaires du Dévonien. Il s'agit des MA présentant des arbuscules parfaitement conservées dans les sédiments fossiles d'*Aglaophyton major*, espèce disparue. Ce qui permet d'affirmer que les MA est le premier type de mycorhize apparu, il y a environ 450 millions d'années (Remy *et al.*, 1994 ; Duhoux et Nicole, 2004).

Les Mycorhizes arbusculaires ont joué un rôle déterminant dans la sédentarisation des végétaux dans le milieu terrestre après la vie aquatique. Ceci a eu un impact incontournable sur la spéciation en coévolution des plantes vasculaires. Les MA ont aussi un impact déterminant sur la genèse des sols et sur l'évolution des écosystèmes terrestres (Selosse et Tcou, 1998 ; Brundrett, 2002).

Les mycorhizes jouent également un rôle dans l'établissement, le développement et la stabilité des écosystèmes terrestres. En effet, l'existence d'arbres adultes colonisés par des CMA entraînent le développement du réseau d'hyphes mycéliens, qui va favoriser la contamination de nouvelles plantules juvéniles de la même espèce et même d'autres espèces différentes se trouvant dans le voisinage (Smith et Read, 1997 ; Simard et Durall, 2004). En outre, les symbioses mycorhiziennes favorisent la co-existence entre plusieurs espèces végétales, améliorant ainsi la productivité et la biodiversité végétales dans ces écosystèmes (Sanon *et al.*, 2006).

4.4 -Les mycorhizes et l'agriculture

L'usage des mycorhizes en agriculture doit être considéré comme une stratégie proactive à la lutte biologique. Connaissant l'impact conjugué des mycorhizes sur le rendement des cultures et comme agent de lutte biologique, leur introduction systématique dans les régions de production vise l'obtention de bénéfices relatifs à la fois à la production et à la protection des végétaux.

La restauration du complexe plante-mycorhize dans les sols, soit par inoculation directe ou par transplantation de plantes pré-mycorhizées, permettrait de rétablir et surtout de conserver à long terme cet équilibre et ce potentiel pour la production et la protection des cultures. De plus, l'usage des mycorhizes s'accommode tout à fait des stratégies proactives déjà pratiquées pour certaines productions, tels que la rotation des cultures et le labour minimal. Une fois rétabli, le potentiel mycorhizien d'un sol peut perdurer durant de nombreuses années sans apport excessif ou onéreux de fertilisants et de pesticides, ce qui entraîne à moyen terme une économie non négligeable du coût de production, une meilleure conservation des terres, de la qualité des cultures et une réduction de l'usage de pesticides (Dalpé, 2005).

5 - Les endophytes :

Parmi la pléthore des micro-organismes existant dans l'environnement édaphique quelque soit leur effet sur la croissance de la plante (néfaste, neutre ou bénéfique), il existe des micro-organismes fongiques nommés endophytes incluant une grande partie des espèces formant dans les racines des végétaux, un mycélium stérile septé et pigmenté appelé alors endophytes foncés septés EFC (DSE : Dark Septate Endophyte), pouvant produire des sclérotés (Jumpponen 2001, Peterson et *al.*, 2004, Peterson et *al.*, 2008) , (Figure 12: A) et quelques uns très peu nombreux forment un mycélium hyalin (Yu et *al.*, 2001) (Fig.12 : B) pouvant produire dans certaines conditions des conidies intraradiculaires (Peterson et *al.*, 2004).

On les rencontre aussi bien dans les cultures en serres, en pépinières que dans tous les écosystèmes (forestier, agricole, horticole...ect). (Haselwendter et Read 1980, Stoyke et *al.*, 1992 ; Hambleton et Currah, 1997 ; Addy et *al.*, 2000, Barrow et Aaltonen, 2001, Schadt et *al.*, 2001).

Ce type d'association est très répandu (Peterson et *al.*, 2004). Ce groupe fongique fut caractérisé chez une large gamme de phytotaxons. Ils sont présents aussi bien chez les Angiospermes, les Gymnospermes, les algues, mousses, hépatiques et les fougères (Suryanarayanan et *al.*, 2003 ; Lucero et *al.*, 2006).

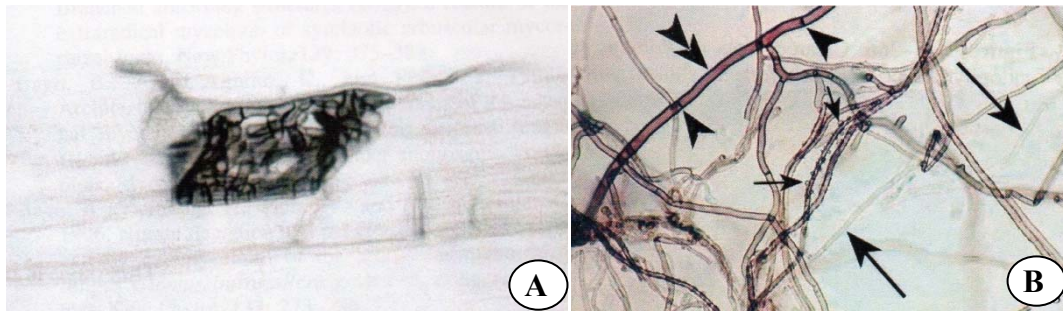


Figure 12 : A)- Formation d'un sclérote dans une cellule du parenchyme corticale racinaire. B)- hyphes hyalins septés (grande flèche) et hyphes mélanisés septés (double tête de flèche) d'endophyte présentant des exsudats (tête de flèche) racinaires.
(Peterson et *al.*, 2004)

Le rôle de ces endophytes sur la croissance des plantes et le maintien des communautés végétales n'est pas connu. Les rares études ultrastructurales montrent que leurs hyphes intracellulaires ne possèdent pas la membrane périfongique dérivée de la cellule hôte, appelée chez les MA (comme chez toutes les endomycorhizes comme mycorhizes orchidoïdes, ectendomycorhizes, ...) membrane périarbusculaire. Caractéristique propre aux interactions cellulaires biotrophiques champignon symbiotique-plante hôte (Peterson et *al.*, 2008). Ceci soulève le problème quant aux mécanismes d'échange entre les DSE et la plante hôte (Peterson et *al.*, 2008).

Ils peuvent représenter toutefois un important réservoir de biodiversité dans ces écosystèmes.

Selon certains auteurs Carrol (1986) et Bérubé (2007), ces champignons endophytes peuvent jouer un rôle en matière d'assimilation des éléments minéraux (N et P).

Récemment des études moléculaires ont permis l'identification 5 espèces : *Chloriduum paucisporum*, *Leptodontidium orchidicola*, *Phialocephala dimorphospora*, *Phialocephala fortinii* et *Phialophora finlandia* dans différentes espèces de plantes. (Stoyke et *al.*, 1992 ; Hambleton et Currah 1997 ; Jumpponen et Trappe 1998 ; Schadt et *al.*, 2001 ; Grünig et *al.*, 2002).

Il est important de noter que de nombreuses espèces végétales forment des symbioses avec des champignons mycorhizogènes MA, des orchidoïdes et qu'elles peuvent également associées avec les EFC (DSE) (Currah et *al.*, 1997 ; Peterson et *al.*, 2004).

II- ETUDE DES MYCORHIZES

1-DESCRIPTION DES STATIONS D'ETUDE DE L'INSTITUT NATIONAL DE RECHERCHE EN FORESTERIE (INRF)

1.1-Pépinière de la station de Baïnem :

Il s'agit de la pépinière de la station de l'INRF de Baïnem où sont produits des plants de plusieurs essences forestières issus de graines destinées au reboisement (Cèdres, Cyprès, Pins, Châtaigniers, chênes,)

Les plantules de cyprès de tassili (*Cupressus dupreziana* A. Camus) âgées respectivement de 1,3 et 5 ans, proviennent donc de cette station (Fig.13 : A et B). Le semis des graines se fait au mois de janvier à raison de 50 graines par sachet à cause du problème de la viabilité des graines. En effet sur les 50 graines, très souvent aucune ne germe car le taux de germination est très faible. Ces graines proviennent de la récolte du peuplement naturel du Tassili N'Ajjers. Quant au substrat utilisé, il est constitué de 1/3 de sable, 1/3 de terre de Baïnem et 1/3 de fumier.

1.2-Arboretum du Cyprès du tassili de la station Baïnem (Fig.13 : C)

Nous avons effectué plusieurs échantillonnages aléatoires de sols et des racines dans la mycorhizosphère de plusieurs arbres de cyprès du tassili, en évitant les arbres qui sont en bordure. Ces prélèvements sont effectués en : Février, Juillet 2008, avril 2009 et décembre 2010.

1.3-Arboretum du Cyprès du tassili de la Station de Baraki (Fig.13 : D)

La parcelle est constituée de 109 arbres de 3 rangées espacées de deux mètres. Les semis à partir desquels sont issus ces arbres ont été ensemencés en 1977 dans leur milieu naturel au Tassili N'Ajjers. A l'âge de 3 ans les plantules sont transportées à la station de Baraki.



Figure 13 : Représentation de différents sites d'échantillonnage du Cypres de Tassili

A)- plantules de la pépinière âgées d'1 an. B)- plantules âgées de 3 ans, C)- Arboretum de Baïnem (arbres âgés de 17 ans), D)- Arboretum de Baraki (arbres âgés de 34 ans).

2- METHODES DE PRELEVEMENT :

2.1-Matériel végétal :

- Pour les plantules de pépinière : tout le système racinaire de toutes les plantules quelle que soit leur âge est étudié.
- Sur le terrain : Le choix doit être porté sur des sujets asymptomatiques qui sont en bon état physiologique, et dont les écailles sont toujours vertes.

La récolte du matériel végétal est faite de la manière suivante : A chaque sortie, trois échantillons sont prélevés en triangle au niveau de chaque arbre choisi au hasard, conformément aux modalités prescrites par BOULARD (1962) et AGERER (1988) pour l'étude des mycorhizes.

A l'aide d'une pelle, nous avons éliminé la litière. Puis, nous avons prélevé des échantillons de sol, jusqu'à une profondeur de 30 cm au maximum. Selon ALEXANDER (1986) les mycorhizes en général ne dépassent jamais 10 cm de profondeur.

Nous avons remarqué que les racines de cyprès sont superficielles, à une profondeur d'environ 20cm.

Les 3 prélèvements du sol par pied sont mélangés dans un sachet pour une meilleure homogénéisation.

3- MANIPULATION AU LABORATOIRE

Pour les plantules d'1 an, 3 et 5 ans respectivement, les systèmes racinaires sont prélevés en prenant soin de ne pas jeter le sol de plantation. Même l'eau de rinçage est récupérée pour y isoler des propagules fongiques par la technique de tamisage.

Le système racinaire des plantules déterrées est délicatement lavé à l'eau pour éliminer toute trace de sol en prenant le soin de le garder le plus complet possible. Les racines sont ensuite différenciées par leur ordre, puis observées sous microscope stéréoscopique à la recherche d'éventuelles ectomycorhizes ou ectendomycorhizes.

Les racines prélevées des arboretas sont lavées abondamment à l'eau du robinet. Puis lavées dans un bécher avec agitation jusqu'à disparition totale de traces de terre. Les racines saines sont observées pour une éventuelle présence d'ectomycorhizes ou ectendomycorhizes.

Ces racines sont par la suite conservées dans une solution fixatrice de FAA (1 volume de formaldéhyde 37%, 1 volume d'acide acétique glacial, 8 volume d'alcool éthylique à 70%).

4- COLORATION DES RACINES:

4.1- Technique de coloration au bleu de trypan :

La technique de PHILIPS et HAYMAN (1970) modifiée ; est utilisée pour mettre en évidence au microscope photonique en premier lieu l'infection mycorhizienne à arbuscules. Une partie des racines fixées au FAA est récupérée et rincée plusieurs fois à l'eau de robinet pour enlever toute trace du fixateur.

- Eclaircissement et coloration des mycorhizes :

Les racines sont découpées en fragments de 1cm de longueur environ, mises dans une solution d'hydroxyde de potassium (KOH) à 10 %, et placées dans l'étuve à 90°C pendant 1 heure. Nous remplaçons la solution de KOH aussitôt qu'elle devient foncée. Pour éliminer le reste des pigments, nous transférons les racines dans une solution d' H_2O_2 (peroxyde d'hydrogène) à 10% à 90°C pendant 20 mn jusqu'à blanchissement total des racines.

Les racines sont ensuite rincées plusieurs fois à l'eau avec un passage dans un bain d'acide lactique à 10%.

Elles sont transférées dans une solution de bleu de trypanet placées dans l'étuve à 90°C pendant 1 heure

- **Montage et observation :**

Après avoir retiré les racines de la solution colorante, elles sont rincées à l'eau courante, puis placées dans une boîte de pétri contenant du glycérol.

Les segments sont montés parallèlement par groupes de 10 dans du glycérol entre lame et lamelle, soigneusement écrasées, puis observées au microscope photonique à différents grossissements.

4.2 -Technique histologique :

- **Confection des coupes au microtome avec inclusion à la paraffine :**

Les racines fixées à la solution de FAAsont mises sous- vide, pendant 3 heures de temps pour éliminer le maximum d'air contenu dans les tissusafin de permettre une meilleure déshydratation.

- **Déshydratation :**

Les racines retirées du fixateur sont coupées en fragments et subissent les différentes étapes de déshydratation dans l'éthanol à concentration croissante:

- D'abord dans deux bains d'éthanol à 95° pendant successivement 1h et ensuite 30mn.
- Puis dans trois bains d'éthanol à 100° successivement de 45,45mn et 1heure chacun.
- Pour les racines dures deux bains de butanol successifs de 1heure et 24 heures étaient nécessaires pour les ramollir.

- **L'imprégnation :**

L'imprégnation consiste à l'élimination complète des traces d'alcool qui sera remplacé par la paraffine. Pour cela les fragments racinaires subissent successivement :

- Un bain toluène+ alcool (1V/1V) pendant 30 mn
- Trois bains successifs de toluène pur pendant 30mn.30mn et 1heure chacun dans l'étuve à 60°C.
- Un bain de toluène +paraffine (1V/1V) pendant 30 mn
- Trois bains de paraffine, les deux premiers pendant 1heure chacun à 58-60°C, le troisième reste toute la nuit dans l'étuve à 60°C.

- Inclusion à la paraffine :

La paraffine est coulée à chaud dans un moule formé de deux barres de Leuckart agencées correctement sur une plaque en verre ou sur des moules métalliques.

Dans les barres de Leuckart, nous versons la paraffine, l'échantillon est déposé à l'aide d'une pince préchauffée, il est orienté puis étiqueté.

En revanche, le système de cassette consiste à remplir le moule métallique de paraffine dans lequel nous déposons délicatement l'échantillon, puis nous plaçons la cassette identifiée sur le moules de manière à ce que la paraffine pénètre dans les perforations de la cassette.

Les barres de Leuckart et les cassettes sont gardées dans une atmosphère fraîche pendant au moins 10 jours pour une bonne consolidation de la paraffine.

- Confection et coloration des coupes :

Les coupes sont réalisées à l'aide d'un microtome « Leica ». Les coupes sont réalisées entre 15 à 30 microns d'épaisseur car il est très difficile d'obtenir des coupes intactes à des épaisseurs moindres.

Les rubans obtenus sont étalés sur des lames porte-objets préalablement enduites d'eau gélatineuse, préparée à raison de 0.3 g de gélatine dans 100 ml d'eau distillée.

L'étalement des coupes est obtenu par un faible chauffage des lames sur une plaque chauffante à 40°C.

Avant la coloration, les coupes sont déparaffinées par passage sur une plaque chauffante puis dans trois bains de toluène de 20 mn chacun. La réhydratation des coupes s'est faite en les passant dans trois bains d'éthanol absolu successifs de 10mn chacun, puis dans un bain d'éthanol et de formol (4V/1V) pendant 30 mn, et un rinçage à l'eau courante et en dernier lieu il y a séchage des lames sur une plaque chauffante à 40°.

Les coupes sont placées dans un bac de coloration au bleu de trypan, disposées sur une plaque chauffante à 60° C pendant 1 heure.

Après coloration les coupes sont rincées à l'eau distillée, séchées et montées dans un quit de montage pour permettre une bonne adhérence de lamelle sur la lame, puis observées au microscope photonique à différents grossissements.

5 - EXTRACTION PAR TAMISAGE HUMIDE DES SPORES A PARTIR DU SOL :

Les échantillons de sol, provenant des plantules de pépinière, des deux arboreta des 2 stations de l'INRF, sont traités par la technique d'extraction de tamisage humide. Tous les propagules des CMA (hyphes mycéliens, spores, sporocarpes ou racines très fines contenant des spores) sont extraits des sols précédents par la technique de tamisage humide de Gerdemann 1963 et Daniels et Skipper, 1982). le sol est lavé dans deux tamis l'un au-dessus de l'autre.

Le premier tamis de 250 μm d'ouverture de mailles est situé au-dessus du second de 63 μm .

Ces deux tamis sont soumis à un jet d'eau de robinet à forte pression, provenant d'une douchette, jusqu'à ce que l'eau qui en ressorte devienne claire et limpide.

Les propagules retenues surtout par le tamis de 53 μm , sont récupérées, mises en suspension dans des piluliers remplis d'eau distillée stérile ou dans une solution physiologique de Ringer jusqu'à leur observation à la loupe stéréoscopique.

L'observation à la loupe stéréoscopique a permis d'isoler les différentes spores et sporocarpes, montés par la suite entre lame et lamelle soit dans l'eau ou dans une solution d'acide lactique à 1% dans le but d'une identification au moins jusqu'au genre à l'aide du microscope photonique, aux objectifs 40 et à l'immersion. Ces propagules sont photographiées aussi bien à la loupe stéréoscopique qu'au microscope optique à l'aide d'un appareil photo numérique.

Partie : Culture *in vitro*

1-Effet de la technique de désinfection

Les résultats obtenus après un mois de culture nous montrent que le bichlorure mercurique permet d'obtenir une stérilisation parfaite des microboutures adultes.

Tableau 4: Effet de l'agent désinfectant sur le développement des microboutures :

Agent désinfectant	Concentration	Nombre d'explants cultivés	Contaminations(%)	Nécroses (%)	Débourrement (%)
Hg Cl ₂	0.5 mg/l	48	4.16	0	31.12
NaClO	8%	48	20.83	29.16	22.91

Une moyenne de 20.83% de contamination et 29.16 nécroses ont été enregistrées chez les microboutures désinfectées par l'hypochlorite de sodium (NaClO) contre seulement 4.16 % chez les microboutures désinfectées par le bichlorure mercurique (HgCl₂) avec aucune nécrose. Nous avons aussi remarqué une décoloration des microboutures désinfectées par le (Na ClO).

Pour la micropropagation des espèces ligneuses la stérilisation des explants cultivés est un problème récurrent qui peut compromettre le développement de la technique Riffaud et Cornu, 1988). L'importance de ce test est de réussir la stérilisation tout en préservant l'intégralité du tissu. Chez les microboutures du cyprès du tassili, la concentration de 0.5 mg/l de HgCl₂ pendant 5 mn est plus efficace que de l'hypochlorite de sodium à 8 %. Les mêmes résultats ont été obtenus chez l'olivier *Olea europea* (Hamlat, 1995). Cet auteur signale que la concentration de 0.5 mg/l est efficace comparativement à l'hypochlorite de sodium contre les infections exogènes. D'autres travaux aussi sur le pistachier (Baghdadi, 2007 ; Benmahioul, 2009) affirment que le bichlorure mercurique est le meilleur stérilisant pour les microboutures issues de pieds adultes.

D'autres travaux, montrent qu'en plus de l'agent désinfectant adopté, les pertes enregistrées peuvent être dues au types d'explants mis en culture, la période de prélèvement et l'intensité lumineuse (Hamlat, 1995 ; Benmahioul, 2009).

Ainsi dans notre travail, nous avons retenu le bichlorure mercurique comme agent désinfectant.

2- Influence des milieux de culture

2.1- Microboutures provenant d'arbres adultes

L'analyse des résultats (fig.14) montre que les microboutures germent sur les trois milieux de culture, cependant le taux de débourrement et la durée de réponse sont différents. Aussi, les microboutures développées sur MS, présentent un aspect vigoureux et qualitatif, comparativement aux deux autres milieux de culture MS/2 et GA. L'allongement des microboutures ensemencées sur MS est plus important que les deux autres milieux.

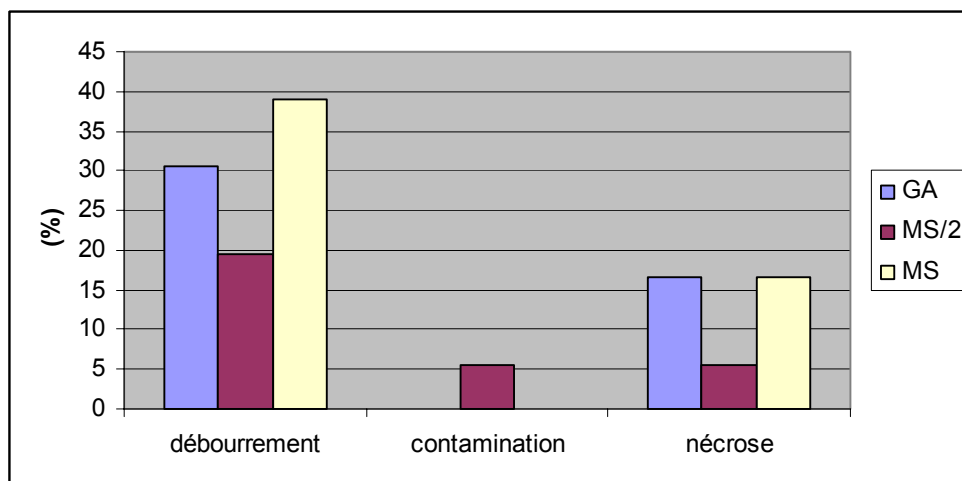


Figure14 : Effet des milieux de culture sur le débourrement des microboutures adultes du cyprès du tassili *Cupressus dupreziana* A. Camus.

Les résultats révèlent aussi, que le meilleur taux de débourrement a été enregistré chez le milieu MS avec un taux de 38.88% comparativement aux deux autres milieux de culture GA et MS/2 qui sont respectivement de 30.55% et 19.44%.

Les microboutures ensemencées sur le milieu GA, présentent un temps de latence court (7jours) comparativement à ceux ensemencées sur milieu MS et MS/2 qui sont respectivement de 9 et de 13 jours.

Sur le milieu MS, nous avons eu un débourrement et un l'allongement de tous les bourgeons axillaires et apicaux (Pl. I : A). Sur le milieu MS/2 nous observons seulement un débourrement des bourgeons (Pl. I : B). Sur le milieu GA, un débourrement de tous les bourgeons avec un allongement des bourgeons apicaux (Pl.I : C).

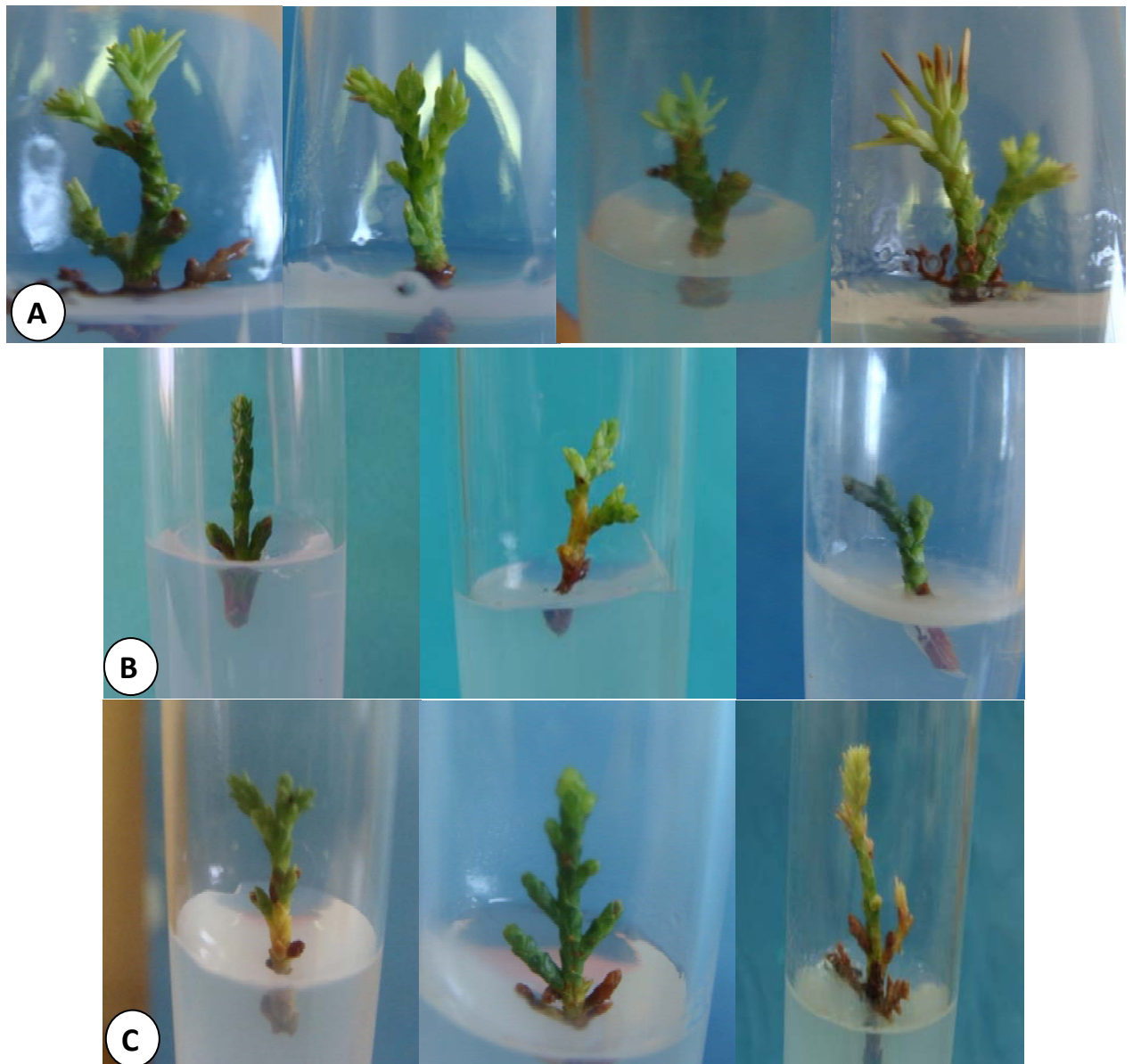


Planche I: Comportement des microboutures du cyprès de tassili issues de pieds adultes, à 3 mois de culture sur les milieux MS, MS/2 et GA.

A : Microboutures de bonne qualité, débourrement de tous les bourgeons axillaires sur milieu MS.

B : Les écailles foliaires qui apparissent sur le milieu MS/2 sont beaucoup plus lignifié que chez les autres milieux de culture

C : Débourrement de tous les bourgeons axillaires sur milieu de GA.

2.2- Microboutures provenant du matériel juvénile :

Nous résultats montrent que la culture des microboutures provenant du matériel juvénile est très délicat. Le problème de contamination n'a pas été un problème limitant. Nous avons eu un débourrement des bourgeons sur les trois milieux de culture, sauf que les taux sont différents (fig. 15).

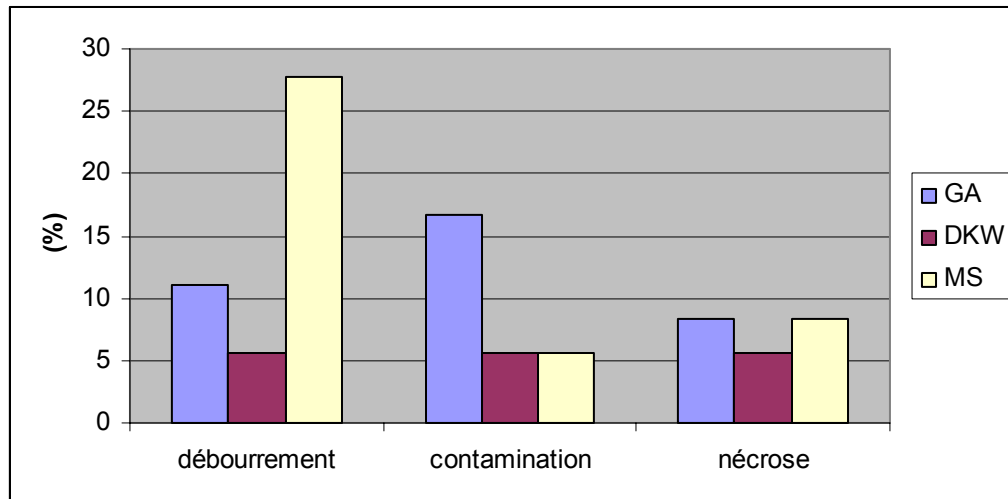


Figure 15: Effet des milieux de culture sur le débourrement des microboutures issues de pieds juvéniles.

L'analyse de la figure 15 montre que le meilleur taux de débourrement a été obtenu sur MS avec un taux de 27.77% comparativement aux autres milieux de culture GA et DKW qui sont respectivement de 11.11% et 5.5%.

Nous avons enregistré un temps de latence moindre chez le DKW qui est de 8 jours comparativement aux autres milieux de culture, de 12 jours pour GA et 15 jours pour le MS. Le débourrement des bourgeons a été constaté sur tous les milieux de culture. Cependant, un arrêt de la croissance a été enregistré au delà de la 8^{ème} semaine de culture. Nous avons réalisé plusieurs repiquages pour la reprise de la croissance, mais aucun changement n'a été observé.

Sur le milieu MS, nous observons des nouvelles écailles (Pl. II : A), par contre sur le milieu GA nous observons un allongement des écailles foliaires (Pl. II : B). Sur le DKW : nous observons des écailles foliaires avec un aspect lignifiées (Pl. II : C).

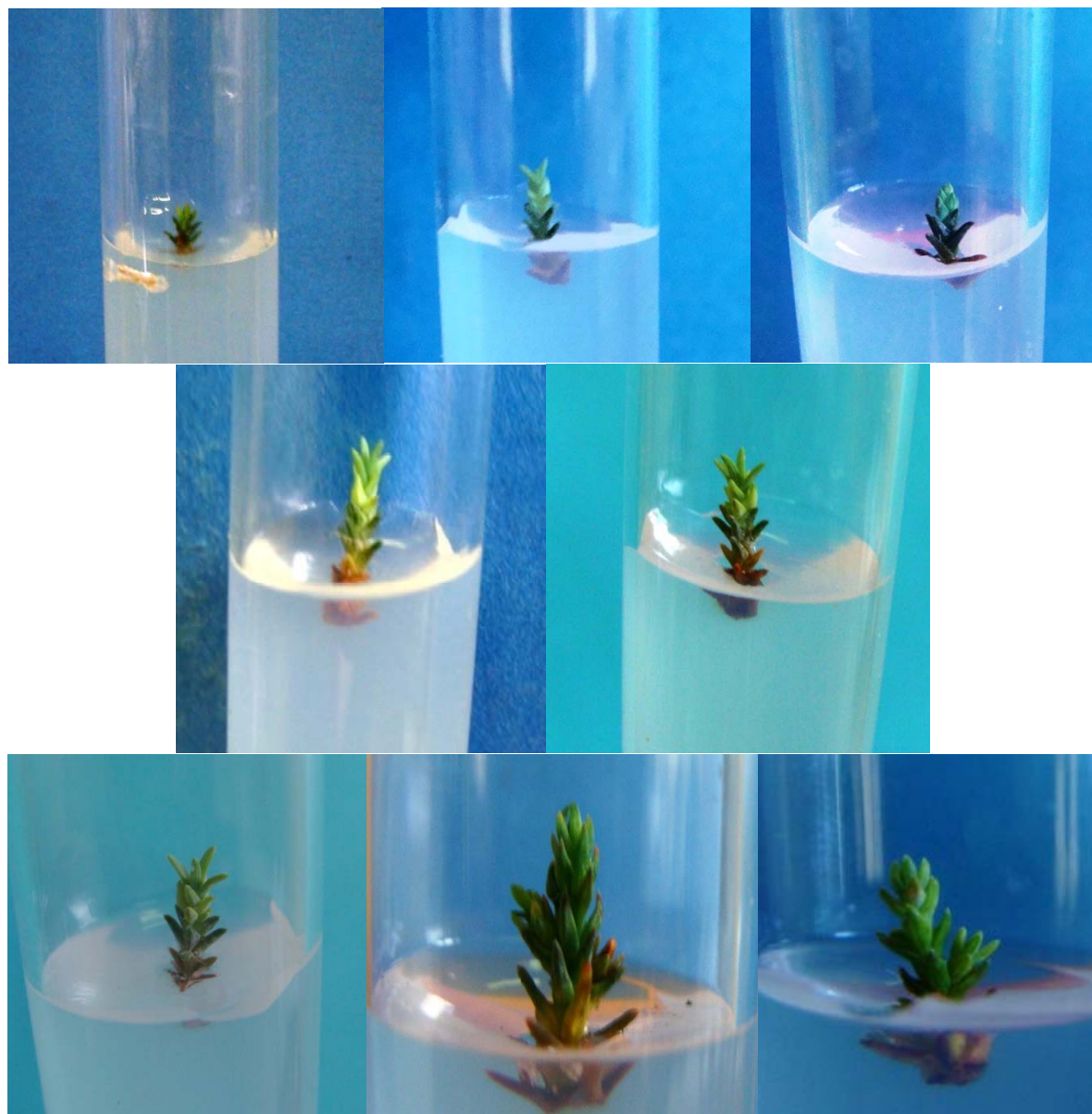


Planche II : Comportement des microboutures juvéniles du cyprès du tassili après deux mois de culture

A : MS ; apparition de nouvelles écailles foliaires.

B : MS/2 ; allongement des microboutures.

C : DKW ; apparition de nouvelles écailles foliaires avec un aspect lignifié.

La réussite du microbouturage via la culture *in vitro*, est influencée par plusieurs facteurs, la composition minérale (Rugini, 1984 ; Berenguer et Gonzalez, 1984 ; Bartolini et *al*, 1989 ; Leva et *al*, 1992) et hormonale (Leva et *al*, 1992) des milieux de culture, le génotype (Rugini, 1984 ; Leva et *al*, 1992) et l'âge de l'explant (Porlingris et Therios, 1976 ; Rugini, 1986, Benmahiou, 2009).

La composition du milieu de culture joue un rôle très important dans l'organogenèse. L'effet d'un milieu de culture résulte de l'ensemble des interactions des différents éléments qui les composent. Certains d'entre eux stimulent les processus du développement *in vitro*, d'autres par contre, ont peu d'influence sur le débourrement (Thorpe, 1980 ; Rugini et Caricato, 1995 ; Grigoriadou et *al*, 2002 ; Brhadda et *al*, 2003).

D'après Auge et *al*, (1989) la micropropagation végétative a pour rôle de provoquer le développement des bourgeons pré-existants.

Les microboutures issues de pieds adultes cultivées sur le milieu GA, donnent une réponse rapide comparativement aux deux autres milieux MS et MS/2. La rapidité de la réponse est supposée due à la concentration de cette solution en composés ioniques KNO_3 vu que la concentration est doublée comparativement aux autres solutions des deux autres milieux de culture.

Avec les microboutures juvéniles, cultivées sur DKW, nous avons noté un temps de latence moindre par rapport aux deux autres milieux de culture. Cette rapidité semble être influencée par la présence de certains macroéléments, qui existent dans ce milieu qui ne se retrouvent pas dans les solutions minérales de MS et de GA particulièrement : $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ et le K_2SO_4 (BAGHDADI, 2007).

Cependant, les meilleurs taux de débourrement ont été obtenus sur le milieu MS avec les deux types de microboutures (issues de pieds adultes et de pieds juvéniles). Ce développement est probablement dû à la richesse du MS en composés ioniques comme le NH_4NO_3 . Le DKW et le MS/2, ayant une concentration inférieure ; aussi ce composé est absent dans le milieu GA. Nos résultats sont similaires à ceux de Hammat et Gran 1997 qui ont eu un bon développement du matériel adulte du Merisier *Prunus avium* L. sur MS. Boualy et Franclet (1977) utilisent pour la prolifération des bourgeons dormants de Douglas (*Pseudotsugamenziesii* L.) une forte concentration en sels minéraux : macroéléments de MS additionnés d'autres macroéléments.

Selon Rugini (1988), les meilleurs taux de développement sont enregistrés avec le milieu MS grâce à sa richesse en azote. L'effet stimulateur de l'azote dans le phénomène de

l'organogénèse a été signalé chez l'olivier (Rugini, 1988 ; Brhadda et *al*, 2003) et chez plusieurs autres espèces tels que le maïs (Miao, 1980) et le blé (Feng et Ouyang, 1988).

L'azote joue un rôle de molécule stimulatrice de la croissance des plants en augmentant l'expression du gène responsable de l'absorption et l'utilisation des nitrates (Mastrayekhi, 2000 in Mansseri-Lamrioui, 2011)

McCown et Sellmer, 1987, rapporte qu'un déficit de croissance *in vitro* dans un milieu dilué peut être corrigé par l'augmentation de la concentration du milieu en NH_4NO_3 .

Caboche (1987) a évoqué le rôle très important du rapport azote/hydrates de carbone dans le contrôle de la biosynthèse des régulateurs de croissance dans les tissus indifférenciés chez *Nicotiana plumbaginifolia*. Viviani et al a signalé que les nitrates assurent d'autres fonctions encore inconnues dans la morphogénèse.

Le milieu MS est caractérisé par la teneur plus élevée en ions K^+ , Mg^+ et Ca^+ comparativement aux autres milieux testés MS/2, GA et DKW. L'effet bénéfique de K^+ et Ca^{2+} sur l'organogénèse a été signalé par certains auteurs (David et *al*, 1978 ; Bornman, 1983). Selon Monnier (1995) le calcium est un constituant des parois et des membranes cellulaires, il intervient positivement sur la survie, en jouant un rôle fondamental dans la perméabilité cellulaire en empêchant les produits toxiques de pénétrer à l'intérieur de la cellule.

Magara (1978) souligne qu'un milieu très riche en potassium est favorable à la production des inflorescences chez l'endive et le chou-fleur. Ainsi le milieu de GA est riche en KNO_3 (nitrate de potassium), qui est présent avec une quantité moindre chez le MS et absent chez le DKW, ce qui peut expliquer le faible taux de débourrement des microboutures cultivées sur le milieu de DKW.

Les milieux « pauvres » en composés ioniques stimuleraient le développement du système racinaire beaucoup plus que la partie aérienne (Abousalim et *al*, 1992). Ceci pourrait expliquer le faible taux de débourrement obtenu chez les microboutures ensemencées sur le milieu MS/2.

La richesse des milieux de culture en Zinc, Bore et Mn pourraient être impliqués dans l'amélioration du microbouturage de la Picholine Marocaine (Brhadda, 2003).

Louerguioui (1988) et Taiz et Zeiger (2002) ont signalé que l'emploi d'une solution minérale enrichie en Mn, Zn et Bo est généralement très favorable à l'organogénèse.

Au cours de notre micropropagation végétative, nous avons constaté que la phase de bourgeonnement est caractérisée par l'âge de l'explant. Le meilleur débourrement a été obtenu chez le matériel adulte avec un pourcentage de 30% comparativement aux matériels juvéniles avec un pourcentage de 15%. Ceci a été confirmé par les travaux de Hamlat (1995)

sur la micropropagation végétative de *Olea europaea*. Ce dernier indique que les explants issus de pieds juvéniles dont l'apparition des jeunes pousses est plus précoce, par contre le taux de bourgeonnement est plus élevé chez les microboutures issues de pieds adultes. Nous suggérons que ce résultat est peut-être dû aux taux d'hormones endogènes élevés chez les microboutures issues de pieds adultes, comparativement aux taux que renferment les microboutures issues de pieds juvéniles.

Ces résultats sont contradictoires avec les résultats d'autres chercheurs (Deogratis, 1986 ; Guendoud et Boussadia, 2001 ; Baghdadi, 2007 et Benmahioul, 2009) sur le *Pistacia* et Yakoub- Bougdal, 2005 sur *Olea europaea*, qui ont montré que les meilleurs résultats de la reprise végétative *in vitro* est obtenue avec du matériel juvénile issu de pousses multipliées *in vitro*. Cependant, la réussite de la micropropagation des bourgeons dépend selon certains auteurs (Auge et al, 1989 ; Yakoub- Bougdal, 2005 ; Mansseri-Lamrioui, 2011) de la période de prélèvement des boutures, d'après ces chercheurs les explants prélevés en automne (repos végétatif) sont plus efficaces que ceux prélevés au printemps.

Pour la suite de notre travail, nous avons retenu le MS comme milieu de culture adéquat et les microboutures issues de pieds adultes comme matériel végétal.

3-Influence des balances hormonales et la taille de la microbouture sur le débourrement:

3.1- Réponses des microboutures à deux ramifications ensemencées sur le milieu MS additionné de 0.01 (mg/l) d'AIB + 1 (mg/l) de BAP

Après 3 mois de culture, les résultats sont mentionnés dans le graphe suivant :

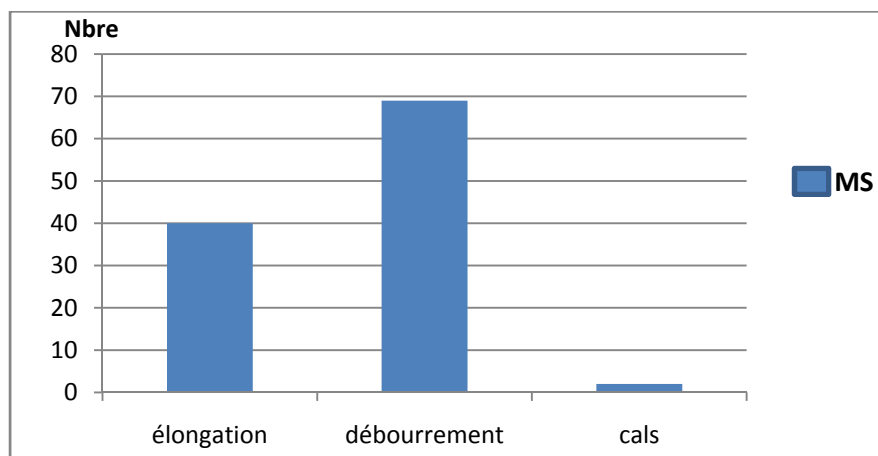


Figure 16 : Effet de la balance hormonale 0,01(mg/l) d'AIB + 1 (mg/l) de BAP sur le développement des microboutures.

L'analyse de la figure 15 montre que les microboutures à deux ramifications ensemencées sur le milieu MS additionné 0.01(mg/l) d'AIB + 1 (mg/l) de BAP, nous ont permis d'obtenir après un temps de latence de 16 jours un nombre important de bourgeons débourrés, au niveau apical et axillaire.

Le développement des microboutures commence avec un gonflement des axillaires au bout de la 3^{ème} semaine de culture (Pl.III : B). Le nombre de débourrement des apex apicaux et axillaires est plus important (Pl.III : C) à la 6^{ème} semaine de culture. Les bourgeons néoformés présentent un accroissement à 9 semaines de culture (Pl.III :D). A deux mois et demi, les écailles foliaires juvéniles sont allongées.

3.2- Réponses des microboutures à plusieurs ramifications ensemencées sur milieu MS additionnée de 0.4 (mg/l) BAP

Au cours de cette étape, nous avons mis en culture :

- Des microboutures à deux ramifications ;
- Des microboutures à plusieurs ramifications.

L'analyse du tableau 5, montre un bon débourrement avec les deux types de microboutures. Nous avons constaté un temps de latence de 16 jours chez les microboutures à plusieurs ramifications, qui est supérieur à celui des microboutures à deux ramifications à savoir 11 jours.

Tableau 5: Le nombre d'élongation et de débourrement des deux types de microboutures ensemencées sur MS additionné de 0.4 (mg/l) de BAP

	Temps de latence	Elongation des apex	Débourrement	Cals	Nombre d'explants
MS0.4 (mg/l) BAP (à 2 ramifications)	11 j.	154	342	3	56
MS0.4 (mg/l)BAP (à plusieurs ramifications)	16 j.	163	315	0	56

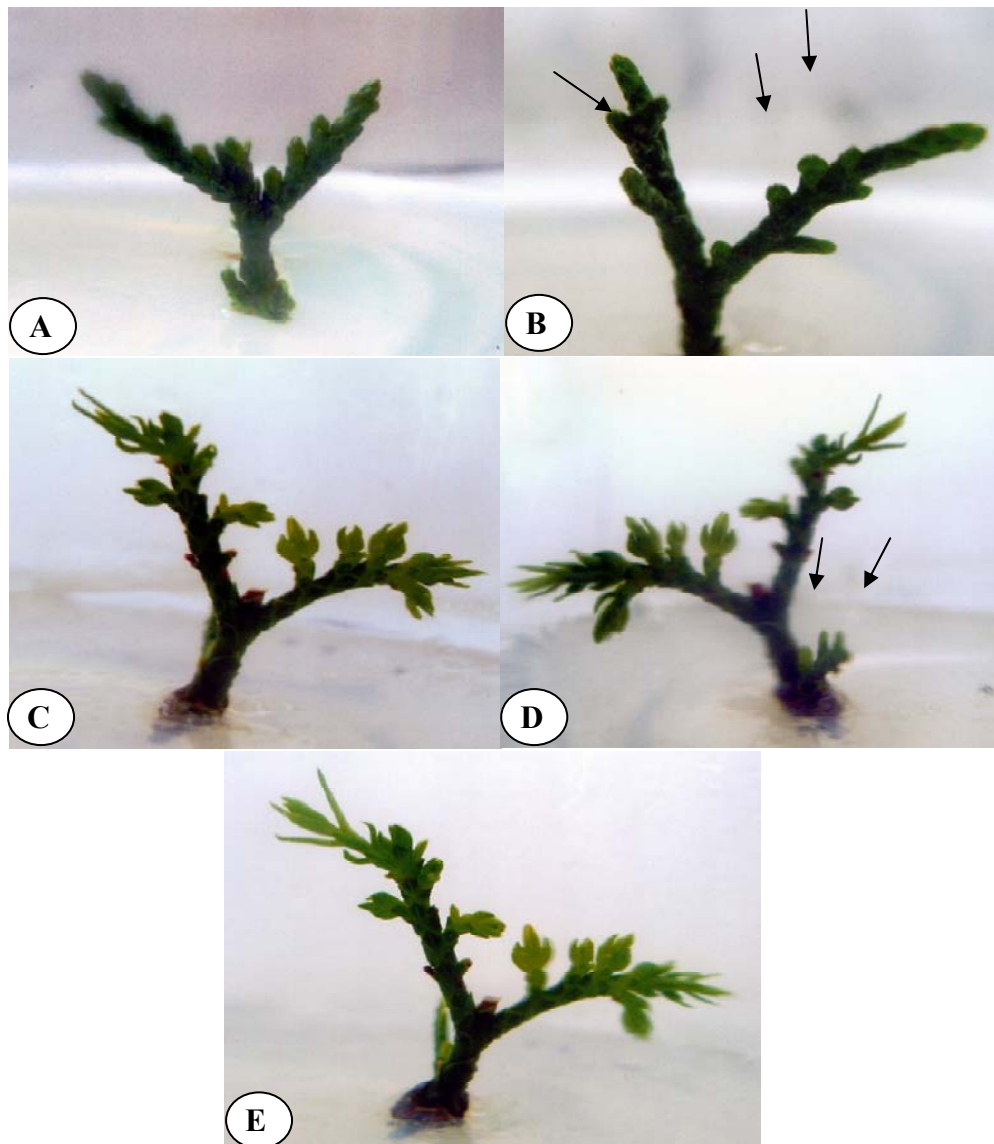


Planche III :Microbouturesdu cyprès du Tassili à deux ramifications ensemencée sur le MSadditionné de 0.01 mg/l AIB + 1mg/l BAP

A : Microbouture au moment de l'ensemencement (l'état initial).

B :Microbouture après 3semaines de culture, avec gonflement des bourgeons axillaires (flèches) qui apparaissent colorées en vert.

C : Microboutures après 6 semaines de culture, avec un débourrement des bourgeons apicaux et axillaires.

D : Microboutures après 9 semaines de culture, accroissement des bourgeons néoformés et débourrement d'autres bougeons (flèches).

E : Microboutures après 12 semaines de culture, avec allongement des écailles foliaires des bourgeons apicaux.

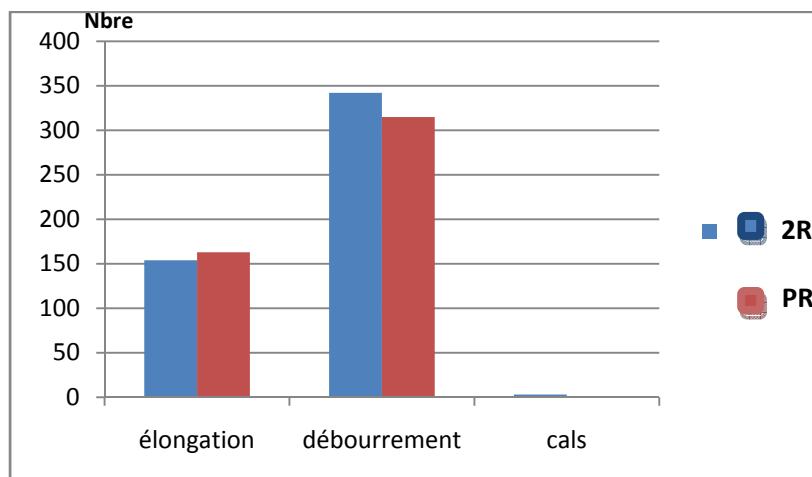


Figure n°17: Développement des microboutures avec deux ramifications (2R) et plusieurs ramifications (PR) sur le MS à 0.4 (mg/l) BAP.

L'analyse de la figure 17 montre un pourcentage de débourrement légèrement supérieur chez les microboutures à 2 ramifications avec un taux de 61.07% contre 56.25% avec les microboutures à plusieurs ramifications.

Avec les microboutures à deux ramifications, nous observons un allongement des écailles foliaires déjà existantes (Pl. VI : B et C) à 9 et 12 semaines de culture. A trois mois est demi un allongement remarquable des écailles foliaires a été observé (Pl. VI: D et E).

Avec les microboutures à plusieurs ramifications, nous observons un développement des bourgeons axillaires avec une élongation des écailles foliaires (Pl. V: B et C). A la 9^{ème} semaine de culture, nous observons la formation de nouvelles écailles foliaires (Pl. V : D). A deux mois de culture, nous observons une prolifération intense des ramifications l'emportant sur le bourgeon apical (Pl. V : E).

La morphologie des microboutures à deux ramifications est modifiée, la forme des feuilles juvéniles s'éloigne de la forme en écaille. Par contre le développement des apex axillaires issus des microboutures à plusieurs ramifications se rapproche de la structure initiale des feuilles.

Concernant la phase de multiplication en présence d'hormone, nos essais ont mis en évidence l'efficacité de la BAP seule ou associée sur le développement des microboutures. Cependant, la BAP à 0.4 mg/l seule est plus efficace sur le développement des microboutures par rapport à la combinaison hormonale (l'AIB 0.01 (mg/l) + BAP 1 (mg/l)) quel que soit le type de la microbouture ensemencée.



Planche VI : Microbouturesdu cyprès du Tassili à deux ramificationsensemencées sur le milieu MS à 0.4 mg /l de BAP.

A : Microboutureau stade initial.

B : Microboutureprésentant un développement important des bourgeons apicaux à 9 semaines de culture.

C : Microboutureprésentant un allongement de toutes les écailles foliaires formées à l'extrémité apicale.

D et E : Les microbouturesprésentant des écailles fortement allongées à 12 semaines de culture.

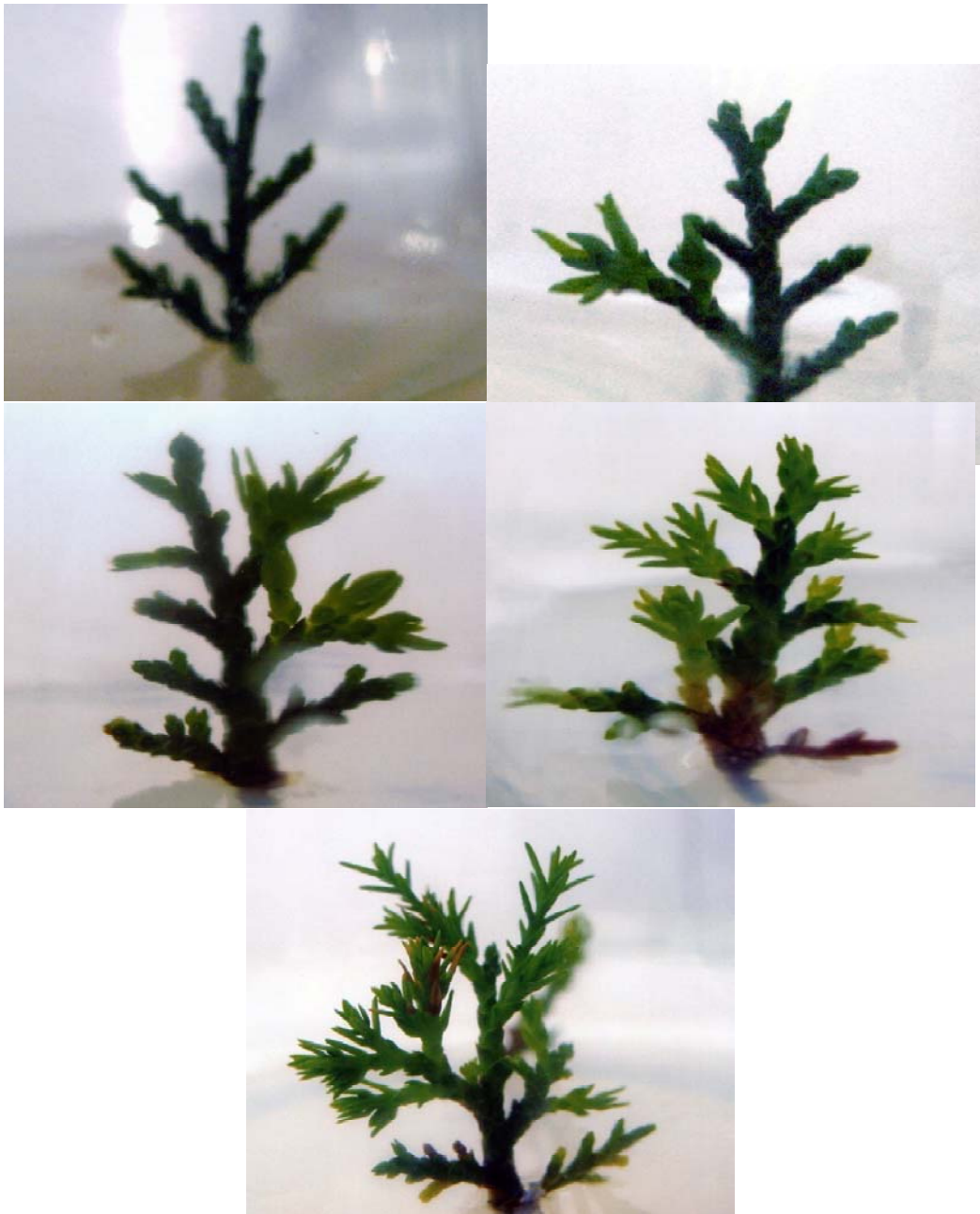


Planche V : Microboutures du cyprès du Tassili à plusieurs ramificationsensemencées sur milieu MS aditionné de 0.4 mg/l de BAP.

A : Microbouture au moment de l'ensemencement, état initial.

B : Microbouture après 3 semaines de culture, développement des bourgeons axillaires avec élongation des écailles foliaires.

C : Microbouture après 6 semaines de culture, débourrement d'autre bourgeons axillaires (flèches).

D : Microbouture après 9 semaines de cultures, développement de tous les bourgeons axillaires.

E : Microbouture après 12 semaines de culture, développement très important des bourgeons initialement débourrés.

Nos résultats sont similaires à ceux de Lebtahi (2009) sur le cyprès du tassili cultivé sur MS additionné à 0.4 mg/l BAP. Ruzic et Vujovic (2008), affirment que les meilleurs paramètres de la multiplication ont été obtenus avec la concentration de 1 mg/l de BAP et 0.1 mg/l de AIB pour la variété de la cerise douce (*Prunus avium* L.). La concentration à 4 mg/l de BAP semble efficace pour la prolifération des pousses de *Prunus cerasus* et *Prunus munsoniana* (Dalzotto et Docampo, 1997). Hamlat (1995) affirme que quelque soit l'origine de l'explant, la BAP est plus efficace que la kinétine dans le débourrement des bourgeons.

Haicour (2002) signale que le milieu MS pourvu des concentrations de BAP comprises entre 0.5 et 1mg/l, en présence de 0.01mg/l d'ANA stimule la formation des bourgeons sur les microboutures de *Sequoiadendron giganteum*.

Mansseri-Lamrioui (2011) affirme que la BAP à 2 mg/l présente le coefficient de multiplication le plus élevé, ainsi qu'une meilleure qualité des vitro-plants chez *Prunus*.

En outre, nous avons eu un meilleur débourrement avec les microboutures à deux ramifications comparativement aux microboutures à plusieurs ramifications. Nous suggérons que chez les microboutures à plusieurs ramifications les taux d'hormones endogènes sont élevés s'exprimant d'une façon néfaste sur le débourrement des bourgeons. D'ailleurs, Cornu et Dalet (1987) ont constaté que les plus faibles pourcentages de débourrement et de développement des pousses de Merisier sont dus aux fortes concentrations de BAP qui les inhibent.

Par ailleurs, nous avons obtenus rarement la formation de cals petiolaires à la base des microboutures à deux ramifications. Ces cals peuvent réduire le débourrement des microboutures. Dans les cas observés, ils ont même tendance à envahir progressivement le bourgeon, inhibant de la sorte ses possibilités d'évolution (Dumanois et al, 1986)

En ce qui concerne, le repiquage des microboutures sur MS riche en auxines à 4mg/l de AIB n'affiche aucun résultat positif sur l'enracinement, cela peut être dû à l'accumulation des produits phénoliques empêchant l'induction de la rhizogenèse.

4-Analyse statistique

4.1-Concernant les taux moyens de reprise

Tableau n° 6: Taux moyens de reprise par condition expérimentale

Milieu Type bouture	GA	MS	MS/2	DKW	Totaux Par type de boutures
Juveniles	11.11	27.77	—	05.55	14.81
Adultes	30.55	38.88	19.44	—	29.63
Totaux par milieu	20.83	11.11	19.44	05.55	23.61

Les taux de réussite moyens obtenus, sont représentés dans le tableau ci-dessus. Nous constatons que le taux moyen de reprise par condition expérimentale est de 23.61% représentant 53/216 de l'ensemble des 6 essais réalisés.

Le meilleur taux de débourrement (réussite) de 50 % est obtenu avec des microboutures adultes dans les milieux MS alors que les plus faibles taux de réussite sont obtenus chez les microboutures juvéniles avec les milieux de culture DKW et GA.

L'analyse de la dispersion des taux de réussite, fait apparaître des variations élevées de 13.69% et de 11.78 respectivement dans les milieux GA et MS, ainsi que pour les 2types de boutures (14.81 % pour les boutures juvéniles et 13.24 % pour les boutures adultes).

La variance moyenne étant de 7.97% avec une erreur relative commise de 21.45%, erreur supérieure au seuil biologiquement admis (12%). Ceci pourrait être du à la différence d'âge des microboutures utilisées et leurs taux d'hormones endogènes.

Par conséquent, l'homogénéisation du matériel végétal doit être plus poussée et le nombre de microboutures doit être augmenté.

- Par ailleurs, La répartition des taux de reprise obtenus par condition expérimentale suit une distribution normale (Test de Normalité), (fig. 18).



Figure 18 : Distribution de fréquence des taux moyens de reprise.

En effet, le test de normalité révèle que 91.66% des essais réalisés présentent des résultats situés dans l'intervalle (23.61 ± 7.97) , avec une asymétrie à gauche (coefficient d'asymétrie positif), ce qui est indicateur de la possibilité d'amélioration des taux de réussite par diversification des conditions expérimentales. En effet, 44.44% des résultats obtenus sont inférieurs au taux moyen de réussite estimée.

4.2 - L'analyse de la variance concernant les deux milieux (MS. GA) et les deux types de boutures :

Tableau 7: d'analyse de la variance des taux de reprise

Sources de variation	DDL	SCE	CM	F _{obs}	F _{thé}
Facteur milieu	01	468.27	468.27	4.26	5.32
Facteur boutures	01	669.68	669.68	6.09	
Interactions	01	83.57	83.57	< 01	
Var. résiduelle	08	879.32	109.92		

L'analyse de la variance (modèle aléatoire) a permis de montrer l'absence de différence significative entre les milieux de culture (Fréquence observée estimée à 4.26 inférieure à la fréquence théorique égale à 5.32) et de leurs interactions avec le type de microboutures utilisées (F observé inférieur à 1).

Par contre, celle-ci a révélé des différences significatives entre les types de microboutures utilisés (Fréquence observée estimée à 6.09, supérieure à la fréquence théorique égale à 5.32) au seuil d'erreur de 5%.

Le coefficient de variation résiduelle (CV_R), estimé à 47.21 % dépassant la norme biologiquement admise de 10 %, atteste que l'importance de la variabilité des résultats, ne permet aucune conclusion sur l'effet des milieux.

4.3 -Comparaison entre les deux milieux MS/2 et DKW : (Test de Student)

$$T_{obs} = \frac{19-5.55}{\sqrt{30.87-2.58}} = \frac{13.89}{5.78} = 2.40$$

$$2.40 > T_{thé} (2.132)$$

Le test de Student a permis de montrer des différences significatives entre les deux milieux associés aux types de boutures, ce qui implique que le milieu MS/2 serait plus efficace dans 95% de cas au moins.

4.4 -Effet des hormones et de la taille de la microboutures :

Tableau 8 : Comparaison des hormones et de la taille des microboutures :

	ϵ
Effet de l'hormone : MS + 0.4 mg /l BAP et de MS + 0.01 mg/l AIB+ 1mg/l BAP	0.875
Effet de la morphologie de l'explant : MS + 0.4 mg /l BAP (PR) et MS + 0.4 mg /l BAP (2 R)	0.22
Effet de l'absence de l'auxine : MS + 0.4 mg /l BAP et de MS + 0.01 mg/l AIB+ 1mg/l BAP	0.875

La comparaison des résultats obtenus dans les différentes conditions expérimentales, par l'utilisation de la méthode de l'écart-réduit n'a pas montré de différences significatives, concernant les effets de l'hormone, ainsi que de la taille des microboutures.

4.5 -Relation entre le nombre de rameaux allongés et le bourgeonnement :

Tableau 9 : Relation entre l'élongation (x) et le débourrement (y)

	r	r ²	Nature de la relation
Essai 1 : MS+ 0.01 mg/l AIB+ 1mg/l BAP	+0.74	0.5476	Relation positive forte
Essai 2: (2 ramifications) MS+ 0.4 mg /l BAP	+0.85	0.7225	Relation positive très forte
Essai 3 : (plusieurs ramifications) MS +0.4 mg /l BAP	+0.91	0.8281	Relation positive forte

La relation entre la taille de la microbouture et le débourrement, sous les différentes conditions a été appréciée par l'estimation des coefficients de corrélation. Il en résulte une synergie d'évolution de ces deux caractères (proche de +1). A cet effet, le taux de bourgeonnement pourrait être expliqué à 54.76%, à 72.25% et à 82.81 % par l'allongement des microboutures respectivement dans les essais 1, 2 et 3.

II- ETUDE DES MYCORHIZES

1- Morphologie racinaire

L'observation morphologique globale du système racinaire des plantules du cyprès de Tassili *Cupressus dupreziana* A. Camus âgées de 1 et 3 ans a montré un type racinaire mixte. En effet, le système racinaire présente d'une part, deux racines secondaires épaisses produites au dessous du collet à croissance horizontales avec des ramifications qui font penser au système fasciculé (Pl. VI : A et B). D'autre part, un système racinaire avec un axe principal beaucoup plus épais partant du collet à croissance verticale en pivot, qui se ramifie en racines d'ordre secondaire qui émettent à leur tour des racines d'ordres tertiaires puis quaternaires (Pl. VI: C).

Nous avons cependant, noté une particularité concernant certaines racines d'ordre secondaire. En effet, nous avons observé une seule racine secondaire très longue et fine par rapport aux autres racines secondaires du même ordre. Elle se ramifie jusqu'au 4^{ème} ordre comme la grande majorité des racines. Contrairement aux autres racines secondaires, celle-ci subit une croissance verticale très importante parallèlement au pivot.

L'observation du système racinaire à l'œil nu et à la loupe stéréoscopique nous a permis de constater l'absence de poils absorbants. Nous avons aussi constaté des racines d'ordres tertiaires et quaternaires relativement longues, épaisses et molles. Ces racines se présentent sous différentes couleurs : certaines sont de couleur jaunes translucides assez courtes charnues, d'autres sont de couleur orange et d'autres encore sont de couleur marron de différentes longueurs (Pl. VI : D, E, F, G, H). Leur aspect charnu et leur différentes couleurs nous ont laissé penser qu'il pourrait s'agir d'ectomycorhizes simples ou d'ectendomycorhizes.

Ces résultats sont en contradiction avec ceux obtenus par ABDOUN (2002), qui a fait ses observations au Tassili N'Ajjer sur de jeunes plantules de cyprès du tassili couchées par les crues et qui présentaient un système racinaire latéral très développé, qu'elle a considéré comme étant fasciculé. Ainsi selon le même auteur, cette espèce ne présente pas un système racinaire mixte, ce qui est exceptionnelle pour une Gymnospermes. Par contre LAFERRER (1993), dans son étude effectuée sur des plantules âgées de 2 ans produites au jardin Botanique de Montpellier en France a signalé la présence d'un pivot, qu'il a considéré comme une racine plongeante peu ramifiée de 78 cm de longueur.

Nous supposons que le cyprès du tassili dans son aire naturel devrait développer un système racinaire mixte, pour pouvoir exploiter les couches superficielles du sol ainsi qu'un système

pivotant qui va permettre non seulement de pomper l'eau à partir de la nappe phréatique mais aussi de lui permettre de se fixer dans cet écosystème particulier.

Il a été remarqué l'absence de poils absorbants dans le système racinaire des plantules de pépinière (Pl. VII : A) et dans celui des arbres de l'arboretum de Baraki. Cependant ils sont observés dans les fragments racinaires prélevés dans la mycorhizosphère des arbres adultes de l'arboretum de Baïnem (Pl. VII : B).

Il nous est difficile d'expliquer la présence des poils absorbants des fragments racinaires d'arbres de l'arboretum de Baïnem et leur absence dans les racines des plantules élevées en pépinières et celles des arbres de l'arboretum de Baraki. Les poils absorbants observés sur les racines des arbres de Baïnem ont une structure inhabituelle, ils sont curieusement organisés sur toute la longueur de la racine. La question qui se pose est de s'avoir si vraiment se sont des poils absorbants ou tout simplement des poils d'ornementation ? L'autre question qui s'impose s'agit-il vraiment de racines d'arbres du cyprès du tassili, ou tout simplement les racines de jeunes plantules d'une espèce d'*Acacia* sp. (Mimosa à fleur jaune) qui croissaient aux pieds des arbres de l'arboretum de Baïnem ? Et à ce moment il s'agirait d'une erreur d'échantillonnage de notre part. Ce qui serait plus plausible.

Si l'absence de poils absorbants était généralisée même chez les arbres de Baïnem, nous pourrions suggérer que le système racinaire du cyprès du tassili est du type magnoloïde proposé par CRONQUIST (1968). Ce caractère montre la dépendance du cyprès de tassili à la mycorhization pour l'absorption des éléments minéraux. En effet, BAYLIS (1975) a rapporté que les plantes qui présentent des racines de type magnoloïde, c'est-à-dire des racines épaisses avec peu ou sans poils absorbants, tendent à montrer une colonisation mycorhizienne à arbuscule (MA) plus importante et une dépendance plus grande que celles ayant des poils absorbants et des racines fines et longues.

JOHNS (1980) a vérifié la théorie émise par BAYLIS (1975) sur 89 espèces forestières brésiliennes. Il a constaté que le système racinaire magnoloïde était prédominant chez les espèces étudiées et qui étaient toutes mycorhizées.

Selon BAYLIS (1975), au cours de l'évolution, il semblerait que la diminution des poils absorbants s'est déroulée avec un transfert de la fonction des poils absorbants au mycélium du CMA. Ce transfert de fonction semble avoir lieu dans un environnement où le phosphore était difficilement accessible pour la plante, comme c'est le cas des plantes des écosystèmes désertiques, habitat naturel du cyprès du tassili. Le mycélium du CMA semble plus efficace que les poils absorbants en raison de sa capacité d'explorer un volume de sol plus important.

De plus, le mycélium n'a pas de seuil limite d'absorption du phosphore, comme c'est le cas de toutes les plantes, il peut mettre le phosphore en réserve sous forme de poly phosphates. Il est aussi capable de le mettre à la disposition de la plante en cas de besoin. Par ailleurs, le mycélium peut avoir plus facilement accès aux formes de phosphore les moins solubles présentes dans le sol.

L'observation morphologique détaillée des racines longues charnues, molles et colorées des différents systèmes racinaires étudiés, nous a permis de douter fortement de la présence d'ectomycorhizes ou d'ectendomycorhizes dans le système racinaire aussi bien des jeunes plantules de pépinières (âgées de 1,3 et 5 ans) que dans les racines prélevées au niveau d'arbres relativement âgés (17 et 34 ans) des deux arboreta de l'INRF. Pour confirmer ces observations nous avons jugé utile de réaliser des coupes histologiques semi-fines transversales et longitudinales.

2 - Coupes histologiques

L'observation, des coupes semi-fines des racines particulières de différentes couleurs citées dans le paragraphe précédent ainsi que les autres racines d'ordres tertiaires et quaternaires des plantules et des arbres considérés dans ce travail, a confirmé de façon définitive l'absence d'ectomycorhizes et d'ectendomycorhizes du système racinaire du cyprès du tassili *Cupressus dupreziana* A. Camus.

En effet, les différentes coupes transversales et longitudinales colorées au bleu de trypan par la technique de Philips et Hayman (1970) révèlent l'absence des structures relatives aux ectomycorhizes et aux ectendomycorhizes, telles que le manteau fongique quelque soit son épaisseur, le réseau de Hartig et les pelotons d'hyphes intracellulaires dans les cellules du parenchyme corticale.

L'assise subéreuse est bien évidente, colorée en brun particulièrement sur la paroi externe subérifiées qui apparaît plus épaisse (Pl. VII : C, D, E et F). L'absence du réseau de Hartig nous a permis d'observer clairement les ponctuations, au niveau des parois cellulaires du parenchyme cortical. Nous avons aussi observé la présence de conidies aussi bien au niveau de la paroi externe de l'assise subéreuse que dans les espaces intercellulaires et intracellulaires et même dans les méats du parenchyme cortical. Nous avons également observé deux types de mycéliums : L'un fin hyalin septé qui semble produire des conidies claires et l'autre large foncé septé aussi qui semble produire des conidies foncées (Pl. VIII : A, B, C, D). Les deux pourraient être formés par des endophytes.

La présence de tanins est observée aussi bien dans les cellules de l'assise pilifère que dans les cellules du parenchyme cortical (Pl. IX : A et B)

Le mycélium foncé septé pourrait correspondre à celui observé par Jumpponen (2001), Peterson *et al.*, (2004) et Peterson *et al.*, (2008), qu'ils nomment endophytes foncés septés (EFS). Par contre, le mycélium clair peut correspondre à l'endophyte observé par Yu *et al.*, 2001 qui peut produire dans certaines conditions des conidies intra radiculaires (Peterson *et al.*, 2004). Selon ces auteurs, le mycélium foncé est un mycélium stérile. Cependant, le mycélium que nous avons observé semble produire des conidies intra radiculaires de la même couleur foncée.

La présence des tannins peut être expliquée comme une réaction normale de la plante suite à la présence intracellulaire des endophytes et des CMA, dont la présence est mise en évidence dans la grande majorité des racines échantillonnées. Il s'agit de polyphénols sécrétés par la plante comme première réaction de défense.

3-Observation et mise en évidence de l'infection mycorhizienne à arbuscules

3.1- dans les coupes histologiques

Dans la grande majorité des coupes histologiques transversales et longitudinales échantillonnées nous avons mis en évidence la présence de mycorhizes à arbuscules. La présence d'arbuscules intracellulaires est observée dans de nombreuses coupes aussi bien des fragments racinaires des plantules de la pépinière que ceux des arbres des arboreta de Baïnem et Baraki (Pl. IX : C, D, E). On y observe aussi très clairement la présence de nombreux enroulements d'hyphes et même un point d'entrée (Pl. X : B).

3.2- Dans les fragments racinaires écrasés:

L'observation des fragments racinaires prélevés durant les deux saisons automne et printemps, écrasées et colorées au bleu de trypan par la technique de Philips et Hayman (1970), nous a permis de mettre en évidence la présence de mycorhize à arbuscule. Ces résultats se sont vérifiés aussi bien chez les plantules cultivées en pépinière jusqu'aux racines prélevés dans la rhizosphère des arbres de Baïnem âgés de 17 ans et ceux de Baraki âgés de 34 ans.

Dans la mycorrhizosphère les hyphes fongiques se ramifient abondamment en entrant en contact avec les cellules les plus externes du rhizoderme de la racine hôte. Le contact de l'hyphe est

suivi d'une adhésion puis de la formation d'un appressorium à partir duquel se développera la phase de colonisation de la plante hôte.

La pénétration de l'hyphe à l'intérieur du cortex racinaire peut se faire de différentes manières. Cette pénétration peut s'effectuer soit entre deux cellules épidermiques, soit directement à travers la paroi squelettique de la cellule rhizodermique comme on le voit très bien dans une des coupes histologiques (Pl. X : B).

A l'intérieur des racines les hyphes fongiques se ramifient et s'étendent surtout au niveau du parenchyme cortical. Nous avons observé des hyphes avec différentes voies de cheminement : La voie intercellulaire et intracellulaire. Nous avons aussi observé des hyphes avec différents diamètres, assez gros dans l'espace intracellulaire, et des hyphes à diamètre réduit dans l'espace intercellulaire formant à leur extrémité des vésicules (Pl. X: C,D,E).

A l'intérieur des cellules, les hyphes fongiques se ramifient pour former des arbuscules. Nous avons observé des arbuscules qui diffèrent par leurs aspects et leurs troncs. Ils peuvent se présenter avec un seul tronc et des ramifications importantes occupent toute la surface cellulaire (Pl. XI : A et B).

Les hyphes pénètrent également en quantité importante dans les cellules du cortex pour former des enroulements (Pl. XI : C et D).

Nous avons observé des vésicules en nombre important ovales, rondes grandes et petites. Ces structures se forment aussi bien dans les cellules intracellulaires où elles apparaissent bien grandes que dans les espaces intercellulaires du parenchyme cortical (Pl. X : E). Ces structures ne se forment qu'après la sénescence et la résorption des arbuscules.

Pour le mode de colonisation des champignons MA nous avons pu observer le type morphologique Paris qui est représenté par des enroulements d'hyphes dans les espaces intracellulaires (Pl. X : A). D'un autre côté, nous avons observé la formation d'arbuscules dans les cellules du cortex, caractéristique du premier type Arum ou Arum A (Pl. XI: A). Nous avons aussi constaté la présence d'hyphe intercellulaire à partir duquel partent deux branches dont chacune se ramifie dans deux cellules adjacentes, caractéristique du second type Arum ou Arum B. Dans le même fragment racinaire nous avons également observé des enroulements d'hyphes dans les espaces intracellulaires, caractéristique du type Paris (Pl. XI : B). Nous avons déduit qu'il s'agit d'un type mixte Arum B et Paris ensemble. Ainsi nous pourrions dire que dans le cyprès du tassili, il existe le type Arum A et le type mixte Arum B-Paris.

Nous avons également observé la présence dans un fragment racinaire un endophyte à mycélium foncé septé avec des conidies de la même couleur à côté d'un enroulement d'hyphe intracellulaire du mycélium des CMA (Pl. XI : E). Ceci montre que les champignons peuvent être associés.

Les observations des fragments racinaires écrasés et des coupes histologiques du système racinaire du cyprès du tassili prélevés aux niveaux des plantules âgées de 1, 3, et 5 ans, ainsi que des arbres âgés de 17 ans et 34 ans, quelque soit la saison de prélèvement révèlent la présence de mycorhizes à arbuscules.

La présence d'arbuscules s'est manifestée au niveau des plantules et des parcelles d'études. Il s'agit de structures bien visibles au microscope optique, ils sont très ramifiés, résultant d'une dichotomie répétée, nommées par Gallaud (1905) arbuscules. En effet, les arbuscules représentent les points fonctionnels entre les deux symbiotes (Gianinazzi, Gianinazzi et Peterson 1982) et reflètent le mieux les potentialités d'échanges symbiotiques de l'association MA en place (Harly et Smith 1983). Harrison (1999) confirme que cette interface cellulaire est considérée comme le site d'échange bidirectionnel des éléments nutritifs entre les deux symbiotes. La durée de vie des arbuscules se limite à quelques jours, après ils deviennent sénescents et se dégradent en laissant la cellule intacte et capable d'intégrer un nouvel arbuscule (Sandres, 1974, Brundrett et *al.*, 1996, Harrison, 1999). Cette sénescence n'affecte pas la progression du CMA qui se poursuit tout au long de la racine en croissance (Jacquelinet et Jeanmougin, 1987).

Dans la plus part des cas, après leur résorption, les arbuscules sont remplacés par de nombreuses vésicules.

Les vésicules sont des structures riches en gouttelettes lipidiques, elles joueraient le rôle d'organes de réserve. Nous avons constaté une grande quantité de vésicules dans tous les fragments racinaires observés. Ce constat montre que, les espèces de champignons mycorhizogènes existantes dans le système racinaires des plantules de *Cupressus dupreziana* A. Camus doivent faire partie de groupes de CMA qui produisent des vésicules dans les tissus des racines hôtes. Alors qu'il existe d'autres espèces qui produisent des vésicules dans la phase mycorhizosphériques uniquement appelées vésicules auxiliaires que nous n'avons malheureusement pas observées.

Il reste à comprendre le rôle des enroulements d'hyphes dans les échanges bidirectionnels. Nous supposons que les enroulements d'hyphes joueraient eux aussi le rôle d'organes de réserves du phosphore sous forme de poly phosphates.

Ces résultats sont similaires à ceux de CHAFI (1992) sur *Cupressus sempervirens* dans la zone aride algérienne de Naama, de Duponnois *et al.*, (2002) et d'Ouahmane *et al.*, 2007 sur *Cupressus atlantica* au Maroc dont les résultats montrent que la croissance de cette espèce est très dépendante de la présence des CMA. Ces résultats confirment donc la présence des MA dans le système racinaire des différentes espèces de cyprès, présents dans les régions méditerranéennes.

La présence des deux champignons endophyte et CMA chez le cyprès de tassili confirme les résultats de Currah 1997 et Peterson *et al.*, 2004 qui signalent l'association symbiotique entre les deux types de champignons. Selon ces mêmes auteurs les endophytes sont rencontrés dans de nombreuses espèces végétales, le plus souvent formant des symbioses avec des champignons mycorhizogènes notamment les CMA. D'après Carrol 1986 et Berube 2007, les endophytes peuvent comme les champignons mycorhizogènes aider les plantes à assimiler certains éléments minéraux comme l'azote et le phosphore.

4- Récolte des propagules fongiques de la mycorhizosphère du cyprès de tassili

La méthode de tamisage humide, nous a permis d'isoler des spores de champignons mycorhizogènes à arbuscules présents dans la mycorhizosphère des différentes plantules de la pépinière de Baïnem et de celle de l'arboretum de Baïnem. Nous avons constaté une grande diversité de spores de différentes formes, dimensions et couleurs.

Dans la mycorhizosphère des plantules âgées d'une année, il n'y avait pas une grande diversité. Nous n'y avons pu observer que deux types morphologiques de spores différentes organisées en grappe sur leur mycélium en une sorte de sporocarpe sans péricarpium (cluster). Les unes sont de couleur hyaline blanchâtre et les autres sont d'un brun clair mielleux (Pl. XII : A).

Nous suggérons que les spores isolées du substrat de ces plantules d'une année sont des fructifications de deux espèces différentes possiblement du genre *Glomus*. Notre suggestion est basée sur le fait que se sont surtout les espèces du genre *Glomus* qui forment des spores en grappe.

Dans le sol des plantules âgées de trois ans nous avons pu observer une grande diversité de spores, qui diffèrent entre elles par leur taille, leur couleur, et leur aspect. Chaque type était représenté par une grande quantité.

La plupart d'entre elles étaient regroupées en grappe dans des sporocarpes sans péricarpium (ou cluster). Les unes étaient hyalines de couleur qui vire vers le beige (Pl. XII : B),

d'autres de tailles variables. Nous avons pu observer un sporocarpie contenant des spores très claires à paroi très épaisse, portées par des structures circulaires à paroi aussi épaisse en continuité avec un hyphes suspenseur (Pl. XII : C). Il s'agit probablement d'espèce de champignon mycorrhizogène, mais que nous sommes incapable d'identifier.

Les spores solitaires sont de taille variable et de couleurs relativement différentes. En effet certaines spores sont de grandes tailles (Pl. XIII : A) à parois peu épaisse et de couleur orange évidente alors que d'autres à paroi très épaisse et de taille un peu moins importante et dont l'hyphes suspenseur est évident (Pl. XII : C). Ce qui montre bien qu'il s'agit d'espèces différentes.

D'autres spores solitaires possédaient des hyphes suspenseurs bien visibles (Pl. XII : C et D). Elles sont de couleur variant du brun à paroi pluristratifiée dont les strates sont non soudées entre elles, de petites tailles (Pl. XII:D) au brun très foncé presque noire à paroi à strates soudées et de grande taille (Pl. XII : E). La plus part des spores que nous avons pu isoler aussi bien celles regroupées en sporocarpes (cluster) des figures des Planches XII :A et :B, que celles retrouvées solitaires des Planches XII :D et planche XIII :B, peuvent appartenir à différentes espèces de l'ordre des Glomérales, famille des Glomeraceae, genres *Glomus* groupe A ou B selon la classification proposée par Schubler et *al.* (2001). Notre suggestion est basée sur le fait que les spores de ce genre présentent différents types d'organisation de leurs hyphes suspenseurs, toujours persistants après la maturité des spores, et parce qu'ils sont en continuité avec la paroi (Gerdemann et Nicholson 1963, Mosse et Bowen 1968, Hall 1977).

Le second critère qui a permis de les classer dans ce genre est le fait que la plus part produisent des spores aux extrémités des hyphes. Il y a aussi le fait qu'elles peuvent être selon les espèces regroupées en vrais sporocarpes avec péridium ou en grappe, ou alors solitaires.

D'autres spores solitaires dont certaines présentent un hyphes suspenseur bulbeux et une taille assez importante (Pl. XIII : C), caractère qui nous permet de suggérer qu'il s'agit bien de différentes espèce du genre *Gigaspora* dans la classification de (Schubler et *al.*, 2001) dans l'ordre des Diversisporales, famille des Gigasporacées genre *Gigaspora*.

Du sol prélevé de la rhizosphère de l'arboretum de l'INRF de Bainem, nous avons isolé une grande quantité de spores solitaires ou regroupées en grappe, identiques à celles isolées des substrats des plantules âgées de 3 ans. Certaines spores particulièrement les spores solitaires n'ont été rencontrées que dans ce sol (Pl. XII : E) cette espèce semble appartenir au genre *Glomus*.

D'après Giovannetti et Gianinazzi-Pearson (1994) chez les CMA le nombre, la forme, la couleur et l'ornementation de la paroi varient considérablement entre les espèces du même genre.

Nous avons observé un mycélium foncé septé cloisonné, aussi bien dans le sol des plantules de la pépinière ainsi que dans le sol de l'arboretum de Baïnem. Il a un diamètre relativement important et présente des crochets courts qui pourraient correspondre à des structures de reproduction sexuée. Ce mycélien semble produire des exsudats sous forme de gouttelettes tout au long de sa paroi. Il pourrait correspondre à l'endophyte foncé septé (EFS ou DES en anglais) que Peterson et *al.*, 2004 ont décrit. D'autant plus que leur endophyte comme le notre produit des exsudats sur sa paroi (Pl. XIII : D et E).

Planche VI

Organisation du système racinaire et recherche d'ectomycorhizes du cyprés de tassili *Cupressus dupreziana* A. Camus.

Figure A : Racine horizontale (tête de flèche) d'une plantule âgée de trois ans. A.P.N. **Gr x36**.

Figure B : Système racinaire d'une plantule âgée de 3ans présentant un système racinaire mixte, deux racines horizontales (tête flèche) et une racine en pivot (flèche). A.P.N. **Gr x36**

Figure C : Système racinaire d'une plantule âgée d'une année présentant un système racinaire en pivot (flèche) avec des ramifications. A.P.N. **Gr x36**

Figures D, E, F, G et H : Organes soupçonnés comme étant des ectomycorhizes ou ectendomycorhizes (flèches), provenant : D et H- d'arbres âgés de 34ans (arboretum Baraki) ; E et G- arbres âgés de 17 ans (arboretum de Baïnem) et F- plantule âgée de 3 ans (pépinière de Baïnem). L.S. **Gr x56,5**.

A.P.N.= Appariel Photo Numérique manuel

L.S.= Loupe Stéréoscopique

M.P.= Microscope Photonique

Planche VI

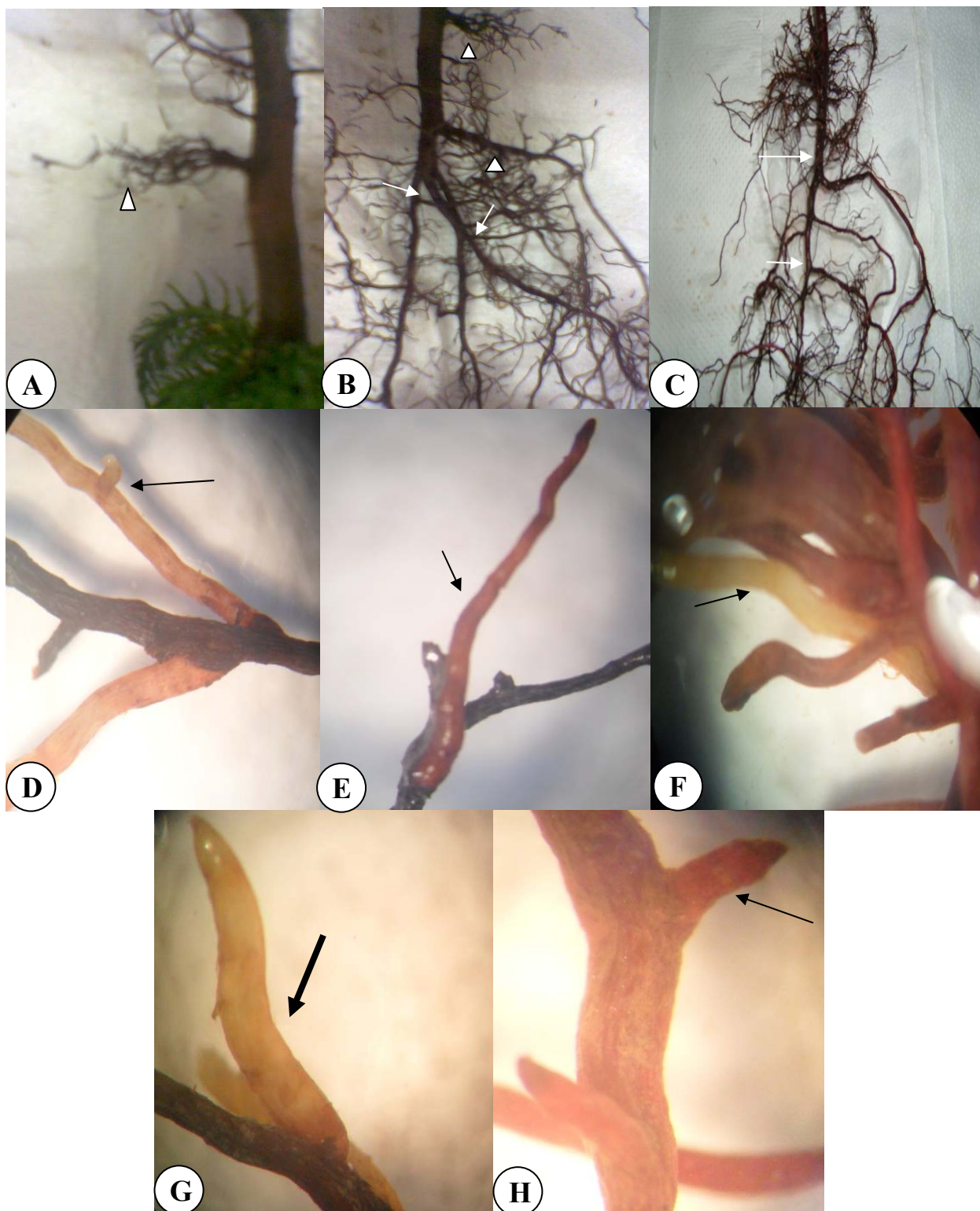


Planche VII
Histo-anatomie de différentes coupes transversales
de racines du *Cupressus dupreziana* A. Camus.

Figure A : Aspect externe de racine sans poils absorbant de plantules. .L.S. **Gr x 56,5.**

Figure B : Racine présentant des poils absorbants ou ornementaux ? D'arbre (arboretum de Baïnem). L.S. **Gr x56.5**

Figure C: Coupe transversale d'une racine sans poils de plantule âgée de 3 ans montrant l'absence d'ectomycorhizes et d'ectendomycorhizes (pas de manteau fongique ni de réseau de Hartig), présence de champignons mycorhizogènes à arbuscules (CMA). M.P. **Gr x 40**

Figure D: Vue générale d'une racine sans poils d'un arbre (arboretum de Baraki), montrant l'absence d'ectomycorhizes et d'ectendomycorhizes. M.P.**Grx100.**

Figure E et F: Vue générale et détail d'une racine avec poils ? D'un arbre (arboretum de Baïnem) montrant absence d'ectomycorhizes et d'ectendomycorhizes, CMA très évidant sur les deux photos (flèche). M.P. respectivement **Gr.x100 et Gr x250.**

Planche VII

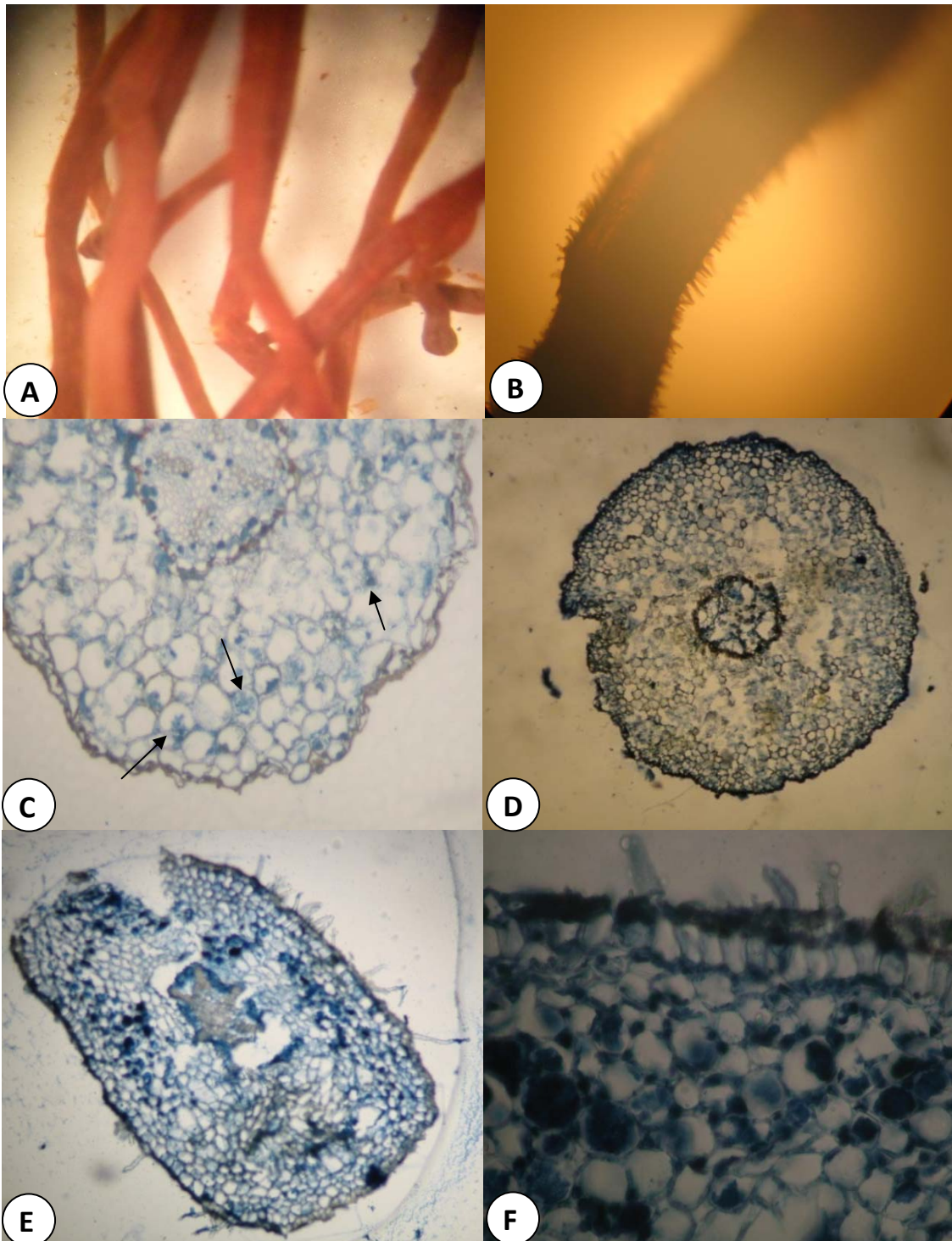


Planche VIII

Histo-anatomie de différentes coupes transversales Et longitudinales de racines du *Cupressus dupreziana* A. Camus.

Figure A : Portion du cortex racinaire (assise subéreuse et cellules du parenchyme cortical)
Hyphe foncé septé dans assise subéreuse (flèches), conidies foncées intracellulaires
dans les cellules subéreuses (tête de flèche) et dans le parenchyme cortical (tête de
flèche) des plantules de 3ans.(Coupe transversale). **M.P.Gr x 400.**

Figure B : Détail des cellules du parenchyme cortical de la coupe précédente, conidies dans
les méats (tête de flèche) et ponctuations dans paroi évidentes (flèche). Structures
intracellulaires de CMA. (Coupe transversale). **M.P.Gr x 1000.**

Figure C : Hyphe foncé septé dans le cortex sur toute la longueur de la racine (flèche) arbre,
de 17 ans(Baïnem). (Coupe longitudinale). **M.P.Gr x 400.**

Figure D : HypheS hyalins septés avec conidies de la même couleur, dans le cortex racinaire,
arbre de 34 ans (Baraki) (Coupe transversale).**P.M.Gr x 400.**

Planche VIII

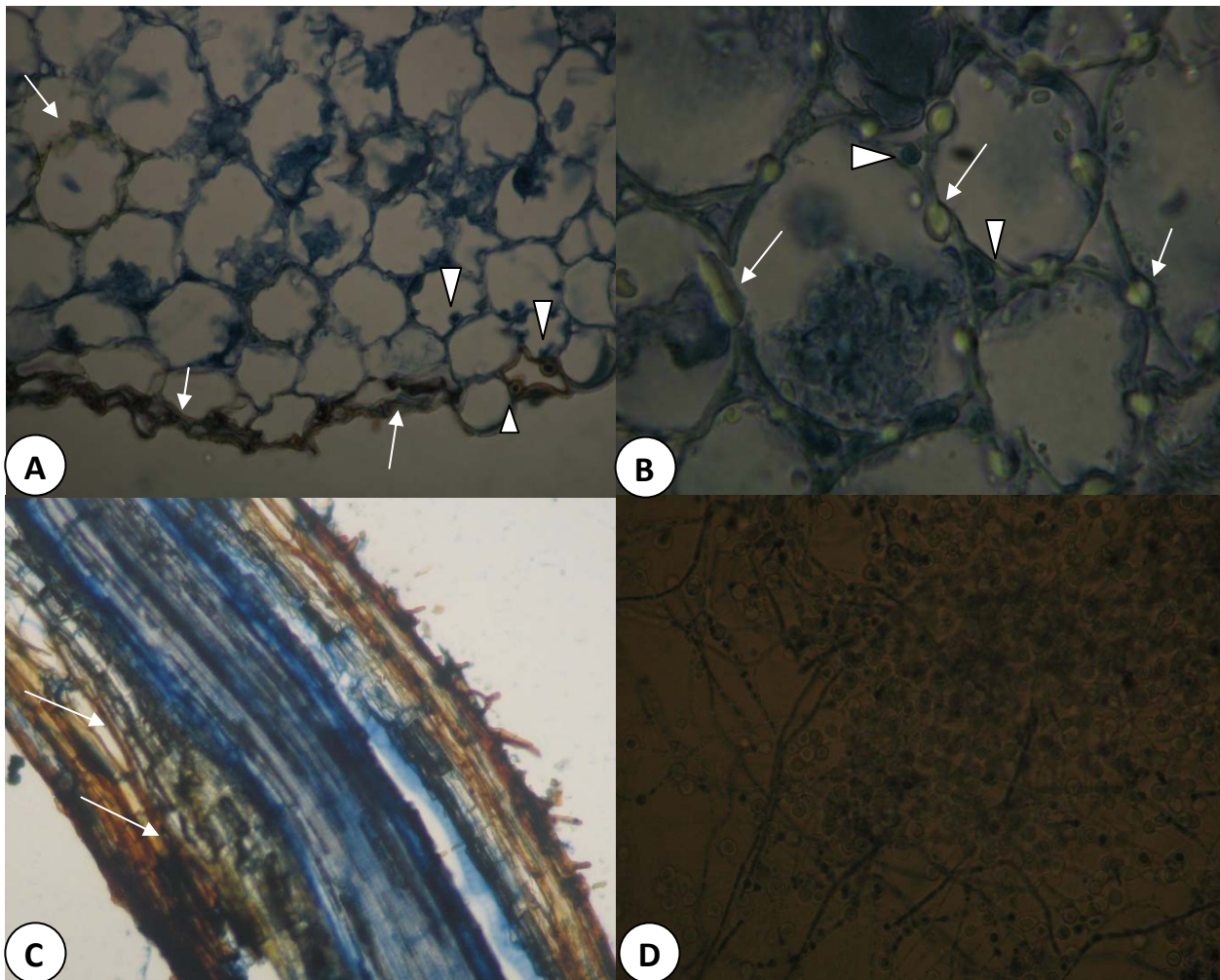


Planche IX

Coupes Histo-anatomiques transversales et longitudinales de racines du *Cupressus dupreziana* A. Camus.

Figure A: Présence de tanins dans les cellules corticales racinaires, arbre de 17 ans (Baïnem).
(Coupe longitudinale). **M.P.Gr x 100.**

Figure B : Présence de tanins au niveau des cellules racinaires, arbre de 17 ans(Baïnem).
(Coupe transversale). **M.P.Gr x 100.**

Figures C. D et E : Arbuscules intracellulaires en sénescence (flèches) dans les cellules du parenchyme corticale racinaire respectivement de plantule de 3ans (C , coupe transversale), d'arbres de 34 ans (Baraki) et 17 ans (Baïnem) (D et E coupes longitudinales). M.P. pour les 3 photos **Gr x 400.**

PLANCHE IX

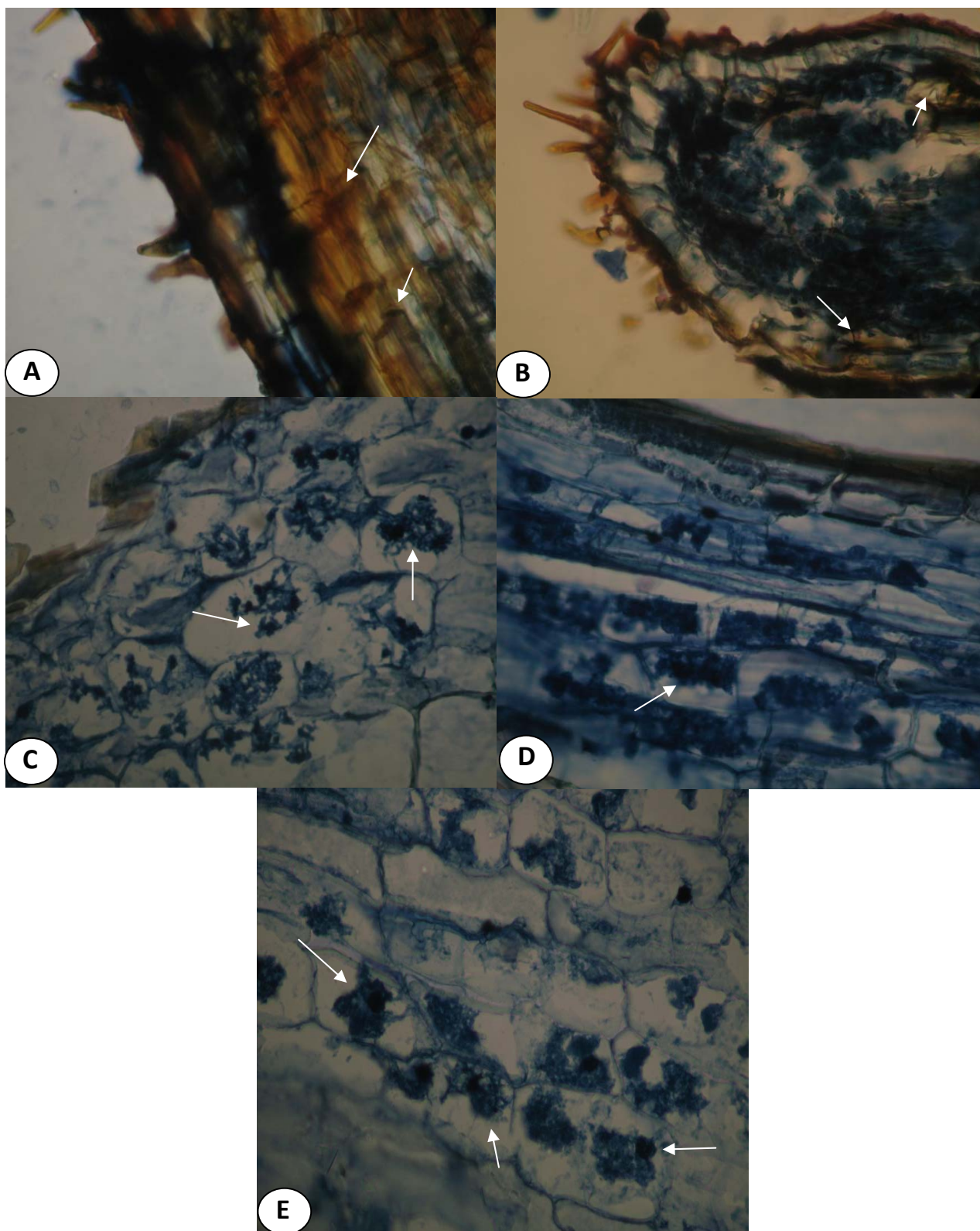


Planche X

Coupes Histo-anatomiques et fragments racinaires écrasés.

Figure A : Enroulement d'hyphe dans cellules corticales de la racine d'arbre de 34ans (Baraki). (Coupe longitudinale). **M.P. Gr x 400.**

Figure B : Point de pénétration d'un hyphe CMA (flèche) dans une cellule du tissu de protection racinaire et formation d'enroulement d'hyphe dans les cellules corticales périphériques (tête de flèche). Racine de plantule de 3ans (Baïnem). (Coupe longitudinale). **M.P.Gr x 100.**

Figure C : Mycélium de CMA intercellulaire (flèche) et intracellulaire (tête de flèche) dans les cellules corticales d'une racine d'arbre 17 ans de (Baraki). (Ecrasement). **M.P. Gr x 100.**

Figure D : Mycélium de CMA intracellulaire dans les cellules corticales d'une racine. Arbre âgé de 17 ans (Baïnem) (Ecrasement). **M.P.Gr x 400.**

Figure E : Vésicules intracellulaires (tête de flèches) et intercellulaires (flèche) dans les cellules corticales, Arbre âgé de 34 (Baraki) (Ecrasement) **M.P.Gr x 100.**

Planche X

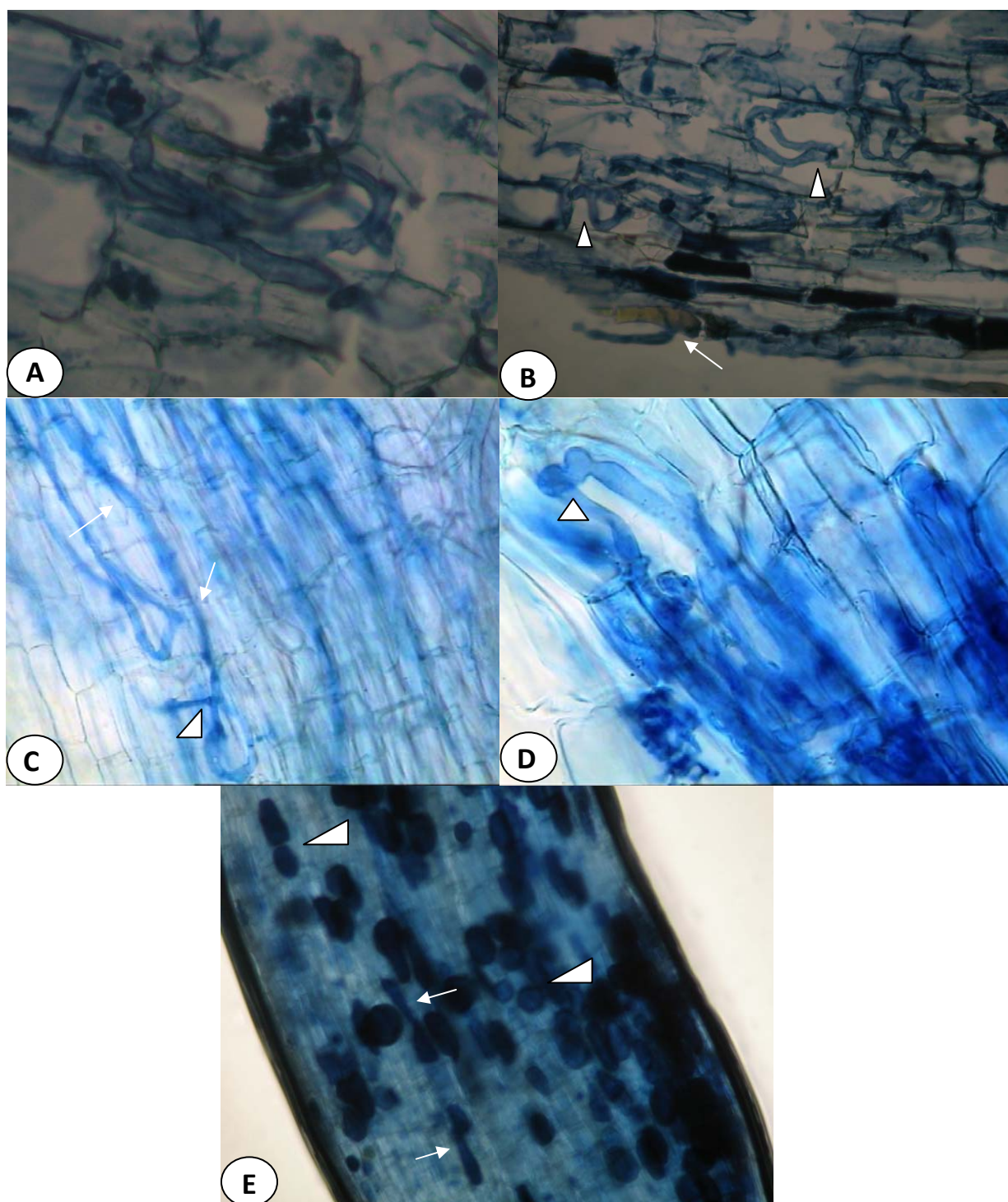


Planche XI

Fragments racinaires écrasés.

Figure A : Hyphe mycélien intercellulaire dont le tronc pénètre dans la cellule pour se ramifier en arbuscules (arb) : Type morphologique le premier type Arum A dans une racine de plantule âgée de 3 ans (Baïnem). **M.P.Gr x 1000.**

Figure B: Hyphe Mycélien intercellulaire (flèche) dont le tronc se ramifie (tête de flèche) pour former deux arbuscules (arb) dans deux cellules adjacentes : Deuxième type morphologique Arum B. Enroulement d'hyphe (flèche blanche) remplissant toute la cellule corticale : Type morphologique Paris. Racine présentant un type morphologique mixte. Plantule âgé de 3 ans (Baïnem). **M.P.Gr x 400.**

Figure C : Nombreux enroulements d'hyphes intracellulaires, dans une racine d'arbre de 17 ans. (Baïnem)M.P. **Gr x 400.**

Figure D : Nombreux enroulements d'hyphes intracellulaires (en hy) et mycéliums intercellulaires (my in), racine d'arbre de 34 ans (Baraki). **M.P.Gr x 400.**

Figure E : Dans la même racine présence de l'endophyte à Hyphe foncé septé (tête flèche) et du CMA formant des enroulements d'hyphes intracellulaires. Racine d'arbre de 34 ans (Beraki). **M.P.Gr x 400.**

Planche XI

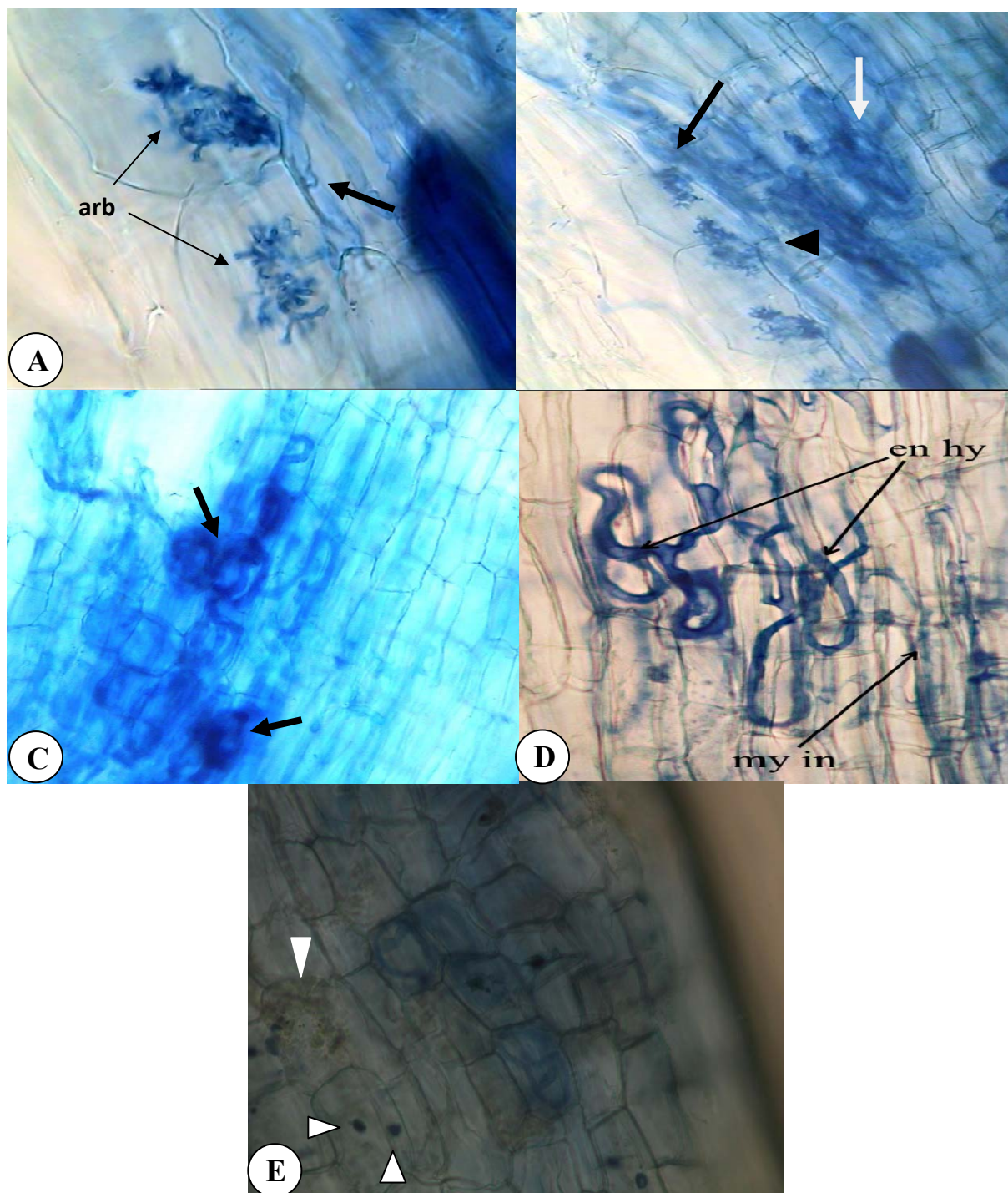


Planche XII

Propagules isolées de la mycorrhizosphère des plantules du cyprès du tassili

Cupressus dupreziana A. Camus.

Figure A : Spores regroupées en grappe sans peridium (cluster) de couleur variant du blanc hyalin jusqu'au brun clair mielleux, isolées de la mycorrhizosphère des plantules âgées d'une année. (Plantules Baïnem). M.P. **Gr x 250**.

Figure B: Spores regroupées en grappe de tailles variables, de couleur variant de différents tons de beige. Plantules de 3 ans. (Plantules Baïnem). **M. P. Gr x 150**.

Figure C : Détail d'une spore prélevée d'une grappe, de couleur claire, paroi très épaisse, présence d'une structure circulaire liée à la spore, à paroi aussi épaisse, en continuité avec l'hyphe suspenseur de la spore. Plantules de 3 ans. (Plantules Baïnem). **M.P. Gr x 2500**.

Figure D : Spore solitaire à hyphe suspenseur évident, de couleur brune, de petite taille. A paroi pluristratifiée dont les strates non soudés. Plantules de 3 ans. (Plantules Baïnem). **M.P. Gr x 1000**.

Figure E: Spore solitaire à hyphe suspenseur visible, de couleur très foncée presque noire de grande taille à strates soudés. M.P. **Gr x 1000**.

Figure F : Spore solitaire à hyphe suspenseur évident, à paroi très épaisse, de couleur brune orangée. Plantules de 3 ans. (Plantules Baïnem). **M.P. Gr x 1000**.

Planche XII

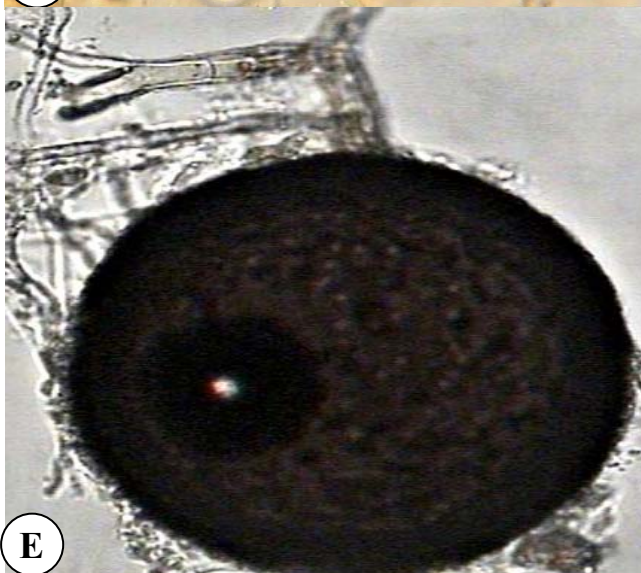
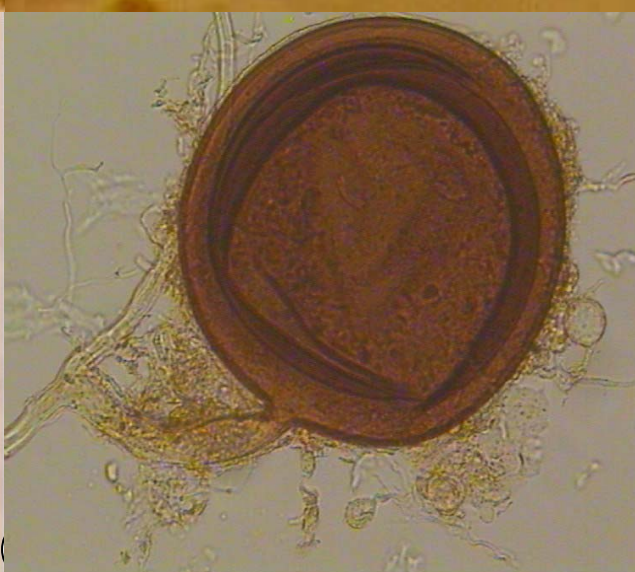
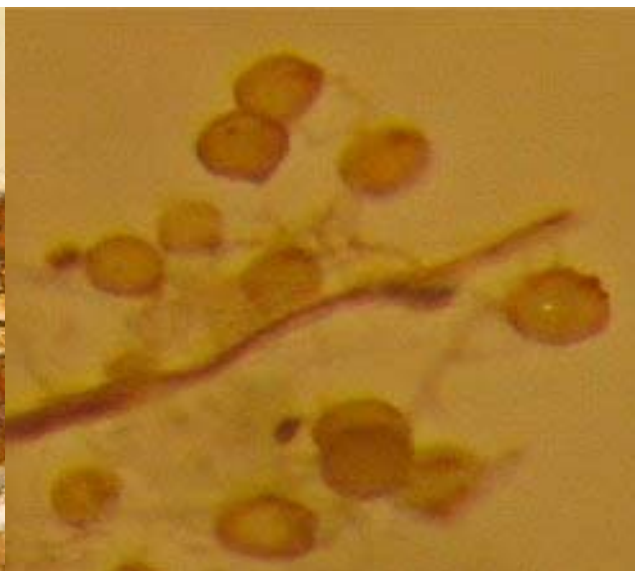
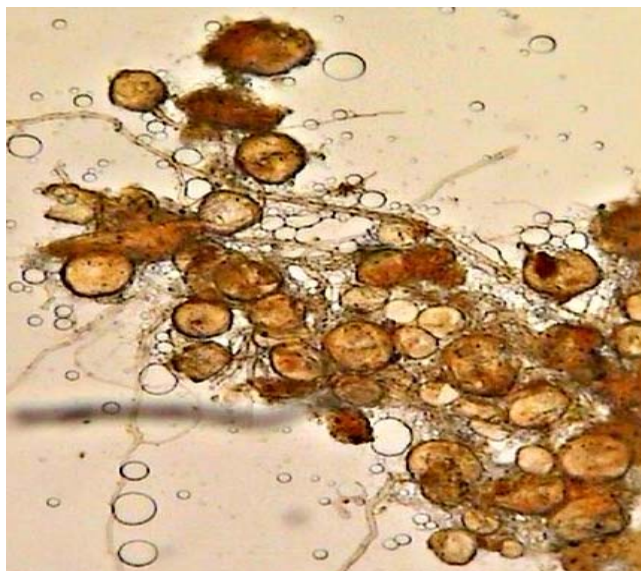


Planche XIII

Propagules isolées de la mycorrhizosphère du cyprès du tassili

Cupressus dupreziana A. Camus.

Figure A : Spore solitaire de grande taille à paroi peu épaisse de couleur orange. Plantules de 3 ans. (Plantules Baïnem). **M.P. Gr x 1000.**

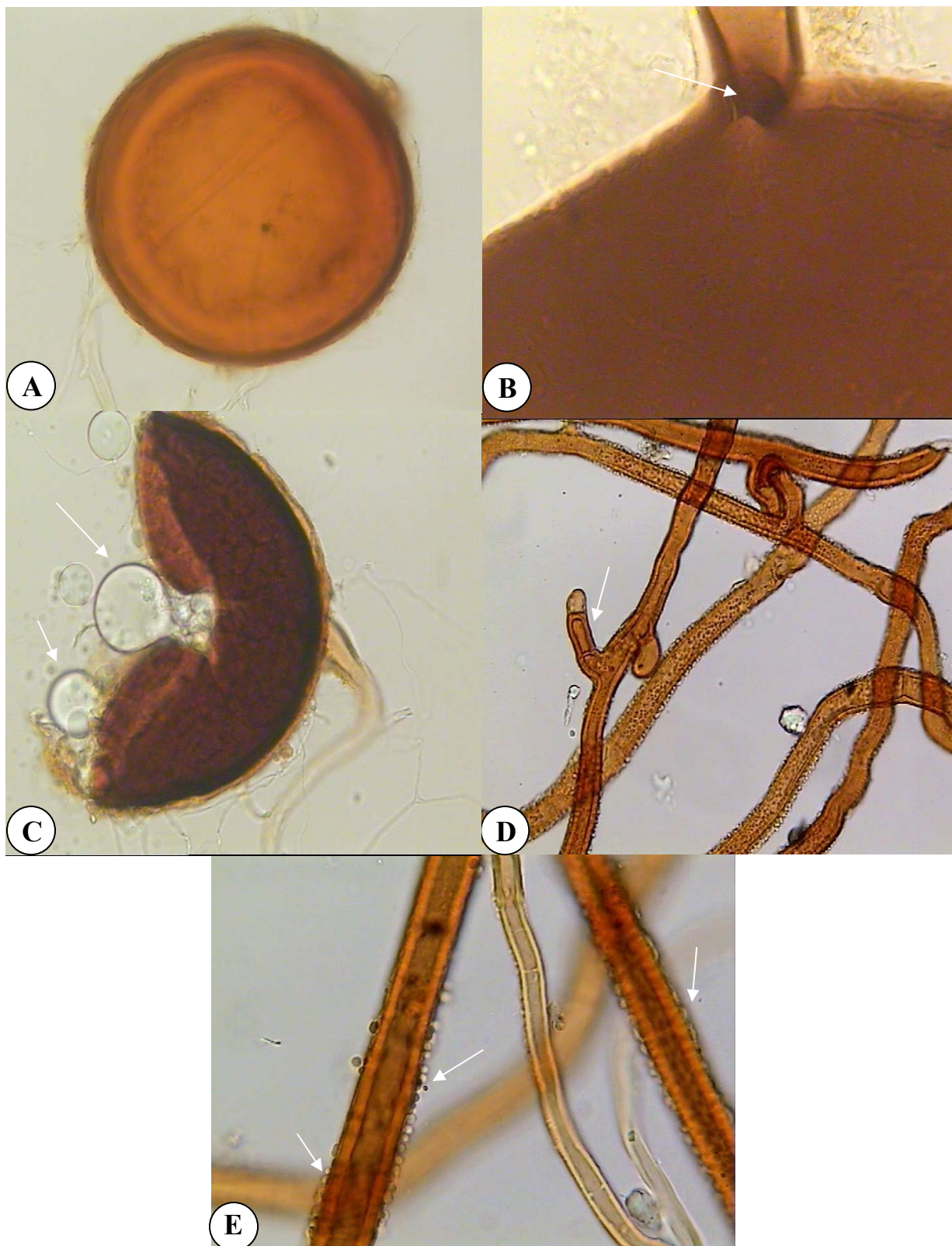
Figure B : Spore solitaire de taille relativement grande à paroi peu épaisse de couleur brune. Détail de la structure particulière de l'hyphe suspenseur. Arbre de 17ans (arboretum Baïnem). **M.P. Gr x 2500.**

Figure C : Spore solitaire écrasée, de taille assez importante, à paroi pas très épaisse, de couleur brune à hyphe suspenseur bulbeux. Libération de gouttelettes lipidiques (flèche). **M.P. Gr x 1000.**

Figure D : Hyphe pigmenté cloisonnée à diamètre important et paroi épaisse (endophyte ?). Présentant des crochets (vrilles) courts (flèches). **M.P.Gr x 2500.**

Figure E : Hyphe foncé septé présentant des exsudats sous forme de gouttelettes (flèche). **M.P. Gr x 2500.**

Planche XIII



Conclusion générale

La multiplication *in vitro* par micropropagation est une alternative de propagation conforme et rapide pour la multiplication du cyprès du tassili. Au terme de cette étude nous pouvons conclure que cette espèce est récalcitrante. En revanche, les essais effectués nous ont montré que cette espèce peut être cultivée *in vitro*.

Pour la désinfection de notre matériel végétal, le bichlorure mercurique à 0.5mg/l semble être le stérilisant le plus performant.

En réponse à la morphogénétique et à la croissance en condition *in vitro* des microboutures mises en culture, nous avons déduit que le milieu et le type de microbouture les plus adéquats restent le Murashige et Skoog (MS) et les microboutures qui sont issues de pieds adultes.

En ce qui concerne la recherche de la balance hormonale pour la culture de microboutures, la BAP à 0.4 mg/l donne une meilleure morphogénèse.

Nous concluons que en plus du milieu de culture et du type de la microbouture, il ya aussi la morphologie (taille) de cette dernière qui rentre en considération :

Une microbouture à plusieurs ramifications ne donne pas obligatoirement un développement important, ceci a été confirmé par le résultat obtenu. Les microboutures à deux ramifications donnent un meilleur débourrement avec un pourcentage de 61.07%, comparativement à celles avec plusieurs ramifications qui ne donnent que 56.25%.

L'étude morphologique du système racinaire du cyprès du tassili des plantules *Cupressus dupreziana* A. Camus a permis de constater qu'il est du type mixte, c'est-à-dire qu'il présente à la fois des racines à développement horizontal et des racines à développement vertical en pivot. Les deux types de racines se ramifient jusqu'à l'ordre quaternaire. Ce qui permet de conclure que l'organisation du système racinaire du cyprès de tassili est comme chez la grande majorité des Gymnosperme mixte.

L'observation de la morphologie des dernières ramifications, des coupes anatomiques et des fragments racinaires écrasés de cette espèce, aussi bien des plantules de pépinière que des arbres adultes a permis de constater de façon définitive que le cyprès du tassili ne présente pas ni ectomycorhizes, ni d'ectendomycorhizes, par l'absence évidente du manteau fongique, du réseau de Hartig et même de pelotons d'hyphes. Par contre nos observations nous ont permis de mettre en évidence la présence de mycorhizes à arbuscules (MA) dans le système racinaire de tous les individus considérés quelque soit leur âge. L'existence de ce type de mycorhize est d'ailleurs confirmée par l'isolement de la mycorhizosphère des sujets traités une grande variété de spores formées de façon caractéristique par les MA dans la phase extra matricielle.

Les résultats de notre travail montrent aussi pour la première fois chez le cyprès du tassili l'existence de deux types morphologiques d'infection (colonisation) par les champignons mycorrhizogènes arbusculaires. Il s'agit de types Arum, et de types Paris. Il a aussi été observé un type mixte, Arum et Paris. Tous ces types morphologiques sont probablement formés par différentes espèces fongiques mycorrhizogènes présentes dans la mycorrhizosphère et qui ont colonisé à la fois les racines, aussi bien des plantules que des arbres âgés.

En effet, nous avons pu isoler de la mycorrhizosphère du cyprès du tassili aussi bien dans le substrat des plantules élevées en pépinières que dans le sol des arbres, une grande variété de spores produites en solitaires ou regroupées en sporocarpes sans péridium (cluster). Ce qui signifie que cette mycorrhizosphère contient un grand nombre d'espèces de CMA qui sont capables d'infecter le système racinaire du cyprès du tassili. Une tentative de classification globale a été effectuée mais qui reste insuffisante.

Comme perspectives, il serait intéressant d'étudier les aspects suivants :

- Un dosage des hormones endogènes des microboutures du cyprès de Tassil.
- Après la maîtrise de la technique de micropropagation du cyprès du tassili, qui permettra la production en grande quantité de plants. La mycorrhization pourrait alors être utile à différentes étapes de production de plantules. Par exemple au moment de l'acclimatation ou encore au stade de leur adaptation dans la pépinière, avant leur utilisation dans le reboisement dans différents sites ; sachant que le cyprès s'adapte bien à différents climats doux et pourquoi pas dans son climat d'origine dans le Tassili ou ailleurs dans les régions désertiques. L'un des intérêts le plus important des mycorrhizes c'est justement leur application dans la lutte contre la désertification.

Les résultats obtenus dans ce travail concernent des plants jeunes ou relativement âgés du cyprès du tassili élevés en dehors de son aire ou climat d'origine. Il serait peut être utile de faire une étude comparative avec des sujets qui se trouvent dans leur milieu d'origine c'est à dire au Tassili N'Ajjer de différents âges y compris chez les très vieux. Ils serait très intéressant de vérifier la flore fongique mycorrhizogène à arbuscules et autre présente dans la rhizosphère naturelle.

Ainsi les différentes souches fongiques isolées du milieu naturel et des différents milieux d'adaptation pourraient être étudiés pour identifier celles qui sont les plus efficaces sur la croissance de plantules micro propagées. Elles seraient par la suite utilisées pour produire assez d'inocula pour inoculer autant de plantules micropropagées qu'il ne faut.

- ABBOTT, L. K. ROBSON, A.D. 1982.**Infectivity of vesicular- arbuscular mycorrhizal fungi agricultural soils. Aust. J.Agric. Res, 33: 1049-1059.
- ABDOUN. F. 2002 :** Etude de la dynamique spatio-temporelle dans des populations de *Cupressus dupreziana* A. Camus.au Tassili n'Ajjer Algérie : synthèse des connaissances actuelles relatives au *Cupussus dupreziana*A. camus, historique, classification, répartition : p 35-40, 41-45-49.
- ABDOUN F., 1999,** La population du cyprès du Tassili en voie de disparition, Symbiose 7 : 23-29.
- ABDOUN F., BEDDIAF M., 2002,** *Cupressus dupreziana* A.Camus, répartition, dépérissement et régénération au Tassili n'Ajjer, Sahara Central, Comptes rendus Biologie, 325 : 617-627.
- ABOUSALIM A., EL MAHBOUL B. et WAALI LOUDIYI DE., 1992.** Germination in vitro de grains et croissance de plantules de Pistachier (*Pistacia vera* L.) Rev. Rés. Amélior. Prod. Agr. Milieu Aride4/ 17-24.
- ABOUSALIM A. and MANTELL S.H.1994.** A pratical method for alleviating shoot-tip necrosis symptoms in in vitro shoot cultur of *Pistacia vera* L. CV.Mateur .J.Hort.sci.,69(2): 357-365.
- ABOUSALIM A. and HAFID A.1995.** Somatic embryogenesis in Pistachio (*Pistachia vera* L.).Effects of subculture growth regulators and explants type. Acta Hort. 419:195-199.
- ABOUSALIM A., BRHADDA, N. et Walali-Loudiyi D.M., 2005.** Essais de prolifération et d'enracinement de matériel issu de rajeunissement par bouturage d'olivier adultes (*Olea europea* L.) et de germination in vitro : effets de cytokinine et d'auxine.Biotechnol .Agron. Soc. Environ.9 (4) : 237-240.
- ADDY H.D., HAMBLETON S., CURRAH R.S. 2000.** Distribution and molecular characterization of the root endophyte *phialocephala fortinii* along an environmental gradient in the boreal forest of Alberta.Mycol. Res. 104: 1213-1221.
- AGERER, R. 1988.,** Colour atlas of ectomycorrhizae. Ed. Prof Dr Reinhard. Institut for systematic Botanik universitat. Munchen. 15-30.
- AHMIN M., 1981 :**Statistique appliquée à l'expérimentation agronomique. Cours polycopié, laboratoire d'amélioration des plantes, INA, EL – HARRACH, 65p.

Références Bibliographiques

- ALEXANDER, L. 1986.** Measuring mycorrhizal : principales and problems. Dans: Proceedings of 6th North American Conference on Mycorrhizae, Oregon. Molina, R. (éd.), Forest Res. Lab., pp. 136-138
- ALLEMAND P., 1979.** Relation physiologique dans le genre *Cupressus*. Ed. GRASSO, et RADDI Florence, Italie, pp : 51 – 67.
- AUGE R., BEAUCHESSÉ G., BOCCON-GIBOD J., DECOURTYE L., DIGAT B., JALOUZOT R., MINIER R., MORONAD CL., REYNOIRD JP., STRULLUS DG., VIDALIE H., 1989.** La culture in vitro et ses applications horticoles. 3^{ème} édition Lavoisier :209p.
- AUGER. M.(2001)** Water relations, drought and vesicular-arbuscular mycorrhizal symbiosis *Mycorrhiza* 11:3-42.
- BAGHDADI H. 2007.** Essais de régénération de deux pistachiers : *Pistacia vera* L. et *Pistacia atlantica* Desf. Par semis, bouturage et culture *in vitro* . Thèse de Magister Soutenu à Oran.
- BAYLIS G.T.S. 1975.** The magnolioid mycorrhiza and mycotrophy in root system derived from it. In: Endomycorrhizas. Eds. F.E. Sanders, B. Mosse et PB Tinker. Academic Press, London, 373-389.
- BAILLAUD J., COURTOT Y., 1961,** Nouvelles remarques sur le rythme de la réparation des rameaux du *Chamaecyparis nootkaensis*. Annales Scientifiques de l'Université de Besançon, Botanique, 17 : 63-68.
- BARTOLONI G., Leva A.R., BENELLI A. 1989.** Advances in vitro culture of the olive : propagation of cv.Maurino. Acta Hort. 286, p.41-44.
- BARROW J. R and AALTONEN R.E. 2001.** Evaluation of the internal colonization of *Atriplex canescens* (Pursh) Nutt. Roots by dark septate fungi and influence of host physiological activity. *Mycorrhiza*. 11 : 199-205.
- BARTHELEMY D., CARAGLIO Y., COSTES E., 1999.** Architecture morphogénétique et âges physiologique des végétaux. In: J. BOUCHON, P. de REFFYE, D. BARTHELEMY (Edi), Modélisation et simulation de l'architecture des végétaux. Institut national de la recherche agronomique. Paris: INRA Editions, Update; p89-234.
- BECARD, G. and FORTIN, J.A. 1988.** Early events of vesicular-arbuscular mycorrhiza formation on Ri T-DNA transformed roots. *New Phytol.* 108:211-218.

- BERTA, G.FUSCONI A ., TROTTA, A. and SCANNERINI, S. 1990.**Morphogenetic modification induced by the mycorrhizal fungus *Glomus* Strain E3 in the root system of *Allium porrum* L. New Phytol.114: 207-215.
- BERTA, G. TROTTA, A. FUSCONI, A. HOOKER, J.E. MUNRO, M. ATKINSON, D. GIOVANETTI, M. MORINI, S. FORTUNA, P. TISSERANT, B. GIANINAZI-PEARSON, V. and GIANINAZZI, S.1995.**Arbuscular mycorrhizal induced changes to plant growth and root system morphology in *Prunus cerasifera*. Tree Physiol. 15: 218- 293.
- BERENGUER B. GONZALEZ G .1989. Cité par Cimmato (1999).**Ressources génétiques. Actes du séminaire international sur les innovations scientifiques et leurs application en oleiculture et oléotechnie 10,12 Mars 1999, Florence, Italie : Conseil oleicole internatioanl p, 1-30 .
- BELLAROSA R., .1981.**Invitro culture of *Quercus suber* L. embryos. Colloque International sur la culture in vitro des essences Forestières, Fontainebleau, Afocel, Nangis, 119- 125.
- BENMAHIOUL B.2009.** Amélioration de la micropropagation in vitro du pistachier (*Pistacia vera* L.) en vue de l'extension des vergers en Algérie. Soutenu à Oran
- BERUBE , J . 2007.** Ressources naturelles .Canada Service canadien des forêts Centre de foresterie des Laurentides n° 34 ; 1055, rue du P.E.P.S.C.P. 10380, succ. Sainte-Foy Québec (Québec) G1V 4C7.
- BOLAN,N. S.ROBENSON, A.D. BARROW, N.J .and AYLMORE, L.A.G . 1984.** Specific activity of phosphorus in mycorrhizal and non mycorrhizal plants in relation to the availability of phosphorus in PlantsSoil Biology and Biochemisty. 16, 299-304.
- BOLAN N.S. and ROBSON A.D. 1987.** Effets of vesicular-arbuscular mycorrhiza on the availability of iron phosphate to plants. Pant and Soil 99, 401-410.
- BARRY J.P., BELLIN B., CELLES J.C., DUBOST D., FAUREL L., HETHENER P., 1970 :** Essai de monographie du *Cupressus dupreziana* A. Camus cypres endémique du Tassili des Ajers (Sahara Central), Bull. Soc. Hist. Nat. Afr. Nord. pp : 61, 122 :95 – 178, Alger. Trav. Labo. Forest. Toulouse, T.I, Vol. IX, Art. II, 1973.

Références Bibliographiques

- BOCCON-GIBOD J., 1989** :Les besoins nutritifs des tissus cultivés en conditions aseptiques in «La Culture *invitro* et ses applications horticoles ».Ed. J.B. Bailliere, Paris, 1989, pp : 33 – 36.
- BOCCON-GIBOD J., 1989** :La technologie de la culture in-vitro in «La Culture *in-vitro* et ses applicationshorticoles ». Ed. J.B. Bailliere, Paris, 1989, pp : 37 – 62.
- BONFANTEP., and PEROTTO S.,1995.**Strategies of arbuscular mycorrhizal fungi when infecting host cells. New phytol. 130: 3-21.
- BORNMAN CH.1983.** Possibilities and constraints in the regeneration of trees from cotyledonary needles of *Picea abies* in vitro. Physiol. Plant. 57, p.5-16.
- BOUHIRED, L. 1984.**Influence dans le temps de différentes doses de phosphore sur la croissance de l'Allium porrum et le développement d'unchampignon endomycorhizien.Thèse de 3^{ème} cycle.Soutenu à l'Université Laval.
- BOULAY M. et FRANCKET A. 1977.**Recherche sur la micriopropagation végétative du Douglas : Pseudotsuga menziesii (Mirb) Franco. Possibilité d'obtention de plants viables à partir de la culture « in vitro » de bourgeons de pieds-mères juvéniles. C.R.Acad.Sci.Paris, serie D, T 284 : 1405-1407.
- BOULLARD, B. 1968.** Quelques conseils pour l'étude des mycorhizes. Première partie : la collecte du matériel. Extrait du bulletin de la société de Normandie, Set 10.3 : p 43-49
- BOUROULET 1994.**Contribution à l'étude de la forme du cyprès méditerranéen (*Cupressus sempervirens* L.): Variabilité génétique, architecture et modélisation de la croissance et de la ramification. Thèse de Doctorat : INAPG. 260p. +annexes.
- BRHADDA N., ABOUSALIM A., WALALI L.D.M .2003.**Effets du milieu de culture et de la lumière sur l'embryogenèse somatique de l'olivier (*Olea europaea* L.) cv Picholine marocaine. Fruit 85 (3), p.1-14.
- BRUNDRETT, M.C. PICHE, Y. PETERSON, R.L. 1984.** A new method for observing the morphology of vesicular-arbuscular mycorrhizae. Canadian Journal of Botany62: 2128-2134.

- BRUNDRETT, M., BOUGHER, N. DELL, B. GROVE, T. AND MALAJCZUK, N. 1996.** Working with mycorrhizas in forestry and agriculture. Australian Center for International Agricultural Research Monograph 32. Pirie Printers, Canberra.
- BRUNDRETT, M.C. KENDRICK B., 1988.** The Mycorrhizal status, root anatomy and phenology of plants in sugar maple forest. Can J Bot 66: 1153-1173.
- BRUNDRETT M.C. 2002.** Coevolution of roots and mycorrhizas of plants. New Phytologist, 154:275-304.
- CABOCHE M. 1987.** Nitrogen carbohydrate and zinc requirements for the efficient induction of shoot morphogenesis from protoplast-derived colonies of *Nicotiana plumbaginifolia*. Plant Cell Tissue Org. Cult. 8, p.197-206.
- CAMEFORT H., 1953.** Evolution de la phyllotaxie et de la taille du point végétatif de *Cupressus macrocarpa*, pendant les trois premières années de son développement. Académie des Sciences de Paris, 236 : 847-849.
- CAMEFORT H., 1956.** Structure de l'apex caulinaire des Gymnospermes. Ann. Biol., 32 : p 401-416.
- CAMUS A., 1926 :** Le *Cupressus dupreziana* A. Camus, Cyprès nouveau du Tassili. Bull. Soc. Dendrol. Fr., 58, pp : 39 – 44.
- CAPOT. REY R., 1954.** Recherches géologiques sur les conifères Algero-Libyens, travx. Inst. Reche. Sahar, pp : 33-34.
- CAVAGNARO T.R., Gao L-L, SMITH F.A., SMITH S.E. 2001.** Morphology of arbuscular mycorrhizas is influenced by fungal identity. New Phytol 151: 469-475.
- CHAFLIM el H., 1992.** Prospection des plantes à associations symbiotiques de type Mycorrhizes des zones Algériennes de la région de Ain Ben Kellil, Wilaya de Naama. Thèse de magister soutenu à l'université d'Oran. p 114.
- CHAFLIM el H., FERTAS. Z., 1999,** Les mycorrhizes des plantes des zones arides Algériennes, Bois et forêts des zones tropiques, N° 262 (4) : 77-79.
- CHATIBI A. 1999.** Les différentes potentialités de régénération in vitro du Pistachier (*Pistacia vera L.*). cv. Mateur. Thèse de Doctorat en sciences Biologiques. université de TUNIS II. 179p.
- CORNU D et DALET F. 1987.** La multiplication végétative du Mérisier (*Prunus avium L.*) 2^{ème} colloque sur les substances de croissance et leurs utilisations en Agriculture. Annales ANPP. 1(3) : 3p.

COURTOT Y., BAILLAUD L., 1961a. Remarque sur les bourgeons d'un cupressus. Bulletin de la Societies Française de Physiologie Végétale, 7 : 96-97.

CRONQUIST A. 1968. The evolution and classification of Flowring plants. Nelson, London. 396 pages.

CURRAH, R.S. ZELMER, C.D. HAMBLETON, S and RICHARDSON, K.A. 1997. Fungi from orchid Mycorrhizas. In Orchid Biology: Review and perspectives. Edited by J. Arditti and A.M. Pridgeon. kluwer Academic Publishers. Great Britain. pp 117-170.

CARROL G C 1986. The biology of endophytism in plants with particular reference to woody perennials. In Fokkema N.J. et Van den Heuvel J (Eds). Microbiology of the phyllosphere .Cambridge University Press. Pp 205-222.

DALPÉ Y. 2005. Les mycorhizes : un outil de protection des plantes mais non une panacée. Agriculture et Agroalimentaire Canada, Ottawa (Ontario), Canada K1A 0C6

DALZOTTO A. and DOCAMPO D.M. 1997. Micropropagation of rootstock from the Marianna-2624 plum (*Prunus cerasifera* x *Prunus munisoniana*) and the pixy plum (*P. insititia* L.) under controlled conditions. Phytom –Int.J.EXP.Bot.60:127-135.

DEIDDA P., AZZENA., Coinu G., 1988. In vitro plantlet regeneration from *Quercus suber* L. seedlings. Acta Hort., 227: 393 – 395.

DAGNELIE P., 1992 : Stat. Théoriques et appliquées : Les bases théoriques, Tome I, Presses agro. De Gembloux – Belgique, 436 p.

DALICHAOUCHE N., 1982, Etude de 3 plantations de cyprès dans le semi-aride : *Cupressus dupreziana* A. Camus et *Cupressus arizonica* Greene à Djalfa (Moudjbara) et Ain Oussara (Benhar et Draa-Souari), mem. Ing. Agr, INA, Alger, 94p.

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

DICKSON, S. 2004. The Arum-Paris continuum of mycorrhizal symbioses. New Phytologist. 163: 187-200.

DEBAZAC E.F., 1964 : Manuel des conifères, Publ. De l'école Nationale des Eaux et Forêts, Nancy, p : 172.

Références Bibliographiques

- DEOGRATIAS J.M., LUTZ A. DOSBA F. 1986.** Microgreffage d'apex de cerisiers (*Prunus avium* L.) multipliés in vitro en vue de l'élimination de trois types de particules virales. *Fruits*, 41(11) : 675-680.
- DUHOUX E., et NICOLE N. 2004.** Association et interaction chez les plantes .IRD Edition P :56-59.
- DUMANOIS C. BRAUT-BOUCHER F. COSSON L. et PARIS M., 1986.** Multiplication végétative in vitro du chanvre (*Canabis sativa* L.). Application à la conservation de clones sélectionnés. *Agronomie* 5 :487-495.
- DUPONNOIS R, OUAHMANE L GALIANA A, HAFIDI M, PRIN Y, DREYFUS B., 2007.** Valoriser et conserver les ressources forestières méditerranéennes : rôle potentiel des champignons mycorhiziens associés à la strate arbustive pionnière. *Bois et forêts des tropiques*, N° 294 (4).
- DUVEYRIER H., 1863 :** Note sur les Touareg et leur pays, *Bull. Soc. Géogr.*, 5, pp:102-125.
- DUVEYRIER H., 1864 :** Les Touareg du Nord, Challamel édit. Paris. 499 p.
- EMBERGER L., 1938 :** La définition phytogéographique du climat désertique. *Mém. Soc. Géogr.*, 6, pp: 6 –14.
- EDELIN C., 1977.** Image de l'architecture des conifères. Thèse de Doctorat : USTL, Montpellier II.255p.
- FAJON A., 1993.** Page, C.N. and Schellevis, N. A preliminary world list of threatened conifer taxa. *Biodiversity and Conservation* 2: 304-326.
- FARJON A., 2005.** A monograph of Cupressaceae and Sciadopitys. Royal Botanic Gardens, Kew, 643 p.
- FAIDI-HAOUYA, H. 1999.** Etude de la morphologie et de l'Histo-anatomie du système racinaire du Palmier dattier (*Phoenix dactylifera* L.) en relation avec la symbiose endomycorhizienne à vésicules et arbuscules. Thèse de magister soutenue à l'INA d'EL HARA, P : 27-29.
- FERRANDES P., 1979.** Les Cyprès africains, in : Il cipresso malattia edi fesasém. *Com. Econ. Eur.* Nov.1979, pp : 45 – 51.
- FENG GH., OUYANG J. 1988.** The effects of KNO₃ concentration in callus induction medium for wheat anther culture. *Plant Cell. Tissue Org. Cult* 12, p. 3-12.
- FOUNOUNE H .2001.** La symbiose ectomycorhizienne des acacias australiens en Afrique de l'Ouest : impact sur le développement de la plante hôte et sur le 186 p.

- FORTIN, J.A, CHRISTIAN PLENCHETTE, YVES PICHE., 2008.** Les mycorhizes, La nouvelle révolution verte. Édition multi monde.138p.
- GALLAUDI. 1905.** Étudessur les Mycorhizes Endotrophs. Rev Gen Bot 17 : 5-500.
- GAUSSEN H., 1950 :**Espèces nouvelles de Cyprès : *Cupressus atlantica* au Maroc, *Cupressus lereddeia*aux Ajjers. Le monde des plantes, pp : 270 – 271, 55 - 56.
- GAUSSEN H., 1952 :**Les résineux de l'Afrique du Nord. Ecologie, Reboisement. Rev. Intern. Bot. Appl.Agric. Trop., pp : 361 – 362, 505 – 552, 508 – 509, 523.
- GARBAYE J.1988.**Biological interactions in the rhizosphere. *Experientia* 47: 370-375.
- GERDEMANN G.W., 1968.**Vesicular-arbuscular mycorrhiza and plant growth. Ann Rev. Phytopathol. 6: 397-418.
- GERDEMANN, J.W., TRAPPE, J.M., 1974.**The Endogonaceae in the pacific northwest.Mycologia memoire. p 5: 27
- GOETGHEBEUR., 1989;** Cupressaceae . In**K. KUBITZKI,al.** 1998; edition the familias and genre of vasculere plante BERLIN , V : 4 , pp 141 – 190.
- GRIGORIADOU K.,VASILAKAKIS M., ELEFThERIOU E.P., 2002.**In vitro propagation of the Greek olive cultivar Chondrolia Chalkidikis. Plant Cell, Tissue Org.Cult. 71 (1), p.47-54.
- GROSFELD J.,2001.** Analisis de la variabiliadad morfologica y arquitectural de Austrocedrus chilensis (D.Don) Pic. Serm. Et Bizzarri, Fitzorya cupressoides (Molina) I.M.Johnst., *Pilgerodendron uviferum* (D. Don) Folrin y Cupressus sempervirens L. (Cupressaceae). Tesis : Universidad Nacional des Comahue ; Centro Regional Universitario Bariloche (Argentine).298p.
- GRIM S., 1972 :**Inventaire des Cyprès du Tassili, Notice Forestière Brèves, de la 1ère note à la 12^enote.
- GUENDOUD S., BOUSSADIA H.2001.**Contribution à l'étude de la micropropagation de Pistachier vrai (*Pistacia atlantica* Desf. A partir de vitrosemis, *Pistacia vera* L. par microgreffage .Th.Ing. I.N.A. Alger.71p.
- GRUNIG, C.R. SIEBER, T.N. ROGER ,S.O and HOLDENDRIEDER, O .2002.**Genetic variability among strains of *Phialocephala fortinii* and phylogenetic analysis of

Références Bibliographiques

- FENG G .H., OUYANG J.1988.** The effects of KNO₃ concentration in callus induction medium for wheat anther culture.Plant Cell. Tissue Org.Cult. 12, p.3-12.
- FLAMANT A,-C., 1996.** Etude de la variabilité architecturale de *Cupressus dupreziana* Mémoire de D.E.A. de Biologie forestière: Université Nancy 1.20p.
- JA, PLENCHETTE C, PICHE Y. 2008.** Les mycorhizes : a nouvelle révolution verte. Editions Multi Mondes Canada. PP 10-12 P 137.
- the genus *Phialocephala* based on Rdna ITS sequence comparisons. Can. J. Bot. 80 : 1239-1249.
- FRANCLET A., 1967.** Une méthode de greffage du *Cupressus dupreziana* sur *Cupressus sempervirens*, Rev. Forest. Fr., 5 : 338-342.
- Flikr .F.,2004 :** www.fliker.com
- HRIB J., DOBRY J.,1984,** An explant culture of Tassilian cypress *Cupressusdupreziana* survive? Proceedings of the Eco-Conference on Africa, held in Prague (Czech Republic), 183- 187.
- HACHEMI F., 2007 :**Contribution à l'étude de la régénération végétative du Cyprès du Tassili –*Cupressus dupreziana*-, DES en biologie et physiologie végétale UMMTO.
- HAICOUR R.2002.**Biotechnologie végétales, techniques de laboratoire. Paris Sud. Ed. Tec et Doc.298p
- HALLE F., OLDEMAN R.A.A., 1970.**Essai sur l'architecture et la dynamique de croissance des arbres tropicaux. Paris : Masson. 178p.
- HAMBLETON S. and CURRAH R.S. 1997.**Fungal endophytes from the roots of alpine and boreal Ericaceae. Can.J.Bot.75 :1570-1581.
- HAMLAT M., 1995 :**Influence des phytohormones sur les embryons, les microboutures d'Olivier (*Olea europea* L.) var. chemlal. Cultivés *in-vitro* ; Thèse de Magister, UMMTO, dirigé parle Dr YAKOUB-BOUGDAL S., p : 167.
- HAMMATT N., GRANT N.J. 1997.** Micropropagation of mature British Wild cherry.Plant Cell Tissue Organ Cult.47:103-110.
- HARLEY J.L.,SMITH S.E., 1983.**Mycorrhizas symbiosis. Academic press, London, New-York. 483p.
- HARELY, J.L. and HARELY, E. L. 1987.**Acheck- list of mycorrhiza in the British flora. New Phythol.105: 101- 102.

Références Bibliographiques

- HARRISON MJ.1999.** Molecular and cellular aspects of the arbuscular mycorrhizal symbiosis. *Annual Review of plant Physiology and Plant molecular Biology* 50: 361-389.
- HARRY, D.E., 1987.**Shoot elongation and growth plasticity in incense-cedar.Canadian Journal of Forest Research, 17: 484-489.
- HASELWANDER K., and READ D. J. 1980.** Fungal associations of roots of dominant and sub-dominant plants in highalpine vegetation systems with special reference to mycorrhiza. *Oecologia*. 45: 57-62.
- HEURET P., 2002.**Analyse et Modalisation de séquences d'événements botaniques : applications à la compréhension de la régularité d'expression des processus de croissance, de ramification et de floraison. Thèse de Doctorat. Unité Mixte Cirad-Cnrs-Ephe-Inra- Université Montpellier 2.
- HELLER R., ESNAULT R. et LANCE CE C., 1995.** Physiologie végétale. Tome 2 : développement. Ed. Masson, Paris, 315 p
- HETHENER P., 1967 :**Activité microbiologique des sols à *Cupressus dupreziana* A. Camus au Tassilin' Ajjer (Sahara Central), Thèse Doc., Toulouse, p : 73.
- HOOKE J.E. MUNRO, M., and ATKINSON, D. 1992.** Vesicular- arbuscular mycorrhizal fungi induced alteration in poplar root system morphology. *Plant and Sol*. p: 145, 207 - 214.
- IOUSSAIDENE A.OUCHENE A.2009.**Essais de régénération du cyprès de tassili (*Cupressus dupreziana* A.CAMUS) par culture in vitro. Mémoire d'Ingénieur en science Agronomique. Soutenu à l'université Mouloud Mammeri TIZI-OUZOU.106p.
- JAKOBSEN. I. 1995.**Transport of phosphorus and carbon in arbuscular Mycorrhizas. In: *Mycorrhizas: Structure, function, molecular biology and biotechnology*. Springer 305-332.
- JUMPPONEN,A. MATTSON, K.G and TRAPPE, J.M 1998.**Mycorrhizal functioning of *phialocephala fortinii* with *Pinus contorta* on glacier forefront soil: interactions with soil nitrogen and organic matter.*Mycorrhiza*. 7: 261- 265.
- JUMPPONENA.2001.**Dark SeptateEndophyte-are they Mycorrhizal? *Mycorrhizal*,11: 207-211.
- KOIDE, R.T. MOSSE, B. 2004.** A history of research on arbuscular mycorrhiza.*Mycorrhiza***14**: 145-163.
- KRAMDI et BOUHADI, 2006 :**Culture *in-vitro* du Cyprès du Tassili « *Cupressus dupreziana* A. Camus », DES enbiologie et physiologie végétale UMMTO.

- KRISHNA K.R., 2005.** Mycorrhizas : A molecular analysis. Science publisher, Inc.
- LAFERRERE M., 1961 :**Compte-rendu sur les essais de graines effectuées durant la saison 1960 dans la palmeraie de Djanet, Service de la colonisation et de l'Hydraulique de l'Algérie, rapport inédit réf. NG. 32. W, p : 20.
- LAFERRERE M., 1969 :** A propos du Cyprès du Sahara planté à Sénanque, Le Saharien, 53, III et IV, pp : 7 –10.
- LAFERRERE M., 1993.** Le cyprès du Duprez ne vient pas du Hoggar, Bull. Ass. Parcs Bot. France, 16 : 27-29.
- LAVAUDEN L., 1926 :**Sur la présence d'un Cyprès dans les montagnes du Tassili des Azdgers. C. R. Acad.Sc., Paris, pp : 182, 541 – 542.
- LAPEYRIE F.F, DUCLOS J.L., BRUCHET G.1982.**Influence du calcaire sur la croissance mycélienne de quelques champignons ectomycorhiziens et endomycorhiziens des éricacées. Les Colloques de l'INRA 13, 381-390
- LAPEYRIE F.F.,1990.** The role of ectomycorrhizal fungi in calcareous soil tolerance by "symbiocalcicole" woody plants. ELSILVER /INRA. Ann. Sci.For.21:579-589.
- LANG B.F., HIJRI M., 2009.** The complete *Glomus intraradices* mitochondrial genome sequence - a milestone in mycorrhizal research. New Phytologist. **183**: 3-6.
- LHOTE H., 1964 :**L'ancienne forêt de cyprès du Tassili-n-Ajjer (Sahara Central), Journ. Agric. Trop.Bot. Appl., XI, pp : 4, 84 – 90.
- LEBTAHI F., HASSINI F/Z., CHETTAH W., BOUGDOURRA N., 2009 :** Essai de multiplication in-vitro du Cyprès du Tassili « *Cupressus dupreziana* A. Camus », INRF BAINEM, ALGER. Séminaire international : Protection et Préservation des Ecosystème Sahariens.
- LEE J, YOUNG JPW. 2009.** The mitochondrial genome sequence of the arbuscularmycorrhizal fungus *Glomus intraradices* isolate 494 and implications for the phylogenetic placement of *Glomus*. New Phytologist .**183**: 200-211.
- LERREDEI C. 1957 :** Etude écologique et phytogéographique du Tassili n'Ajjer, II, Inst.Rech. Sahara,Alger, 455 p.
- LEVA A.R., PETRUCCELI R., GORETTI PANICUCCI M.1992.** Ruolo di alcuni microelementi e carboidrati nella proliferazione in vitro di cv. Di olivo (*Olea europea* L.) In Atti quattita olio extravergine di olive, Firenze, 333p.
- LOUERGUIOUI A.1988.** Techniques de multiplication par clonage du genre *Eucalyptus*. Thèse de Doctorat Roen. 135p.

Références Bibliographiques

- LUCERO M E BARROW J.R.OSUNA P REYES I .2006.**Plant-fungal interactions in arid and semi-arid ecosystem : large-scale impacts from microscale process. Journal of Arid Environement 65:276-284.
- MANSSERI- LAMRIOUI A 2011.** Etude de la multiplication par clonage (in vitro) du merisier(*Prunus Avuim* L.)Université M'hamed BOUGHERA BOUMERDES
- MC COWN B.H., SELLMER JC.1987.**General media and vessels suitable for woody plant culture. In Bonga JM., Durzan DJ. (eds). Cell and tissue culture in forestry . Vol 1: General principes and biotechnology. Dordrecht, The Netherlands : Martinus Nijhoff,p.4-16.
- 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, p. 654-661.
- MONNIER M., 1988.** Embryogenèse somatique. In Zryd : Culture de cellules, tissus et organes vaégétaux.,JP. Ed.Press polytechniques romandes, Lausanne,Suisse,307p.
- MORTON, J.B., BENNY, G.L. 1990.** Revised classification of arbuscular mycorrhizal fungi (Zygomycetes): A new order, Glomales, two new suborders, Glomineae and Gigasporineae, and two new families, Acaulosporaceae and Gigasporaceae, with arnemenration?of Glomaceae. Mycotaxon **37**: 471-491.
- MAIRE R., 1933 :**Etude sur la flore et la végétation du Sahara Central, Mém. Soc. Hist. Nat. Afr. Nord,Mission du Hoggar, 2, pp: 1- 272.
- MAIRE R., 1943 :**Contribution à l'étude de la flore des montagnes du Sahara méridional, Bull. Soc.Hist. Nat. Afr. Nord, t. 34, pp: 134 – 141.
- MAIRE R., 1952 :**Flore de l'Afrique du Nord, Lechevalier édit., Paris, I, 366 p.
- MARGARA J., 1989 :**Bases de la multiplication végétative. Les méristèmes et l'organogenèse. INRA,Versailles, pp : 185 – 216
- MARTIN F., .1998.**Recherche de gènes de la plante impliqués dans le processus d'endomycorhization développé entre *Pisum sativum* L. et le champignon endomycorhizogene à arbuscule à arbuscules *Glomus mosseae*. Thèse d'état Docteur de l'univers : biochimie, biologie, cellulaire et moléculaire, 1-9p, INRA , Dijon(France).
- MASHAYEKHI NK., 2000.** The protein synthesis spectrum during the induction phase of somatic embryogenesis in carrot (*Daucus carota* L) cultures and the role of nitrogen forms for embryo development. Dr. sci. Thesis. Justus Liebig University, Giessen, Germany.
- MAYUMI KUBOTA., et HYAKUMACHI M., 2004.**Co-occurrence of Arum and Paris-type morphologies of arbuscular mycorrhizae in cucumber and tomato. Mycorrhizas.15 : 73-77.

Références Bibliographiques

- MIAO S. H. 1980.** Effet on NH_4^+ on embryoid generation from pollens of maize. Acta. Bot. Sin. 22(4), p.356-359.
- MOSSE B., 1973.** Advance in the study of vesicular arbuscular mycorrhiza. Ann. Rev Phytopathol. 11: 171-196.
- MOSSE B. 1981.** V.A.M research for tropical agriculture. Research bulletin 194, (Hawaii Institue of Tropical Agriculture and Humain Ressource). University of Hawaii 82p.
- MURASHIGE et SKOOG, 1962 :** Murashige T, Skoog F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. Physiol Plant 1962 ;15 : 473- 97.
- MURRAY R., SPIEGEL, 1981 :** Probabilité et Statistique, Cours et problèmes, Série Schaum, Copyright by Mc Graw– Hill – Paris, pp : 270 – 280.
- NICOLSON T.H., 1959.** Mycorrhizas in the Gramineae. I-Vesicular-arbuscular endophyte, with special reference to the external phase. Trans.Brit.Mycol.Soc. p: 42, 421-438.
- NICOLSON T.H ET GERDEMANN JW. 1963.** Spores of mycorrhizal Endogone species extracted by wet sieving and decanting. *Transactions British Mycological Society*, 46, 235-244.
- OZENDA P., 1977 :** La flore du Sahara, Paris, CNRS, 622 p.
- OZENDA P., 2004:** La flore du Sahara, Paris, CNRS, 720p.
- OUAHMANE L. HAFIDI M., THIOULOUSE J., DUCOUSSO M., KISA M., PRIN Y., GALIANA A., BOUMEZZOUGH A., DUPONNOIS R., 2007 .** Improvement of *Cupressus atlantica* Gaussen growth by inoculation with native arbuscular mycorrhizal fung .Journal of applied Microbiology. Volume 103, issue 3, pages 683-690.
- PHILIPS, J.S et HAYMAN, D.S. 1970.** Improved procedures for clearing roots and staining parasitic and vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi for rapid assessment of infection. Trans.Brit.Mycol. Soc. P: 55, 158-160.
- PETERSON, L.R., MASSICOTTE, HUGUES. B., MELVILLE, LEWIS.H. 2004.** Mycorrhizas: Anatomy and Cell Biology. NRC research press. Ottawa 2004. P: 1-3, 147-153.
- PETERSON, L.R., WAGG C., PAUTLER M. 2008.** Association between microfungel endophyte and roots: do structural features indicate function? Botany 86:445-456.
- PFLEGER F.L., LINDERMAN. R.G. 1994.** Mycorrhizae and plant health. APS Press, The American phytopathological society, ST. Paul ,Minnesota, 334p.
- PICHOT C., BRUNO F., HOCHU I., 1999 :** Lack of mother tree alleles in zymograms of *Cupressus dupreziana* A. Camusembryos. Ann. For. Sci. 57, INRA, pp: 17 – 22.

Références Bibliographiques

- PICHOT C, FADY B, HOCHU L., 2000:** Lack of mother tree alleles in zymograms of *Cupressus dupreziana* A. Camus embryos. Ann for Sci 57: 17-22.
- PICHOT C., EL-MAATAOUI M., RADDI S., RADDI P., 2001 :** Surrogate noter for endangered *Cupressus*, Nature, 412, p: 39.
- PLENCHETTE C., 1982.** Les endomycorhizes à vésicules et arbuscules, un potentiel à exploiter en agriculture. Rev. Phytoprot., 63(2) : 68-108.
- PONCHET J., 1981 :** Le chancre cortical du Cyprès. Rev. Forest. Medit. T. III. n° 2.
- PONS A., QUEZEL., 1957.** Première étude palynologique de quelques paléosols sahariens, Trav.Inst.Rech. Sahar. Univ. Alger, 16 : 15-40.
- PONS A., QUEZEL., 1957.** Contribution à l'étude de la flore et de la végétation du Hoggar, T.I.R.S., mono gr. Régionales, 2, 164p
- PILLAI S.K.1963,** Structure and seasonal study of the shoot apex of some *Cupressus* species. The New Physiologist, 62(3):335-341. **In HEURE P., 2002.**
- PORLINGRIS I.C., THERIOS I. 1976.** Rooting reponse of juvenile and adult leafy olive cutting to various factors. J.Hort. Sci 51(1), p.31-39.
- PURIN, S. RILLIG, M.C. 2007.** The arbuscular mycorrhizal fungal protein glomalean: Limitations, progress, and a new hypothesis for its function. Pedobiologia **51**: 123-130.
- QUEZEL P., 1933, In ABDOUN, 2002.** Etude de la dynamique spatio-temporelle dans des populations de *Cupressus dupreziana* A. Camus. au Tassili n'Ajjer Algérie : synthèse des connaissances actuelles relatives au *Cupressus dupreziana* A. camus, historique, classification, répartition : p 35-40, 41-45-49.
- QUEZEL P., 1954 :** Contribution à l'étude de la flore et de la végétation du Hoggar, T.I.R.S., monogr.Régionales, 2, p : 164.
- QUEZEL P., SANTA S., 1962 :** Nouvelle flore de l'Algérie et des régions désertiques méridionales, CNRS, Paris, 1170 p.
- READD.J., 1984.** The structure and function of the vegetative mycelium of mycorrhizal roots. In the ecology and physiology of the fungal mycelium. Edited by D.H.Jennings and A.D.M. Rayner. Cambridge University Press, Cambridge . pp. 215-240.
- REMY W., TAYLOR T.N., HASS. H., KERP. 1994.** Four hundred-million-year-old vesicular arbuscular mycorrhizae. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 91 : 11841-11843.
- RIVERA NAVA J L., 2005.** Stratégie mère porteuse chez *Cupressus dupreziana* A. Camus : Analyse conséquence et perspectives. Université d'Avignon (84, Vaucluse).

Références Bibliographiques

- ROUANE P., 1979.** Croissance des rameaux et de différenciations chez *chamaecyparis lawsoniana* (A. Murr.) Parl. (Cupressaceae). Bulletin de la Société Botanique de France, Actualités botaniques, 3 : 133- 137.
- ROUANE P., 1973.** Etude comparée de la répartition des ramifications au cours de l'ontogenèse de quelques Cupressacées. Thèse de Doctorat :Laboratoire Forestier de Toulouse . 277p.
- ROSENDAHL S, MATZEN H.B.2008.** Genetic structure of arbuscular mycorrhizal populations in fallow and cultivated soils. *New Phytologist* 179: 1154-1161.
- RUGINI E. 1984.**In vitro propagation of some olive (*olea europea* L .) cultivars with different root-ability, and medium development using analytical data from developing shoot and embryo. *Hortic.* 24.p.123-124.
- RUGINI E .1986.**Olive (*Olea europea* L.) In Bajaj YPS. (ed.). Biotechnology in agriculture and forestry. Vol 5. Trees I. Berlin: Springer –Verlag.p.253-267.
- RUGINI E. 1988.**Somatic embryogenesis and plant regeneration in olive(*Olea europea*L.).*Plant Cell.Tiss.Org.Cult.*14, p.207-214.
- RUGINI E., CARICATO G. 1995.** Somatic embryogenesis and recovery from mature tissues of olives cultivars (*Olea europaea* L.) “Canino” and “Moraiolo ». *Plant cell Rep* 14,p.257-260.
- SAHLI F., 2007 :**Le Cyprès du Tassili, *Cupressus dupreziana* A. Camus conservation in-situ et exsitu,INRF BAINEM, pp : 2 - 4.
- SANON A, MARTIN P., THIOULOUSE J., PLENCHETTE C., SPICHIGER R., LEPAGE M., DUPONNOIS R.2006.**Displacement of an herbaceous plant species community by mycorrhizal and non-mycorrhizal *Gmelina arborea*, an exotic tree, grown in a microcosm experiment. *Mycorrhiza* 16 : 125-132.
- SAYOUD M.S., 1995 :**Bouturage herbacé et Culture in-vitro du Cyprès du Tassili « *Cupressus dupreziana*A.Camus ». Thèse d'ingénieur d'état en agronomie, UMMTO, pp :93.
- SCALES, P.F., and PETERSON R.L.1991b.**Structureand development of *Pinus banksiana*-*Wilcoxina ectendomycorrhizae*.*Can.J.Bot.* 69: 2149-2157.
- SCHADT C.W., MULLER R.B and SCHMIDT S.K.2001.**Isolation and phylogenetic identification of a dark-septate fungs associated with the alpine plant *Ranunculus adoneus*. *New Phytol.* 150:747- 755.
- SCHÜBLER A., SCHWARZOTT D and WALKER CH. 2001.,** A new fungal phylum, the glomermycota, phylogery and evolution. *Mycol* 105: 1413- 1421, dec 2001. The British Mycological society.

- SCHÜSSLER A, GEHRIG H, SCHWARZOTT D, WALKER C. 2001b.** Analysis of partial Glomales SSU RNA gene sequences: Implications for primer design and phylogeny. *Mycological Research* **105**: 5-15.
- SCHÜSSLER A., SCHWARZOTT D., WALKER C. 2001a.** A new fungal phylum, the Glomeromycota: Phylogeny and evolution. *Mycological Research* **105**: 1413-1421.
- SELOSSE M.A., LE TACON F., 1998.** The land flora : phototroph-fungus partnership? *Trends Ecol. Evol.* **13**, p15-20.
- SIMARD S.W., DURALL D.M. 2004.** Mycorrhizal networks: a review of their extent, function, and importance. *Canadian Journal of Botany* **82**: 1140-1165.
- SMITH G.S. 1987.** Interactions of nematodes with mycorrhizal fungi. *in*: Veech JA, Dickson DW (eds), *Vistas on Nematology*, Society of Nematologists. Hyattsville, Maryland. pp 292-300.
- SMITH S .E., and GIANINAZZI-PEARSON V. 1988.** Physiological interactions between symbionts in vesicular-arbuscular mycorrhizal plants. *Ann. Rev. Plants Physiol Plant Mol. Biol.* **39**: 221-224.
- SMITH F.A., and SMITH, S.E., 1997.** Transley Review No.96. Structural diversity in (vesicular)-arbuscular mycorrhizal symbiosis. *New Phytol.* **137**: 373- 388.
- SMITH, S.E., and READ, D.J., 1997.** *Mycorrhizal Symbiosis*. Second edition Academic press, San Diego, Calif., U.S.A.
- SMITH, S.E., and READ, D.J., 2008.** *Mycorrhizal symbiosis*. Second edition. Academic press.
- SIMONNEAU P., DEBAZAC E.F., 1961 :** Les cyprès des Ajjers. *Rev. Forest. Fr.*, **2**, pp: 67 – 90.
- STOYKE, G. EGGER, K.N. and CURRAH, R.S. 1992.** Characterization of sterile endophytic fungi from the mycorrhizae of subalpine plants. *Can.J.Bot.* **70**: 2009 – 2010.
- SURYANARAYANAN T.S., MURALI T.S., VENKATESAN G. 2003.** Occurrence and distribution of fungal endophytes in tropical forest across a rainfall gradient.
- STONE J.K., SHERWOOD M.A. CARROL G.C. 1996.** Canopy microfungi: function and diversity *Northwest Science* **70**: 37-45.
- TAIZ L and Zeiger E. 2002.** Mineral Nutrition. *In* : *Plant physiology*. 2 nd Ed. Sinauer Associates Inc. Pub. p.67-86.
- THROPE TA 1980.** Organogenesis in vitro: structural physiological and biochemical aspects. *In* Vasil IK. (ed) *International review of cytology*. Suppl, II, p.71-111

Références Bibliographiques

- TRAPPE, J.M. and GERDEMANN, J.W.1979.**A neotype of *Endogone pisiformis*. *Mycologia*.50: 251-260.
- TRISTAM H.B.,1960.** The great Sahara: Wanderings south of the Atlas mountains, Murray edit., London, 435p.
- Van Campo M., 1958,** Analyse pollinique des dépôts wurmiens d'El- Guettar (Tunisie), Veroff. Geobot. Inst. Rubel, Zurich, 34 : 133-135.
- WALKER, C.and SANDERS, F.E. 1986.** Taxonomic concepts in the Endogonaceae: III. Theseparation of *Scutellospora* gen. Nov. from *Gigaspora* gerd. & trappe. *Mycotaxon*.27: 169-182.
- YAKOUB- BOUGDAL S., 1984.**Etudes des R.R sur les méristèmes et sur les embryons en culture in-vitro chez le palmier dattier. Approches quantitatives. D.E.A de biologie et physiologie végétale, Université Pierre et Marie Curie. PP. 58.
- YAKOUB-BOUGDAL S., 2005.**Morphogénese in vitro du palmier dattier (*Phoenix dactylifera*) et de l'olivier (*Olea europea*)Var.Chemlal. Thèse d'état es-science.Univ.Tizi-Ouzou.191p
- YU,T. E., J-C., EGGER, K. N., and PETERSON, R.L. 2001 a.** Ectendomycorrhizal associations- characteristics and functions. *Mycorrhizas*, 11:167-177.
- ZOBEL, D.B., 1983.** Twig elongation patterns of *Chamaecyparis lawsoniana*. *Botanical Gazette*, 144(1): 92-103.
- ZERAMDINI N, 2009.,** Etude du polymorphisme intra- et inter- spécifique du gène β -tubuline chez des espèces de champignons mycorhiziens à arbuscules en vue de développer des marqueurs moléculaires. Thèse de M .Sc en sciences biologiques. Université de Montréal. 101p

DALZOTTO A. and DOCAMPO D.M. 1997. Micropropagation of rootstock from the Marianna-2624plum (*Prunus cerasifera* x *Prunus munisiana*) and the pixy plum (*P. insititia* L.) under controlled conditions. *Phyton –Int.J.EXP.Bot.* 60:127-135.

CORNU D et DALET F. 1987. La multiplication végétative du Merisier(*Prunus avium* L.)
2^{ème} colloque sur les substances de croissance et leurs utilisations en Agriculture.

Références Bibliographiques

Annales ANPP.1(3) :3p.

DUMANOIS C. BRAUT-BOUCHER F. COSSON L. et PARIS M., 1986.Multiplication végétative in vitro du chanvre(*Canabis sativa L.*). Application à la conservation de clones sélectionnés. *Agronomie* 5 :487-495.

HAICOUR R.2002.Biotechnologie végétales, techniques de laboratoire. Paris Sud. Ed. Tec et Doc.298p

J.-L. Guignard et F.Dupont 2004 *Abreges Botanique systématique moléculaire* 13 eme édition .III MASSON . P 54

Read, D.J. 1984.The structure and function of vegetative mycelium of mycorrhizal roots. In the ecology and physiology of the fungal mycelium. Edited by D.H. Jennings and A.D.M. Rayner. Cambridge. University Press, Cambridge pp.215

Jakobsen I. 1995. Transport of phosphorus and carbon in arbuscular mycorrhizas. In: *Mycorrhiza, structure, function, molecular biology and biotechnology*. Springer 305-332.

Jean Bérubé . 2007 Ressources naturelles Canada Service canadien des forêts Centre de foresterie des Laurentides n° 34 ; 1055, rue du P.E.P.S.
C.P. 10380, succ. Sainte-Foy Québec (Québec) G1V 4C7
Téléphone : 418-648-7174
Télécopieur : 418-648-5849
Courriel : jean.berube@rncan.gc.ca
Site Web : scf.rncan.gc.ca/regions/cfl

Résumé

Recherche des conditions adéquates pour la micropropagation du cyprès du Tassili *Cupressus dupreziana* A. CAMUS et étude préliminaire des mycorhizes.

Mots-clés : *Cupressus dupreziana* A.CAMUS, culture *in-vitro*, hormone, milieu de culture, morphogenèse, mycorhize, rhizosphère.

Résumé : Le cyprès du Tassili *Cupressus dupreziana* A.CAMUS constitue une des reliques les plus remarquables du monde végétal. Le problème de la multiplication par semis, dans les conditions naturelles, a été observé par plusieurs auteurs. Ainsi, nous nous sommes intéressés à la propagation des microboutures par le biais de la culture *in-vitro*.

Les microboutures ont subi plusieurs tests de désinfection et soumises à différentes concentrations. Le bichlorure mercurique à 0.5mg/l pendant 5mn a donné le meilleur résultat. Différents milieux de culture ont été utilisés : Murashige et Skoog (MS)(1962) ; MS/2 ; Gamborg (1986) ; Driver et Kuniyuki (1984) avec deux types de microboutures : l'une issue de pieds adultes et l'autre issue de pieds juvéniles. Les microboutures issues de pieds adultes et ensemencées sur MS, donnent une meilleure morphogenèse. Le milieu de Murashige et Skoog (MS)(1962) additionné de B.A.P à 0.4 mg/l reste le milieu le plus performant.

Aussi la mycorhization des plants représente une alternative pour tenter de solutionner les problèmes pour lesquels le cyprès du Tassili est confronté. Ainsi des travaux préliminaires mettant en évidence le type de mycorhize rencontré dans la rhizosphère de pieds adultes et des plantules

Search on the adequate conditions for the micro-spreading of the tassili cypress *Cupressus dupreziana* A.CAMUS and preliminary study of mycorrhizas found in this specy.

Key words : *Cupressus dupreziana* A.CAMUS, *in-vitro* culture, hormone, culture environment, morphogenesis, micorrhizae, rhizosphere.

Summery: The Tassili cypress *cupressus dupreziana* A.CAMUS constitutes one of the most remarkable replies of the vegetable world. Multiplication problem by seeds in natural conditions has been observed by many authors. Thus, we have been interested in micro-cuttings spreadig through *in-vitro* culture.

The micro -cuttings have undergone many desinfection tests under different concentrations. The bichloride mercuric at 0.5mg/l during 5 minutes has given the best result. Many different environment of culture have been used : Murashige and Skoog (MS) (1962), MS/2 ,Ganborg(1968), driver and Vuniyuki (1984) with two types of cuttings : the first is issued from adult stalks and the second from juvenile stalks. The micro- cuttings issued from adult stalks and sowed on MS give the best morphogenesis. Muraskige, environment and skoog (MS)1962 additioned to B.A.P at 0.4 mg/l stays, the most performing . Likewise , plants mycorrhization represents an alternative to try to solve the problems which theTassili Cypress is faced to. Thus, preliminary labors showing the micorrhizae kind