



Faculteit Landbouwkundige en
Toegepaste Biologische Wetenschappen



Academisch jaar 2002-2003

**UN SYSTEME INTEGRE DE MICROPROPAGATION
DE L'ARTICHAUT (*CYNARA SCOLYMUS* L.)**

**EEN GEÏNTEGREERD SYSTEEM VOOR DE
MICROPROPAGATIE VAN ARTISJOK
(*CYNARA SCOLYMUS* L.)**

door

Bouthaina DRIDI

Thèse présentée en vue de l'obtention du grade de Docteur (PhD)
en Sciences Agronomiques et Biologiques Appliquées :
Biotechnologie cellulaire et génétique

Proefschrift voorgedragen tot het bekomen van de graad van
Doctor in de Toegepaste Biologische Wetenschappen:
Cel- en genbiotechnologie

Op gezag van
Rector **Prof. dr. A. DE LEENHEER**

Decaan
Prof. dr. ir. H. VAN LANGENHOVE

Promotor
Prof. dr. ir. P. DEBERGH

The author and the promoters give authorization to consult and copy parts of this book for personal use only. Any other use is limited by laws of Copyright. Permission to reproduce any material contained in this work should be obtained from the author.

De auteur en de promotor geven de toelating dit doctoraatswerk voor consultatie beschikbaar te stellen, en delen ervan te kopiëren voor persoonlijk gebruik. Elk ander gebruik valt onder de beperkingen van het auteursrecht, in het bijzonder met betrekking tot de verplichting uitdrukkelijk de bron te vermelden bij het aanhalen van de resultaten uit dit werk.

Promotor

Prof. Dr. ir. Pierre DEBERGH

Author

Bouthaina DRIDI

DEDICACE

A la mémoire de deux êtres très chers à mon cœur

Mon père, Mohamed Hédi

Mon frère, Sidi Ahmed



L'artichaut...c'est le seul plat que, quand t'as fini de manger, t'en as plus dans ton assiette que quand t'as commencé!!!

Coluche



AVANT-PROPOS

Le présent travail a été mené au Laboratoire d'Horticulture à la Faculté d'Agriculture et des Sciences Biologiques appliquées de Gent sous la direction du Professeur P.Debergh auquel j'exprime ma vive gratitude et mon profond respect. L'intérêt qu'il a manifesté à l'égard de mon travail et les conseils précieux et les encouragements qu'il m'a prodigués m'ont été d'un grand apport.

Ce Doctorat a été réalisé grâce à la contribution matérielle de la CTB (Coopération Technique Belge), je la remercie en l'aimable personne de son représentant Monsieur C. Misigaro.

J'exprime ma gratitude et mon respect à Messieurs les professeurs A.Mougou et M.H.Ben Hamouda et à Monsieur R.Rouis respectivement Président de l'Institution de la Recherche et de l'Enseignement Supérieur Agricoles (IRESA), Directeur et Secrétaire Général de l'Ecole Supérieure d'Horticulture et d'Elevage de Chott-Mariem (Tunisie) pour leurs encouragements et les facilités administratives qu'ils m'ont assuré tout au long de la réalisation de cette thèse.

Madame et Monsieur les Professeurs N.Dorion et C.Bigot ont guidé mes premiers pas dans la culture *in vitro* à l'Ecole Nationale Supérieure d'Horticulture de Versailles (France), ils m'ont fait l'honneur d'accepter de juger mon travail et de faire partie du jury d'examen et de lecture. Qu'ils trouvent ici l'expression de mes profonds estime et reconnaissance.

Ma sincère gratitude va aux membres du comité de lecture et d'examen: Prof.Dr.ir.M.Höpte, Prof.Dr.ir.J.Viaene, Dr.ir.L.Maene Prof.Dr.ir.D.Reheul, Prof.Dr.M.Ben Kheder, et Prof.Dr.R.Viane, pour leurs commentaires et suggestions constructives.

Je tiens à remercier les Professeurs R.Viane et P.Du Jardin et Mme F.Skhiri pour m'avoir donné de leur temps et aidé à interpréter mes coupes d'histologie.

Les Docteurs A.Rival du Centre de Coopération Internationale en Recherche Agronomique pour le Développement à Montpellier (CIRAD) et S. De Schepper du laboratoire d'Horticulture de la Faculté des Sciences Agronomiques et Biologiques Appliquées de Gent, ont eu la gentillesse de m'aider à interpréter les résultats d'analyse de la cytométrie en flux, qu'ils trouvent ici mes profonds respects et reconnaissance.

Les analyses statistiques n'auraient pas été menées à bien sans l'aide de mon collègue A.Douaik, Doctorant au Département de Gestion et de Protection des sols à la Faculté des Sciences Agronomiques et Biologiques Appliquées de Gent. Qu'il trouve ici mes vifs remerciements.

J'exprime mon affectueuse reconnaissance à Messieurs I.Ghezal et L.Chabchoub de la Station d'Appui de Manouba (SAM, Tunisie) pour m'avoir fourni le matériel végétal avec lequel j'ai mené toutes les expérimentations de mon Doctorat.

Je remercie vivement Madame H. Carlier du département de Génétique et d'Amélioration Végétales (CLO, DvP) à Merelbeke (Belgique) qui m'a aidé à faire les analyses de cytométrie en flux.

J'exprime mes amitiés et ma profonde gratitude à tout le personnel du laboratoire d'Horticulture de la Faculté des Sciences Agronomiques et Biologiques Appliquées de Gent. Madame T.Versluys a eu l'amabilité de s'occuper du matériel végétal et de suivre même quelques essais pendant mon absence, qu'elle trouve ici l'expression de ma profonde reconnaissance. P.Bruynseels, N. Sieron, H.Verleysen, E.Oyeart, S.De Schepper, P.Delare, K.Gillis, P.Vanneste, A.Verkerken et P.Schepers m'ont toujours aidé avec le grand sourire, je n'oublierais jamais leur soutien moral durant les dures épreuves par lesquelles je suis passée, je leur dis tous «dankuwel».

Je remercie chaleureusement mes collègues et amis de l'Ecole Supérieure d'Horticulture et d'Elevage de Chott-Mariem, en particulier Messieurs M.Ben Kheder et C.Hannachi et Madame F.Skhiri pour leur soutien continu.

Mes remerciements vont aussi au personnel de l'OBSG (Ontmoeting Buitenlandse Studenten Gent) qui m'a assuré l'hébergement durant mon séjour à Gent, malgré sa discontinuité.

Mes vifs remerciements vont à tous mes amis en Tunisie et en Belgique qui n'ont pas arrêté de m'apporter leur soutien moral; je cite en particulier Mary, Karijn, Muna, Mounir, Hatem, Sen, Marianne, Julien, Leïla, Rym, Karim et tous ceux dont, non par ignorance mais seulement par oubli, je n'ai pas cité le nom.

Ma profonde gratitude et mon respect vont à ma chère mère Bouraouia et à tous mes frères et sœurs, leurs femmes, leurs maris et leurs enfants, pour leur soutien moral tout le long de la réalisation de ce Doctorat, je cite en particulier, mes adorables sœurs Fatma et Monia et leurs charmants époux Ezzedine et Abid qui, sans eux, je n'aurais jamais pu réaliser ce travail; ils étaient des mères et des pères pour mon fils pendant mon absence. Qu'ils trouvent ici ma reconnaissance et mes plus affectueux remerciements.

Enfin, je ne saurais quoi dire pour remercier l'être le plus cher à mon cœur, mon fils Omar. Je lui demande tout d'abord de me pardonner si j'étais obligée de le quitter durant des mois quand je devais partir en Belgique, je le remercie de tout mon cœur pour sa compréhension, ses sacrifices et son soutien moral continu et je lui dis «Rabbi ikhallik lia amayratou lghali»!!

Gent, Juin 2003
Bouthaina DRIDI

TABLE DES MATIERES

Résumé	
Samenvatting	
Summary	
Liste des abréviations	

INTRODUCTION GENERALE	1
CHAPITRE I. REVUE BIBLIOGRAPHIQUE	5
1.1. Généralités	6
1.2. Intérêts de la culture	6
1.2.1. Alimentation humaine	6
1.2.2. Phytothérapie	7
1.2.3. Nutrition animale	9
1.2.4. Autres utilisations de l'artichaut	9
1.3. Origine phylogénétique de la plante	9
1.4. Biologie de l'artichaut	11
1.4.1. La plante	11
1.4.2. Transition apex végétatif-apex floral	13
1.4.2.1. Phase "tunica-carpus"	13
1.4.2.2. Phase "manteau-coeur"	13
1.4.3. La biologie florale	14
1.4.4. La pollinisation	16
1.4.5. La protandrie	16
1.4.6. La graine	17
1.4.7. Cycle physiologique de la plante	18
1.4.8. Mode de propagation de la plante	19
1.4.8.1. La multiplication végétative	20
1.4.8.2. La multiplication par graines	21
1.5. Situation économique	21
1.5.1. Dans le monde	21
1.5.2. L'artichaut en Tunisie	22
1.5.2.1. Les variétés cultivées	23
1.5.2.2. Problèmes soulevés par la culture de l'artichaut	23
1.5.2.2.1. Mode de propagation de la plante	25
1.5.2.2.2. Aspects phytosanitaires	25
1.6. Problèmes phytosanitaires	25
1.6.1. Invertébrés parasites de l'artichaut	27
1.6.2. Virus de l'artichaut	29
1.7. Amélioration de l'artichaut	31
1.8. Culture <i>in vitro</i> de l'artichaut	31
1.8.1. Historique	32

1.8.2. La micropropagation	33
1.8.2.1. Micropropagation à partir de segments de rhizome	33
1.8.2.2. Micropropagation à partir de méristèmes	34
1.8.2.3. Micropropagation à partir de graines	35
1.8.3. Assainissement viral par culture de méristèmes	35
1.8.4. Problèmes posés par la culture <i>in vitro</i>	36
CHAPITRE II. MATERIELS ET METHODES	40
2.1. Matériel végétal	41
2.1.1. Cultivars utilisés	41
2.1.2. Explants	41
2.2. Stérilisation	42
2.2.1. Stérilisation du matériel végétal	42
2.2.2. Stérilisation des milieux de culture	43
2.3. Milieux et récipients de culture <i>in vitro</i>	43
2.3.1. Composition du milieu de base	43
2.3.2. Les hormones utilisées	43
2.3.3. Autres additifs	44
2.3.4. Récipients de culture	46
2.3.5. pH des milieux de culture	46
2.4. Conditions de culture	46
2.4.1. Température	46
2.4.2. Eclairage	46
2.4.3. Hygrométrie	47
2.4.4. Pluviométrie	47
2.5. Etude histologique	47
2.6. Poids sec	49
2.7. Acclimatation des vitroplants	49
2.8. Analyses statistiques	50
CHAPITRE III. MULTIPLICATION <i>IN VITRO</i> DE L'ARTICHAUT	51
3.1. Introduction	52
3.2. Etude de l'effet de différentes cytokinines sur le taux de multiplication des vitroplants	52
3.2.1. Matériels et méthodes spécifiques	53
3.2.1.1. Protocole expérimental	53
3.2.1.2. Paramètres observés	54
3.2.2. Résultats et discussion	54
3.2.2.1. Effet des différentes cytokinines sur la qualité des explants primaires	54
3.2.2.2. Effet sur la qualité des pousses axillaires	55
3.2.2.3. Effet sur le développement des pousses axillaires	55
3.2.2.4. Effet sur la longueur des pousses axillaires	56
3.2.3. Conclusion	57
3.3. Effet du paclobutrazol sur la qualité et le taux de multiplication des vitroplants	58

3.3.1. Matériels et méthodes spécifiques	58
3.3.1.1. Protocole expérimental	58
3.3.1.2. Paramètres observés	59
3.3.2. Résultats et discussion	59
3.3.2.1. Effet des différentes concentrations de paclobutrazol sur la qualité des vitroplants	59
3.3.2.2. Effet du paclobutrazol sur la taille des feuilles	59
3.3.2.3. Effet sur le développement des bourgeons axillaires	61
3.3.2.4. Effet sur le développement en biomasse des vitroplants	61
3.3.3. Conclusion	62
CHAPITRE IV. ENRACINEMENT <i>IN VITRO</i> DE L'ARTICHAUT	63
4.1. Effet de la riboflavine sur l'enracinement <i>in vitro</i> de l'artichaut	65
4.1.1. Introduction	65
4.1.2. Matériels et méthodes spécifiques	66
4.1.2.1. Protocole expérimental	66
4.1.2.2. Paramètres observés	66
4.1.3. Résultats et discussion	67
4.1.4. Conclusion	68
4.2. Effet de la durée de l'exposition à l'auxine sur l'enracinement <i>in vitro</i> de l'artichaut	68
4.2.1. Introduction	68
4.2.2. Matériels et méthodes spécifiques	69
4.2.2.1. Protocole expérimental	69
4.2.2.2. Paramètres observés	70
4.2.3. Résultats et discussion	70
4.2.4. Conclusion	71
4.3. Effet des différentes cytokinines sur l'enracinement <i>in vitro</i> de l'artichaut	72
4.3.1. Introduction	72
4.3.2. Matériels et méthodes spécifiques	74
4.3.2.1. Protocole expérimental	74
4.3.2.2. Paramètres observés	74
4.3.3. Résultats et discussion	75
4.3.3.1. Effet des différentes auxines sur le taux d'enracinement	75
4.3.3.2. Effet des différentes auxines sur le nombre et la longueur des racines	77
4.3.4. Conclusion	78
4.4. Effet de la β -cyclodextrine sur l'enracinement <i>in vitro</i> de l'artichaut	79
4.4.1. Introduction	79
4.4.2. Matériels et méthodes spécifiques	80
4.4.2.1. Protocole expérimental	80

4.4.2.2. Paramètres observés	80
4.4.3. Résultats et discussion	80
4.4.4. Conclusion	81
4.5. Effet de la concentration en macroéléments sur l'enracinement <i>in vitro</i> de l'artichaut	82
4.5.1. Introduction	82
4.5.2. Matériels et méthodes spécifiques	83
4.5.2.1. Protocole expérimental	83
4.5.2.2. Paramètres observés	83
4.5.3. Résultats et discussion	83
4.5.4. Conclusion	84
4.6. Aperçu sur les essais d'enracinement non concluants	84
4.6.1. Effet de la taille de l'explant sur l'enracinement de l'artichaut	84
4.6.2. Effet de la qualité de la lumière sur l'enracinement de l'artichaut	85
4.6.3. Utilisation de la méthode "double layer"	86
4.7. Effet du rang de subculture sur l'enracinement <i>in vitro</i> de l'artichaut	86
4.8. Conclusion	89

CHAPITRE V. UTILISATION DES PEROXYDASES COMME MARQUEUR BIOCHIMIQUE DE L'ENRACINEMENT *IN VITRO* ET ETUDE DES CHANGEMENTS ANATOMIQUES INTERVENANT AU COURS DE LA FORMATION DES RACINES CHEZ L'ARTICHAUT 90

5.1. Utilisation des peroxydases comme marqueur biochimique de l'enracinement <i>in vitro</i> de l'artichaut	91
5.1.1. Introduction	91
5.1.2. Matériels et méthodes spécifiques	92
5.1.2.1. Matériel végétal et milieux de culture	92
5.1.2.2. Extraction et activité des peroxydases	93
5.1.2.3. Dosage des protéines	94
5.1.2.4. Paramètres observés	94
5.1.3. Résultats et discussion	94
5.1.4. Conclusion	98
5.2. Etude des changements anatomiques au cours de la formation des racines <i>in vitro</i> de l'artichaut	99
5.2.1. Introduction	99
5.2.2. Matériels et méthodes spécifiques	101
5.2.3. Résultats et discussion	101
5.2.4. Conclusion	106

CHAPITRE VI. ETUDE DE L'ACCLIMATATION DES VITROPLANTS D'ARTICHAUT 107

6.1. Introduction	108
6.2. Matériels et méthodes spécifiques	109
6.2.1. Matériel végétal	109

6.2.2. Acclimatation	109
6.2.2.1. Récipients et substrats de culture	109
6.2.2.2. Conditions d'acclimatation	110
6.2.3. Etude histologique	111
6.2.4. Dosage des chlorophylles	111
6.3. Paramètres observés	111
6.4. Résultats et discussion	113
6.4.1. Effet du type de pousse sur la réussite de l'acclimatation	113
6.4.2. Modifications anatomiques observées sur les plantules au cours de l'acclimatation	115
6.4.2.1. Feuilles	115
6.4.2.1.1. Epaisseur de la feuille et de l'épiderme	115
6.4.2.1.2. Structure anatomique des feuilles	118
6.4.2.1.3. Nombre de chloroplastes et contenu en chlorophylles	121
6.4.2.2. Racines	124
6.5. Conclusion	126

CHAPITRE VII. ETUDE DES PERFORMANCES AGRONOMIQUES AU CHAMP DES PLANTES D'ARTICHAUT OBTENUES *IN VITRO*

7.1. Introduction	127
7.2. Matériels et méthodes spécifiques	128
7.2.1. Matériel végétal pour l'essai de plein champ	128
7.2.2. Matériel végétal pour la cytométrie en flux	129
7.2.3. Protocole expérimental	129
7.2.3.1. Essai de plain champ	129
7.2.3.2. Cytométrie en flux	130
7.2.4. Paramètres mesurés	130
7.2.4.1. Paramètres de croissance	131
7.2.4.1.1. La plante	131
7.2.4.1.2. La feuille	131
7.2.4.1.3. Production de biomasse	131
7.2.4.2. Paramètres de production	131
7.3. Résultats et discussion	132
7.3.1. Paramètres de croissance	132
7.3.1.1. La plante	132
7.3.1.2. La feuille	133
7.3.1.3. Production de biomasse	134
7.3.2. Paramètres de production	135
7.3.2.1. Précocité	135
7.3.2.2. Production	137
7.3.3. Cytométrie en flux	138
7.4. Conclusion	141

CHAPITRE VIII. DISCUSSION ET CONCLUSIONS GENERALES

8.1. Initiation	142
-----------------	-----

8.2. Multiplication <i>in vitro</i> de l'artichaut	144
8.3. Enracinement <i>in vitro</i> de l'artichaut	145
8.4. Utilisation des peroxydases comme marqueur biochimique de l'enracinement <i>in vitro</i>	148
8.5. Changements anatomiques au cours de la rhizogenèse	149
8.6. Acclimatation des vitroplants d'artichaut	150
8.7. Performances agronomiques des vitroplants d'artichaut	151
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	155
Curriculum vitae	

RESUME

L'artichaut est une culture très importante dans le monde. En Tunisie, cette espèce valorise mieux que d'autres une terre lourde et une eau chargée en chlorure de sodium, caractérisant la basse vallée de Medjerda, berceau de cette culture. Cependant, cette espèce présente un régime de reproduction sexuée très complexe et c'est la multiplication végétative qui demeure jusqu'à maintenant la seule voie de multiplication aussi bien pour la production que pour la sélection.

Toutefois, même cette voie de multiplication est sujette à deux problèmes majeurs qui limitent l'extension et le développement de cette culture, à savoir, le faible taux de multiplication et les maladies virales. De tels problèmes ne peuvent être résolus que par les techniques de la culture *in vitro*. Beaucoup de travaux ont été réalisés dans le but de pallier à ces problèmes, mais les résultats obtenus sont peu brillants, notamment ceux relatifs à l'enracinement et à l'acclimatation. Nous avons essayé, moyennant les techniques de la culture *in vitro*, d'établir un système adéquat qui permet d'obtenir des plantes d'artichaut des cultivars 'Violet d'Huyères' et 'Blanc Oranais', qui soient saines et capables de croître et de produire.

Une première approche visant l'amélioration du taux de multiplication et de la qualité des vitroplants a permis de constater qu'un milieu contenant les macro et les microéléments de Murashige et Skoog (1962) additionné de 0.1 mg/L acide indole butyrique, 0.5 mg/L meta-topolin et 2 mM/L paclobutrazol donne les meilleurs résultats aussi bien au niveau de la qualité des pousses qu'au niveau du taux de multiplication qui était de 4.5 pour le cultivar 'Violet d'Huyères'.

Plusieurs essais d'enracinement ont été effectués et ils nous ont permis de dégager une remarque très importante. En effet, ce sont seulement les pousses qui proviennent d'un rang de subculture élevé (10 ou plus) qui sont capables de s'enraciner. Ces pousses subissent certainement un phénomène de rajeunissement qui leur permet de réacquérir la capacité à s'enraciner. C'est le milieu composé des macroéléments de Murashige et Skoog dilués (MS/2) et des microéléments MS additionné d'acide naphthalène acétique ou d'acide 3-(Benzo[b]selenyl) acétique à 2 mg/L, et de β -cyclodextrine à 2 g/L qui a donné 100% d'enracinement quand les pousses proviennent d'un rang de subculture supérieur à 10.

Nous avons d'autre part étudié l'évolution des peroxydases dans les pousses au cours de l'enracinement, et nous avons constaté que cette activité évolue les premiers jours suivant le traitement rhizogène pour atteindre un pic et ceci correspond à une phase d'induction racinaire. Juste après le pic, l'activité peroxydasique va chuter et ceci correspond à une phase d'initiation racinaire.

Par ailleurs, les modifications survenues au niveau anatomique sont aussi étudiées. Nous avons pu repérer sur des coupes réalisées à la base des pousses en enracinement les différents stades ontogéniques de l'enracinement qui se résument par un premier

stade de dédifférenciation des cellules, suivi d'une différenciation et organisation en amas méristématiques et enfin l'apparition des primordias racinaires suivie de l'émergence des racines. Celles-ci peuvent avoir deux origines: soit les tissus endogènes de la tige et dans ce cas, il existe une connection vasculaire adéquate entre le système racinaire et la pousse; soit les tissus superficiels d'origine callogène et dans ce cas, une faible ou même une absence totale de connection vasculaire est notée.

Toutes les plantes enracinées et acclimatées ont pu survivre et poursuivre leur développement grâce à un système d'acclimatation basé sur une réduction progressive de l'humidité relative pour que les plantules s'adaptent aux conditions d'environnement au champ. Pendant les premiers jours suivant la sortie des récipients de culture, les plantules présentaient des feuilles à structure anormale. En effet, celles-ci ont un épiderme très fin, très peu ou pas de cire épicuticulaire et de parenchyme palissadique et de grands espaces inter-cellulaires. Une telle structure expose la plantule à de grandes pertes d'eau par transpiration; d'où la nécessité de soumettre les plantules à une atmosphère presque saturée afin d'éviter à la plante les risques de chocs physiologiques et de dessèchement. La baisse de cette humidité relative se passe ensuite d'une manière progressive, jusqu'à ce que la plante s'adapte aux conditions de l'environnement extérieur.

Nous avons finalement planté les clones des cultivars 'Blanc Oranais' et 'Violet d'Huyères' obtenus *in vitro*, sous les conditions écologiques Tunisiennes et les résultats ont montré une supériorité de ces plantes par rapport aux plantes témoin issues d'oeilletons, quant à la croissance végétative et l'état phytosanitaire. La production des vitroplantes était moins précoce mais égale ou supérieure à la production des plantes témoin. Nous avons toutefois noté des variations au niveau des capitules récoltés sur les vitroplantes du cultivar 'Violet d'Huyères'. Cette variation n'a pas comme origine une modification du niveau de ploïdie qui a été maintenu mais devrait être épigénétique. Néanmoins, cette variation ne constitue pas un handicap pour le développement d'un système de multiplication de l'artichaut *in vitro*, puisqu'elle intéresse un critère recherché par le consommateur local en Tunisie, à savoir la couleur violette des capitules.

SAMENVATTING

De artisjok is wereldwijd belangrijk, maar in Tunesië nog meer dan in andere landen omdat het gewas toelaat de zware bodems van de vallei van de Medjerda te valoriseren en tevens gebruik te maken van het irrigatiewater dat heel wat natriumchloride bevat. Geslachtelijke vermenigvuldiging is zeer complex, daarom wordt praktisch uitsluitend gebruik gemaakt van vegetatieve vermenigvuldiging.

Ook met deze laatste techniek doen zich problemen voor waardoor dit gewas niet in voldoende mate geëxploiteerd wordt. Deze problemen zijn de lage vermenigvuldigingscoëfficiënt en virusaantastingen, die beide kunnen opgelost worden door aangepaste *in vitro* strategieën. Er heeft reeds heel wat onderzoek plaatsgegrepen maar nooit werd een gestroomlijnd geheel gepresenteerd, de voornaamste struikelstenen zijn de wortelvorming en de acclimatisatie. Voor ons onderzoek maakten we gebruik van twee populaire Tunesische cultivars 'Violet d'Hyères' en 'Blanc Oranais'.

Voor het optimaliseren van de vermenigvuldigingsfase ontwikkelden we een medium op basis van de zoutformulering van Murashige & Skoog + 0,1 mg/L indolboterzuur + 0,5 mg/L metatopoline + 2 mM/L paclobutrazol; deze formulering liet toe een vermenigvuldigingfactor van 4,5 te bekomen en de scheuten waren van goede kwaliteit.

Wat de wortelvorming betreft kunnen we een zeer belangrijk besluit formuleren: slechts scheuten afkomstig van tenminste rang tien in subcultuur die vormen wortels. Blijkbaar verwerven de scheuten naarmate het aantal subculturen vordert een soort verjonging, waardoor wortelvorming kan plaatsgrijpen. Het optimale medium (100% wortelvorming) bevat de halve concentratie van de macrozouten en de volle concentratie van de microzouten volgens Murashige & Skoog + α -naftylazijnzuur of BSAA 2 mg/L + β cyclodextrine 2 g/L.

Anderzijds hebben we de ontwikkeling van de peroxydasen in de scheuten gevolgd tijdens de wortelvorming. Hierbij is gebleken dat hun concentratie toeneemt tijdens de eerste dagen van de wortelinducerende behandeling, om nadien te dalen, hetgeen gepaard ging met de verschijning van de wortels.

Tevens werd een anatomische studie uitgevoerd. Aan de basis van scheuten werd de ontogenese van de wortelontwikkeling gevolgd, waarbij de klassieke stadia van dedifferentiatie, gevolgd door differentiatie en de vorming van een wortelmeristeem werden bekeken. Wortels kunnen zowel ontstaan uit endogene weefsels van de scheut, waarbij er vasculaire verbinding werd aangetoond tussen wortel en scheut, of uit callusweefsel, waarbij de vasculaire connectie niet steeds ideaal is, of zelfs ontbreekt.

Al de gewortelde en geacclimatiseerde planten overleefden dank zij een goed uitgewerkt, maar nog steeds arbeidsintensief, afhardingprotocol. Hierbij laten we de relatieve vochtigheid geleidelijk dalen. De eerste dagen *ex vitro* hebben de bladeren nog steeds een abnormale structuur, gekarakteriseerd door: een dunne epidermis, weinig of geen cuticulaire was en palissadeparenchym en grote intercellulaire ruimten. Dit alles heeft voor gevolg dat deze planten veel water verliezen door transpiratie, vandaar de noodzaak een hoge relatieve vochtigheid aan te houden na uitplanten en ze geleidelijk aan af te harden.

In vitro geproduceerde planten van beide voornoemde cultivars werden uitgeplant in Tunesië, en we konden duidelijk aantonen dat dit materiaal superieur is aan het klassieke gestekte materiaal, zowel qua groeikracht als qua fyto-sanitaire toestand. De productie was wel wat uitgesteld, maar minstens evengoed als de getuige. Er zijn wel kleine verschillen in morfologie van de vrucht van 'Violet d'Huyères' die niet te wijten zijn aan ploëdieverschillen. De vruchten zijn iets meer purper, en dit is gewenst in Tunesië.

SUMMARY

The artichoke (*Cynara scolymus* L.) is largely cultivated all around the world. In Tunisia, this species valorizes efficiently heavy soils and sodium chloride water charged, occurring frequently in the low valley of Medjerda, where this culture is cultivated. However, this species presents a very complex mode of sexual reproduction and vegetative multiplication is until now the only way of multiplication, for production as well as for selection.

However, even this way of multiplication is confronted with two major problems which limit the extension and the development of this culture: the low propagation ratio and viral diseases. Such problems can only be solved by *in vitro* culture techniques. In view of solving these problems many research works were undertaken, but the results were not satisfactory, especially during rooting and acclimatization. We tried to develop an integrated *in vitro* system, for 'Violet d'Hyères' and 'Blanc Oranais', the two most important cultivars in Tunisia.

The first goal was to improve the multiplication rate and the quality of the vitroplants. A medium containing Murashige and Skoog's (1962) macro and microelements, supplemented by 0.1 mg/L of indole butyric acid, 0.5 mg/L of meta-topolin and 2 mM/L of paclobutrazol gave the best results.

Several rooting tests were performed and they allowed us to formulate a very important observation. Indeed, only shoots coming from an elevated subculture rank (10 or more) can be rooted. Probably these shoots undergo a phenomenon of rejuvenation which allows them to root. The most appropriate medium is composed of diluted Murashige and Skoog's macroelements (MS/2) supplemented with MS microelements, naphthalene acetic acid or 3-(Benzo[b]selenyl) acetic acid 2 mg/L, and by β -cyclodextrine 2 g/L; this medium yielded 100% rooting as soon as shoots are coming from a subculture rank superior to 10.

On the other hand, we studied the evolution of peroxidases in shoots during rooting and we noticed that this activity evolves during the first days following the rooting treatment to reach a peak, corresponding to the phase of root induction. Subsequent to that peak, peroxidase activity drops, corresponding with phase of root initiation.

We also studied the changes occurring at the anatomical level. Cytological observations of shoot bases during the rooting process, allowed to identify the different ontogenic stages; first a stage of cell dedifferentiation, followed by the differentiation and organization in apical root meristematic tissues and finally by the appearance of root primordia and their emergence. Roots can have two origins: either they are initiated from endogenous stem tissue and in this case, an adequate vascular connection exists between the root system and the shoot, or originate from superficial tissue after forming a callus and in this case, a weak or even no vascular connection is observed.

All acclimatized plants, rooted from endogenous tissues could survive and pursued their development in the field, thanks to an acclimatization system based on a progressive reduction of the relative humidity. During the first days following of acclimatization, the plantlets presented some abnormal leaf structures. Indeed, these leaves have a very thin epidermis, very little or no epicuticular wax and palisade parenchyma, and large intercellular spaces. Such defaults expose the plantlet to important water losses by perspiration. Gradually decreasing the relative humidity during acclimatization allows to overcome these shortcomings.

We finally planted the clones of 'Blanc Oranais' and 'Violet d'Hyères', cultivars obtained *in vitro*, under the ecological conditions of Tunisia and the results showed the superiority of these plants concerning vegetative growth and health status, when compared to control plants issued from traditional vegetative propagation using axillary buds. The production of artichoke fruits by these vitroplants was less precocious but equal or superior to the production of the control plants. However, we noticed some variations at the level of capitules harvested on the vitroplants of 'Violet d'Hyères', they are more purple. This variation was not due to variation at ploidy level, but is probably epigenetic. Moreover, this variation is not a handicap, since it is an interesting characteristic searched after by local consumers in Tunisia.

LISTE DES ABREVIATIONS

ADN	acide désoxyribonucléique
AIA	acide indole acétique
AIB	acide indole butyrique
ANA	acide naphthalène acétique
BAP	benzylaminopurine
BO	'Blanc Oranais'
BSAA	acide 3-benzo[b]selenyl acétique
CD	β -cyclodextrine
GA ₃	acide gibbérellique
HPLC	high pressure liquid chromatography
HR	humidité relative
K	kinétine
LI	couche histogénique 1
LII	couche histogénique 2
LIII	couche histogénique 3
MS	Murashige et Skoog (1962)
mT	meta-topolin
PBZ	Paclobutrazol
PPFD	photosynthese photon flux density
RF	riboflavine
rpm	tours par minute (rounds per minute)
SAM	Station d'Appui de Manouba (Tunisie)
VH	'Violet d'Huyères'
2iP	6(2-isopentenylaminopurine)

INTRODUCTION GENERALE

L'artichaut (*Cynara scolymus* L.) une espèce pérenne appartenant à la famille des *Asteraceae*, est cultivée pour ses propriétés à la fois culinaires, thérapeutiques et industrielles. Son aire de distribution géographique couvre les régions du globe à été frais et hiver doux sans gel, où sa production est possible toute l'année.

En Tunisie, l'artichaut est cultivé principalement dans la basse vallée de la Medjerda où il valorise mieux que d'autres cultures une terre lourde et une eau chargée en chlorure de sodium.

Cette espèce possède un régime de reproduction sexué très complexe où la floraison est étalée sur plusieurs mois. L'allogamie entomophile est obligatoire en raison de la protandrie, ce qui n'exclut pas la gitonogamie en raison du gradient centripète de floraison. Ainsi, et en dépit de la forte variabilité génétique que recèle l'espèce, le recours aux hybridations pour la sélection de nouvelles variétés est très limité et la multiplication végétative demeure la seule voie de multiplication aussi bien pour la production que pour la sélection. Par conséquent, il serait préférable de parler de «cultivars» plutôt que de «variétés» puisque les parcelles actuelles sont constituées pratiquement d'un mélange d'écotypes homogènes, de structures génétiques quasiment indéterminées.

En outre, le faible taux de multiplication végétative de cette plante, qui n'excède pas 2 à 3 unités/an/pied-mère se trouve encore réduit de moitié suite à diverses attaques parasitaires (insectes, bactéries, champignons et virus) et particulièrement aux attaques virales, responsables du phénomène de dégénérescence infectieuse qui affaiblit considérablement les cultures et exige un renouvellement et un déplacement périodiques des artichautières tous les trois à quatre ans.

Ce problème a pu être partiellement résolu par les techniques de la culture *in vitro* et ce, par la culture de méristèmes qui contribue à l'assainissement viral et par la suite à la multiplication massive des clones sains. Les travaux de Harbaoui *et al.* (1982), Pécaut *et al.* (1983), Moncousin et Ducreux (1984) et Draoui *et al.* (1993) ont abouti à

l'établissement d'un système donnant des clones sains. Toutefois, les résultats restent peu brillants quant à l'enracinement et le taux de multiplication.

C'est dans le but de pallier à ces problèmes qu'a été proposé le sujet de ce Doctorat effectué à la Faculté des Sciences Agronomiques et de Biologie Appliquée de Gent (Belgique), au laboratoire d'Horticulture de Monsieur le Professeur Pierre Debergh.

Le doctorat a été établi selon le système «sandwich», toutes les expériences de laboratoire ont été effectuées en Belgique, et seulement l'essai de plein champ a été effectué en Tunisie, dans le domaine de l'Ecole Supérieure d'Horticulture et d'Elevage de Chott-Mariem. De ce fait l'organisation pour mener à bien toutes les expériences a été d'une très grand difficulté.

Deux cultivars d'artichaut ont été choisis pour mener l'ensemble de nos recherches: le 'Violet d'Hyères' et le 'Blanc Oranais'.

Après une étude bibliographique qui passe en revue l'intérêt de la culture de l'artichaut, la biologie de l'espèce, sa situation économique et les résultats obtenus jusqu'à maintenant en culture *in vitro* (chapitre 1), nous étudierons les différentes techniques permettant d'améliorer le taux de multiplication de l'artichaut et la qualité des vitroplants obtenus (chapitre 3). Dans le chapitre 4, plusieurs méthodes visant l'amélioration de l'enracinement *in vitro* seront décrites. Les peroxydases ont été utilisées comme marqueur de l'enracinement *in vitro*, les résultats seront donnés et interprétés au chapitre 5, où on trouve aussi l'étude des modifications anatomiques intervenant au cours de l'enracinement *in vitro* de l'artichaut. Dans le chapitre 6, nous essayerons de déterminer les conditions optimales de l'acclimatation et nous étudierons les modifications anatomiques au niveau de la feuille et de la racine *in vitro* et pendant la phase d'acclimatation. Enfin une étude comparative du comportement agronomique au champ des plantes obtenues *in vitro* et de celles provenant d'une multiplication traditionnelle à partir d'œilletons, est présentée au chapitre 7. Une discussion et les conclusions générales permettront de rassembler l'ensemble des

résultats auxquels nous avons abouti pour décrire une approche objective et intégrée permettant de sortir l'artichaut du cercle des plantes récalcitrantes.

CHAPITRE I
REVUE BIBLIOGRAPHIQUE

1.1. GENERALITES

L'artichaut (*Cynara scolymus* L.) a une très longue histoire qui remonte à la nuit des temps; en effet, la mythologie rapporte que «*cynara*» est le nom d'une belle jeune fille aux cheveux longs et «cendrés» qui fut transformée en artichaut par Jupiter amoureux. «*Cynara*» dériverait donc de «cendre» pour rappeler la couleur claire des feuilles, alors que «*scolymus*» signifie en grec épineux et pointu.

Au Moyen-Orient on appelle souvent l'artichaut «ardhi chouki», qui signifie littéralement «épine de terre». Les mots «Artichaut» en français, «Carciofo» en italien, «Artichoke» en anglais, «Alcachofa» en espagnol et «Artishoke» en allemand, trouvent tous leur origine dans le mot arabe «Harsciof», qui signifie «épine de terre» (Guyot et Gibassier, 1967).

Au début de l'ère chrétienne, l'artichaut était déjà cultivé et bien connu; selon Foury (1997), la mise en culture date du premier siècle après J.C., en Andalousie et/ou en Tunisie. L'espèce est pérenne et est multipliée normalement par voie végétative. Toutefois, au début de sa culture, elle était vraisemblablement multipliée par graines. La transition vers la multiplication végétative aurait été le résultat de la fixation de certains types particuliers ayant une bonne aptitude à s'adapter dans diverses aires de culture (Foury, 1978).

1.2. INTERETS DE LA CULTURE

1.2.1. Alimentation humaine

L'artichaut est cultivé pour ses capitules, dotés de principes actifs dont la nature phénolique joue un rôle prépondérant dans leurs caractéristiques organoleptiques. En alimentation, la valeur nutritive globale du cœur d'artichaut est comparable, sinon supérieure, à celle de la majorité des cultures maraîchères (Tableau 1.1). Il possède une valeur énergétique élevée (47 kcal/100 g), est riche en protéines (3.27 g/100 g), en sucres (10.50 g/100 g), en fibres (5.40 g/100 g), en sodium (94 mg/100 g) (FAO, 1998), en calcium (44.05 mg/100 g) et en fer (1.51 mg/100 g) (Lattanzio *et al.*, 1981). Il constitue également un apport important en vitamines B1, B2, B3, B5, B6 et en acide folique. La fraction glucidique est très riche en inuline, sucre à faible pouvoir

calorifique, qui fait de l'artichaut un aliment particulièrement indiqué pour les diabétiques (Lattanzio *et al.*, 1981; Van Loo *et al.*, 1995). En outre, les artichauts constituent, avec quelques légumes et fruits, une source saisonnière de caroténoïdes sériques (lutéine, zéaxanthine, lycopène, beta-cryptoxanthine, alpha-carotène et bêta-carotène) (Granado *et al.*, 1996).

L'artichaut se consomme également en conserves. Toutefois, la conserverie, qui est un moyen d'exportation appréciable, augmente le taux déjà élevé de composés phénoliques (Dhondt *et al.*, 1974). En effet, parmi les aliments les plus couramment consommés, l'artichaut, avec les pois chiches et les lentilles, possèdent les teneurs les plus élevées en polyphénols (264, 217 et 197 mg/100 g respectivement) et en tanins (9.1, 10.8 et 6.3 mg/100 g respectivement) (Mianiati *et al.*, 1994).

1.2.2. Phytothérapie

L'artichaut est depuis longtemps utilisé en médecine traditionnelle dans le traitement de certaines maladies du foie (Sayed et Marini, 1980; Adzet *et al.*, 1987). Les extraits d'artichaut possèdent en effet diverses propriétés cholérétiques, uréolytiques, diurétiques et hypocholestérolaémiques (Hammouda *et al.*, 1993a).

Les extraits de feuilles peuvent réduire le cholestérol dans le sérum selon deux mécanismes: soit par l'induction de son élimination, soit par une action inhibitrice sur sa synthèse *de novo* (Gebhardt, 1995). Les feuilles d'artichaut, en plus de leurs propriétés diurétiques, sont utilisées également dans le traitement de l'hydropisie (œdème) et des rhumatismes (Hammouda *et al.*, 1993b). En outre, le contenu en chrome de l'artichaut, estimé à 7.6 ppm, pourrait être utilisé dans le traitement de *Diabetes mellitus* type II (désordre dans les îlots de Langerhans, non insuline dépendante) (Muller *et al.*, 1988).

Tableau 1.1. Valeur alimentaire comparative des cultures maraîchères (FAO, 1998)

100g	Protéines (g)	Lipides (g)	Carbohyd. (g)	Fibres (g)	Energie (Kcal)	Sodium (mg)	B1 (mg)	B2 (mg)	B3 (mg)	B5 (mg)	B6 (mg)	C (mg)	E (mg)	A (IU)	Acide Folique (mg)
Artichaut	3.27	0.15	10.50	5.40	47.00	94	0.072	0.066	1.050	0.338	0.116	11.7	-	18.0	68.0
Aubergine	1.02	0.18	6.07	2.50	26.00	3	0.052	0.034	0.598	0.252	0.084	1.7	-	8.0	19.0
Cardon	0.70	0.10	4.89	1.60	20.00	170	0.020	0.030	0.300	0.099	0.043	2.0	-	12.0	28.3
Carotte	1.03	0.19	10.10	3.00	43.00	35	0.097	0.059	0.928	0.197	0.147	9.3	-	2813.0	14.0
Céleri	0.75	0.14	3.65	1.70	16.00	87	0.046	0.045	0.323	0.186	0.087	7.0	-	13.0	28.0
Chou-fleur	1.98	0.21	5.20	2.50	25.00	30	0.057	0.063	0.526	0.652	0.222	46.4	-	2.0	57.0
Concombre	0.69	0.13	2.76	0.80	13.00	2	0.024	0.022	0.221	0.178	0.042	5.3	-	21.0	13.0
Epinard	2.86	0.35	3.50	2.70	22.00	79	0.078	0.189	0.724	0.065	0.195	28.1	-	672.0	194.4
Fenouil	1.24	0.20	7.29	-	31.00	52	0.010	0.032	0.640	0.232	0.047	12.0	-	13.0	27.0
Laitue	1.30	0.30	3.50	1.90	18.00	9	0.050	0.080	0.400	0.200	0.055	18.0	-	190.0	49.8
Oignons	1.16	0.16	8.63	1.80	38.00	3	0.042	0.020	0.148	0.106	0.116	6.4	0.310	0.0	19.0
Persil	2.97	0.79	6.33	3.30	36.00	56	0.086	0.098	1.310	0.400	0.090	133.0	-	520.0	152.0
Piment	.89	0.19	6.43	1.80	27.00	2	0.066	0.030	0.509	0.080	0.248	89.3	0.680	63.0	22.0
P. de terre	2.07	0.10	18.00	1.60	79.00	6	0.088	0.035	1.480	0.380	0.260	19.7	-	0.0	12.8
Radis	0.60	0.54	3.59	1.60	17.00	24	0.005	0.045	0.300	0.088	0.071	22.8	-	1.0	27.0
Tomate	0.85	0.33	4.64	1.10	21.00	9	0.059	0.048	0.628	0.247	0.080	19.1	0.340	62.0	15.0

1.2.3. Nutrition animale

Les sous-produits de l'artichaut représentent des quantités importantes, aussi bien au champ (15-20 T/ha/an) que dans les résidus des conserveries. Leur utilisation en nutrition animale ne doit pas être sous-estimée, tant du point de vue qualitatif que quantitatif. En effet, la composition physico-chimique de l'artichaut, qui varie selon les organes de la plante (Lattanzio *et al.*, 1981), montre que les feuilles sont riches en protéines (12-19%) et en fibres brutes (18%) et peuvent constituer un fourrage appréciable pour l'engraissement des bovins (Montemurro et Cianci, 1976) et autres animaux, tels que les chèvres (Hernandez *et al.*, 1992) et les lapins (Bonanno *et al.*, 1994).

1.2.4. Autres utilisations de l'artichaut

Chez l'artichaut, les graines contiennent 28% de substances grasses dotées d'un arôme et d'un goût appréciables. Dans les triacylglycérides, on trouve les acides laurique, myristique, palmitique, stéarique, palmitoléique, oléique, linoléique et linoléinique. Les acides oléique et linoléique représentent respectivement 44% et 40% du total. Dans la fraction monoacylglycéride, les huit mêmes acides gras sont présents, avec 21.2% et 6.3% du total pour les acides oléique et linoléique, respectivement (Kuliev *et al.*, 1985). Ainsi, l'huile d'artichaut, riche en acides poly-insaturés, pourrait être utilisée dans la fabrication de savons, de shampoings et de cirages (Miceli et De Leo, 1996).

En apiculture, l'artichaut représente une source importante de nectar et de pollen, avec une production de miel estimée à 150-400 kg/ha (Cirnu, 1988). En effet, la plante possède une longue période de floraison (50-60 jours) et produit 0.250-0.270 mg de sucres/fleur. Par ailleurs, les fleurs d'artichaut, outre leur intérêt ornemental, notamment en raison de leur résistance au séchage (Hartrath *et al.*, 1982), offrent également un latex qui peut être utilisé en fromagerie comme agent coagulant du lait (Morsli *et al.*, 1985).

1.3. ORIGINE PHYLOGENETIQUE DE LA PLANTE

L'artichaut (2n=34) appartient à la famille des *Astéracées*, il est originaire du bassin méditerranéen, probablement de l'Afrique du nord ou du sud-ouest de l'Europe.

Dans le genre *Cynara*, il y a un complexe d'espèces sauvages, de races et de cultivars qui occupent l'ensemble du bassin méditerranéen (figure 1.1):

- *Cynara scolymus* L., l'artichaut cultivé, n'a jamais été trouvé à l'état sauvage, c'est plutôt un produit de la culture et de la sélection du cardon sauvage, *Cynara cardunculus* L. (De Candolle, 1886);
- *Cynara cardunculus* L., le cardon, est largement répandu à l'état sauvage en Tunisie et dans les pays de la Méditerranée occidentale et centrale (Zohary et Basnizky, 1975). Il peut être également cultivé pour ses pétioles épais et charnus (cardon potager) utilisés en alimentation humaine et en phytothérapie (Le Floc'h, 1983);
- *Cynara syriaca* Boiss., *Cynareae* sauvage du Levant (Syrie) et du sud de la Turquie (Zohary et Basnizky, 1975);
- *Cynara sibthropiana* Boiss. Et Heldr., présent essentiellement dans les îles de la mer Egée (y compris Crête et Chypre) (Zohary et Basnizky, 1975).

A l'heure actuelle, il est difficile de dire dans quelle partie de la Méditerranée a eu lieu la domestication de l'artichaut. Les deux espèces sauvages, *C. cardunculus* et *C. syriaca*, étant les deux parents probables, doivent être considérés comme géniteurs potentiels et réservoirs génétiques dans les programmes d'amélioration de l'artichaut. Cette domestication aurait pu avoir lieu:

- A l'est de la Méditerranée si l'ancêtre est *C. cardunculus* avec introgression de *C. syriaca*;
- A l'ouest de la Méditerranée si l'ancêtre est *C. syriaca* avec introgression de *C. cardunculus*.

Toutefois, les deux espèces semblent avoir contribué à la variation génétique présente chez l'espèce cultivée. Il est cependant possible que *C. sibthropiana* montre des affinités similaires, certains auteurs classent les trois principales *Cynareae*, *C. scolymus*, *C. syriaca* et *C. cardunculus*, en espèces distinctes, alors que d'autres en font des sous-espèces de la même espèce, *C. cardunculus*. En effet, Basnizky (1979) a réexaminé le problème sur la base d'importants aspects physiologiques et en s'appuyant sur le fait que les trois espèces devraient être considérées comme des variétés botaniques de la même espèce.

1.4. BIOLOGIE DE L'ARTICHAUT

1.4.1. La plante

L'observation d'un pied d'artichaut (figure 1.2) permet de constater que la plante peut demeurer en place un grand nombre d'années en donnant périodiquement naissance, à partir d'une souche rhizomateuse, à un certain nombre de bourgeons axillés par les feuilles de base des rosettes antérieurement formées.

La tige épaisse, de 4 à 8 cm de diamètre (après un an de plantation) présente une moelle très volumineuse et un système vasculaire relativement important. Elle présente des entre-nœuds serrés d'où émergent des feuilles larges et légèrement dentelées, d'un vert cendré au-dessus et d'un blanc tomenteux en dessous; les premières feuilles sont petites et entières, tandis que les suivantes sont plus larges et plus ou moins profondément découpées (Foury, 1989).

A l'intérieur de ces pseudo-rosettes se trouvent plusieurs hampes florales supportant les capitules. L'axe principal de la hampe florale se termine par un capitule terminal appelé capitule aîné ou capitule de 1^{er} ordre, en dessous duquel se ramifient des capitules de 2^{ème} ordre, puis des capitules de 3^{ème} ordre, etc... Le capitule, représentant l'inflorescence de la plante, est la partie comestible; il est ovoïde, globuleux et a un diamètre de 8 à 9 cm. Les bractées de l'involucre sont coriaces et charnues à la base. Elles sont triangulaires et terminées par de fines épines.

L'artichaut est vivace grâce à sa partie souterraine sur laquelle se développent plusieurs bourgeons ou œilletons qui, avec les cabosses et les éclats de souche, constituent les principaux organes de multiplication végétative de la plante. C'est à la fin du cycle végétatif que le rhizome s'allonge sous terre et de ses bourgeons on aura les nouvelles plantules. Les racines sont des formations endogènes qui percent à travers les rayons médullaires très élargis, alors que les bourgeons proviennent de l'écorce. Ce sont les parties hypogées qui sont utilisées pour la propagation naturelle qui est souvent rendue difficile du fait de l'incertitude quant à la distinction entre les formations nettement racinaires de celles rhizomateuses (Scaramella et Ricci, 1981).

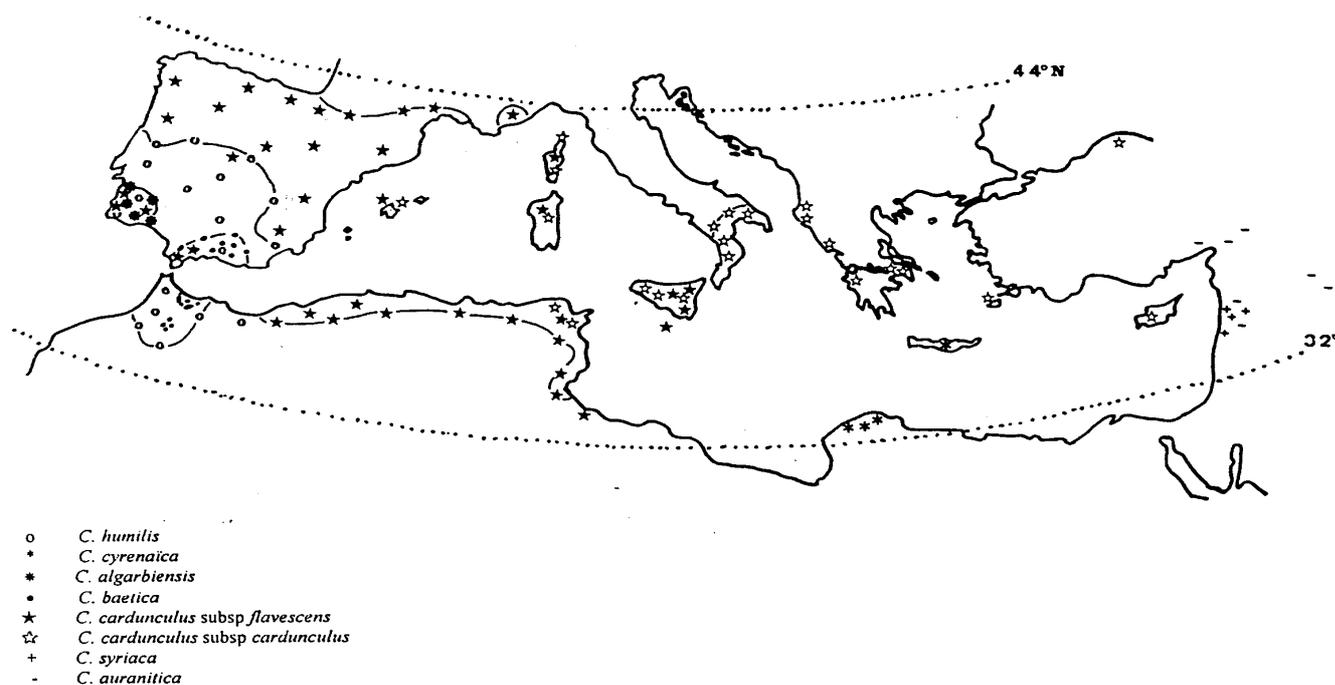
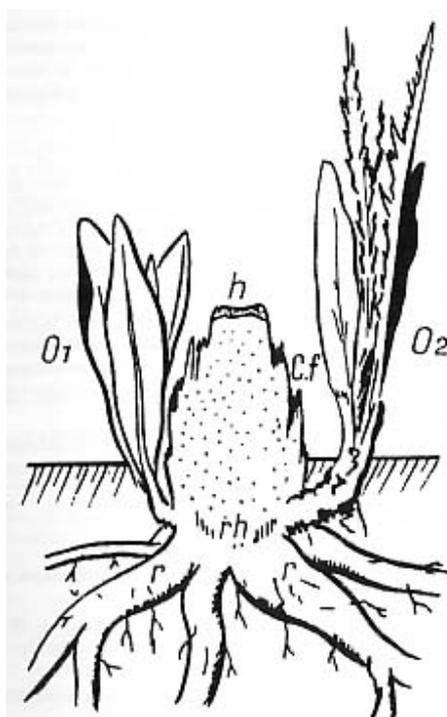


Figure 1.1. Répartition des espèces de *Cynara*
(Foury, 1997)



h. vestige de la hampe florale (axe d'inflorescence); cf. cicatrices foliaires;
rh. Base rhizomateuse de la tige; O1-O2. œilletons à divers stades; r. racines tubérisées.

Figure 1.2. Schéma de formation des œilletons sur un pied d'artichaut
Ayant produit l'année précédente
(Chaux et Foury, 1994)

1.4.2. Transition apex végétatif-apex floral

La période de transition de l'apex végétatif à l'apex floral est une étape importante dans le développement de la plante, notamment en ce qui concerne l'utilisation de régulateurs de croissance pour induire l'émission de capitules.

Durant son développement, le méristème végétatif présente une organisation «corpus-tunica» de l'apex végétatif qui, durant la transition florale, est modifié en une organisation «manteau-cœur». La différenciation commence environ trois mois après la levée des bourgeons, et les primordia floraux apparaissent environ un mois plus tard (Morone Fortunato *et al.*, 1981).

1.4.2.1. Phase «tunica-corporus»

L'apex végétatif est composé au début d'une «tunica», constituée de 8-9 couches cellulaires (L1, L2 et L3), et d'un «corpus» moins homogène. Durant la phase «tunica-corporus», l'apex végétatif forme une petite coupole posée à l'intérieur des jeunes feuilles (figure 1.2).

1.4.2.2. Phase «manteau-cœur»

Les premiers changements notables se traduisent par une augmentation de l'activité mitotique qui finit par individualiser une structure en «manteau-cœur». L'apex est au début globuleux, puis s'aplatit et s'élargit en mettant en évidence le «manteau» constitué de deux couches méristématiques qui se superposent au «cœur» parenchymateux.

A ce stade, à la périphérie de la surface de l'apex commencent à apparaître les primordia floraux sous forme de zones méristématiques subcylindriques, dont le développement se poursuivra de manière centripète jusqu'à intéresser la surface entière, et finit ainsi la différenciation.

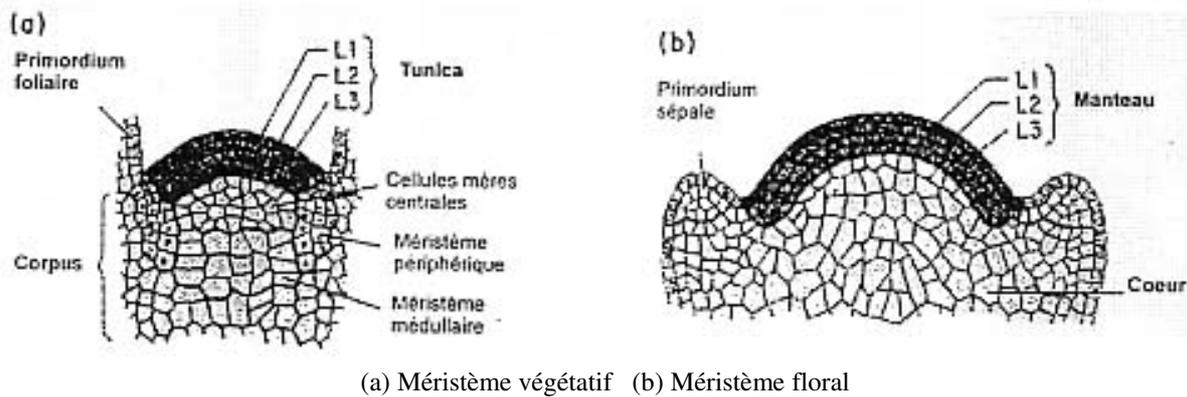


Figure 1.2. Schéma de l'organisation d'un méristème apical (Morone Fortunato *et al.*, 1981)

1.4.3. La biologie florale

Le fonctionnement de l'apex caulinaire domine toute la vie de la plante. Après formation de la rosette de feuilles, sa transformation aboutit à l'élaboration d'une inflorescence complexe sous forme de cyme de capitules.

D'après Foury (1967), on distingue six stades phénologiques au cours de l'organogenèse florale:

Stade A

Complètement enveloppé des feuilles de la hampe florale encore très courte, le capitule est perceptible au toucher au fond de la rosette. A la fin du stade A les premiers bourgeons floraux apparus à la périphérie du réceptacle, portent cinq mamelons correspondant aux ébauches des cinq sépales

A l'intérieur de la coupe ainsi formée pointent ensuite les ébauches des cinq pétales. Entre de nombreuses petites protubérances figurent les futures paillettes.

Stade B

La croissance de la hampe et le déploiement de ses feuilles font apparaître le capitule au centre de la rosette. Sur le réceptacle très élargi et concave, les bourgeons floraux sont tous individualisés. Les pétales se recourbent en capuchon et se soudent par leur base, le massif ovarien d'abord plat s'invagine lentement, alors que surgissent les

ébauches des cinq étamines. A la fin de ce stade, la locule ovarienne est close et sa partie supérieure s'accroît pour former le style et le stigmate.

Stade C

Le capitule de 1^{er} ordre est parfaitement dégagé de la rosette, les fleurs atteignent 4 mm à la périphérie et moins de 2 mm au centre. L'ovule est implanté à l'aisselle du carpelle antérieur, il n'est pas encore différencié. A la base du style, un bourrelet ébauche déjà les futurs nectaires. Le tissu conducteur est bien visible; la face inférieure du stigmate commence à se garnir de poils vésiculeux. Le filet de l'étamine est court, il est au dixième de sa longueur et les loges très volumineuses, contiennent déjà les cellules mères de microspores et des diades peuvent même être repérées à la fin de ce stade.

Stade D

Le capitule de 1^{er} ordre est au stade optimum de récolte, les bractées ne divergent pas encore. La longueur des fleurs est d'environ 5 mm au début du stade D. L'ovule amorce son basculement et la cellule mère des macrospores grossit rapidement et subit la méiose à la fin du stade D. Le style et les nectaires ont acquis leur structure définitive. Le pollen est en tétrade dès le début de ce stade. Très rapidement, l'exine s'épaissit et les trois pores deviennent bien visibles.

Stade E

Les bractées extérieures divergent, le réceptacle concave devient plan et les fleurs centrales peuvent atteindre 20 mm. Une assise lytique nutritive se forme permettant la croissance accélérée du sac embryonnaire qui va quadrupler de longueur en 15 jours.

Stade F

Les bractées scarieuses centrales apparaissent. Le sac embryonnaire octonucléé est formé. Le pollen atteint sa taille définitive.

Stade G

Des paillettes apparaissent dans le vide laissé par la divergence des bractées centrales, les fleurs périphériques éclosent. Il se passe de 9 à 11 jours entre l'éclosion du premier fleuron et la fanaison du dernier. Certaines variétés évoluent plus lentement. La forme et la position relative des étamines et du stigmate durant l'anthèse semble favoriser l'autopollinisation. Ce dispositif peut également être un véritable «présentoir à pollen» propice à l'allogamie.

1.4.4. La pollinisation

Chez l'artichaut, l'autofécondation est réalisable sous certaines conditions, et il n'y a donc pas d'auto-incompatibilité. Des capitules isolés sous des sacs de papier ne donnent pas de graines (Foury, 1967). Le transport de pollen d'une fleur à l'autre est donc indispensable à la fécondation et est assuré pour 95% par des insectes qui peuvent en récolter jusqu'à 400 mg sur un même capitule (Baldini, 1953).

Sa grande taille, rend sans doute l'inflorescence très visible. La couleur bleue violacée, et plus encore l'opposition de couleur entre les fleurs d'une part et les bractées et le feuillage d'autre part, ainsi que l'abondance de nectar sont certainement très attractifs pour les insectes. La pollinisation chez l'artichaut est donc entomophile. Cependant, l'inflorescence en «brosse» et la fleur dépourvue de guide ne sont pas plus attractives pour un groupe déterminé d'insectes, aussi la faune entomophile de l'artichaut est-elle abondante et variée. Parmi les insectes qui visitent les fleurs d'artichaut, les abeilles (*Apis mellifera* L.) représentent 55-62% des insectes identifiés par Frediani et Pinzauti (1983). Les visites des abeilles sont importantes pour la pollinisation, mais les fleurs ne sont pas particulièrement attractives pour les abeilles qui préfèrent visiter d'autres plantes à fleurs.

La fertilité diffère d'un cultivar à l'autre et d'un individu à l'autre. Les capitules stériles sont fréquents et peuvent réduire le rendement en graines de 35-40%.

1.4.5. La protandrie

Le pollen est apte à germer *in vivo* au moins 24 h avant l'éclosion des fleurs (anthèse). Cette faculté est perdue au bout de 4-5 jours (Foury, 1967). Il en est de même de

l'efficacité du pollen estimée d'après les taux de nouaison réalisés. L'activité du pollen peut être prolongée de 3-4 jours lorsqu'il est stocké au réfrigérateur (2-4°C).

En pollinisation libre, le stigmate n'est pas réceptif avant son décollement partiel, et cesse de l'être 3-4 jours plus tard. Le décollement stigmatique se produit 5-7 jours après l'éclosion, le pollen ne commence à germer que 24-72 heures plus tard. Les lèvres stigmatiques, n'apparaissant que 4-8 jours après l'éclosion, l'autofécondation est impossible au niveau de la fleur. En pollinisation contrôlée, il n'y a fructification que si la pollinisation est effectuée moins de deux jours avant le décollement stigmatique.

Il n'y a pas de barrière absolue d'auto-incompatibilité. La protandrie, plus ou moins accentuée selon les variétés, interdit l'autogamie au niveau de la fleur, mais ne l'exclut pas au niveau de l'inflorescence (gitonogamie).

En ce qui concerne la fertilité des croisements et des autofécondations, elle est souvent assez faible quel que soit le mode de pollinisation. Cette faiblesse est attribuée à un défaut maternel se manifestant peu avant la fécondation (Foury, 1967).

Dans la nature, du fait de la protandrie et de l'activité des insectes qui récoltent le pollen bien avant la réceptivité du stigmate, l'allogamie est certainement dominante. Chez certains cultivars, les croisements naturels avec le cardon sont assez fréquents, au vu des types à «faciès cardon» qui représentent 25 à 75% de la descendance (Foury, 1967).

1.4.6. La graine

Le capitule d'artichaut est une inflorescence de type composée dont le réceptacle charnu est garni de soies denses qui sont en fait les fleurs hermaphrodites immatures.

Dans une optique de production de semences, la pollinisation peut être:

- manuelle;
- libre au champ;
- effectuée par des abeilles dans des abris adéquats.

La pollinisation libre est sans doute meilleure pour des raisons commerciales, mais son succès dépend des conditions bioclimatiques: un hiver doux, un été assez sec, et un contrôle des agents pathogènes.

Dans le but de produire des lignées ou des hybrides F1, la pollinisation en serre recouverte de filets a montré que le nombre d'akènes par plante chez *C. scolymus* varie entre 2 et 457 en fonction des cultivars et de l'année (Foury et Delage, 1984).

Le passage du mode de propagation végétatif à la propagation par graines a attiré l'attention sur la qualité des graines. Les graines d'artichaut peuvent germer à des températures variées, comprises entre 3-4°C et 35-39°C. Elles ne sont pas sensibles à la photopériode, ni à la dormance. Toutefois, la fécondation et le développement des embryons sont les principales causes de la faible qualité des graines (Foury, 1989).

La production de graines peut être très affectée par deux ravageurs, *Terellia fusicornis* et *Larinus scolymi*, et par plusieurs champignons (Foury, 1967). *Terellia fusicornis* (Loew) est inféodée à l'artichaut. Les adultes volent et pondent à partir de juin. Il n'est pas rare de trouver une dizaine de larves dévorant les jeunes ovaires et les paraphyses d'un capitule. L'ensachage des inflorescences au Stade C (voir 1.4.3) assure une protection suffisante. Dans le cas de production de graines en plein champ, il faut pulvériser les insecticides appropriés à plusieurs reprises au cours de l'été. Les adultes de *Larinus scolymi* apparaissent généralement plus tard que ceux des mouches (*Terellia fusicornis*); les dégâts sont de même nature. Outre leurs dégâts propres, ces deux ravageurs amènent souvent la pourriture de l'inflorescence. *Botrytis cinerea* peut provoquer des dégâts importants surtout sous sac de papier. Fréquemment les capitules de certaines variétés se dessèchent à cause du *Verticillium dahliae* qui peut pénétrer jusque dans le réceptacle.

En conséquence, dans les champs de culture, il est difficile de recueillir suffisamment de graines, d'autant plus que les capitules sont récoltés bien avant la maturité des fleurs.

1.4.7. Cycle physiologique de la plante

En Tunisie, la plante de l'artichaut végète de l'automne au printemps (figure 1.3). Durant la période de repos végétatif, la partie aérienne de la souche se dessèche sous l'effet des chaleurs estivales. Néanmoins, avant d'entrer en état de quiescence (dormance végétative), la plante assure la pérennité de sa végétation grâce aux rejets qui se développent au cours de la période de végétation.

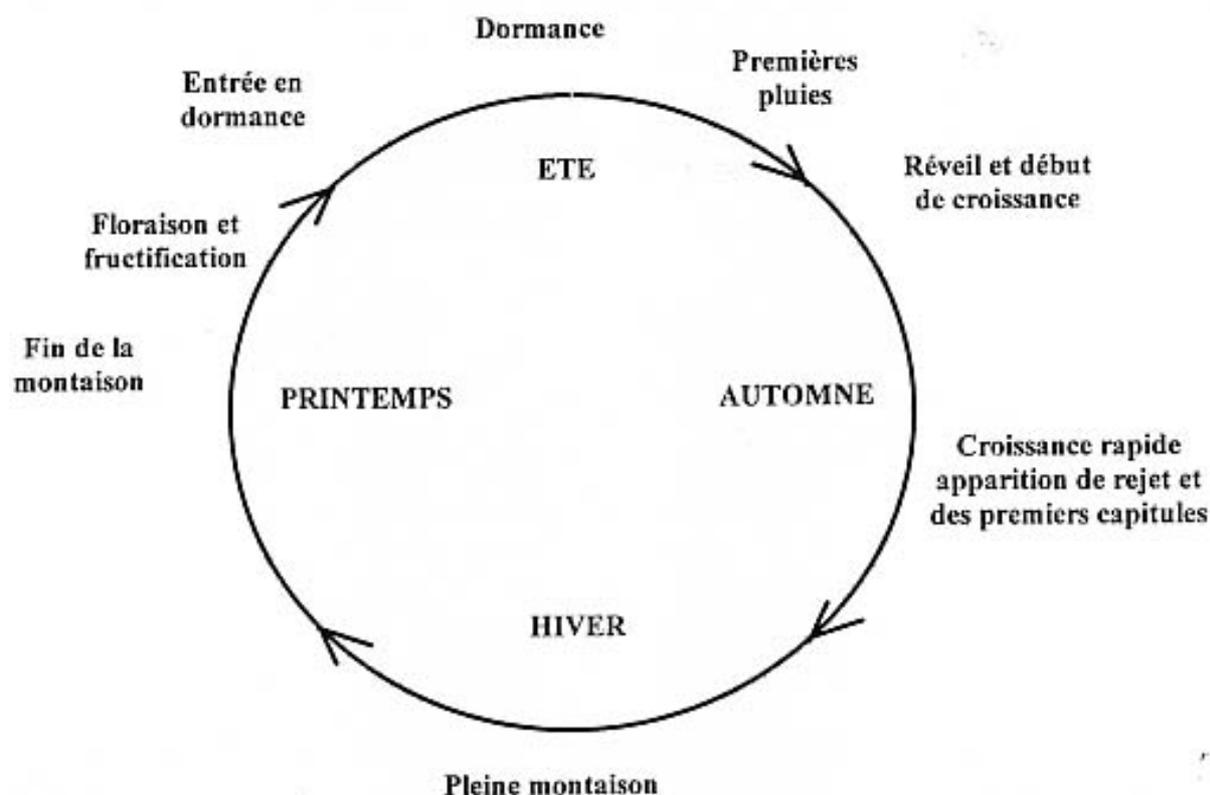


Figure 1 3. Cycle physiologique de la plante d'artichaut pour la zone méditerranéenne (PHM, 1969)

1.4.8. Mode de propagation de la plante

Traditionnellement, l'artichaut est multiplié végétativement par des oëlletons, des cabosses, des bâtons ou des éclats de souche. Ces méthodes de reproduction végétative sont non seulement coûteuses mais de par la pérennité qu'elles attribuent aux cultures, elles entraînent une baisse du rendement et de la qualité après la 2^{ème} année, sans ignorer les risques de maladies qui peuvent apparaître. C'est pour cette raison que depuis quelques années des chercheurs se sont intéressés aux variétés propagées par semences qui garantissent normalement l'assainissement viral du fait que la plupart des virus ne sont pas transmis par la graine. Toutefois, seulement ces variétés ne peuvent être cultivées que dans des zones à hiver doux.

1.4.8.1. La multiplication végétative

Les œilletons: ce sont des pousses faiblement racinées qui se développent à la manière des rejets à partir de bourgeons souterrains; ils sont détachés de la plante mère à l'état poussant pendant le mois de mars et gardés en pépinière pour être plantés au mois d'août.

Les cabosses: appelés aussi ovolo, sont des œilletons qui ont subi sur la plante mère une dessiccation accentuée mais dont le bourgeon terminal doit cependant conserver l'aptitude à «germer». Détachés de la plante mère, ils sont utilisés comme boutures, soit à l'état sec, soit après une courte «prégermination».

Les bâtons: se sont des pousses axillaires de faible vigueur, ayant produit des capitules, tard au printemps, et utilisées comme boutures directement au champ.

Les éclats de souche: se sont des fragments de la souche mère prélevés en mi-juillet - début août sur des plantes âgées de deux ou trois ans. Chaque fragment de souche doit renfermer au moins un bourgeon, qui après développement donne le futur pied-mère.

Ces méthodes de propagation présentent plusieurs inconvénients, à savoir:

- le faible taux de multiplication, voisin de deux à trois (Devos *et al.*, 1975);
- l'hétérogénéité des plants obtenus, d'où une production non regroupée (Dellacecca et Bianco, 1967);
- la transmission de maladies d'origine virale, bactérienne et cryptogamique (Welvaert et Zitouni, 1976; Harbaoui et Debergh, 1980; Rana et Cherif, 1981; Chabbouh, 1989; Chabbouh et Cherif, 1990; Chabbouh *et al.*, 1990).

Dans les conditions normales de culture au champ, et par suppression de la dominance apicale, on pourrait porter le nombre d'organes de multiplication par plante à des niveaux assez élevés, de 10 à 15, mais il faudrait alors renoncer à la production de capitules (La Malfa et Foury, 1968).

La multiplication à partir d'œilletons demeure toutefois assez avantageuse commercialement car ils donnent une production précoce et concentrée dans le temps, ce qui diminue le nombre de récoltes. Les plants sont également droits et uniformes, et moins affectés par les parasites. Ils ont un feuillage réduit par rapport aux plants issus d'éclats de souche. La généralisation de cette méthode pourrait augmenter la production et favoriser la mécanisation des récoltes (Ibrahim *et al.*, 1977).

En Tunisie, la totalité des agriculteurs artichautiers utilisent les cabosses et les éclats de souches comme plants, donc la voie de multiplication la moins coûteuse, mais pas la meilleure sur les plans de la qualité de la production et de la rentabilité économique (Basly, 1998).

1.4.8.2. La multiplication par graines

La multiplication de l'artichaut à partir de graines a été abandonnée depuis le XVII^{ème} siècle, mais un développement nouveau lui a été donné ces dernières années dans le but de pallier principalement aux maladies virales et de baisser le coût de production. Seulement, la conduite de cultures développées à partir de graines n'est possible que dans les régions à hiver doux, spécialement dans les pays du bassin méditerranéen.

Le nombre de variétés issues de semences actuellement disponibles demeure réduit; les premières, issues à la station de Montfavet (France), n'étaient pas très performantes; les plus récentes, telles que '*Imperial star*' et '*Talpiot*' produisent des plantes uniformes à partir de semences et un pourcentage élevé de capitules dès la première année (Welbaum, 1994).

L'artichaut est biennal lorsqu'il pousse à partir de semences, mais la vernalisation des semences et l'application de GA₃ peuvent réduire ce cycle de 5-6 mois (Basnizky et Zohary, 1987).

1.5. SITUATION ECONOMIQUE

1.5.1. Dans le monde

L'artichaut est cultivé dans toutes les régions du globe où les conditions climatiques sont appropriées: été frais avec des températures moyennes inférieures à 18°C et des hivers doux sans gel avec des températures moyennes comprises entre 4°C et 10°C. Dans ces régions, la production est possible toute l'année. Toutefois, en raison des tendances culinaires ancestrales, la plus grande partie de la production mondiale se trouve concentrée dans le bassin méditerranéen, centre d'origine de cette culture, et en particulier en Italie et en Espagne (tableau 1.2).

La production mondiale avoisine actuellement 1.278.694 T pour 120.837 ha. Cette production est concentrée, pour 90%, dans les pays circum-méditerranéens, le solde se répartissant entre des pays bénéficiant de conditions climatiques semblables de par:

- leur latitude: Nord de l'Argentine, USA (Californie), Nouvelle Zélande, ou
- leur situation en zone tropicale d'altitude: Chili, Venezuela, Pérou.

La conquête de nouvelles aires de culture par l'artichaut ces dernières années ne doit pas masquer une baisse mondiale de la production depuis 1991 et plus particulièrement dans les pays du bassin méditerranéen du fait de l'invasion de certains virus, tels que l'AMCV (Artichoke Mottled Crinckle Virus), auxquels la sélection classique n'offre pratiquement aucune solution. Ainsi, l'Italie bien que toujours premier producteur mondial d'artichaut (avec 464.783 T en 2001), a enregistré une baisse d'environ 31% par rapport à 1972. En Espagne, les pertes sont de 43% par rapport à 1989. De même, chez les petits producteurs tels que l'Egypte, les pertes sont de 64% par rapport à 1989. En Tunisie, la production a atteint son maximum en 1997 avec 24 000 T. Ces pertes sont certainement dues:

- à la régression des surfaces cultivées;
- aux irrégularités des rendements;
- aux pratiques culturales elles-mêmes, fortement conditionnées par le mode de propagation de la plante;
- au marché intérieur et extérieur, ainsi qu'au conditionnement des produits destinés à l'exportation (Kchouk, 2000).

1.5.2. L'artichaut en Tunisie

En Tunisie, l'artichaut est en grande partie cultivé dans les périmètres irrigués du Nord, notamment dans la vallée de la Medjerda (tableau 1.3).

Cette contrainte supplémentaire qu'est l'irrigation, joue un rôle non négligeable dans le développement de la culture.

Les surfaces cultivées en artichaut ont connu une certaine augmentation au cours des dix dernières années, toutefois, les rendements et la production n'ont pas suivi la même évolution, (figures 1.4 et 1.5).

Concernant l'exportation de l'artichaut en frais, la figure 1.6 montre qu'elle a atteint son apogée en 1975 avec une quantité de 600 T, puis a brusquement chuté en 1978 et depuis on n'a pas exporté des quantités supérieures à 112 T/an; des efforts importants sont donc à déployer pour regagner le marché étranger.

La transformation de l'artichaut pour en faire des conserves, n'a commencé en Tunisie qu'en 1993, elle a subi une évolution régulière pour atteindre son maximum en 1996 (Figure 1.7), cependant, en 1997 on a enregistré une chute importante de la quantité transformée qui s'est limitée à 100 T.

Tous ces problèmes sont le résultat d'une seule cause: la chute de la production due principalement aux maladies de dégénérescence.

1.5.2.1. Les variétés cultivées

On dispose en Tunisie de trois catégories variétales formées principalement par des cultivars qui assurent un approvisionnement du marché en grande quantité durant la période allant du mois d'octobre au mois de mai:

- **cultivars précoces:** ils arrivent sur le marché depuis octobre jusqu'à février, on y distingue le 'Blanc Oranais' qui est précoce et à croissance rapide;
- **cultivars semi-précoces:** ils produisent de décembre à avril; les plus répandus sont les cultivars violets tels que 'Violet de Bari', 'Violet d'Hyères' et 'Violet d'Algérie';
- **cultivars de fin de saison:** ils se distinguent par leur production tardive arrivant sur le marché de mars à mai, les plus connus sont: 'Beldi' et 'Annabi'.

1.5.2.2. Problèmes soulevés par la culture de l'artichaut

La culture de l'artichaut en Tunisie est sujette à deux problèmes majeurs qui limitent son extension, à savoir le mode de propagation de la plante et les maladies.

1.5.2.2.1. Mode de propagation de la plante

Vu sa biologie florale caractérisée par une protandrie, et son mode de reproduction sexué caractérisé par une gitonogamie, le mode de propagation naturel de l'artichaut est la voie végétative.

Tableau 1.2. Production, superficies cultivées et rendement chez l'artichaut en 2001 (FAO, 2002)

	Production T	Superficies ha	Rendement Hg/ha	% Production mondiale
Monde	1.278.694	120.837	105.820	100%
Algérie	39.000	4.800	81.250	3%
Argentine	85.000	4.500	188.889	6.5%
Chili	24.650	3.200	77.031	2%
Chine	30.000	6.500	46.154	2%
Chypre	3.000	165	181.818	0.2%
Egypte	71.052	3.512	202.312	5.5%
Espagne	295.500	19.300	153.109	23%
Etats-Unis d'Amérique	49.580	3.840	129.115	4%
France	65.000	12.500	52.000	5%
Grèce	23.000	2.300	100.000	2%
Iran	1.000	-	-	0.08%
Israël	4.791	650	73.708	0.4%
Italie	464.783	49.324	94.231	36%
Liban	11.950	695	171.942	1%
Maroc	44.500	3.000	148.333	3.5%
Mexique	5.300	400	132.500	0.4%
Pérou	5.500	380	144.737	0.4%
Réunion	300	-	-	0.02%
Syrie	5.708	471	121.189	0.4%
Tunisie	20.000	2.800	71.429	1.5%
Turquie	28.500	2.500	114.000	2%
Zambie	400	-	-	0.03%
Zimbabwe	180	-	-	0.01%

Tableau 1.3. Répartition des surfaces cultivées en artichaut par gouvernorat de Tunisie pour la campagne 2000/2001 (CRDA Ariana, 2001)

Gouvernorat	Surface cultivée (ha)
Tunis	20
Ariana	550
Manouba	630
Nabeul	50
Bizerte	690
Béja	130
Zaghouan	40
Gafsa	10

Les divers cultivars sont des sélections empiriques dans des populations naturelles très hétérogènes. Chacun des cultivars étant lui-même le plus souvent un «mélange» homogène de clones génétiquement différents.

1.5.2.2.2. Aspects phytosanitaires

A l'inverse de certaines cultures, la sélection locale joue un rôle primordial dans l'amélioration de l'artichaut. En effet, en Tunisie par exemple, les besoins en plants d'artichaut, estimés à 3 à 4 millions par an, ne peuvent être comblés par aucun pays tant du point de vue quantitatif que qualitatif, car l'artichaut est un foyer naturel pour toutes sortes de parasites invertébrés, bactériens et viraux, et son importation est interdite. A l'heure actuelle, la sélection opérée au sein des organismes publics est loin de satisfaire la demande en plants qui se limite en grande partie aux seuls efforts de l'agriculteur.

1.6. PROBLEMES PHYTOSANITAIRES

En Tunisie, l'artichaut est cultivé surtout dans la basse vallée de la Medjerda (Tableau 1.2). L'évolution de la culture de cette espèce a été toujours en dents de scie (Figures 1.4 et 1.5) suite à des contraintes principalement d'ordre phytosanitaire. En effet, le taux de multiplication de l'artichaut se trouve sensiblement réduit à 1.5 à la suite d'une contamination virale des plantes appartenant aux variétés les plus appréciées (Marrou et Mehani, 1964; Mehani, 1969; Welvaert et Van Vaerenbergh, 1979). Toutes les plantes d'artichaut sont des «porteurs sains» sur lesquels on peut constater l'extériorisation de symptômes de dégénérescence dès que les conditions climatiques et culturales créent un déséquilibre physiologique (Migliori *et al.*, 1984; Ghorbel *et al.*, 1987).

L'artichaut étant une plante herbacée et vigoureuse, elle présente un milieu favorable pour le développement d'insectes et de champignons pathogènes. Les attaques de la plante par des pucerons, des noctuelles, la fusariose, la verticilliose, l'oïdium, des *Xanthomonas* spp et l'*Erwinia carotovora* provoquent la perte d'un grand nombre de plants (Ancora, 1986).

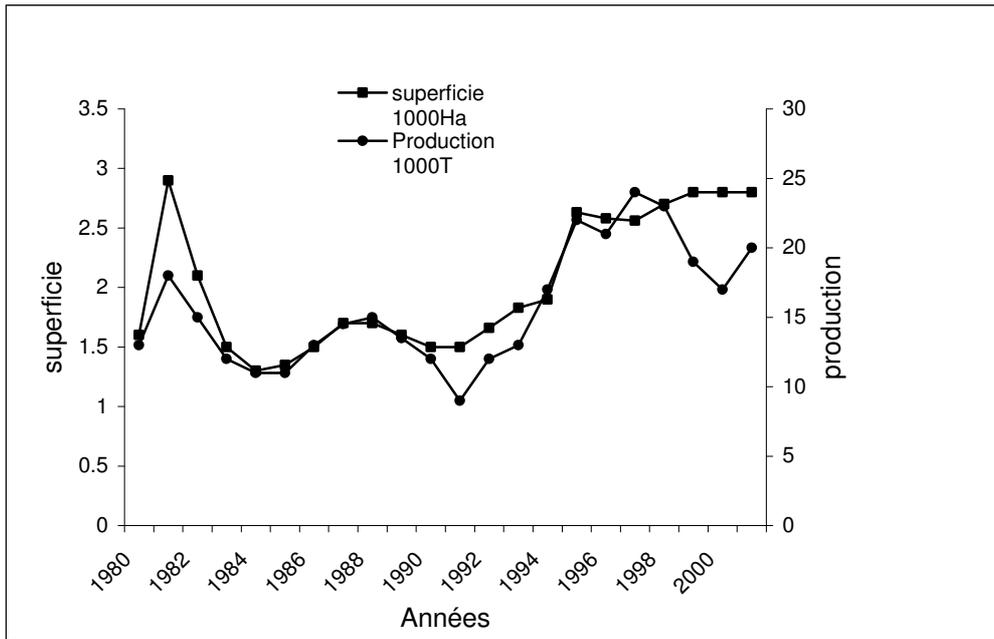


Figure 1.4. Evolution de la culture de l'artichaut en Tunisie (production, superficies) (GIL, 2002)

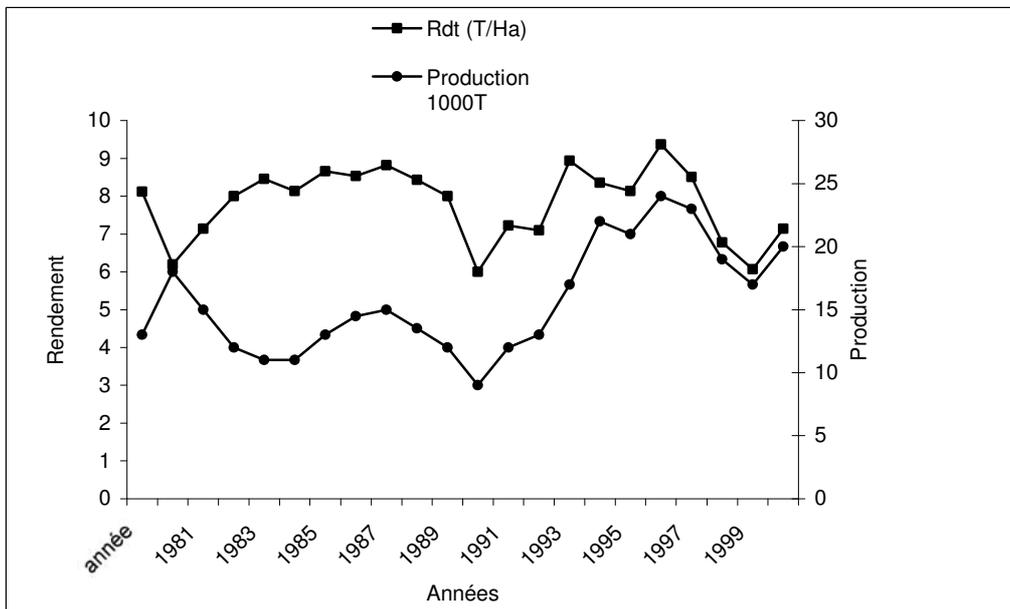


Figure 1.5. Evolution de la culture de l'artichaut en Tunisie (production, rendements) (GIL, 2002)

Outre les dégâts causés par les insectes et les champignons, les maladies virales causent de sérieux dégâts puisque les plants malades accusent une perte considérable, aussi bien en qualité qu'en quantité (Mehani, 1969).

1.6.1. Invertébrés parasites de l'artichaut

La morphologie de l'artichaut et ses feuilles bien étendues et charnues font de cette plante un habitat idéal pour les insectes. La surface foliaire en touffe offre plusieurs sites privilégiés pour les ravageurs (alimentation, dissimulation des pontes). Par ailleurs, la récolte des capitules étant étalée, il est nécessaire de limiter l'utilisation de produits antiparasitaires, ce qui favorise le développement de ces parasites.

Parmi les phytoparasites, les lépidoptères sont les plus importants, en effet ils attaquent au stade larvaire, la tige, les bourgeons des jeunes plantes et le capitule. Ils creusent des galeries et causent un développement anormal du capitule lui-même, ou bien rongent les feuilles, avec pour conséquence une réduction de l'appareil foliaire au détriment de la production (Ippolito et Parenzan, 1979). Vingt sept espèces de lépidoptères ont été signalées dans la littérature comme vivant sur l'artichaut dans le bassin méditerranéen.

Les pucerons et autres hémiptères dotés de pièces buccales suceuses trouvent eux aussi dans le feuillage un site idéal pour leur alimentation et leur reproduction. D'autres pucerons et quelques chenilles attaquent les bourgeons.

Les cloportes et insectes, tels que les punaises, les charançons et les pucerons deviennent un problème lorsqu'ils se cachent au milieu des bractées du capitule, ne sortant souvent que sur les étalages ou même chez le consommateur.

Les racines, larges et charnues, attirent plusieurs insectes du sol tels que les larves de coléoptères (scarabée).

Divers mollusques, et spécialement les limaces, se trouvent dans les alentours des racines et des matières organiques en décomposition à la surface du sol. Certains se nourrissent sur les racines alors que d'autres montent et se nourrissent au niveau du feuillage (Foury, 1989).

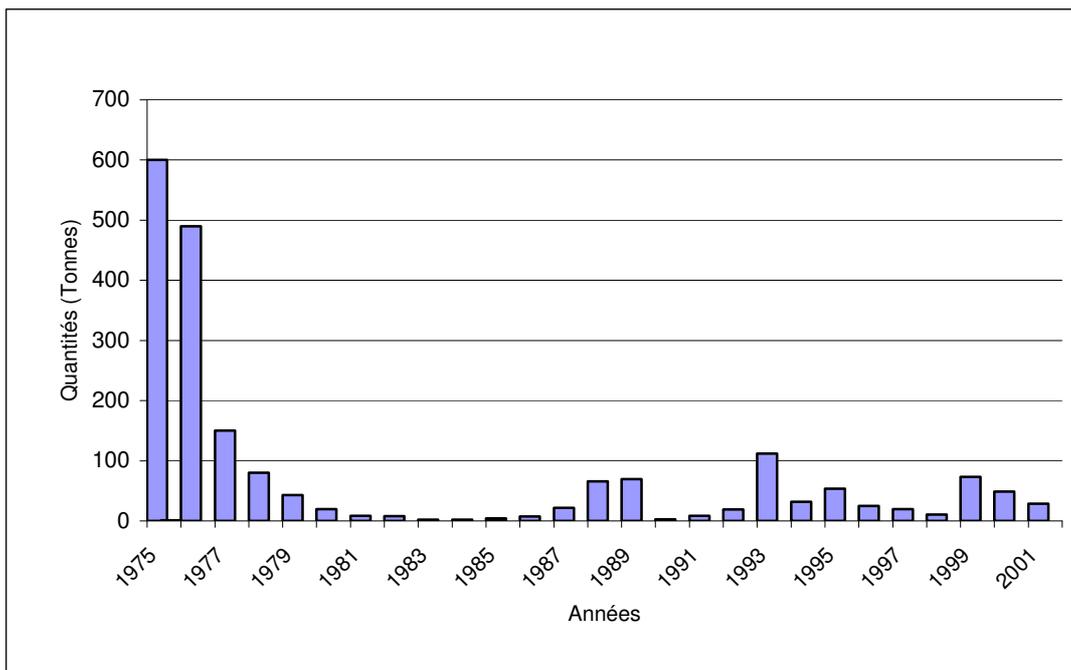


Figure 1.6. Evolution de l'exportation de l'artichaut en frais pour la Tunisie (GIL, 2002)

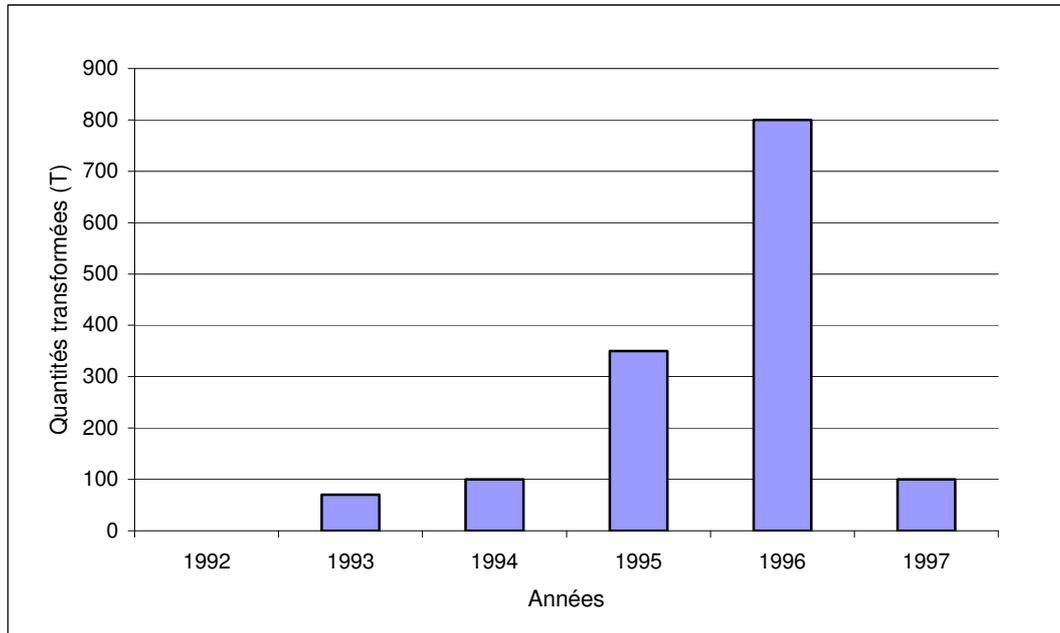


Figure 1.7. Evolution des quantités d'artichaut transformées en Tunisie (GIL, 2002)

1.6.2. Virus de l'artichaut

En 1959 Costa et al. ont pour la première fois signalé la présence d'un virus latent (ALV) dans les artichautières californiennes. Ensuite, Marrou et Mehani (1964) ont signalé que toutes les plantations françaises et tunisiennes étaient contaminées par un virus dont les caractéristiques rappellent celles décrites par Costa *et al.* (1959). C'est la première fois que la dégénérescence infectieuse est mentionnée en Tunisie. Welvaert et Zitouni (1976) ont également montré, qu'en plus de l'ALV dont l'existence est certaine chez les artichauts exprimant ou non les symptômes de dégénérescence, l'AILV est également présent. Ils observent chez les plantes atteintes un nanisme très marqué. Les feuilles deviennent petites et cloquées, et le rendement est quasi nul. Les plantes atteintes ne produisent que rarement un capitule qui est de mauvaise qualité, avec des bractées ouvertes, dentées et presque décolorées.

En Espagne, la dégénérescence des artichauts serait due à une association de trois virus, l'un latent, l'ALV, l'autre appartenant au groupe des potyvirus, l'ADV et le troisième de type bacilliforme, serait très rare en Espagne (Pena-Iglesias et Ayuso, 1974). En Italie, Majorana et Rana (1970) ont décrit un virus latent typique de l'artichaut, l'AILV.

Martinelli *et al.* (1979) ont compté 16 virus (tableau 1.4) qui peuvent être récupérés par inoculation de sève à partir de plantes présentant ou non des symptômes. La plupart de ces virus infectent d'autres cultures maraîchères chez lesquelles ils peuvent révéler de sérieux désordres. Jusqu'à maintenant, quelques-uns ont été isolés seulement chez l'artichaut ou le cardon, mais leur spécificité quant à ces hôtes demeure à prouver.

Tableau 1.4. Virus infectant les espèces de *Cynara* dans la nature (Martinelli *et al.*, 1979)

Virus	Abbr.	Taille particule (nm) et groupe	Mode de diffusion	Vecteur	Hôte naturel	Distribution géographique
Particules isométriques						
1. Artichoke mottled crinckle	AMCV	(30), Tombusvirus	sol	Inconnu	<i>C.scolymus</i>	Italie, Maroc, Malte, Grèce (?)
2. Artichoke yellow ringspot	AYRV	(30), Nepovirus	sol	Inconnu	<i>C. scolymus</i> <i>C.cardunculus</i>	Italie (?), Grèce
3. Artichoke italian latent	AILV	(30), Nepovirus	sol	<i>Longidorus apulus</i>	<i>C. scolymus</i>	Italie, Bulgarie, URSS
4. Artichoke vein banding	AVBV	(30), Nepovirus	sol	Inconnu	<i>C. scolymus</i>	Italie, Turquie (?)
5. Cucumber mosaic	CMV	(30), Cucumovirus	insecte	Aphides	<i>C.cardunculus</i>	Italie
6. Broad bean wilt	BBWW	(30), non assigné	insecte	Aphides	<i>C. scolymus</i>	Italie
7. Tobacco streak	TSV	(26-35), Ilarvirus		Inconnu	<i>C. scolymus</i>	Brésil
8. Tomato spotted wilt	TSWW	(70), Monotypique	insecte	Thrip sp	<i>C. scolymus</i>	Argentine, Australie
Particules anisométriques						
9. Tobacco mosaic	TMV	(300), Tobamovirus	contact	Inconnu	<i>C.cardunculus</i>	Italie
10. Tobacco rattle	TRV					
11. Artichoke curly dwarf	ACDV	(582), Potexvirus	insecte	Inconnu	<i>C. scolymus</i>	USA (Californie)
12. Cynara rhabdovirus	CyRV	(260), Rhabdovirus	insecte	Inconnu	<i>C. scolymus</i> <i>C. syriaca</i>	Italie, Espagne
13. Bean yellow mosaic	BYMV	(750), Potyvirus	insecte	Aphides	<i>C. scolymus</i>	Italie
14. Artichoke degeneration virus	ADV	(585), Potyvirus	Insecte (?)	Inconnu	<i>C. scolymus</i>	Espagne
15. Artichoke latent (carla) virus		(673) Carlavirus	insecte	Aphides	<i>C.scolymus</i> <i>C.cardunculus</i>	USA, Italie, Maroc, Espagne(?), Brésil(?)
16. Artichoke latent (poty)vir.		(725), Potyvirus	insecte	Aphides	<i>C. scolymus</i> <i>C.cardunculus</i> <i>C. syriaca</i>	Bassin méditerranéen Brésil

1.7. AMELIORATION DE L'ARTICHAUT

L'amélioration de l'artichaut se base surtout sur les facultés de multiplication végétative que possède cette espèce permettant la sélection clonale, et ses facultés de reproduction sexuée permettant la sélection de variétés semences. Quelle que soit la méthode de sélection adoptée, le premier recours est sans doute aux ressources génétiques disponibles, ou germoplasme. Aujourd'hui on compte 115 cultivars dans le germoplasme de l'artichaut, qui sont conservés au «Cynar Study Center» en Italie (Dellacecca *et al.*, 1976).

L'amélioration de l'artichaut est basée sur la recherche de clones intéressants par des autofécondations ou par des croisements contrôlés. Jusqu'à maintenant, la sélection clonale n'a pas donné les résultats escomptés (Pochard *et al.*, 1967), bien que l'isolement de clones intéressants ait été signalé (Abbate et Noto, 1979). Cependant, les autofécondations et les croisements intervariétaux ont permis l'exploration de la variabilité présente et l'isolement de nouveaux clones (Corre *et al.*, 1976; Bozzini et Lachelli, 1973). En outre, des cycles répétés d'autofécondations ont également permis d'isoler des lignées qui sont d'un grand intérêt pour la constitution de variétés propagées par graines (Pécaut *et al.*, 1979).

D'autre part, la diffusion des clones obtenus lors des programmes de sélection reste limitée par le faible taux de multiplication qui ne permet pas de tirer profit de la sélection clonale, d'autant plus que la multiplication végétative a eu pour conséquence de maintenir plusieurs maladies.

La protandrie a elle aussi limité l'utilisation de semences pour la multiplication puisque la fécondation croisée est favorisée et la descendance qui en est issue est très hétérogène.

1.8. CULTURE *IN VITRO* DE L'ARTICHAUT

Nous avons déjà vu que la production de l'artichaut est limitée par certains facteurs:

- le mode de propagation exclusivement végétatif avec un taux de multiplication très faible (2 à 3/plante) et certains inconvénients tels que la transmission de plusieurs maladies (bactéries, champignons, insectes, virus,...), l'infestation des

artichautières par divers virus et la transplantation de plants hétérogènes de diverses origines;

- la biologie florale de l'espèce qui empêche le recours aux croisements intra- et inter-spécifiques dans les programmes de sélection, l'amélioration variétale se trouve ainsi limitée à une sélection clonale dans des populations de cultivars le plus souvent génétiquement hétérogènes;
- la production étalée qui limite le contrôle des maladies par l'usage exclusif de pesticides contre le grand nombre de parasites et d'adventices qui envahissent les cultures.

Une grande partie de ces problèmes a pu être résolue par les techniques de la culture *in vitro*, tels que l'assainissement viral par culture de méristèmes et la micropropagation en masse.

1.8.1. Historique

De Leo et Greco (1976) ont été les premiers à affronter le problème de la propagation *in vitro* de l'artichaut, ils utilisèrent du matériel issu de graines pour contourner les difficultés de désinfection du matériel provenant du champ.

Pena-Iglesias et Ayuso (1974) sont partis de culture d'apex méristématique; ils ont réussi à obtenir des plants indemnes de virus de 'Tudela', cependant, l'enracinement demeurait problématique.

Devos *et al.* (1975), obtinrent seulement occasionnellement une différenciation de bourgeons et de racines à partir de cals.

Harbaoui et Debergh (1980), initièrent un programme de culture *in vitro* et Harbaoui (1982) et Harbaoui *et al.* (1982) mirent au point une méthode plus ou moins efficace de micropropagation et d'assainissement par culture de méristèmes.

Des taux de multiplication satisfaisants furent obtenus *in vitro* par Moncousin (1981), Ancora *et al.* (1981), Pécaut *et al.* (1983), Moncousin et Ducreux (1984) et Draoui *et al.* (1993); cependant l'enracinement des pousses néoformées a toujours constitué un handicap au développement de cette technique.

Les plantes issues de la culture *in vitro* sont exemptes de divers pathogènes bactériens et fongiques, alors que l'absence de virus reste tributaire de la taille de l'apex

méristématique mis en culture et qui selon Harbaoui (1982) ne doit pas dépasser 0.8 mm.

L'analyse du comportement en champ des plantes micropropagées a clairement mis en évidence qu'elles sont plus vigoureuses et même plus productives que les plantes propagées avec les méthodes traditionnelles (Saccardo et Ancora, 1984; Draoui *et al.*, 1993). Toutefois, le succès de la multiplication *in vitro* par culture de méristèmes fut handicapé par deux problèmes majeurs, l'un inhérent aux conditions sanitaires des artichautières, et l'autre à la technique elle-même, qui est une source de variation somaclonale. En effet, très vite on s'aperçut que les clones sains étaient difficiles à maintenir en champ car dès leur plantation la recontamination virale est observée la même année (Pécaut *et al.*, 1983; Ghorbel *et al.*, 1993).

L'utilisation de plantes micropropagées à partir de méristèmes réduit considérablement, du moins à la première année, les coûts de main d'œuvre d'une part et d'autre part, elles permettent de produire dès la première année de plantation. Enfin, quelque soit l'avenir de cette technique du point de vue commercial, la micropropagation permet de disposer d'un stock de plantes mères saines qui peuvent être utilisées pour la multiplication par les méthodes classiques (Ancora et Saccardo, 1987).

1.8.2. La micropropagation

Trois types d'explants primaires ont été utilisés pour la micropropagation de l'artichaut:

- des segments de rhizome;
- des méristèmes;
- des graines;

mais les méristèmes restent les plus utilisés du fait que les applications pratiques en micropropagation restent les plus importantes.

1.8.2.1. Micropropagation à partir de segments de rhizome

La culture de segments de rhizome est antérieure à celle des méristèmes en raison du grand nombre de bourgeons et d'œilletons présents sur les parties souterraines de la

plante. De Leo et Greco (1976) ont utilisé ces tissus et ont réussi à stimuler par l'addition au milieu de culture de l'ANA à faible dose (0 à 1 mg.l⁻¹) des bourgeons rhizomateux.

Scaramella et Ricci (1981) ont eux aussi réussi à obtenir des plantes entières en mettant en culture des explants de rhizome sur milieu additionné de kinétine (1 mg.l⁻¹) et d'ANA (0.5 mg.l⁻¹).

1.8.2.2. Micropropagation à partir de méristèmes

Cette technique nécessite le passage par différents stades:

Stade I: mise en culture primaire

Cette étape de développement est relativement courte et ne dépasse pas le 1^{er} transfert, elle a pour but de démarrer les apex et d'éliminer les explants contaminés. Plusieurs auteurs se sont intéressés à l'étude de ce stade en adoptant différents milieux de culture (tableau 1.5) sachant que le milieu de base était dans la plupart des cas celui de MS (Murashige et Skoog, 1962) avec parfois quelques modifications spécifiques.

Stade II: multiplication

Ce stade vise la multiplication des pousses par induction du développement de bourgeons axillaires; l'efficacité de cette étape est estimée par le taux de multiplication et plusieurs subcultures sont parfois nécessaires pour atteindre le nombre désiré de pousses.

Les hormones sont parmi les substances qui peuvent jouer un rôle déterminant dans la prolifération des bourgeons axillaires. Le tableau 1.6 récapitule les travaux des différents auteurs sur l'artichaut et les résultats obtenus.

Stade III: enracinement

L'enracinement des pousses obtenues en fin de multiplication a longtemps été, et est toujours l'un des problèmes majeurs de la micropropagation industrielle de l'artichaut malgré la réussite de la phase de prolifération. Certains auteurs ont mentionné la nécessité d'un passage par une phase de pré-enracinement. Plusieurs auxines ont été utilisées à différentes concentrations pour tenter de réussir cette phase (tableau 1.6), mais le taux d'enracinement n'a jamais dépassé les 80% et dans la plupart des rapports même considérablement moindre.

1.8.2.3. Micropropagation à partir de graines

Benoit et Ducreux (1981) étaient les premiers à prendre les graines comme explants primaires pour multiplier *in vitro* l'artichaut. La phase de prolifération était réussie puisqu'ils ont obtenu à partir d'une graine 50 explants en 80 jours, mais la phase d'enracinement a toujours posé des problèmes puisqu'ils n'ont obtenu que 1% d'enracinement.

En 1984, Moncousin et Ducreux ont pu cultiver des plantules d'artichaut issues de graines, ils ont ajouté de l'ergocalciferol au milieu de culture pour stimuler la formation de racines.

Lauzer et Vieth (1990) ont eux aussi développé une méthode de micropropagation à partir de graines, 65% des plantules ont été enracinées et transférées au sol.

Cependant, pour constituer un système de micropropagation convenable, il est important de partir de graines sélectionnées, ce qui n'était certainement pas le cas dans les travaux sus-mentionnés.

1.8.3. Assainissement viral par culture de méristèmes

Comme il a été déjà signalé, la seule méthode pour éradiquer des virus chez des espèces envahies par ces agents pathogènes est la culture de méristème. Il s'agit de reconstituer une plante entière à partir des quelques centaines de cellules du méristème apical. L'absence de virus dans cette partie de la plante s'explique par les différences entre le taux de multiplication cellulaire chez la plante d'une part et celui de la réplication virale d'autre part, ce dernier étant inversement proportionnel à la vitesse de multiplication cellulaire. Le méristème apical étant le siège de multiplications cellulaires intenses, la synthèse d'acides nucléiques normaux l'emporte sur celle de l'acide nucléique viral, d'où son absence dans les cellules du méristème apical (White, 1934; Limasset et Cornuet, 1950). Cette hypothèse n'explique pas tout quant à l'absence de virus dans les méristèmes apicaux, car certains virus demeurent capables de transgresser ce filtre tel que le virus X de la pomme de terre, quoique à des concentrations relativement faibles (Appiano et Pennazio, 1972). La limitation de l'expansion virale n'est donc pas purement physique mais résulte d'un mécanisme biochimique moléculaire dépendant de la température. Ce mécanisme est sous la

dépendance d'un gène N dominant qui s'exprime jusqu'à 28-29°C et ne peut s'exprimer à 30°C ou plus. Biochimiquement, il s'accompagne de l'apparition de phénolamides présentes en quantités considérables dans les cellules où existe une inhibition virale. Ces molécules ne sont pas détectables dans les feuilles et agissent à des concentrations élevées, de l'ordre de 3 mM (Martin-Tanguy *et al.*, 1976). Par contre on peut les trouver au niveau des organes reproducteurs, ovules et anthères (Buta et Isaac, 1972; Cabanne *et al.*, 1981). Ainsi, plus la plante avance en âge, c'est à dire plus elle s'approche de la floraison, plus la zone méristématique indemne de virus est importante (Spengler, 1976). Ce phénomène explique également l'absence de virus au niveau de la graine. En outre, le prélèvement de méristème ou d'apex en voie de différenciation florale est quasiment une garantie pour l'obtention de plantes indemnes de virus (Martin *et al.*, 1967; Martin, 1985), ceci est d'autant plus intéressant que chez certaines espèces, comme l'artichaut, l'excision de méristèmes au sens strict du terme, ou de méristèmes accompagnés de 2 à 3 primordia foliaires, s'avère parfois problématique en raison de leur taille minuscule (Bayouhd, 1995).

1.8.4. Problèmes posés par la culture *in vitro*

Ces problèmes surviennent à deux échelles: au laboratoire, le problème des contaminations à l'initiation et de l'hyperhydricité et au champ celui de la non-conformité variétale.

L'hyperhydricité: c'est un désordre physiologique qu'on peut observer chez l'artichaut et d'autres plantes à tous les stades de la culture *in vitro*. Ce phénomène est du à l'état hydrique dans le récipient de culture, et peut être amoindri, voire évité en augmentant la concentration d'agar dans le milieu de culture (Debergh *et al.*, 1983).

La non-conformité variétale: qui a été toujours attribuée aux divers stress hormonaux imposés aux explants au cours des diverses subcultures. En 1987, Pécaut a constaté que la plupart des plantes régénérées par culture de méristèmes ne sont pas conformes au clone originel. Pécaut et Martin (1992), ont eux aussi obtenu des variants quand ils ont essayé de propager *in vitro* des plantes d'artichaut. Afin d'éviter ce phénomène et d'augmenter la fréquence de plants normaux, le nombre de subcultures doit être limité,

mais comme nous allons le constater ultérieurement, ceci influence le taux d'enracinement.

Tableau 1.5. Milieux de base utilisés par différents auteurs au cours des divers stades de développement de l'artichaut *in vitro*

Auteurs	Explant	SD	Macro	Micro	Na	PVP	AA	Vit.	My	Th	T	A
De Leo et Greco (1976)	Ma	I	MS	MS				MS				
		III	MS	MS				MS				
Moncoussin (1981)	Ma	I	LS	LS				G				
		II	MS	G				G			50	100
		IIa	MS**	MS				G				
		III	MS/10*	MS				G				
Moncoussin (1981)	Ma	I	MS	G				G				
		II	MS	G				G				100
		III	MS/10	G				G		100		
Fortunato (1981)	Apex	I	MS	MS				MS				
		II	MS	MS				MS				
		III	MS	MS				MS				
Ancora et al. (1981)	ma, ba	I	MS	MS	50			MS	100		100	40
		II	MS	MS				MS	100			
		III	MS/2	MS/2			10	MS	100	1		
Fortunato et al. (1981)	Ma	I	MS	MS				MS				
		II	MS	MS				MS				
Suelzu et al. (1989)	Ma	I	MS	MS	50			MS			100	40
Pécaut et al. (1983)	Ma	I	TL	TL				MW				
		II	MS	MS	85			MW				40
		III	MS/2	MS				MW				
Pécaut et Martin (1993)	Ma	I	TL	TL				MW				
		II	MS	MS	85			MW	100	0.4		40
		III	TL	TL				MW				
Harbaoui et al. (1982)	Ma	I	MS	NN				MS	100	0.4		
		II	MS	NN				MS	100	0.4		
Draoui et al. (1993)	ma, ba	I	KNOP	QL		0.1		W	50			
		II	MS	MS		0.1		W	100			40
		III	MS/2***	MS		0.1		W	100			
Kanakis et Demetriou (1993)	Ma	I	MS	MS			10	MS				
		II	MS	MS				MS				
		III	MS/2	MS/2			10	MS		1		

SD: Stades de développement: I- mise en culture primaire, II- multiplication, II a- pré-enracinement, III- enracinement

Na: NaH_2PO_4 , PVP: Polyvinylpyrrolidone, AA: Acide ascorbique, Vit.: vitamines, My: Myo-inositol, Th: Thiamine, T: Tyrosine, A: Adénine

ma: méristème apical, ba: bourgeon axillaire, MS: Murashige et Skoog (1962), G: Gamborg (1958),

LS: Linsmaier et Skoog (1967), TL: Tendille et Lecerf (1974), MW: Morel et Wetmore (1951),

NN: Nitsch et Nitsch (1969), W: Walkey (1972), QL: Quoirin et Lepoivre (1977)

* $\text{NH}_4\text{NO}_3 = 150\text{mg.l}^{-1}$

** Tetraborate de Na (100mg.l^{-1}) + Ergocalciferol (20mg.l^{-1})

*** NaH_2PO_4 dilué au quart de MS

Tableau 1.6. Régulateurs de croissance utilisés par les différents auteurs au cours des différents stades de la micropropagation

Auteurs	SD	GA ₃	AIA	AIB	ANA	BAP	K	2iP	TDZ	TM	Taux
De Leo et Greco (1976)	I					1.0				4.5	
	III			0.2							
Moncousin (1981)	I		0.1			0.1					
	II	0.5	0.1					50.0			
	III										
Moncousin (1981)	I	0.1	0.1					5.0			96%
	II	0.5	0.1					50.0		4.5	50%
	II a				1.0						
	III										75%
Fortunato (1981)	I	0.03			1.9	2.3					
	II	0.01	0.2					0.2		5.0	
	III		3.5								
Ancora <i>et al.</i> (1981)	I		0.5				10.0				
	II		0.5				5.0			4.5	
	III				2.0						80%
Fortunato <i>et al.</i> (1981)	I	0.04			0.9	2.3					80%
	II	0.04			0.9	2.3				5.0	
Suelzu <i>et al.</i> (1989)	I		0.5				10.0			3.0	100%
Pécaut <i>et al.</i> (1983)	I	0.1					0.1				90%
	II				0.1		1.0			4 à 5	100%
	III				0.5		0.05				70%
Pécaut et Martin (1993)	I	0.1					0.1				90%
	II				0.1		0.5	0.5		4 à 5	100%
	III				0.5						
Harbaoui <i>et al.</i> (1982)	I	0.03	1.0					1.0			
	II		1.0					20.0			
	III			2.0							80%
Draoui <i>et al.</i> (1993)	I	0.1		0.5		0.5					80%
	II			0.4		0.2	2.0				
	III				2.0						80%
Kanakis et Demetriou (1993)	I		0.1								
	II									3.0	
	III				2.0				3.0		36%

TDZ: Thidiazuron, TM: taux moyen de multiplication, T: taux

CHAPITRE II

MATERIELS ET METHODES

Dans ce chapitre nous présentons les matériels et méthodes relatifs aux différentes expérimentations réalisées *in vitro* ou à l'extérieur (serre, champ), d'une manière générale; ensuite, et pour chaque chapitre nous donnerons les matériels et méthodes spécifiques à chaque expérience.

2.1. MATERIEL VEGETAL

2.1.1. Cultivars utilisés

Le matériel végétal utilisé pour toutes les expériences effectuées *in vitro* a été obtenu auprès de la Station d'Appui de la Manouba (SAM); il est composé des deux cultivars les plus cultivés en Tunisie:

- Le 'Violet d'Hyères': un cultivar demi-précoce (récolte de novembre à avril) à capitules violets;
- Le 'Blanc Oranais': un cultivar précoce (récolte d'octobre à février) à capitules blancs.

Tous les vitroplants utilisés dans nos expériences proviennent de plantes mères obtenues *in vitro* par culture de méristèmes. Ces derniers sont prélevés sur des œilletons des deux cultivars pré-cités, que nous avons arrachés sur l'artichautière de la SAM et transporté en Belgique.

2.1.2. Explants

Deux types d'explants ont été utilisés lors de nos essais:

Des méristèmes végétatifs: Pour la constitution d'un stock de plantes mères, nous sommes partis de méristèmes végétatifs prélevés sur des œilletons. Ceux-ci sont débarrassés de leurs feuilles à l'exception des 3 ou 4 dernières ébauches foliaires qui sont laissées intactes pour protéger la zone méristématique des agents stérilisants lors de la désinfection. La partie apicale est décapitée à une hauteur de 2 cm et subira la stérilisation dans cet état.

L'isolement des apex méristématiques, suivi immédiatement de leur inoculation sur milieu gélosé, se fait aseptiquement sous hotte à flux laminaire à l'aide d'une loupe binoculaire équipée de fibres à lumière froide; en effet, la lumière incandescente

provoque par la chaleur dégagée, le dessèchement et la nécrose rapide des apex lors de l'élimination des dernières ébauches foliaires protectrices (Harbaoui, 1982). La taille des apex varie entre 0.4 et 1 mm allant du méristème vrai jusqu'à l'apex couvert de 2 ou 3 primordia foliaires. Ces dimensions permettent de minimiser les risques d'obtention de plantes virosées (Hayami *et al.*, 1984). Les méristèmes sont inoculés sur le milieu MS (tableau 2.1). Nous avons remplacé le sequestrène de Fe par le NaFeEDTA (35 mg/L), et nous avons ajouté les régulateurs de croissance suivants: AIA (1 mg/L), 2iP (1 mg/L) et GA₃ (0.025 mg/L). Ces régulateurs et leurs concentrations ont été recommandés par Harbaoui (1982), et ils nous ont permis d'avoir un taux de réussite de 80%. Les plantules obtenues à partir de ces méristèmes entrent ensuite dans une chaîne de prolifération. En effet, à chaque cycle, nous obtenons, à partir d'un vitroplant mis en culture, une touffe de plantules. A la fin de chaque cycle (cycle = 5 semaines) nous procédons à l'éclatement de ces touffes pour séparer les plantules obtenues par bourgeonnement axillaire. Elles sont ensuite repiquées sur un milieu de multiplication neuf en vue de leur micropropagation pour l'obtention d'un stock de vitroplants qui nous permettra de mener tous nos essais. Ce milieu de multiplication est composé par le milieu MS de base (tableau 2.1), additionné d'AIB (0.1 mg/L) et de BAP (0.5 mg/L). La constitution du stock de plantes mères a nécessité cinq subcultures, les essais ont démarré à la 6^{ème} subculture.

Des plantules: pour tous les essais de multiplication et d'enracinement nous sommes partis de pousses provenant d'un rang déterminé de subculture (cité à chaque fois dans matériels et méthodes spécifiques), et ayant été produites sur le milieu de multiplication précédemment cité.

2.2. STERILISATION

2.2.1. Stérilisation du matériel végétal

Les œilletons préparés selon le protocole précédent (2.1.2) ont subi sous hotte à flux laminaire le protocole de stérilisation suivant:

- un lavage à l'eau courante pour éliminer les impuretés se trouvant en surface;

- un trempage dans une solution contenant 0.5% de chlorure de mercure (HgCl_2) plus quelques gouttes de teepol (détergent = agent mouillant) pendant 5 min;
- un lavage à l'eau distillée stérile pendant 5 min;
- un trempage dans une 2^{ème} solution stérilisante, contenant de l'eau de javel commerciale à 1% de chlore actif plus quelques gouttes de teepol, pendant 15 min;
- trois bains de 10 min chacun dans de l'eau distillée, stérile.

Les tissus de l'artichaut sont très sensibles à un phénomène de brunissement dû aux polyphénols. Pour surmonter cette difficulté, le matériel végétal est conservé après stérilisation et jusqu'à la dissection du méristème et son inoculation sur le milieu de culture (voir 2.1.2) dans une solution anti-oxydante contenant 150 mg/l d'acide citrique et 100 mg/l d'acide ascorbique.

2.2.2. Stérilisation des milieux de culture

Après leur préparation, les milieux de culture sont autoclavés à une température de 120°C et sous une pression de 100 KPa pendant 20 min. Les produits thermolabiles, tels que l'acide gibbérellique et l'acide ascorbique, sont stérilisés à froid par des filtres millipores (0.22 μm) préalablement autoclavés, puis ajoutés sous hotte à flux laminaire au milieu déjà stérilisé et refroidi à une température de $\pm 40^\circ\text{C}$.

2.3. MILIEUX ET RECIPIENTS DE CULTURE *IN VITRO*

2.3.1. Composition du milieu de base

Le milieu de base utilisé est celui de Murashige et Skoog (1962) complet ou modifié (tableau 2.1) et complété selon le but de l'expérience par des additifs qui seront mentionnés dans les chapitres appropriés.

2.3.2. Les hormones utilisées

Les hormones utilisées sont:

- pour la culture de méristèmes: l'acide indole acétique (AIA), la N⁶-(2-isopentenyl)adenine (2iP), et l'acide gibbérellique (GA₃). Cette dernière favorise la reprise de croissance des méristèmes; son action stimulatrice semble s'exercer au niveau de la zone latérale du méristème, initiatrice des ébauches foliaires (Morel et Muller, 1964);
- pour la multiplication, la 2iP, la kinétine (K), la benzylaminopurine (BAP) et la meta-topolin (mT) qui favorisent la ramification des pousses et s'opposent à la dominance exercée par le bourgeon apical sur les méristèmes axillaires (George, 1993);
- Pour l'enracinement, ce sont principalement les auxines connues par l'induction de la rhizogénèse, telles que l'acide indole acétique (AIA), l'acide indole butyrique (AIB), l'acide naphthalène acétique (ANA) et l'acide 3-(Benzo(b)selenyl) acétique (BSAA) qui sont utilisées.

La GA₃, les auxines et les cytokinines sont dissoutes préalablement dans quelques gouttes d'éthanol, de NaOH (1N) ou de HCl (1N), respectivement avant leur dilution dans de l'eau distillée.

2.3.3. Autres additifs

Comme autres additifs aux milieux de culture nous avons utilisé:

- le paclobutrazol (produit commercial Bonzi et matière active acide N-diméthylaminosuccinamique, C₁₅H₂₀ClN₃O);
- le charbon actif (Merck, 159 246);
- riboflavine;
- β-cyclodextrine;
- le saccharose;
- l'agar MC29 (Lab M, plant tissue culture agar, Topley house, wash lane. Bury, England BL 9, 6AV)

Plus de détails sur les concentrations utilisées seront donnés dans les chapitres concernés.

Tableau 2.1. Composition des milieux de culture en macroéléments, microéléments et vitamines utilisés dans les différentes expériences (mg/l)

MS: Murashige et Skoog (1962)

Eléments	Milieu MS	Milieu MS/2
Macroéléments		
NH ₄ NO ₃	1650	825
KNO ₃	1900	950
CaCl ₂ ·2H ₂ O	440	220
MgSO ₄ ·7H ₂ O	370	185
KH ₂ PO ₄	170	85
Microéléments		
MnSO ₄ ·4H ₂ O	22.3	22.3
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	8.6	8.6
H ₃ BO ₃	6.2	6.2
KI	0.83	0.83
CuSO ₄ ·5H ₂ O	0.025	0.025
Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	0.25	0.25
CoCl ₂ ·6H ₂ O	0.025	0.025
Séquestrène de Fe	100-	100
Vitamines		
Myo-inositol	100	100
Acide nicotinique	0.5	0.5
Thiamine HCl	1	1
Autres additifs		
Saccharose	20000	20000
Agar MC29	7000	7000

Tableau 2.2. Pluviométrie (en mm) au cours des années 2000-2002 dans la région de Chott-Mariem

	Janv.	Fev.	Mars	Avr.	Mai	Juin	Juill.	Août	Sept.	Oct.	Nov.	Dec.
2000	11.3	2.2	33.8	28.9	20.6	3.4	0	0	5.7	30.3	13.2	2
2001	16.9	9.2	2.9	15.1	60.9	0	1.2	0.12	73.8	0.6	13.4	50.5
2002	4.2	6.7	24.1	21.6	32.5	2.6	5.2	44.8	49.4	0.3	30.7	16.2

2.3.4. Récipients de culture

Deux types de récipients de culture ont été utilisés:

- des tubes à essai en verre pyrex de 24 mm de diamètre et de 150 mm de longueur pour les cultures de méristèmes, leur obturation est assurée par des capuchons plastiques (Kap UtTM) et nous y mettons 10 ml de milieu par tube
- des bocaux Meli en verre ayant un volume de 380 ml pour la multiplication et l'enracinement, leur fermeture est assurée à l'aide de couvercles en polycarbonate et nous les avons rempli de 100 ml de milieu par bocal (De Proft *et al.*, 1985).

2.3.5. pH des milieux de culture

Le pH de tous les milieux utilisés a été ajusté à 5.8 par des solutions de NaOH ou de HCl 0.1N ou 1N. Cette valeur du pH a été jugée bonne par Pennazio et Redolfi (1973) pour éviter l'apparition d'anomalies morphologiques.

2.4. CONDITIONS DE CULTURE

2.4.1. Température

- Salle de culture: la température dans la salle de culture est maintenue à $22^{\circ}\pm 2^{\circ}\text{C}$, avec une photopériode de 16h;
- Serre: l'acclimatation des vitroplants est effectuée dans une serre sous différentes conditions de température, d'humidité et d'éclairement qui seront mentionnées dans matériels et méthodes spécifiques du chapitre approprié;
- Champ: l'essai de plein champ a été mené dans la région de Chott-mariem où les relevés mensuels donnent 10°C minima et 27°C maxima de régime thermique.

2.4.2. Eclairement

Dans la salle de culture, les bocaux en phase de multiplication sont placés sur des étagères équipées de tubes fluorescents type «cool white» montés horizontalement et donnant une PPFd au niveau des récipients de culture de $45 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$.

Pour les essais d'enracinement, différentes qualités et intensités de lumière ont été testées. Elles seront exposées dans le chapitre concerné.

2.4.3. Hygrométrie

L'hygrométrie dans les récipients est contrôlée par un système «bottom cooling» permettant d'avoir une hygrométrie de 90%. En effet, l'hygrométrie saturée à l'intérieur des bocal entraîne certains problèmes, entre autres l'hyperhydricité. Vanderschaeghe et Debergh (1987), ont proposé ce système de «bottom cooling» afin de réduire l'hygrométrie à l'intérieur des bocal. Il s'agit de placer ces derniers sur des étagères refroidies par des tubes dans lesquels circule de l'eau refroidie. Ce système permet au milieu de culture d'avoir une température inférieure à celle de l'air et par conséquent de créer un gradient de température et une réduction de la vapeur d'eau à l'intérieur des bocal, par condensation de la vapeur d'eau sur la base refroidie.

Dans la serre différentes hygrométries ont été utilisées au cours de l'acclimatation (voir chapitre VI).

En culture de plein champ dans la région de Chott-mariem, l'hygrométrie a varié de 70% à 76%.

2.4.4. Pluviométrie

Pendant la période d'essais au champ, le Centre de Recherche de Génie Rural à Chott-mariem et le Laboratoire de bioclimatologie de l'Ecole Supérieure d'Horticulture et d'Elevage de Chott-mariem ont pu relever les valeurs mentionnées dans le tableau 2.2 concernant la pluviométrie dans la région.

2.5. ETUDE HISTOLOGIQUE

Une étude histologique a été effectuée sur feuilles, racines et pousses au cours de l'enracinement. Nous avons utilisé la méthode de Johansen (1940) qui fait appel aux étapes suivantes:

Fixation: Le matériel végétal en question a été fixé dans une solution FAA (5% formol, 5% acide acétique et 90% éthanol) durant toute la nuit à température ambiante.

Déshydratation: Le matériel fixé est ensuite déshydraté dans les solutions suivantes:

Solution	Ethanol 70% (ml)	Butanol tertiaire 100% (ml)	Eau distillée (ml)	Période (h)
I	80	15	5	12
II	65	35	0	12
III	45	55	0	12
IV	25	75	0	12
V	0	100	0	12

Inclusion: A la sortie du butanol, les tissus sont placés pendant une nuit dans de la paraffine en pastilles, ils sont ensuite placés dans une étuve à 56°C pour faire fondre la paraffine. Un 2^{ème} bain de paraffine fondue est nécessaire pour éliminer totalement les traces de butanol. L'inclusion est réalisée dans des capsules en papier, en veillant à bien placer le matériel végétal au centre à l'aide de pinces chauffées. Quand la paraffine se solidifie, on coupe les blocs dans des dimensions appropriées.

Préparation des lames porte-objets: Les lames porte-objets sont marquées à l'aide d'une pointe diamant, puis enduites d'une goutte de colle légère: la solution de Haupt, à base de gélatine (1%), de glycérine (15%) et de phénol (2%), dissous dans de l'eau distillée à 30°C. Elles sont séchées avant utilisation sur une plaque chauffante à 40°C.

Coupes au microtome: Les coupes sont réalisées à l'aide d'un microtome à déplacement manuel et ont différentes épaisseurs, selon l'objectif de l'étude à faire (5 à 20 µm). Les rubans de paraffine obtenus sont disposés sur des lames préparées comme ci-dessus et contenant quelques gouttes d'eau. Ces lames sont ensuite placées pendant quelques minutes sur une plaque chauffante à 40°C afin de faire fondre la paraffine et assurer une meilleure adhésion des coupes aux lames.

Coloration: Les lames ainsi préparées sont plongées dans les solutions suivantes:

- 1- deux bains de 10 min chacun dans du xylène;
- 2- 5 min dans une solution de xylène plus éthanol à 95% vol.1/1;

- 3- 3 min dans de l'éthanol à 95%;
- 4- 3 min dans de l'éthanol à 85%;
- 5- 3 min dans de l'éthanol à 70%;
- 6- une nuit dans de la safranine (4g de safranine dans 100 ml d'éthanol à 95%, 100 ml d'eau distillée, 4g de sodium acétate anhydre et 8 ml de formol);
- 7- rinçage des lames à l'eau distillée puis trempage dans les solutions suivantes;
- 8- quelques secondes dans de l'éthanol additionné de 4 à 5 gouttes d'ammoniaque (min.25%) par 100 ml;
- 9- 5 min dans une solution d'éthanol plus butanol normal vol.1/1;
- 10- 5 min dans du butanol normal;
- 11- 5 à 7 min dans du fastgreen (dissoudre 200 mg de fastgreen dans 100 ml de butanol normal);
- 12- deux bains de 5 min chacun dans du butanol normal;
- 13- 5 min dans une solution de butanol normal plus xylène vol.1/1;
- 14- 5 min dans du xylène;
- 15- 15 min dans du xylène.

Les lames ainsi préparées sont prêtes à l'observation microscopique. Les préparations sont montées dans une goutte de «baume de Canada» pour une conservation de longue durée; le séchage des lames se fait ensuite dans une étuve portée à la température de 32°C. L'observation microscopique des coupes est faite au moyen d'un microscope optique.

2.6. POIDS SEC

Pour déterminer le poids sec, les pousses ou parties des pousses sont séchées pendant 24h dans une étuve à 90°C.

2.7. ACCLIMATATION DES VITROPLANTS

Les conditions d'acclimatation seront donnés plus en détails dans le chapitre concerné. Néanmoins, à leur sortie des récipients de culture, les vitroplants sont rincés à l'eau courante pour les débarrasser de toute trace de milieu de culture, ils sont ensuite

repiqués dans des plaques alvéolées «multi-trays», avec des alvéoles de 3 cm de diamètre, remplies de tourbe.

2.8. ANALYSES STATISTIQUES

Toutes les données ont été statistiquement analysées moyennant le logiciel «SPSS for windows» (version 9.0). Nous avons effectué l'analyse de la variance (ANOVA) et à chaque fois qu'il existe des différences significatives, les moyennes ont été séparées par le test de Duncan (au seuil de 5%). Les résultats sont représentés par les moyennes \pm les écart types (SE).

CHAPITRE III

MULTIPLICATION *IN VITRO* DE L'ARTICHAUT

3.1. INTRODUCTION

L'artichaut est une espèce difficile à multiplier *in vitro*. Au stade I, correspondant à la mise en culture primaire des méristèmes, c'est souvent le problème des polyphénols qui se pose; ceux-ci, par leur effet toxique, empêchent les méristèmes de se développer. Le stade II qui correspond à la multiplication des pousses par induction du développement des bourgeons axillaires, se trouve souvent limité par le faible taux de multiplication et l'hyperhydricité, un phénomène qui survient lors de la multiplication et qui donne des vitroplants de mauvaise qualité. Enfin, le stade III correspondant à l'enracinement des pousses sur un milieu rhizogène et le transfert ultérieur des plants racinés au champ, se caractérise pour l'artichaut par de grandes difficultés d'enracinement et d'acclimatation des plantules.

D'autre part, nous avons vu dans la revue bibliographique que les maladies virales et la multiplication sont parmi les majeurs problèmes de l'artichaut. Ces deux problèmes ne peuvent être résolus que par les techniques de la culture *in vitro* qui permettent l'assainissement viral par culture de méristèmes d'une part et la rapidité de la multiplication par micropropagation d'autre part. Cependant, vu que la technique est assez onéreuse, cette voie ne devient rentable que si on obtient un taux de multiplication suffisamment élevé.

Le but de nos essais, est d'améliorer le taux de multiplication *in vitro* tout en maintenant une bonne qualité des vitroplants leur permettant de donner des résultats satisfaisants à l'enracinement et à l'acclimatation.

3.2. ETUDE DE L'EFFET DE DIFFERENTES CYTOKININES SUR LE TAUX DE MULTIPLICATION DES VITROPLANTS

Le taux de multiplication est défini par le nombre de plantules obtenues d'un explant après un cycle de culture et utilisables comme unités de multiplication pour la subculture suivante (Harbaoui, 1982).

Dans cette partie de ce chapitre, nous allons étudier la possibilité d'améliorer ce taux de multiplication de l'artichaut *in vitro* par l'utilisation de différentes cytokinines. En effet, les cytokinines sont connues par l'effet qu'elles exercent sur la stimulation de la division cellulaire et le développement des bourgeons axillaires par inhibition de la

dominance apicale (Jouanneau, 1975). Toutefois, elles ont une certaine spécificité d'action vis à vis des différentes espèces végétales. Par exemple, dans le cas du châtaigner, la BAP induit la prolifération des bourgeons axillaires, alors que la kinétine n'a aucun effet sur ceux-ci; d'autre part, dans le cas de la pomme de terre, seule la kinétine induit la prolifération des pousses, alors que la BAP et la 2iP n'ont aucun effet (George, 1993).

Dans le but de déterminer la cytokinine qui optimise les résultats au stade II, différentes cytokinines ont été utilisées sur des explants d'artichaut *in vitro*.

3.2.1. Matériels et méthodes spécifiques

3.2.1.1. Protocole expérimental

Les explants utilisés sont des pousses provenant d'une 8^{ème} subculture du stade II de prolifération (milieu MS + AIB 0.1 + BAP 0.5), ayant pour origine des méristèmes des cultivars 'Violet d'Hyères' et 'Blanc Oranais'. Elles ont une taille variant entre 15 et 20 mm, et des feuilles entières, vertes et portant du duvet. Les pousses sont inoculées sur le milieu MS (tableau 2.1) additionné d'une auxine, l'AIB, et d'une des quatre cytokinines: BAP (milieu témoin), 2iP, K et mT. Si les trois premières ont été déjà utilisées par d'autres auteurs dans des essais de multiplication de l'artichaut (tableau 1.6), la mT (C₁₂N₅OH₁₀), une nouvelle cytokinine appartenant à la classe des cytokinines naturelles à structure chimique aromatique (Strnad, 1992), n'a encore, à notre connaissance, jamais été utilisée sur artichaut.

Nous avons choisi les concentrations d'AIB, de BAP, de 2iP et de K en nous basant sur les travaux de Harbaoui (1982) et de Draoui *et al.* (1993) sur l'artichaut.

Tableau 3.1 Composition en hormones (mg/L) des différents milieux de multiplication utilisés

	AIB	BAP	MT	2iP	K
Milieu 1	0.1	0.5	-	-	-
Milieu 2	0.1	-	0.5	-	-
Milieu 3	0.1	-	-	5	-
Milieu 4	0.1	-	-	-	2.5

Nous avons utilisé 6 bocaux Meli/milieu (6 plantules/bocal) que nous avons placé après inoculation des pousses, dans la salle de culture (voir chapitre II).

3.2.1.2. Paramètres observés

Cinq semaines après inoculation des pousses sur les différents milieux, nous avons observé les paramètres suivants:

- qualité de l'explant primaire (couleur, hyperhydricité, présence de cal);
- qualité des pousses axillaires (couleur, présence de duvet sur les feuilles, hyperhydricité);
- nombre de pousses axillaires obtenues/explant primaire (il s'agit de pousses qui peuvent être utilisées pour la multiplication);
- longueur des pousses axillaires.

3.2.2. Résultats et discussion

3.2.2.1. Effet des différentes cytokinines sur la qualité des explants primaires

Les cytokinines utilisées ont eu différentes actions sur les explants primaires mis en culture. La mT donne les meilleurs résultats quant à la couleur des feuilles. Avec la 2iP et la K, les feuilles, surtout celles de la base, sont nécrosées et deviennent hyperhydriques; ce phénomène est plus accentué avec les explants du 'Violet d'Hyères' qu'avec ceux du 'Blanc Oranais' (tableau 3.2). Nos résultats confirment ceux de Werbrouck *et al.* (1996), qui ont obtenu des plantules de *Spathiphyllum* d'un vert très foncé avec la mT, ce qui n'était pas le cas avec les autres cytokinines utilisées dans leurs essais. D'autre part Debergh (1983) et Debergh et Maene (1985) ont eux aussi constaté que la K et la 2iP sont plus évocatrices que les autres cytokinines utilisées en ce qui concerne le phénomène d'hyperhydricité.

Nous avons aussi observé une callogenèse moins accentuée à la base des pousses avec la mT qu'avec les autres cytokinines utilisées, toutefois les plantules du 'Violet d'Hyères' sont plus sujettes à ce phénomène que celles du 'Blanc Oranais'.

3.2.2.2. Effet sur la qualité des pousses axillaires

Le tableau 3.3 montre que la mT a donné encore une fois les meilleurs résultats quant à la qualité des pousses axillaires développées par les explants primaires.

En effet, les feuilles de ces pousses sont très vertes, ayant un épiderme couvert d'un duvet blanchâtre, caractéristique des feuilles de l'artichaut dans la nature, contrairement à celles des pousses sur les autres milieux, qui ont une couleur vert pâle à vert jaune, des feuilles à épiderme peu duveteux ou même lisse et où le phénomène d'hyperhydricité est très marqué surtout avec la kinétine.

Tableau 3.2 Effet des différentes cytokinines sur la qualité des explants primaires au stade II

Cytokinine	Couleur des feuilles		Hyperhydricité		Présence de cal	
	VH	BO	VH	BO	VH	BO
BAP	Vert pâle	Vert pâle	++	++	++	++
mT	Vert	Vert	+	+	+	+
2iP	Vert pâle-nécrosées	Vert pâle-nécrosées	+++	++	+++	++
K	Vert pâle-nécrosées	Vert pâle-nécrosées	+++	++	+++	++

VH: 'Violet d'Hyères'; BO: 'Blanc Oranais'. Hyperhydricité et présence de cal: + faible, ++ moyenne, +++ forte

Tableau 3.3 Effet des différentes cytokinines sur la qualité des pousses axillaires au stade II

Cytokinine	Couleur des feuilles		Hyperhydricité		Présence de duvet	
	VH	BO	VH	BO	VH	BO
BAP	Vert pâle	Vert pâle	+	+	+	+
mT	Vert	Vert	+	+	++	++
2iP	Vert jaune	Vert pâle	++	++	+	+
K	Vert jaune	Vert pâle	+++	+++	-	-

Duvet: - absent, + faible présence, ++ présence de duvet

3.2.2.3. Effet sur le développement des pousses axillaires

L'observation des résultats qui se rapportent au nombre de pousses axillaires par explant primaire mis en culture ou taux de multiplication (Tableau 3.4) nous laisse

constater que la BAP n'est pas très performante pour la multiplication puisque pour les deux cultivars elle n'a donné qu'un taux de 1.9 et 1.6 respectivement pour le 'Violet d'Hyères' et le 'Blanc Oranais'.

Tableau 3.4 Effet des différentes cytokinines sur le nombre de pousses axillaires émises par l'explant primaire au stade II

	Nbre de pousses axillaires 'Violet d'Hyères'	Nbre de pousses axillaires 'Blanc Oranais'
BAP	1.9 ±0.5 a	1.6 ±0.6 a
mT	2.5± 0.6 b	2.2 ±0.6 b
2iP	2.2± 0.6 b	2.0± 0.5 b
K	2.4± 0.7 b	2.7±0.7 c

Les moyennes de la même ligne, suivies par la même lettre ne diffèrent pas statistiquement entre elles au seuil de 5%

La kinétine a donné un taux de multiplication significativement plus élevé que la BAP. Toutefois, vu la mauvaise qualité qu'elle confère aux pousses (tableau 3.3), il serait inutile de la maintenir pour le stade multiplication, sinon, les résultats seraient peu brillants à l'enracinement. Ce résultat confirme celui d'Harbaoui (1982), qui a lui aussi obtenu le meilleur taux de multiplication mais la plus mauvaise qualité de pousses avec la kinétine.

La mT a permis d'avoir un taux de multiplication de 2.5 pour le 'Violet d'Hyères' et 2.2 pour le 'Blanc Oranais'; quoiqu'ils soient assez faibles, ces taux sont significativement plus élevés que ceux obtenus avec la BAP. Ces résultats sont appréciables dans la mesure où cette cytokinine donne une qualité de pousses assez bonne, leur permettant d'obtenir de bons résultats à l'enracinement (voir chapitre 4).

3.2.2.4. Effet sur la longueur des pousses axillaires

La figure 3.1 montre que pour les deux cultivars étudiés, il existe une différence significative entre les quatre cytokinines utilisées. La mT a donné les pousses significativement les plus longues. La 2iP a donné, elle aussi, des pousses supérieures à 2 cm. Ce résultat confirme celui obtenu par Harbaoui (1982) qui a constaté lui aussi que la 2iP est une cytokinine stimulatrice de la longueur des pousses *in vitro*.

La BAP et la K restent peu favorables à la multiplication, puisqu'elles donnent des pousses de petite taille, or, Harbaoui (1982) considère que des plantules ayant une taille supérieure à 2 cm sont plus favorables pour réussir la phase enracinement.

Quoique la différence ne soit pas significative, nous avons constaté qu'avec les quatre cytokinines testées, le 'Violet d'Hyères' qui donne toujours des pousses plus grandes que celles du 'Blanc Oranais'.

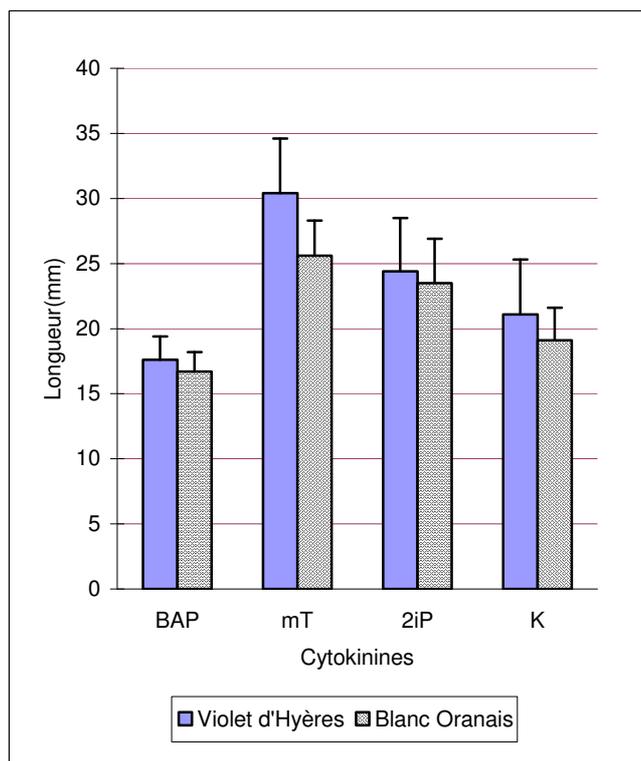


Figure 3.1. Effet des différentes cytokinines sur la longueur des pousses axillaires au stade II

3.2.3. Conclusion

L'étude de l'effet des différentes cytokinines testées afin d'optimiser les résultats au stade II nous permet de choisir la meta-topoline (à 0.5 mg/L) comme cytokinine à introduire dans le milieu de multiplication. En effet, c'est elle qui a donné les meilleurs résultats concernant la qualité des pousses axillaires; le taux de multiplication obtenu reste faible mais nous allons essayer de l'améliorer.

3.3. EFFET DU PACLOBUTRAZOL SUR LA QUALITE ET LE TAUX DE MULTIPLICATION DES VITROPLANTS

Dans la première partie de ce chapitre, nous avons constaté que le milieu contenant 0.5 mg/L de meta-topoline donne les meilleurs résultats, cependant, le taux de multiplication reste assez faible et le phénomène d'hyperhydricité, quoique pas trop marqué, reste présent.

Dans le but d'améliorer encore la qualité des vitroplants et le taux de multiplication, nous avons maintenu le Milieu 2 comme milieu de multiplication de référence (tableau 3.1), auquel on a ajouté un retardateur de croissance, le paclobutrazol (PBZ). Cette substance a été utilisée par certains auteurs et sur des espèces autres que l'artichaut (Marino, 1981; Ziv, 1991) et a donné de bons résultats. Nous avons tenté d'extrapoler ces résultats à l'artichaut.

Ancora *et al.* (1981), Debergh (1991) et Morzadec et Hourmant (1997) rapportent que la qualité des vitroplants est d'une importance primordiale pour la réussite de l'enracinement. D'autre part, Werbrouck et Debergh (1996) ont montré que le PBZ augmente l'effet inducteur du bourgeonnement dû aux cytokinines ajoutées au milieu de culture.

Ziv *et al.* (1994), ont eux aussi montré que des retardateurs de croissance, tel que le PBZ, sont des inhibiteurs de la biosynthèse des gibbérellines qui sont utilisés *in vitro* pour limiter la croissance foliaire et contrôler le phénomène d'hyperhydricité.

3.3.1. Matériels et méthodes spécifiques

3.3.1.1. Protocole expérimental

Les explants utilisés dans cet essai sont des pousses qui proviennent d'une 9^{ème} subculture du stade II de prolifération du cultivar 'Violet d'Hyères', et sont inoculées sur le milieu de multiplication sus-mentionné additionné des différentes concentrations de paclobutrazol (PBZ): 0, 2, 4 ou 6 mM/L de matière active.

8 Méli par traitement sont utilisés (avec 6 pousses/bocal) et placés dans une salle de culture où les conditions de température et de lumière sont les mêmes que celles mentionnées dans le chapitre II.

3.3.1.2. Paramètres observés

Cinq semaines après inoculation des plantules sur les milieux contenant les différentes concentrations de PBZ, nous avons observé les paramètres suivants:

- la qualité des pousses: forme et couleur des feuilles, présence ou absence de cal;
- longueur et largeur du limbe;
- nombre de pousses axillaires/explant primaire;
- poids frais et poids sec des touffes (explant primaire plus les axillaires).

3.3.2. Résultats et discussion

3.3.2.1. Effet des différentes concentrations de PBZ sur la qualité des vitroplants

Le tableau 3.5 montre que les pousses repiquées sur un milieu contenant du PBZ présentent un meilleur aspect avec une couleur vert foncé, la présence de duvet sur la face supérieure des feuilles et la réduction de la taille du cal formé à la base des explants; les plantules témoin sont un peu hyperhydriques, d'une couleur vert plus clair et ont un cal basal très développé.

Ces résultats confirment ceux de Ziv et al. (1994), qui ont eux aussi constaté que les retardateurs de croissance, tel que le PBZ, contribuent à l'amélioration de la qualité des plantules *in vitro* par la réduction de la taille des feuilles ainsi que des aberrations morphologiques et physiologiques, tels que l'hyperhydricité. D'autre part, il a été constaté que, ajouté au milieu de culture, le PBZ réduit le phénomène de callogenèse (George, 1993).

3.3.2.2. Effet du PBZ sur la taille des feuilles

Le PBZ ajouté au milieu de multiplication entraîne une réduction de la taille des feuilles. Des concentrations de 4 ou de 6 mM/L donnent des feuilles significativement moins longues et moins larges que celles sur milieu contenant 0 ou 2 mM/L (Tableau 3.6 et figure 3.2). Toutefois, il ne faut pas que cette réduction de la taille des feuilles soit exagérée.

Tableau 3.5 Effet des différentes concentrations de PBZ sur la qualité des pousses d'artichaut *in vitro* (cinq semaines sur milieu MS+0.5 mg/L mT)

PBZ/L	Couleur des feuilles	Présence de duvet	Hyperhydricité	Présence de cal
0 mM	Vert	+	+	+++
2 mM	Vert foncé	+	+	++
4 mM	Vert foncé	++	-	+
6 mM	Vert foncé	++	-	+

Présence de duvet et de cal, hyperhydricité: - absente, + faible, ++ moyenne, +++ forte

Tableau 3.6 Effet des différentes concentrations de PBZ sur la longueur (mm) et la largeur (mm) des feuilles de l'explant primaire au stade II (cinq semaines sur milieu MS+0.5 mg/L mT)

PBZ/L	0 mM	2 mM	4 mM	6 mM
Longueur (mm)	31.9 ± 5.9 a	26.9 ± 5.4 b	21.4 ± 4.3 c	18.8 ± 3.0 d
Largeur (mm)	5.9 ± 1.2 a	5.0 ± 0.9 b	4.2 ± 1.0 c	3.6 ± 0.6 d

Chaque valeur représente la moyenne de 48 plantules / traitement

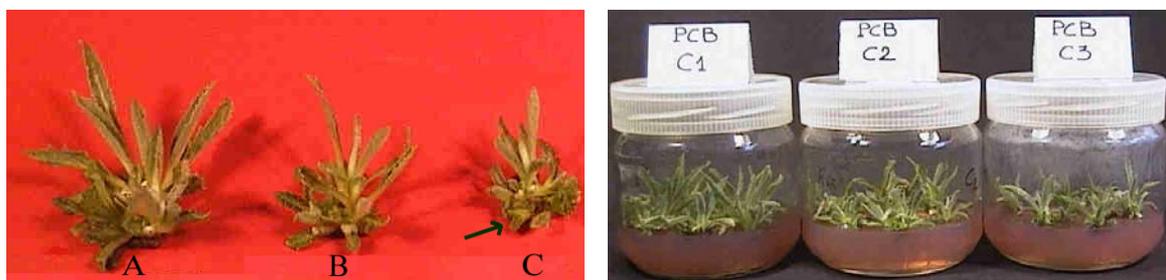
Les moyennes de la même ligne, suivies par la même lettre ne diffèrent pas statistiquement entre elles au seuil de 5%

Tableau 3.7 Effet des différentes concentrations de PBZ sur le développement des bourgeons axillaires (cinq semaines sur milieu MS+0.5 mg/L mT)

Concentration en PBZ (mM)	0	2	4	6
Nbre de bgs ax./ Explant primaire	1.9 ± 0.6 a	4.5 ± 1.5 b	3.9 ± 1.4 b	2.9 ± 0.9 c

Chaque valeur représente la moyenne de 48 plantules/traitement

Les moyennes de la même ligne, suivies par la même lettre ne diffèrent pas statistiquement entre elles au seuil de 5%



C1=2mM (A), C2=4mM (B) et C3=6mM (C) de PBZ

La flèche indique la miniaturisation des bourgeons obtenus avec les fortes concentrations de PBZ (PCB)

Figure 3.2 Effet du PBZ sur la croissance des pousses *in vitro*

3.3.2.3. Effet sur le développement des bourgeons axillaires

Les différentes concentrations de PBZ testées ont donné un nombre de bourgeons axillaires significativement plus élevé que le traitement témoin, mais la concentration la plus élevée donne à son tour un nombre significativement plus réduit que les autres, mais toujours supérieur au témoin (tableau 3.7). Les concentrations de 2 et 4 mM de PBZ permettent le développement d'un assez grand nombre d'axillaires aboutissant à des pousses bien différenciées, contrairement aux pousses obtenues avec les fortes concentrations qui restent de très petite taille (figure 3.2). Ces résultats confirment ceux de Belaizi *et al.* (1994) qui ont pu eux aussi améliorer le taux de multiplication du caroubier par l'addition de paclobutrazol au milieu de culture; ce taux est passé de 4 (témoin) à 16. Werbrouck et Debergh (1996) ont eux aussi obtenu un meilleur développement des bourgeons sur *Spathyphillum* avec les plus faibles concentrations de PBZ utilisées dans leurs expériences. Ils ont eux aussi constaté que les fortes concentrations donnent de très petites pousses réduites même à des dômes méristématiques. Belaizi *et al.* (1994) ont eux aussi constaté que l'emploi de fortes concentrations de paclobutrazol dans le milieu de multiplication du caroubier aboutit à d'abondantes régénérations du type agglomérats de méristèmes, et entraîne une miniaturisation des bourgeons. En plus, l'origine axillaire n'est pas garantie, il se pourrait que ce soient des adventifs, avec tous les risques que cela entraîne au niveau de la stabilité génétique.

3.3.2.4. Effet sur le développement de biomasse par les vitroplants

L'étude du poids frais et du poids sec des touffes *in vitro* après un cycle de culture sur PBZ (explant primaire + pousses axillaires) montre que la concentration de 2 mM de PBZ dans le milieu de culture permet la plus forte accumulation de biomasse comparé aux autres concentrations utilisées (figures 3.3); ceci est certainement traduit par le nombre élevé d'axillaires développés par les explants primaires mis en culture dans le milieu contenant cette concentration (figure 3.2). Nous remarquons d'autre part qu'il existe une corrélation entre le poids frais et le poids sec des pousses.

3.3.3. Conclusion

Parmi les concentrations de PBZ testées, celle de 2 mM/L a donné les meilleurs résultats; en effet, le nombre moyen de pousses axillaires qui est de 4.5 demeure le plus significativement élevé ce qui conduit à un taux de multiplication assez important. En outre, la qualité des pousses permet d'obtenir les meilleurs résultats à l'étape ultérieure, à savoir l'enracinement (voir chapitre 4). Les explants inoculés sur le milieu témoin ont présenté quelques signes d'hyperhydricité et ont développé très peu de pousses axillaires; de même, les plus fortes concentrations ont abouti à des touffes contenant plusieurs bourgeons mais pour la plupart d'entre eux, restés sous forme de dômes méristématiques.

A la lumière de ces résultats, nous allons maintenir comme milieu de prolifération pour les subcultures à venir le milieu MS additionné de 0.1mg/L AIB, 0.5mg/L mT et 2mM/L PBZ.

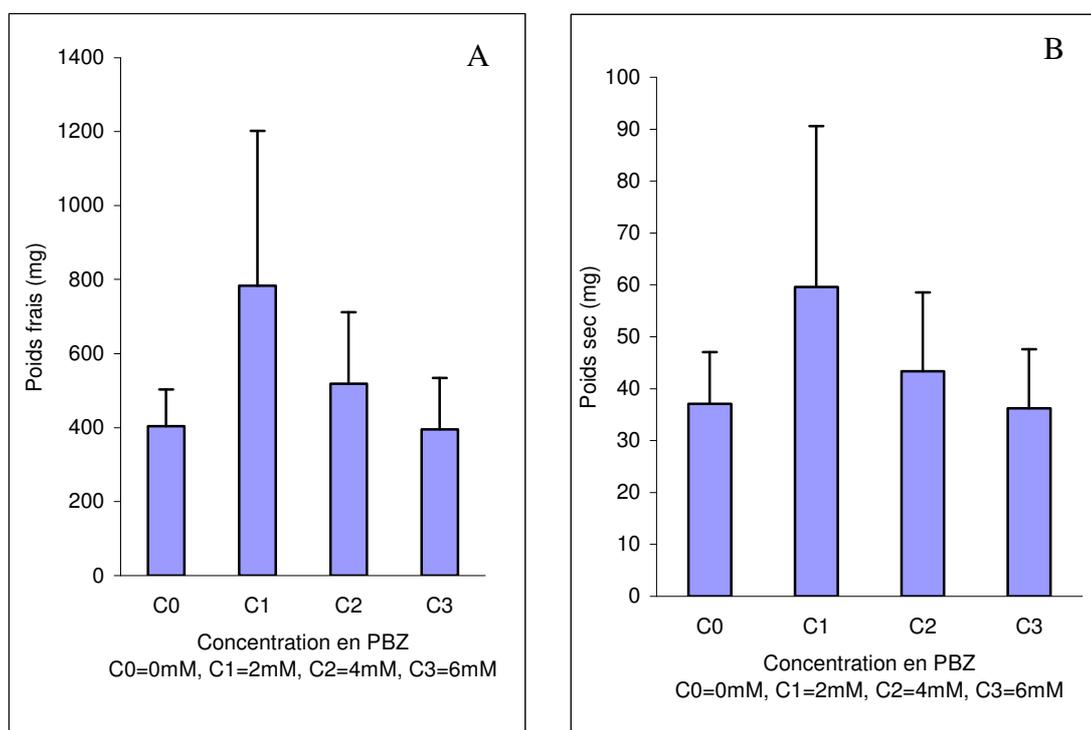


Figure 3.3. Effet de la concentration en paclobutrazol sur le Poids frais (A) et le poids sec (B) des touffes au stade II de multiplication (cinq semaines sur milieu MS+0.5 mg/L mT)

CHAPITRE IV

ENRACINEMENT *IN VITRO* DE L'ARTICHAUT

L'artichaut a toujours présenté des difficultés d'enracinement *in vitro*, c'est la raison pour laquelle on n'a pas encore pu établir une chaîne industrielle fiable de production de vitroplants de cette espèce. Néanmoins, si on veut que ceci se réalise, il est impératif de produire des vitroplants avec un taux élevé d'enracinement et présentant un système racinaire de bonne qualité, assurant une bonne reprise lors de la transplantation en sol.

Nous allons dans ce chapitre étudier l'effet de différentes techniques, et/ou de différents types de substances, qui ont déjà été essayés par d'autres auteurs et ont donné des résultats positifs sur l'enracinement d'autres espèces.

Pour tous les essais d'enracinement, nous avons utilisé des pousses ayant une taille de 20 à 30 mm, présentant des feuilles vertes entières ou dentelées et recouvertes d'un duvet. Elles proviennent d'un matériel en prolifération, issu de méristèmes (chapitre II). Vu qu'on dispose de beaucoup plus de matériel végétal appartenant au cultivar 'Violet d'Hyères' que de celui appartenant au 'Blanc Oranais', la plupart des essais ont été effectués avec seulement le 'Violet d'Hyères'.

Les essais suivants sont énumérés en respectant la chronologie selon laquelle ils ont été effectués et par conséquent, les pousses utilisées proviennent de rangs de subculture différents. Les cinq premières subcultures qui ont suivi la culture des méristèmes ont servi à constituer le stock de pousses nécessaires aux différents essais. Pour les essais d'enracinement, nous avons commencé à la 6^{ème} subculture par les essais figurant en 4.6 (essais non concluants). L'essai suivant, étudiant l'effet de la riboflavine, a été effectué avec des pousses provenant d'une 9^{ème} subculture, et ainsi de suite. A chaque subculture, nous avons utilisé des pousses qui ont une taille entre 20 et 30 mm pour les essais d'enracinement et remis celles ayant une taille inférieure à 20 mm sur milieu neuf de prolifération.

4.1. EFFET DE LA RIBOFLAVINE SUR L'ENRACINEMENT *IN VITRO* DE L'ARTICHAUT

4.1.1. Introduction

Depuis plusieurs décennies, il a été démontré (Went et Thimann, 1937; Went, 1939) qu'il y a deux phases lors de la formation de racines adventives:

- une phase d'initiation racinaire: quand l'explant est exposé directement à une auxine;
- une phase d'émergence et de croissance des racines: où la présence d'auxine n'est pas obligatoire, voire même défavorable.

Ces résultats ont été confirmés à l'issue d'essais d'enracinement *in vivo* sur des boutures d'*Azukia* (Mitsubishi Kato *et al.*, 1978), de pois (Mohammed et Eriksen, 1974) et de *Pinus radiata* (Smith et Thorpe, 1975). Les plantules *in vitro* passent elles aussi par ces deux phases lors de la rhizogenèse. Ceci a été observé entre autres, sur des vitroplants d'un porte-greffe de pommier (James, 1983). Cependant, à cause du coût élevé qui pourrait découler du transfert des vitroplants sur un milieu neuf sans auxines, particulièrement pour les entreprises industrielles qui fonctionnent avec des effectifs énormes de matériel végétal, on a préféré garder les vitroplants sur milieu d'enracinement contenant l'auxine durant 3 ou 4 semaines avec tout ce que ceci pourrait entraîner comme anomalies sur l'élongation et la morphologie des racines.

Ce sont les travaux de Gorst *et al.* (1983) et Drew *et al.* (1991) qui sont à l'origine de l'idée de l'utilisation de la riboflavine en phase d'enracinement. En effet, ces derniers ont, par une analyse du milieu de culture par HPLC montré que la réduction d'AIB est accélérée par addition de cette substance au dit milieu. Cet effet demande un passage à l'obscurité pendant l'action de l'auxine, suivi d'un passage à la lumière pour l'inhibition de cette action.

4.1.2. Matériels et méthodes spécifiques

4.1.2.1. Protocole expérimental

Des explants appartenant aux deux cultivars ‘Violet d’Hyères’ et ‘Blanc Oranais’ et provenant d’une 9^{ème} subculture du stade II de prolifération (milieu MS + AIB 0.1mg/L + mT 0.5mg/L), sont inoculés à raison de six/bocal sur différents milieux d’enracinement:

- un milieu d’enracinement témoin MS (tableau 2.1) contenant 1 mg/L AIB (5 bocaux Meli);
- un milieu d’enracinement MS (tableau 2.1) contenant 1 mg/L AIB et 30 µM riboflavine (5 bocaux Meli).

Le choix de l’AIB comme auxine, de sa concentration et de la concentration de la riboflavine sont effectués sur la base des travaux de Drew *et al.* (1991).

Les bocaux sont d’abord placés à l’obscurité durant une semaine pour éviter la dégradation de la riboflavine à la lumière, après laquelle ils sont transférés à la lumière, où ils vont séjourner durant 4 semaines dans la salle de culture présentant les caractéristiques mentionnées dans le chapitre II.

Remarque: les explants utilisés dans cet essai et décrits en introduction présentent pour la plupart d’entre eux des feuilles dentelées; certains cependant présentent des feuilles entières.

4.1.2.2. Paramètres observés

Les paramètres observés après 5 semaines de l’inoculation des explants sur les différents milieux rhizogènes sont:

- le pourcentage de pousses enracinées;
- l’importance du cal à la base des pousses;
- le nombre de racines/plante enracinée;
- la longueur de la racine la plus longue.

4.1.3. Résultats et discussion

Des résultats du tableau 4.1 nous constatons que, pour les deux cultivars étudiés, la riboflavine contribue à l'amélioration de l'enracinement. En effet, avec seulement l'auxine, nous n'obtenons aucune plante enracinée pour 'Blanc Oranais' et seulement 3% d'enracinement pour 'Violet d'Hyères'; en ajoutant la riboflavine, nous obtenons une augmentation significative de l'enracinement qui arrive à 30% pour le premier cultivar et à 43% pour le second. Par ailleurs, nous avons relevé un effet variétal vis à vis de l'enracinement, puisqu'il existe une différence significative entre les pourcentages d'enracinement du 'Violet d'Hyères' et du 'Blanc Oranais', en faveur du premier cultivar. D'autre part, l'activité callogène a été appréciée visuellement à la fin du stade III, et nous avons constaté que la riboflavine a un effet inhibiteur sur la callogenèse, puisque les plantes témoin ont développé à leur base un cal plus important que les plantes sur riboflavine. La même chose a été constatée par Drew *et al.* (1993).

La comparaison basée sur le nombre de racines formées et la longueur de la racine la plus longue par pousse enracinée n'a révélé aucune différence significative entre les différents traitements; toutefois, les racines émises restent peu nombreuses puisqu'elles n'ont pas dépassé 2.2 racines/plante (tableau 4.1); en plus, elles sont d'une mauvaise qualité: racines longues et très épaisses et par conséquent cassantes.

Ces résultats, quoique peu brillants, confirment en partie ceux de Gorst *et al.* (1983), Drew (1987), Druart (1987), et Drew *et al.* (1991, 1993). En effet, ceux-ci ont également pu constater une amélioration de l'enracinement en qualité et en quantité après addition de riboflavine dans le milieu de culture contenant l'AIB.

L'étude de Drew *et al.* (1993) sur la papaye, a montré qu'une exposition prolongée des plantules à l'AIB en phase d'enracinement entraîne de faibles pourcentages de plantes enracinées. Ils recommandent un passage sur un milieu contenant de l'AIB durant 2 à 3 jours avant un transfert sur un milieu sans hormones; d'où l'idée de l'utilisation de la riboflavine. En effet, pour éviter la main d'œuvre due aux opérations de transfert, ils essaient d'utiliser cette substance, qui, d'après Gorst *et al.* (1983) et Drew *et al.* (1991), peut en présence de lumière photo-oxyder 90% de l'AIB contenue dans le milieu de culture; le rôle bénéfique de la riboflavine est donc d'annuler l'effet de l'auxine quand l'induction a eu lieu et que la présence d'auxine n'est plus nécessaire.

Tableau 4.1. Effet de la riboflavine (30 μ M) sur le pourcentage d'enracinement de l'artichaut *in vitro*, cinq semaines après l'inoculation

Traitement	T-BO	RF-BO	T-VH	RF-VH
Importance du cal à la base	++	+	++	+
Pousses mises en culture	30	30	30	30
Pousses enracinées	0	9	1	13
% pousses enracinées	0 a	30 b	3 a	43 c
Racines/pousse enracinée	-	2 \pm 0.3 a	2 \pm 0.4 a	2.2 \pm 0.4 a
Racine la plus longue (mm)	-	54.1 \pm 2.7 a	52.7 \pm 2.4 a	51.4 \pm 2.5 a

les moyennes de la même ligne suivies par la même lettre ne diffèrent pas statistiquement entre elles au seuil de 5%.

Importance du cal à la base des pousses: + cal peu développé, ++ cal important

BO: 'Blanc Oranais', VH: 'Violet d'Hyères', T: témoin, RF: riboflavine

4.1.4. Conclusion

L'addition de 30 μ M de riboflavine au milieu de culture au stade III d'enracinement de l'artichaut a donné de nettes améliorations des taux d'enracinement, quoique ceux-ci restent assez bas.

4.2. EFFET DE LA DUREE DE L'EXPOSITION A L'AUXINE SUR L'ENRACINEMENT *IN VITRO* DE L'ARTICHAUT

4.2.1. Introduction

Le moment de l'exposition à une auxine, des pousses, pendant la phase d'enracinement a une influence sur les résultats. Certaines espèces nécessitent une exposition prolongée à l'auxine, d'autres non (George, 1993). Il y a des espèces qui préfèrent le pré-traitement par un passage sur un milieu sans hormone suivi de l'exposition à l'auxine; d'autres par contre, préfèrent une exposition à l'auxine d'abord suivie d'un transfert sur un milieu sans hormones (Király *et al.*, 2001).

Dans l'essai qui suit, nous allons tester l'effet de la durée de l'exposition des pousses d'artichaut à l'auxine, sur l'enracinement *in vitro* de cette espèce.

4.2.2. Matériels et méthodes spécifiques

4.2.2.1. Protocole expérimental

Des pousses en prolifération (milieu MS+AIB 0.1mg/L+mT 0.5mg/L+PBZ 2mM/L), provenant d'un rang 10 de subculture, du cultivar 'Violet d'Hyères', sont inoculées successivement sur deux milieux différents:

- Un milieu sans hormone, qui n'est autre que le milieu MS (tableau 2.1)
- Un milieu d'enracinement MS (tableau 2.1) avec 2 mg/L ANA; en effet, cette auxine et cette concentration ont donné les meilleurs résultats dans les études portant sur l'enracinement *in vitro* de l'artichaut (Ancora *et al.*, 1981; Lauzer et Vieth, 1990; Draoui *et al.*, 1993).

La succession des pousses sur les deux milieux est faite comme indiqué ci-dessous, selon les différents traitements:

- T1: une première semaine sur milieu sans hormones suivie de 4 semaines sur milieu avec ANA;
- T2: 2 semaines sur milieu sans hormones suivies de 3 semaines sur milieu avec ANA;
- T3: 3 semaines sur milieu sans hormones suivies de 2 semaines sur milieu avec ANA;
- T4: 1 semaine sur milieu avec ANA suivie de 4 semaines sur milieu sans hormones;
- T5: 2 semaines sur milieu avec ANA suivies de 3 semaines sur milieu sans hormones;
- T6: 3 semaines sur milieu avec ANA suivies de 2 semaines sur milieu sans hormones.

Nous avons mis en culture six bocaux Meli par traitement (avec 6 pousses/bocal), que nous avons placé après inoculation des pousses sur les différents milieux dans la salle de culture (voir chapitre II)

4.2.2.2. Paramètres observés

Après cinq semaines de culture, nous avons observé:

- le pourcentage de pousses enracinées;
- le nombre de racines/plante enracinée;
- la longueur de la racine la plus longue.

4.2.3. Résultats et discussion

Cet essai s'est soldé par les résultats figurant dans le tableau 4.2, qui montre que le traitement T4 donne le pourcentage d'enracinement significativement le plus élevé, avec 66.7% de plantes enracinées, suivi de T5, avec 55.6% (tableau 4.2). Ceci suggère qu'un premier passage sur milieu contenant une auxine, suivi d'un transfert sur un deuxième milieu sans auxine est plus bénéfique que le traitement inverse pour l'enracinement de pousses d'artichaut *in vitro*. Néanmoins le séjour sur un milieu avec auxine ne doit pas durer trop longtemps, puisqu'il engendre une baisse non significative du pourcentage d'enracinement. Yu *et al.* (2000), et Kiraly *et al.* (2001), confirment ce résultat puisqu'ils ont obtenu les meilleurs pourcentages de plantes enracinées, quand ils ont placé les plantules pendant 3 à 4 jours sur un milieu d'induction contenant une auxine, suivi d'un transfert sur un milieu neuf sans auxine. Certains auteurs (Collet et Le, 1988; Mathur et Nadgouda, 1999) réduisent cette durée d'exposition à l'auxine à quelques heures seulement, mais en utilisant de fortes concentrations, ensuite ils transfèrent les pousses sur un milieu neuf sans hormones; ceci confirme dans une certaine mesure les résultats obtenus dans l'essai précédent avec la riboflavine.

Le traitement inverse, c'est à dire un passage sur milieu d'élongation sans auxine suivi d'un transfert sur milieu contenant une auxine a donné les résultats les moins brillants. Le tableau 4.2 montre que, plus la durée de culture sur milieu sans hormones est prolongée, plus le pourcentage d'enracinement est bas; en effet, le taux significativement le plus faible (30.6%) parmi tous les traitements, est celui des pousses qui ont passé trois semaines sur un milieu sans hormones suivies de deux semaines sur le milieu contenant l'ANA.

Sur ce point, les résultats sont très divers selon les espèces et les auteurs. Popov *et al.* (1976), et Snir (1983), ont trouvé les mêmes résultats que nous avec le cerisier, Rugini et Verma (1982) avec l'amandier et Mathur et Nadgauda (1999) avec le pin. Cependant, Boxus (1971), Boxus et Quoirin (1974, 1977), Quoirin *et al.* (1977), et Maene et Debergh (1985) obtiennent de meilleurs résultats à l'enracinement quand ils soumettent les pousses à un milieu d'élongation sans auxines avant de les transférer sur le milieu d'enracinement.

Nous avons aussi remarqué que plus la durée d'un premier passage sur milieu sans auxine est longue, plus la qualité des pousses devient médiocre (feuilles jaunes et apex nécrosé); Kiraly *et al.* (2001) et Vietiez *et al.* (1989), ont eu des résultats similaires.

Le mauvais état des pousses des traitements T1, T2 et T3 pourrait expliquer sa répercussion sur leur enracinement. En effet, il a toujours été vérifié que la qualité du matériel végétal soumis à l'enracinement est d'une grande importance pour la réussite à ce stade, puisqu'un matériel qui montre une forte activité de croissance au niveau du stade II de prolifération, répond mieux à l'enracinement qu'un matériel de mauvaise qualité (Harbaoui, 1982; Druart, 1994, 1995). Bigot et Foury (1984), ont eux aussi remarqué que la vigueur des pousses soumises à l'enracinement est très importante pour l'obtention d'une rhizogenèse active et rapide.

Il a été aussi noté, que les pousses des traitements T4, T5 et T6 émettent des racines significativement plus nombreuses et plus longues que celles de T1, T2 et T3. Brunner (1978) et Liu et Reid (1992), ont constaté les mêmes faits quand ils ont fait subir aux pousses au stade d'enracinement *in vitro* un traitement rhizogène moyennant une auxine avant de les transférer sur un milieu sans hormones. D'autre part, il existe une différence significative (au seuil de 5%) entre presque tous les traitements (à part T4 et T5), quant à la longueur de la plus longue racine par plante enracinée, avec les moins longues racines (17.3 ± 3.3 mm) pour les pousses qui sont passées d'abord sur un milieu sans auxines pendant trois semaines.

4.2.4. Conclusion

Si avec un certain nombre d'espèces, le passage par un milieu d'élongation ne contenant pas d'auxines précédant le transfert sur milieu d'enracinement améliore les

résultats au stade III, ceci n'est pas le cas pour l'artichaut, puisque le pourcentage d'enracinement a été amélioré quand on a mis les pousses d'abord sur milieu d'induction contenant l'auxine (ANA dans notre cas) durant une semaine, puis quand on les a transféré sur milieu sans auxine.

Tableau 4.2. Effet d'une phase d'élongation sur l'enracinement de l'artichaut *in vitro*

Traitement	T1	T2	T3	T4	T5	T6
Pousses mises en culture	36	36	36	36	36	36
Pousses enracinées	18	14	11	24	20	18
%d'enracinement	50 abc	38.9 ab	30.6 a	66.7 c	55.6 bc	50 abc
Racines/pousse enracinée	2.2 ± 0.4 a	2.3 ± 0.5 a	1.3 ± 0.4 b	2.9 ± 0.6 c	2.9 ± 0.6 c	2.7 ± 0.7 c
Racine la + longue (mm)	36.7 ± 4.0 a	28.6 ± 3.3 b	17.3 ± 3.3 c	52.1 ± 2.4 d	50.8 ± 2.6 d	45.2 ± 4 e

Les moyennes de la même ligne suivies par la même lettre, ne diffèrent pas statistiquement entre elles au seuil de 5%.

T1: 1 semaine sur MS+ 4 semaines sur MS avec ANA 2mg/L; T2: 2 semaines sur MS + 3 semaines sur MS avec ANA 2mg/L; T3: 3 semaines sur MS + 2 semaines sur MS avec ANA 2 mg/L; T4: 1 semaine sur MS avec ANA 2mg/L+ 4 semaines sur MS; T5: 2 semaines sur MS avec ANA 2mg/L + 3 semaines sur MS; T6: 3 semaines sur MS avec ANA 2 mg/L + 1 semaine sur MS

4.3. EFFET DE DIFFERENTES AUXINES SUR L'ENRACINEMENT *IN VITRO* DE L'ARTICHAUT

4.3.1. Introduction:

Si depuis longtemps, il a été admis par tous que les auxines jouent un rôle prépondérant dans le mécanisme de l'enracinement adventif (Németh, 1986), une certaine spécificité de ces hormones existe vis à vis des différentes espèces végétales. En effet, sur des explants de *Echinacea purpurea*, Choffe *et al.* (2000), ont démontré que parmi les trois auxines testées (AIB, AIA et ANA), c'est l'AIB qui donne les meilleurs résultats, suivie de l'AIA, ensuite de l'ANA. Al-Bahrany (2002) a abouti à des résultats presque équivalents pour *Citrus aurantifolia*, dont l'enracinement est totalement inhibé par addition d'ANA au milieu d'enracinement. Andrade *et al.* (1999) ont toutefois obtenu les meilleurs pourcentages d'enracinement de *Lavandula vera* avec l'ANA, de même que Starrantino et Caruso (1988) sur *Poncirus trifoliata*. En

outre Scarpa *et al.* (2000) ont prouvé eux aussi l'efficacité de cette même auxine sur l'enracinement du myrtille, mais à des doses élevées, les faibles doses bloquant cependant l'enracinement. D'autre part Monteuis et Bon (2000) ont démontré que l'AIA donne de meilleurs résultats pour l'enracinement d'acacia que l'AIB.

Cette spécificité est due à plusieurs facteurs:

- au génotype lui-même: en effet, l'interaction entre génotypes et auxines a été relevée avec plusieurs espèces (Nemeth, 1986);
- aux conditions de d'environnement et à l'âge physiologique des explants pendant la phase d'enracinement (Choffe *et al.*, 2000; Scarpa *et al.*, 2000);
- à la capacité qu'ont les espèces à s'enraciner naturellement, vu qu'il existe des espèces faciles à enraciner et d'autres difficiles. Certains auteurs (Baraldi *et al.*, 1993; Epstein et Ludwig-Müller, 1993), attribuent cette différence dans la capacité d'enracinement, aux différences de prélèvement, de transport et de métabolisme des auxines par les différentes espèces, et notamment à la capacité qu'ont les tissus de ces espèces à convertir les auxines conjuguées en auxines libres durant la phase critique de l'enracinement. Ces dernières en effet constituent la source majeure d'auxines durant la rhizogenèse;
- à la stabilité des différentes auxines dans les plantes. L'AIA et l'ANA paraissent avoir des vitesses de transport très similaires (Hertel *et al.*, 1969; Kaldewey, 1984), alors que l'AIB circule plus lentement (Mc Cready, 1963).

Sur artichaut, beaucoup de travaux ont été faits pour tenter de faire enraciner des pousses *in vitro* (tableau 1.6), mais les résultats restent jusqu'ici peu brillants.

L'étude suivante est proposée dans le but de trouver un système adéquat pour l'enracinement *in vitro* de l'artichaut moyennant différentes auxines: l'AIA, l'AIB et l'ANA qui ont été communément utilisées en enracinement et de la 3-(Benzo[b]selenyl) acetic acid (BSAA), une auxine synthétique (benzo-séléniée), qui a prouvé son efficacité *in vitro* sur des espèces difficiles à enraciner (Gaspar, 1995), mais qui n'a jamais été utilisée sur artichaut.

4.3.2. Matériels et méthodes spécifiques

4.3.2.1. Protocole expérimental

Le matériel végétal est représenté par des pousses de ‘Violet d’Hyères’ provenant d’un rang 11 de subculture du stade de prolifération (milieu MS+AIB 0.1mg/L+mT 0.5mg/L+PBZ 2mM/L). Huit milieux d’enracinement ont été testés; la composition du milieu de base figure au tableau 2.1 (milieu MS), à ce milieu nous avons ajouté différentes auxines à différentes concentrations. Celles-ci sont choisies sur la base des travaux des auteurs déjà cités en introduction:

- l’AIA à 1 et 2 mg/L;
- l’AIB à 1 et 2 mg/L;
- l’ANA à 1 et 2 mg/L;
- la BSAA à 1 et 2 mg/L.

Nous avons utilisé six bocaux Meli par milieu avec six pousses par bocal. Après inoculation des pousses sur les différents milieux d’enracinement, les bocaux sont placés en salle de culture où les conditions de température et d’éclairage sont les mêmes que ceux cités dans les essais précédents.

4.3.2.2. Paramètres observés

L’observation des différents paramètres a été effectuée à deux dates différentes:

- au jour 18 après inoculation;
- au jour 35 après inoculation.

Nous avons noté:

- le pourcentage de pousses enracinées;
- l’importance du cal à la base des pousses;
- le nombre de racines/pousse enracinée;
- la longueur de la racine la plus longue.

4.3.3. Résultats et discussion

4.3.3.1. Effet des différentes auxines sur le taux d'enracinement

L'examen du tableau 4.3, relève qu'au jour 18, la plupart des traitements n'ont pas encore donné de taux élevés d'enracinement; c'est seulement le milieu contenant l'ANA à 2 mg/L qui a abouti à la valeur la plus élevée: 25% d'enracinement. Les plantes pourraient être encore en phase d'induction, et c'est seulement l'émergence et la croissance des racines qui n'ont pas encore eu lieu. Ceci suppose, que cette phase d'induction est assez longue pour l'artichaut, puisque pour d'autres espèces, elle est beaucoup plus courte (exemple: 3-4 j pour le chêne, Kiraly *et al.*, 2001). D'autre part, il a été constaté que, si les auxines avaient parfois des conséquences négatives sur l'enracinement, c'était à cause de leur faible mobilité survenant juste après l'effet inductif qu'elles exercent sur les pousses (Gaspar *et al.*, 1997).

A la fin de la phase d'enracinement, et au jour 35, nous avons relevé une différence hautement significative entre la plupart des traitements (tableau 4.3). C'est l'ANA à 2mg/L qui a donné le pourcentage d'enracinement le plus élevé (91.7%), suivie de la BSAA à 2mg/L (69.4%). Toutefois, à des concentrations moins élevées (1 mg/L), ces deux auxines ont donné des pourcentages d'enracinement significativement moins élevés: 33.3% avec ANA et 22.2% avec BSAA (tableau 4.3).

D'autre part, à 1 mg/L, les pourcentages d'enracinement obtenus avec AIA et AIB étaient les plus significativement bas, cependant, quand nous avons augmenté les concentrations, ces pourcentages se sont améliorés: 25% avec AIA et 38.9% avec AIB. Nos résultats sont confirmés par d'autres auteurs qui ont travaillé sur l'artichaut. Ancora *et al.* (1981), ont obtenu de meilleurs résultats à l'enracinement (58%) avec ANA (à 2 mg/L) qu'avec AIA et AIB. Lauzer et Vieth (1990) n'ont obtenu aucune pousse enracinée avec AIA, cependant avec ANA à 1 et 2.5 mg/L, ils ont obtenu 64% d'enracinement. Kanakis et Demetriou (1993), ont abouti à des résultats beaucoup moins brillants (36% d'enracinement), mais toujours avec la même auxine (ANA à 2 mg/L); enfin, Draoui *et al.* (1993), ont fait enraciner 80% des pousses mises en culture toujours avec 2 mg/L ANA.

L'AIA a souvent donné de faibles pourcentages d'enracinement, surtout quand elle est employée à de faibles concentrations, que ce soit avec l'artichaut (Ancora *et al.*, 1981; Lauzer et Vieth, 1990) ou avec d'autres espèces (Scarpa *et al.*, 2000). Pourtant, étant une auxine naturelle, l'AIA peut être directement absorbée et auto-régulée par les explants pour augmenter la concentration d'auxine endogène à des niveaux permettant la formation de racines adventives; toutefois, cette auxine garde l'inconvénient d'être sensible à la lumière (George, 1993).

Tableau 4.3. Effet des différentes auxines sur le taux d'enracinement des pousses d'artichaut *in vitro*

Auxine (mg/L)	AIA 1	AIB 1	ANA 1	BSAA 1	AIA 2	AIB 2	ANA 2	BSAA 2
Importance du cal	+	+	++	+	+	++	+++	++
Pousses mises en culture	36	36	36	36	36	36	36	36
Pousses enracinées au J18	0	0	6	0	0	0	9	4
% enracinement. Au J18	0 a	0 a	16.7 bc	0 a	0 a	0 a	25 c	11.1 ab
Pousses enracinées au J35	0	4	12	8	9	14	33	25
% enracinement au J35	0 a	11.1 ab	33.3 c	22.2 bc	25 bc	38.9 c	91.7 e	69.4 d

Les moyennes de la même ligne suivies par la même lettre, ne diffèrent pas statistiquement entre elles au seuil de 5%. Importance du cal: + cal peu développé, ++ cal important, +++ cal très développé

D'autre part, l'AIB qui a donné des pourcentages d'enracinement très faibles avec l'artichaut, a été reconnue comme ayant une grande capacité pour activer l'enracinement chez plusieurs autres espèces, vu sa grande stabilité (Mc Cready, 1963; Hartmann *et al.*, 1990), sa capacité à se convertir en AIA (Noiton *et al.*, 1992), et vu qu'elle aboutit dans les tissus à la formation de l'AIB_{sp} (AIB-acide aspartique), qui active l'enracinement mieux que l'AIA (Wiesman *et al.*, 1989). Toutefois, sur artichaut, ces théories n'ont pas pu être vérifiées. Ceci pourrait être du au transport et au métabolisme de l'AIB dans les pousses d'artichaut, espèce difficile à enraciner, qui pourraient être différents des autres espèces, particulièrement celles faciles à enraciner.

En effet, Epstein et Ludwig-Müller (1993) ont étudié le métabolisme de l'AIB exogène appliquée à deux cultivars de *Prunus avium*, l'un facile, et le second difficile à enraciner. L'autofluorographie d'extraits des bases des plantules des deux cultivars, a montré, qu'un jour après l'inoculation sur milieu contenant l'AIB, on ne pouvait pas détecter d'AIB libre dans le cultivar difficile à enraciner, alors que le cultivar facile à enraciner, métabolise l'AIB plus lentement, et l'AIB libre peut encore être détectée. Celle-ci disparaît 2 jours après l'inoculation, mais réapparaît après 4 jours (3 jours avant l'émergence des racines), puis disparaît encore une fois après 7 jours. Les auteurs concluent que le cultivar facile à enraciner, a, contrairement au cultivar difficile à enraciner, la capacité d'hydrolyser l'ester conjugué au bon moment pour libérer l'AIB libre qui active l'initiation racinaire.

Nous avons aussi observé l'importance du cal à la base des pousses, à la fin de la phase d'enracinement, et avons constaté que c'est l'ANA qui stimule la callogenèse plus que les autres auxines, surtout à forte concentration (tableau 4.3); ceci a été confirmé par les travaux de De Klerk *et al.* (1997) et Lauzer et Vieth (1990).

Les différentes auxines ont elles aussi différents impacts sur la croissance de la partie aérienne. Nous avons constaté que l'ANA, l'AIB et la BSAA donnent un meilleur développement des feuilles que l'AIA (figure 4.2).

4.3.3.2. Effet des différentes auxines sur le nombre et la longueur des racines

Les observations du tableau 4.4 montrent qu'au jour 18, et parmi les plantes enracinées avec les différents traitements, se sont celles sur ANA (2mg/L) qui ont donné un nombre de racines et une longueur de racines les plus significativement élevées par rapport aux autres auxines et concentrations utilisées (figure 4.2); ces résultats sont confirmés au jour 35.

Après 35 jours de culture, 1 mg/L d'ANA donne un nombre de racines/plante significativement moins élevé que 2 mg/L: 6.6 pour la première concentration contre 9.8 pour la seconde; néanmoins, la longueur des racines ne varie pas beaucoup. Andrade *et al.* (1999) ont constaté eux aussi que le nombre de racines/pousse enracinée, augmente avec l'augmentation de la concentration d'ANA dans le milieu de culture pour la lavande.

La BSAA à 2 mg/L a donné de bons résultats sur l'artichaut. Gaspar (1995), Kevers *et al.* (1999), et Tadino *et al.* (2003), ont eux aussi obtenu de bons résultats à l'enracinement d'autres espèces avec cette auxine sélénée. Bien que le pourcentage d'enracinement reste peu élevé (69%, tableau 4.3), le nombre de racines/pousse enracinée et la longueur des racines devraient permettre de bons résultats à l'étape ultérieure, à savoir l'acclimatation. Néanmoins, les racines très longues et cassantes rendent l'opération de plantation au moment de l'acclimatation assez difficile.

A 1 mg/L, cette auxine a toutefois donné le nombre de racines/pousse enracinée et la longueur de racine les moins significativement élevés par rapport à toutes les autres auxines.

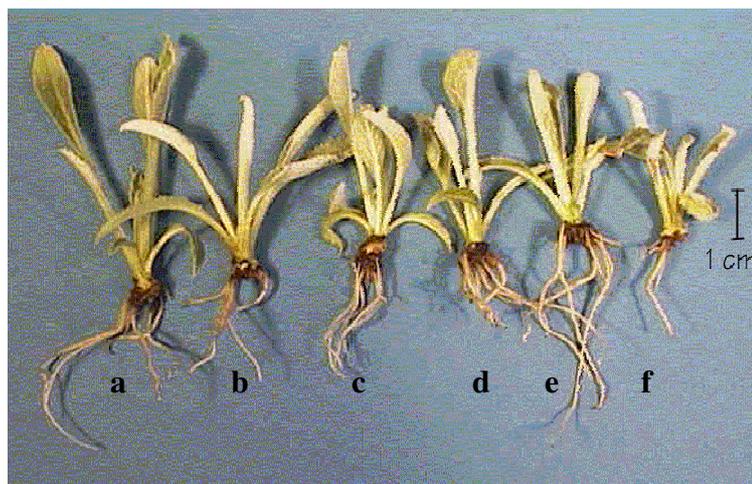
4.3.4. Conclusion

Après analyse des résultats relatifs à cet essai, on peut conclure que parmi les auxines testées (AIA, AIB, ANA et BSAA), c'est l'ANA qui donne les meilleurs taux d'enracinement, suivie de la BSAA. Néanmoins, l'ANA garde l'inconvénient de stimuler la callogenèse. A faible concentration, l'AIA et l'AIB s'avèrent peu efficaces du point de vue du taux d'enracinement; toutefois, quand on augmente la concentration, on observe non seulement une amélioration de ce taux, mais en plus, une nette amélioration de la qualité des racines de point de vue nombre et longueur.

Tableau 4.4. Effet des différentes auxines sur l'enracinement des pousses d'artichaut *in vitro*

Auxine (mg/L)	AIA 1	AIB 1	ANA 1	BSAA 1	AIA 2	AIB 2	ANA 2	BSAA 2
Racines/pousse au J18	0 a	0 a	4.3 ± 0.5 c	0 a	0 a	0 a	6.2 ± 0.4 d	2.2 ± 0.2 b
Racine la + longue (mm) J18	0 a	0 a	31.3 ± 2.6 b	0 a	0 a	0 a	46.3 ± 2.1 c	30.7 ± 1.1 b
Racines/pousse au J35	0 a	3.2 ± 0.2 c	6.6 ± 0.5 d	1.6 ± 0.2 b	3.2 ± 0.2 c	4.5 ± 0.3 c	9.8 ± 0.3 e	3.7 ± 0.2 c
Racine la + longue (mm) J35	0 a	37.0 ± 2.1 c	55.3 ± 1.2 e	15.9 ± 0.9 b	35.4 ± 1.4 c	43.3 ± 1.4 d	51.9 ± 0.8 e	44.9 ± 0.6 d

Les moyennes de la même ligne suivies par la même lettre, ne diffèrent pas statistiquement entre elles au seuil de 5%



a. ANA 1 mg/L; b. BSAA 1 mg/L; c. BSAA 2 mg/L; d. AIB 2 mg/L; e. ANA 2 mg/L; f. AIA 2 mg/L

Figure 4.2. Effet des différentes auxines sur l'enracinement *in vitro* de l'artichaut

4.4. EFFET DE LA β -CYCLODEXTRINE SUR L'ENRACINEMENT *IN VITRO* DE L'ARTICHAUT

4.4.1. Introduction

Devant les difficultés qu'ont trouvé plusieurs auteurs à faire enraciner certaines espèces, les chercheurs ont pensé à utiliser des substances spécifiques qui contribuent d'une manière ou d'une autre à une meilleure action des auxines, et par conséquent à de meilleurs résultats à l'enracinement.

Les cyclodextrines comptent parmi les substances qui ont amélioré l'enracinement des espèces récalcitrantes. Ce sont des carbohydrates cycliques, les plus connus sont: α -cyclodextrine et β -cyclodextrine (avec respectivement 6 et 7 unités glucose), produits à partir d'amidon par conversion enzymatique (Apostolo *et al.*, 2001). Les effets morphologiques et physiologiques de la cyclodextrine sur les plantes ont été reportés par certains auteurs. Mura *et al.* (1995) ont réussi à améliorer l'enracinement *in vivo* de l'olivier par l'utilisation de la α -cyclodextrine. D'autre part, Brutti *et al.* (2000), ont eux aussi obtenu de bons résultats à l'enracinement sur des pousses d'artichaut *in vitro* en additionnant de la β -cyclodextrine au milieu de culture.

Nous avons à notre tour tenté d'améliorer nos résultats par l'utilisation de cette substance.

4.4.2. Matériels et méthodes spécifiques

4.4.2.1. Protocole expérimental

Les explants utilisés dans cet essai proviennent d'une 12^{ème} subculture du stade II de prolifération (milieu MS+AIB 0.1mg/L+mT 0.5mg/L+PBZ 2mM/L), du cultivar 'Violet d'Hyères'. Nous avons maintenu seulement les deux auxines qui ont donné les meilleurs résultats à l'enracinement dans l'essai précédent, à savoir, l'ANA et la BSAA.

Le milieu de base utilisé est toujours le milieu MS dont la composition figure au tableau 2.1; il est additionné de:

- 2 mg/L ANA;
- 2 mg/L BSAA;
- 2 mg/L ANA + 2 g/L β -cyclodextrine;
- 2 mg/L BSAA + 2 g/L β -cyclodextrine.

Le choix de la concentration de 2 g/L de β -cyclodextrine est fait en se basant sur les travaux de Brutti *et al.* (2000) sur artichaut, qui ont constaté que 2 g/L est la dose optimale; une dose de 4 g/L entraîne une forte stimulation de la callogenèse.

Six bocaux Meli par traitement sont utilisés (6 pousses/bocal), et placés après inoculation dans une salle de culture où les conditions de température et d'éclairage sont les mêmes que celles citées dans les autres essais d'enracinement.

4.4.2.2. Paramètres observés

Les paramètres suivants ont été observés cinq semaines après l'inoculation des pousses sur les différents milieux d'enracinement:

- le pourcentage de pousses enracinées;
- le nombre de racines/pousse enracinée;
- la longueur de la racine la plus longue.

4.4.3. Résultats et discussion

L'observation des résultats figurant dans le tableau 4.5 indique que l'addition de β -cyclodextrine au milieu de culture, a nettement amélioré les pourcentages

d'enracinement; en effet, il existe une différence hautement significative entre les traitements contenant la cyclodextrine et ceux n'en contenant pas (tableau 4.5). Nous avons même obtenu 100% d'enracinement en présence d'ANA 2 mg/L. Nos résultats confirment ceux d'autres auteurs. En effet, Mura *et al.* (1995) ont amélioré l'enracinement *in vivo* de boutures d'olivier par l'utilisation de la α -cyclodextrine. Ils ont attribué cette amélioration, à l'augmentation de la solubilité de l'auxine en présence de cyclodextrine. Brutti *et al.* (2000), ont eux aussi réussi à avoir de nettes améliorations du taux d'enracinement de pousses d'artichaut *in vitro*, en ajoutant la β -cyclodextrine au milieu d'enracinement, de même Apostolo *et al.* (2001) avec des pousses de jojoba. Selon eux, puisque l'auxine est déjà soluble dans le milieu de culture, et puisque les cyclodextrines augmentent la perméabilité de la membrane cellulaire (Uekama *et al.*, 1998), l'effet positif de la β -cyclodextrine pourrait être attribué à une interaction altérée entre les auxines et leurs récepteurs.

La β -cyclodextrine, améliore aussi la qualité des racines (figure 4.3). Ajoutée au milieu de culture, elle entraîne une baisse significative au niveau de la longueur des racines tout en maintenant un nombre de racines par plante enracinée assez convenable; en effet, l'ANA seule donne 9.8 racines/plante avec une plus longue racine qui fait 51.9 mm, alors que si on ajoute de la β -cyclodextrine, le nombre de racines est significativement moins important mais reste toujours appréciable puisqu'il devient de 6.5, avec une plus longue racine significativement moins longue puisqu'elle ne fait que 37 mm. La BSAA donne des résultats similaires. De plus, avec ANA seule et un peu moins avec BSAA seule, les racines sont grosses et cassantes, alors qu'après addition de β -cyclodextrine, elles sont fines et souples, ce qui facilite la transplantation.

4.4.4. Conclusion

La β -cyclodextrine améliore nettement l'enracinement de l'artichaut *in vitro*. Cette substance permet non seulement d'avoir des pourcentages élevés à l'enracinement, mais aussi d'améliorer la qualité des racines.

Tableau 4.5. Effet de la β -cyclodextrine sur l'enracinement *in vitro* de l'artichaut

Traitement	ANA 2*	BSAA 2	ANA 2 – CD 2**	BSAA 2 – CD 2
Pousses mises en culture	36	36	36	36
Pousses enracinées	33	25	36	32
% enracinement	91.7 b	69.4 a	100 c	88.9 b
Racines/pousse enracinée	9.8 \pm 0.3 c	3.7 \pm 0.2 a	6.5 \pm 0.2 b	3.6 \pm 0.1 a
Racine la plus longue (mm)	51.9 \pm 0.8 c	44.9 \pm 0.6 b	37.0 \pm 0.7 a	35.7 \pm 0.6 a

Les moyennes de la même ligne suivies par la même lettre, ne diffèrent pas statistiquement entre elles au seuil de 5%.
 CD: β -cyclodextrine, * 2 mg/L, ** 2 g/L



a. ANA 2 mg/L; b. ANA 2 mg/L-CD 2 g/L; c. BSAA2 mg/L-CD 2 g/L; d. BSAA2 mg/L

Figure 4.3. Effet de la β -cyclodextrine sur l'enracinement de l'artichaut *in vitro*

4.5. EFFET DE LA CONCENTRATION EN MACRO-ELEMENTS SUR L'ENRACINEMENT *IN VITRO* DE L'ARTICHAUT

4.5.1. Introduction

La dilution des macro-éléments au stade III, a souvent donné de bons résultats à l'enracinement (George, 1993, 1996). Dans l'essai suivant, nous avons essayé cette méthode d'enracinement dans le but d'optimiser les résultats déjà obtenus.

4.5.2. Matériels et méthodes spécifiques

4.5.2.1. Protocole expérimental

Des pousses provenant d'un rang 13 de subculture, du stade de prolifération (milieu MS+AIB 0.1mg/L+mT 0.5mg/L+PBZ 2mM/L), du cultivar 'Violet d'Hyères', sont inoculées sur différents milieux d'enracinement:

- un milieu MS;
- un milieu MS/2 (tableau 2.1).

Les milieux sont additionnés par l'ANA ou la BSAA à 2 mg/L, hormones et concentrations qui ont donné les meilleurs résultats à l'essai précédent, et de β -cyclodextrines à 2 g/L.

Six bocaux Meli/traitement sont utilisés et placés après inoculation sur les différents milieux en salle de culture (chapitre III).

4.5.2.2. Paramètres observés

Il s'agit toujours des mêmes paramètres, que nous observons 5 semaines après l'inoculation.

- Pourcentage d'enracinement;
- Nombre de racines/pousse enracinée;
- Longueur de la racine la plus longue.

4.5.3. Résultats et discussion

La composition du milieu en macro-éléments ne semble pas être déterminante et l'effet de la dilution n'a pas été observé sur le pourcentage d'enracinement des pousses traitées à l'ANA. Toutefois, cet effet a été observé sur les pousses traitées à la BSAA, puisqu'il existe une différence significative entre les pourcentages d'enracinement des pousses sur MS/2 et celles sur MS, en faveur des premières (tableau 4.6). Moncousin (1981) a observé les mêmes résultats sur artichaut. Par ailleurs, l'effet de la dilution des macroéléments a été aussi observé sur la croissance des racines. En effet, les pousses sur MS/2 donnent un nombre de racines significativement plus élevé que celles sur MS. Ceci, pourrait être du à la réduction de la concentration en NH_4NO_3 ; en

effet certains auteurs ont relevé l'effet inhibiteur de cet élément sur la croissance des racines (George, 1993, 1996; Druart, 1992). Halperin (1967) a même parlé d'une formation de racines restant à l'état primordial quand le milieu contient une concentration élevée en NH_4NO_3 , même en présence d'un apport d'auxine exogène important.

Du point de vue longueur de racine, il existe une différence significative entre les quatre traitements, en faveur des pousses sur MS et ANA 2 mg/L.

Tableau 4.6. Effet de la concentration en macro-éléments sur l'enracinement *in vitro* de l'artichaut

Milieu	MS+ANA2+ CD2	MS+BSAA2+CD2	MS/2+ANA2+CD2	MS/2+BSAA2+CD2
Pousses mises en culture	36	36	36	36
Pousses enracinées	34	31	36	35
% enracinement	94.4 ab	86.1 a	100 b	97.2 b
Racines/pousse enracinée	4.2±0.7 b	3.7±0.7 a	5.2±0.7 d	4.5±0.6 c
Racine la + longue (mm)	37.7±3.3 d	33.1±1.9 a	36.4±3.0 c	35.0±2.4 b

Les moyennes de la même ligne suivies par la même lettre, ne diffèrent pas statistiquement entre elles au seuil de 5%.

4.5.4. Conclusion

Tous les milieux essayés ont donné des pourcentages élevés (85% et plus) de pousses enracinées, la dilution des macro-éléments n'a pas eu une grande influence sur l'enracinement.

4.6. APERCU SUR LES ESSAIS D'ENRACINEMENT NON CONCLUANTS

Différentes techniques utilisées en enracinement et qui ont prouvé leur efficacité sur d'autres espèces, ont été essayés mais les résultats étaient non concluants.

4.6.1. Effet de la taille de l'explant sur l'enracinement de l'artichaut

Il a été démontré par Harbaoui (1982), que les pousses ayant plus de 2 cm s'enracinent mieux que celles qui ont moins de 2 cm. Nous avons dans cet essai mis sur milieu d'enracinement MS (tableau 2.1) additionné de 2 mg/L ANA, des plantules des

cultivars ‘Violet d’Hyères’ et ‘Blanc Oranais’ issues d’une 6^{ème} subculture au stade prolifération:

- Traitement 1: plantules ayant une taille < 2 cm;
- Traitement 2: plantules ayant une taille > 2 cm

Sur un effectif de 120 plantules (5 bocaux Meli/traitement), et cinq semaines après inoculation des pousses sur le milieu d’enracinement, nous avons obtenu seulement deux pousses de ‘Violet d’Hyères’ du traitement 2, enracinées.

4.6.2. Effet de la qualité de la lumière sur l’enracinement de l’artichaut

C’est en nous basant sur les travaux de certains auteurs (Rossi *et al.*, 1993; Bertazza *et al.*, 1995) qui ont démontré l’effet de la qualité de la lumière sur l’enracinement *in vitro*, que nous avons effectué cet essai. Des pousses des deux cultivars testés, provenant d’une 7^{ème} subculture, sont inoculées sur milieu d’enracinement MS (tableau 2.1), contenant 2 mg/L ANA et placées en salle de culture sous différentes lumières:

- une PPFd de 87 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ délivrée par des lampes «white» (osram L 36W/31 Lumilux warm white);
- une PPFd de 87 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ délivrée par des lampes «white-far red» (pour le far red, lampes sylvania F36WT8/2735 far red)
- une PPFd de 130 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ délivrée par des lampes «white»;
- une PPFd de 45 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ délivrée par des lampes «white» (témoin).

Sur les quatre traitements, et après cinq semaines de culture, nous n’avons observé aucune pousse enracinée. En outre, les pousses sous PPFd élevée (87 et 130 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$) se sont nécrosées, alors que les plantes du traitement témoin ont gardé des feuilles vertes ayant une bonne croissance. Rossi *et al.* (1993), ont cependant obtenu de bons résultats à l’enracinement quand ils ont soumis leurs explants à de la lumière rouge.

Dans le même esprit, un autre essai a été mené avec le même type de matériel végétal, pour tester l’effet d’un passage à l’obscurité sur l’enracinement *in vitro* de l’artichaut. Les pousses inoculées sur le même milieu d’enracinement que précédemment sont placées en salle de culture, soit directement à la lumière (PPFd 45 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$, photopériode 16h lumière/8h obscurité) pendant cinq semaines, soit placées pendant

une semaine à l'obscurité puis transférées à la lumière pour y rester durant 4 semaines. Là aussi, aucune plante ne s'est enracinée pour les deux cultivars testés; de plus, les plantes qui ont passé une semaine à l'obscurité se sont nécrosées. Anderson *et al.* (1987) et Rugini *et al.* (1988), ont abouti aux mêmes résultats. Cependant, certains auteurs ont obtenu de nettes améliorations de l'enracinement après passage des plantes à l'obscurité durant une courte période (3 à 10j) après inoculation sur milieu rhizogène (Anderson, 1982; Zimmerman, 1984; Hammerschlag, 1987).

4.6.3. Utilisation de la méthode «double layer»

Dans le but de minimiser les frais dus à la main d'œuvre nécessaire au transfert des pousses d'un milieu d'élongation à un milieu d'enracinement, Maene et Debergh (1985), ont proposé d'ajouter du milieu liquide au milieu solide contenant les pousses. Nous avons mis en culture des pousses des cultivars 'Violet d'Hyères' et 'Blanc Oranais' provenant d'une 8^{ème} subculture sur un milieu d'élongation MS sans hormones (tableau 2.1). Trois semaines après, nous avons soit ajouté du milieu liquide qui n'est autre que le milieu d'enracinement MS/2 (tableau 2.1), additionné de 2 mg/L ANA soit transféré les pousses sur ce même milieu mais gélosé (traitement témoin). Nous avons compté après deux semaines le nombre de pousses enracinées et sur un effectif de 120 pousses, seulement 5 du cultivar 'Violet d'Hyères' sur traitement témoin se sont enracinées. Néanmoins, les pousses de tous les traitements jaunissent et se nécrosent, ceci pourrait être dû au fait qu'elles ont passé trois semaines sur un milieu sans phyto-hormones.

4.7. EFFET DU RANG DE SUBCULTURE SUR L'ENRACINEMENT

***IN VITRO* DE L'ARTICHAUT**

Tous les protocoles expérimentaux des essais pré-cités dans ce chapitre, ont été établis en nous basant, soit sur les résultats obtenus déjà par d'autres auteurs ayant travaillé sur l'artichaut, soit sur ceux d'auteurs ayant obtenu des résultats intéressants en enracinement grâce à différents facteurs chimiques ou physiques essayés, mais sur d'autres espèces.

Les résultats que nous avons obtenu sont plus ou moins intéressants selon les essais; toutefois, nous avons constaté que le rang de subculture a un effet primordial sur l'enracinement *in vitro* de l'artichaut. En effet, le tableau 4.7 qui récapitule tous les essais effectués, et classés par ordre chronologique, montre que, plus on avance dans le temps et dans le rang de subculture, plus les pourcentages d'enracinement obtenus sont élevés. Par conséquent, tous les essais effectués avec des pousses issues des premiers rangs de subculture avaient abouti à l'échec, cependant, plus les rangs de subculture sont supérieurs, et plus les résultats à l'enracinement sont meilleurs.

D'après Druart (1994, 1995), les espèces difficiles à enraciner, réagissent mieux à l'enracinement après plusieurs passages successifs en multiplication.

Tableau 4.7. Relation entre le rang de subculture et les pourcentages d'enracinement obtenus lors des différents essais d'enracinement *in vitro* du cultivar 'Violet d'Hyères'

Essai	1	2	3	4	5	6	7	8
Rang de subculture	6	7	8	9	10	11	12	13
Meilleur % d'enracinement obtenu	1.7	0	4.2	43	66.7	91.7	100	100

Essais: 1.taille de l'explant; 2.lumière; 3. méthode «double layer»; 4.riboflavine; 5. moment d'exposition à l'auxine; 6. auxines; 7. cyclodextrine; 8. concentration en macro-éléments.

Ceci est probablement dû à un rajeunissement du matériel végétal au cours des différentes subcultures. Nous avons remarqué, une évolution de la morphologie foliaire au fil des subcultures; en effet la majorité des feuilles présentaient une morphologie adulte jusqu'à la 8^{ème} subculture (feuilles dentelées), puis vers les rangs supérieurs, les feuilles acquièrent la morphologie d'une plante juvénile (feuilles entières, figure 4.4); ceci explique peut être l'augmentation des pourcentages d'enracinement vers les derniers rangs.

Doorenbos (1965) a depuis des décennies montré que la phase de juvénilité serait caractérisée, outre par ses particularités morphologiques, par sa grande potentialité à former des racines adventives. La diminution partielle ou totale de l'aptitude à

l'enracinement adventif lors du passage de la phase de juvénilité à la phase ultérieure a d'ailleurs été notée par certains auteurs (Doorenbos 1953; Franclet, 1969). Néanmoins, Nozeran (1978) a montré que la possibilité d'un retour au système initial de fonctionnement persiste au niveau de certaines zones de la plante, et semble favorisé par l'emploi des cultures *in vitro*. Quelques années plus tard, le même auteur a avec ses collaborateurs (Nozeran *et al.*, 1982) avancé que le phénomène de rajeunissement pouvait être relié à trois groupes de phénomènes capables d'intervenir concurremment ou non:

- la réduction de la taille du territoire assurant la nouvelle morphogenèse;
- l'arrêt de fonctionnement ou diapause du méristème;
- l'environnement écologique ou corrélatif auquel est soumis ce territoire.

Ils ont en outre précisé que les cultures *in vitro* déclenchent au fil des repiquages, dans le même temps, la miniaturisation du méristème édificateur de la plante, et le retour vers une morphogenèse et des propriétés physiologiques d'une jeune plante. Ces résultats sont appuyés par ceux de Moncousin et Ducreux (1984), qui ont trouvé que des pousses issues de la 15^{ème} subculture se comportent comme des pousses issues de graines vis à vis des traitements rhizogènes. Bigot et Foury (1984), ont eux aussi constaté que les pousses à morphologie juvénile avaient plus d'aptitude à s'enraciner que celles ayant atteint le stade adulte.



Figure 4.4. Plantules à feuilles entières en acclimatation et provenant de l'essai avec la β -cyclodextrine (pousses de la 12^{ème} subculture)

4.8. CONCLUSION

Les différents essais d'enracinement effectués nous conduisent à conclure que l'activité rhizogène des pousses est étroitement liée au rang de subculture dont elles découlent. Donc, si on veut réussir l'enracinement *in vitro* de l'artichaut, c'est surtout à la nature du matériel végétal qu'il faut attacher de l'importance en premier lieu, les traitements inducteurs, que ce soient chimiques ou physiques à utiliser, viennent en deuxième position. Toutefois, si on devrait recommander un milieu d'enracinement adéquat pour l'artichaut ce serait le milieu MS/2 additionné de ANA ou de BSAA à 2mg/L et de β -cyclodextrine à 2g/L.

CHAPITRE V

**UTILISATION DES PEROXYDASES COMME MARQUEUR
BIOCHIMIQUE DE L'ENRACINEMENT *IN VITRO*
ET ETUDE DES CHANGEMENTS ANATOMIQUES
INTERVENANT AU COURS DE LA FORMATION DE
RACINES CHEZ L'ARTICHAUT**

5.1. UTILISATION DES PÉROXYDASES COMME MARQUEUR BIOCHIMIQUE DE L'ENRACINEMENT *IN VITRO* DE L'ARTICHAUT

5.1.1 Introduction

L'organogenèse en général, et chez les plantes cultivées *in vitro* en particulier, est sous le contrôle de certains facteurs tels que les carbohydrates, les conditions de l'environnement (Legrand et Bouazza, 1991), et les interactions entre les phytohormones exogènes et endogènes (Tran Thanh Van, 1981).

Par leur participation à la dégradation oxydative de l'acide indole acétique, les peroxydases sont des enzymes d'un intérêt particulier, du fait qu'elles peuvent modifier la balance hormonale et moduler la morphogenèse des plantes (Gaspar *et al.*, 1982). Donc l'analyse de l'activité peroxydasique à différents stades de la différenciation peut contribuer à la compréhension des changements physiologiques et biochimiques déterminant les processus morphogènes.

Plusieurs auteurs ont pris l'activité peroxydasique comme marqueur biochimique de l'enracinement (Moncousin *et al.*, 1988; Mato *et al.*, 1988; Hausman, 1993; Gonçalves *et al.*, 1998) et ont constaté que celle-ci augmente durant les premiers jours qui suivent l'inoculation des pousses sur le milieu d'enracinement pour atteindre un pic qui précède l'expression de l'enracinement et qui correspond à une variation inverse de la teneur en auxine dans la plante.

D'autre part, Druart *et al.* (1982) et Moncousin et Gaspar (1983), ont constaté que les facteurs physiques et chimiques qui entraînent une augmentation de l'activité peroxydasique durant la phase d'induction ou sa diminution durant le stade d'expression, améliorent l'enracinement. Ceci a des répercussions sur le choix des traitements physiques et chimiques à appliquer sur les pousses *in vitro* en phase d'enracinement et le moment de leur application pour contribuer à l'amélioration des résultats à ce stade.

Dans notre cas, nous avons commencé à obtenir de bons résultats à l'enracinement à partir de la 9^{ème} subculture (après plus de onze mois de la mise en culture des méristèmes), de tels résultats n'intéresseront certes pas des entreprises industrielles. Par contre, l'utilisation de l'activité peroxydasique comme marqueur biochimique de

l'enracinement serait intéressante dans le sens où elle nous permettrait de déterminer le moment adéquat de l'application des facteurs chimiques ou physiques inducteurs de l'enracinement et aptes à moduler cette activité peroxydasique dans les pousses en cours d'enracinement.

Nous allons dans cet essai montrer la relation qui pouvait exister après un traitement rhizogène des pousses moyennant des auxines, entre un critère morphologique qui est l'aptitude à la rhizogenèse et un critère biochimique qui est l'évolution de l'activité peroxydasique des explants.

5.1.2. Matériels et méthodes spécifiques

5.1.2.1. Matériel végétal et milieux de culture

Des pousses du cultivar 'Violet d'Hyères' issues d'une 20^{ème} subculture de la phase de prolifération (milieu MS+AIB 0.1mg/L+mT 0.5mg/L+PBZ 2mM/L), sont repiquées sur différents milieux d'enracinement:

- MS/2 sans auxines (traitement témoin)
- MS/2+ANA 2mg/L
- MS/2+BSAA 2mg/L
- MS/2+ANA 2mg/L+ β -CD 2g/L
- MS/2+BSAA 2mg/L+ β -CD 2g/L

Par le choix de ces milieux nous avons voulu voir d'une part l'effet de la nature de l'auxine sur l'évolution de l'activité peroxydasique (l'ANA et la BSAA sont les auxines qui ont donné les meilleurs résultats à l'enracinement lors des essais précédents) par rapport à un milieu sans auxines et d'autre part l'effet de la β -CD sur cette évolution.

Nous avons utilisé dix pots Meli par traitement (avec 6 pousses/Meli), que nous avons placé après inoculation des pousses sur les différents milieux en salle de culture (voir chapitre II) pendant cinq semaines.

5.1.2.2. Extraction et activité des peroxydases

L'activité peroxydasique des pousses installées sur les différents milieux d'enracinement a été déterminée à partir du jour 0 et jusqu'au jour 12. Nous avons préparé les extraits enzymatiques de la manière préconisée par Gaspar et Van Hoof (1976) qui consiste à broyer dans un mortier froid 250mg de feuilles fraîches de pousses d'artichaut dans 2.5ml de solution tampon phosphate (pH 6.1; 0.06M, préparée à partir de solutions mères de phosphate de sodium monobasique et phosphate de sodium dibasique). Le mélange est ensuite centrifugé à 15000 rpm pendant 10 min à l'aide d'une centrifugeuse réfrigérée (4°C) (centrifugeuse Heraeus, biofuge primo R). Le surnageant obtenu est ensuite clarifié par une 2^{ème} centrifugation à 6000 rpm pendant 5min. Le 2^{ème} surnageant obtenu sert d'extrait d'enzyme pour l'analyse de l'activité peroxydasique globale, qui est déterminée dans un milieu réactionnel contenant:

- 100µL de H₂O₂, 10mM
- 100µL de guaïacol 20mM
- 700µL de tampon phosphate (pH 6.1; 0.06M)
- 100µL de l'extrait d'enzyme.

La réaction est déclenchée après addition de l'extrait enzymatique à ce milieu réactionnel. Après homogénéisation, l'activité peroxydasique est déterminée par dosage du tétraguaïacol formé à partir du guaïacol d'après la réaction de la figure 5.1. En effet, la peroxydase est une enzyme spécifique du peroxyde d'hydrogène comme accepteur d'hydrogène mais tolère divers substrats RH₂ comme donneur d'hydrogène, par exemple des dérivés phénoliques comme le méthoxyphénol (guaïacol). Incolore au départ, il prend rapidement une teinte brune qui absorbe la lumière dans le bleu ou le vert lorsqu'il est oxydé. Cette propriété rend alors possible l'étude de la cinétique enzymatique par spectrophotométrie.

L'activité peroxydasique est déterminée après lecture de l'absorbance à 470nm (spectrophotomètre UVIKON 930).

5.1.2.3. Dosage des protéines

L'activité peroxydasique est exprimée par mg de protéines, pour chaque échantillon nous avons donc effectué le dosage des protéines par la méthode de Bradford (1976) basée sur l'interaction du bleu de Coomassie G-250 avec les protéines. La solution passe du bleu au rouge brun avec un maximum d'absorbance se décalant de 465 à 595 nm. Le «Bovin Serum Albumin» a été utilisé comme standard.

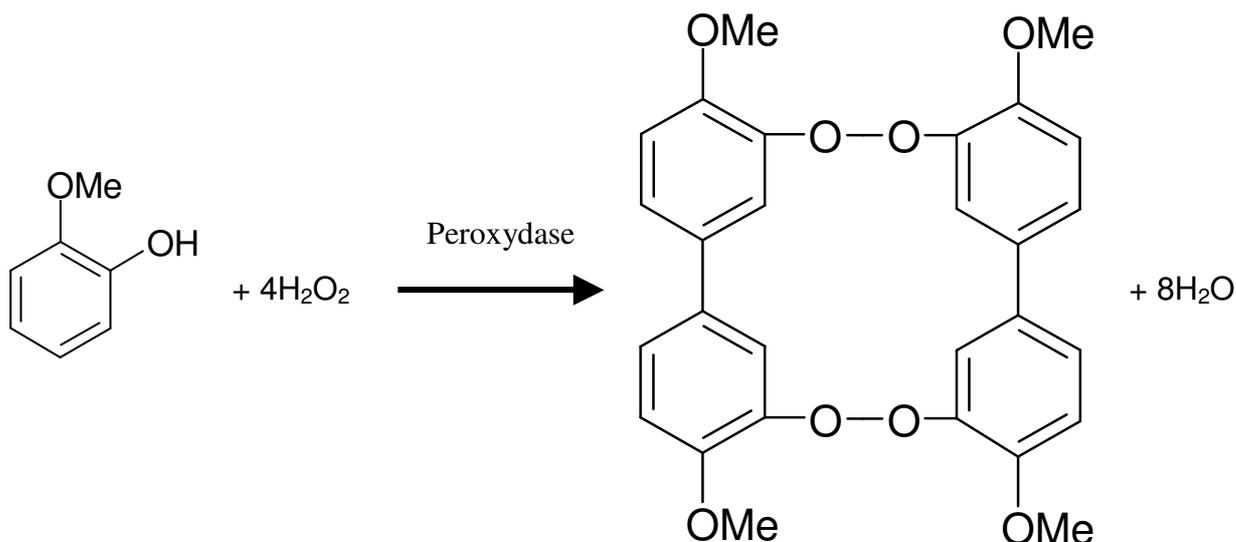


Figure 5.1 Réaction du guaiacol en présence de peroxyde d'hydrogène

5.1.2.4. Paramètres observés

Pour l'aptitude à la rhizogenèse, nous avons noté pour chaque traitement le nombre de pousses enracinées après 18 et 35 jours de culture.

Pour l'activité peroxydasique, nous avons fait chaque jour (à partir du jour 0 de l'inoculation et jusqu'au jour 12) l'extraction de l'extrait enzymatique à partir des pousses de chaque traitement et nous avons dosé les protéines et mesuré l'activité peroxydasique, à partir de chaque échantillon.

5.1.3. Résultats et discussion

Le tableau 5.1 montre que certaines pousses, inoculées sur les milieux contenant une auxine ont commencé déjà à émettre des racines à partir du jour 18, alors que sur le milieu témoin aucune pousse ne s'est enracinée. L'ANA donne un enracinement

significativement meilleur que la BSAA, plus de 55% vs. 30 à 40%. D'autre part, il n'existait pas de différences significatives (au seuil de 5%) entre les milieux contenant la même auxine, aussi bien au jour 18 qu'à la fin du stade d'enracinement, c'est à dire au jour 35. Autrement dit, la cyclodextrine n'a pas d'effet significatif sur l'enracinement, quoique les pourcentages soient légèrement améliorés.

Tableau 5.1 Effet des différents traitements rhizogènes sur la capacité d'enracinement des pousses d'artichaut *in vitro*

Milieu	MS/2	MS/2+ANA2*	MS/2+BSAA2*	MS/2+ANA2+CD2**	MS/2+BSAA2+CD2
Pousses mises en culture	36	36	36	36	36
Pousses enracinées J18	0	20	11	22	14
%enracinement J18	0 a	55.6 c	30.6 b	61.1 c	38.9 b
Pousses enracinées J35	9	36	33	36	35
%enracinement J35	25 a	100 c	91.7 b	100 c	97.2 bc

Les moyennes de la même ligne suivies par la même lettre ne diffèrent pas statistiquement entre elles au seuil de 5%.

* ANA et BSAA: 2mg/L; ** β -cyclodextrine: 2g/L

Par ailleurs, l'observation de la figure 5.2 montre que les courbes relatives aux différents traitements rhizogènes, à part celle qui correspond au traitement MS/2+BSAA 2mg/L, suivent toutes l'évolution de la courbe typique de l'activité peroxydasique présentée par Gaspar (1981), qui consiste en une augmentation de l'activité durant les premiers jours du traitement jusqu'à l'atteinte d'un pic suivi d'une diminution de cette activité. On ne peut pas exclure que les résultats inattendus obtenus avec le traitement MS/2+BSAA2 mg/L, soient dus à une mauvaise extraction de l'enzyme ou à une défaillance au niveau du spectrophotomètre.

Avec ANA 2mg/L et β -CD 2g/L dans le milieu d'enracinement, nous obtenons d'une part le pourcentage d'enracinement significativement le plus élevé au jour 18 (61.6%) et au jour 35 (100%), et d'autre part le pic peroxydasique le plus significativement élevé aussi (232 ± 2.6 μ g/mg protéines), et qui survient le premier (au jour 5) par rapport aux autres courbes.

En outre, la diminution de l'activité peroxydasique au niveau de cette courbe est relativement plus rapide. Nous remarquons aussi que, plus l'activité peroxydasique chute rapidement après le pic, plus les réponses au test rhizogène sont meilleures au jour 18 (tableau 5.1).

Avec BSAA 2mg/L et β -CD 2g/L, nous avons toujours un pic au jour 5 mais qui correspond à une activité peroxydasique moins élevée que la précédente ($212.3 \pm 4.5\mu\text{g}/\text{mg}$ protéines). Toutefois, l'absence de β -CD du milieu de culture, entraîne une apparition retardée du pic de peroxydases qui n'intervient qu'au 6^{ème} jour, mais ceci n'a eu aucune répercussion sur le pourcentage d'enracinement (tableau 5.2). D'autre part, nous avons noté l'existence d'une corrélation positive entre l'activité rhizogène et la hauteur du pic d'activité peroxydasique (figure 5.3). En effet, pour des pics à activité peroxydasique faible, nous avons obtenu de faibles pourcentages d'enracinement, pour ceux à activité peroxydasique élevée, l'activité rhizogène était forte (tableau 5.2). Kevers *et al.* (1991), infirment nos résultats puisqu'ils n'ont trouvé aucune relation entre ces deux facteurs.

L'ensemble de nos résultats confirme ceux d'autres auteurs. Moncousin et Gaspar (1983, 1988), Mato *et al.* (1988) et Hausman (1989), ont en effet noté la même évolution de l'activité peroxydasique au cours de l'enracinement, c'est à dire, une augmentation de cette activité durant les premiers jours du traitement rhizogène, jusqu'à un pic, suivi d'une baisse de cette activité; les racines n'apparaissent jamais avant ce pic. D'après ces mêmes auteurs, la première partie de cette courbe (avant le pic), correspond à la phase d'induction de la rhizogenèse, et la deuxième (après le pic) à la phase d'initiation racinaire.

La figure 5.2 montre également, que même les pousses sur milieu sans auxine ont eu une évolution de l'activité peroxydasique similaire à celle des pousses traitées par l'auxine, mais de moindre ampleur. Toutefois, Hausman (1993), n'a noté aucune évolution de l'activité peroxydasique de pousses de peuplier sur milieu sans auxine; le pic d'activité peroxydasique précédant l'enracinement n'a été observé qu'avec les pousses traitées à l'ANA, alors que nos résultats sont en accord avec ceux de De Klerk *et al.* (1989). En effet, ils ont obtenu des courbes d'activité peroxydasique similaires à la courbe typique aussi bien pour les pousses sur milieu contenant une auxine que pour

celles sur milieu n'en contenant pas, mais avec de plus faibles valeurs pour ce dernier. D'autre part, il a été démontré par plusieurs auteurs (Moncousin et Gaspar, 1983; Hausman, 1993; Blakesley *et al.*, 1991), que la variation de l'activité peroxydasique quand on passe de la phase inductive à la phase initiatrice de l'enracinement correspond à une variation inverse du niveau d'auxine endogène dans la plante, et que le pic d'activité de cette enzyme correspond à une période durant laquelle les pousses ont un très faible niveau d'auxine. La chute d'activité peroxydasique correspond à une remontée du niveau auxinique endogène. Auderset *et al.* (1994), ont en effet mesuré l'activité peroxydasique et l'AIA dans des pousses de *Malus* en cours d'enracinement, et ont constaté une évolution antagoniste de l'activité peroxydasique et de l'AIA libre.

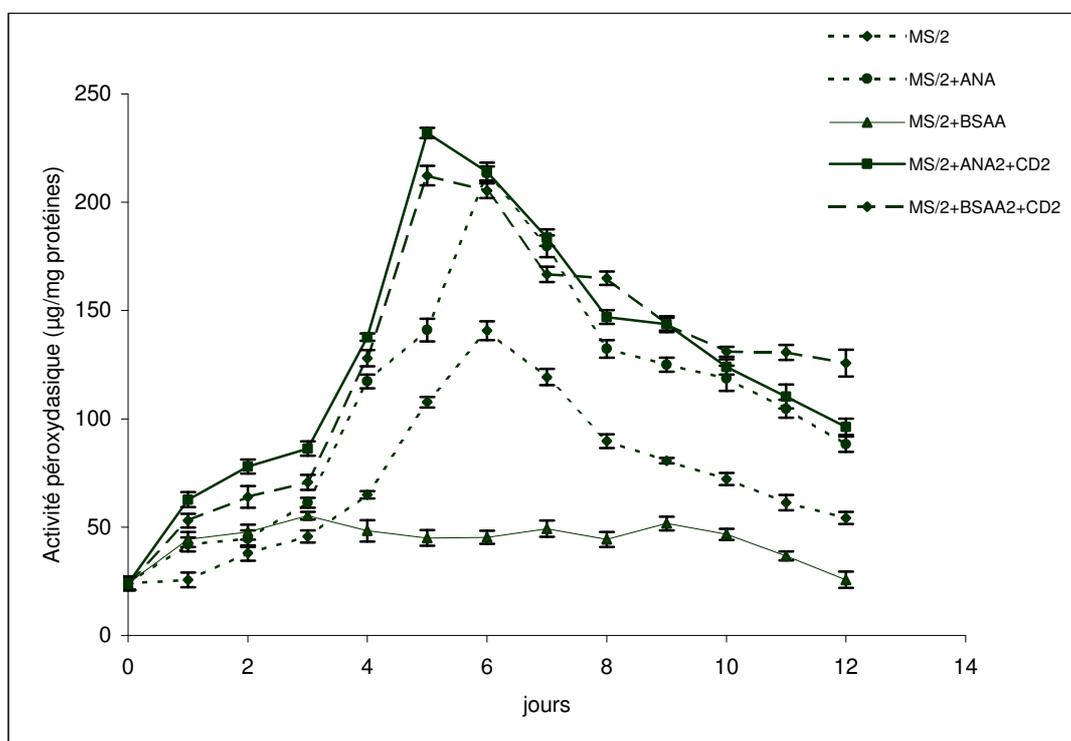


Figure 5.2. Evolution de l'activité peroxydasique au cours de l'enracinement *in vitro* de l'artichaut

La détermination de la courbe d'activité peroxydasique pour un matériel végétal en enracinement est très importante, spécialement pour les espèces difficiles à enraciner. En effet, elle nous permet de déterminer le moment opportun auquel nous devrions appliquer les facteurs physiques et/ou chimiques capables d'augmenter cette activité

durant la phase d'induction ou la baisser durant la phase d'expression, en vue d'améliorer les résultats à l'enracinement (Druart *et al.*, 1982; Moncousin et Gaspar, 1983).

Berthon *et al.* (1993) ont utilisé certains composés phénoliques comme contrôleurs de l'activité peroxydasique dans des pousses de *Sequoiadendron* en enracinement. Ils ont alors constaté que des composés phénoliques qui sont capables d'augmenter l'activité peroxydasique, tel que l'acide gallique, augmentent aussi le pourcentage d'enracinement quand ils sont appliqués durant la phase d'induction, alors que des composés qui entraînent une baisse de cette activité peroxydasique tel que la rutine, entraînent une amélioration de l'activité rhizogène quand ils sont appliqués durant la phase d'expression de la rhizogénèse. Ceci suggère, que les composés phénoliques qui sont connus comme inhibiteurs de la formation de racines (Jones et Hopgood, 1979), peuvent au contraire améliorer la formation de racines s'ils sont appliqués durant la phase appropriée de la rhizogénèse.

Tableau 5.2. Relation entre le jour d'apparition et la hauteur du pic peroxydasique et le pourcentage d'enracinement *in vitro* de l'artichaut

Traitement	Hauteur du pic ($\mu\text{g}/\text{mg}$ protéines)	Jour d'apparition du pic	% enracinement au jour 35
MS/2	140.7 \pm 4.3	6	25
MS/2+ANA2*	213.3 \pm 3.2	6	100
MS/2+BSAA2*	-	-	91.7
MS/2+ANA2+CD2**	232 \pm 2.4	5	100
MS/2+BSAA2+CD2	212.3 \pm 4.5	5	97.2

* ANA et BSAA: 2mg/L; ** β -cyclodextrine: 2g/L

5.1.4. Conclusion

Pour des plantes difficiles à enraciner *in vitro* comme l'artichaut, l'activité peroxydasique pourrait être un bon marqueur biochimique, dans le sens où elle nous permet de cerner les différentes phases de l'enracinement, et par conséquent savoir à quel moment il faut intervenir pour appliquer les traitements inducteurs de la rhizogénèse.

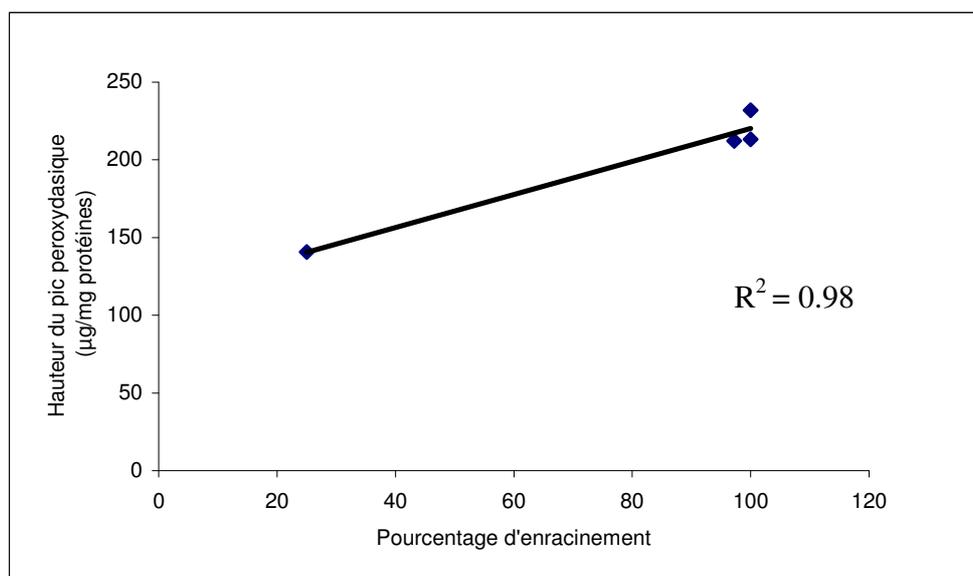


Figure 5.3. Corrélation entre le pourcentage d'enracinement et la hauteur du pic de peroxydases

5.2. ETUDE DES CHANGEMENTS ANATOMIQUES AU COURS DE LA FORMATION DE RACINES *IN VITRO* DE L'ARTICHAUT

5.2.1. Introduction

La compétence cellulaire est l'aptitude des cellules à répondre à un stimulus inducteur qui orientera leur développement ultérieur vers un processus de différenciation. Mais souvent, les cellules ne deviennent compétentes qu'après un prétraitement. Pour des pousses cultivées *in vitro*, les cellules se trouvant dans un stade de «compétence» organogène, soit initialement, soit après dédifférenciation, sont capables de réagir aux inducteurs exogènes tels que auxines, cytokinines, éthylène, etc... (Favre, 1980).

Dans le cas de l'enracinement *in vitro*, les explants sont soumis généralement à un traitement auxinique. En effet, il a été souvent avancé, que les auxines ont un rôle important dans l'enracinement adventif (Davis *et al.*, 1988), vu qu'elles peuvent créer une balance hormonale favorable à l'enracinement. Cette idée émane des résultats obtenus suite aux différents essais d'enracinement, constatant que les auxines

exogènes induisent la formation du plus grand nombre de racines par rapport à toutes les autres substances utilisées.

Différents aspects de l'enracinement *in vitro* de l'artichaut ont été étudiés mais pas à notre connaissance l'aspect histologique et cytologique. Le but de cette étude, est donc, d'étudier et de suivre les différentes modifications cytologiques et anatomiques intervenant au cours de l'enracinement *in vitro* de l'artichaut. Nous avons voulu aussi déterminer les différents stades ontogéniques de la rhizogenèse et voir s'ils correspondent bien avec ce qui a été avancé dans la littérature pour d'autres espèces. En effet, d'après Favre (1973) et Moncousin (1991), il existe quatre stades ontogéniques de l'enracinement:

- le premier stade est marqué par des modifications cytologiques et consiste essentiellement en une activation générale au niveau de la base de l'explant;
- le second stade est caractérisé par l'apparition de divisions cellulaires qui vont aboutir à la formation d'une masse primaire de cellules méristématiques que plusieurs auteurs ont appelé «champ morphogène» (Favre, 1980; Auderset *et al.*, 1994);
- au cours du troisième stade, ces champs morphogènes vont s'organiser pour donner un méristème racinaire;
- le dernier stade correspond aux premiers stades de croissance du méristème racinaire et à l'émergence de la première racine.

Ces quatre stades correspondent par conséquent à des phénomènes très importants se déroulant simultanément:

- une dédifférenciation;
- une formation d'amas de cellules méristématiques, et
- une différenciation et une organisation de ces amas méristématiques en primordiums racinaires qui vont se développer plus tard en jeunes racines.

La présente étude vise à déterminer ces différents stades pour une meilleure compréhension de l'enracinement *in vitro* de l'artichaut.

5.2.2. Matériels et méthodes spécifiques

Le matériel végétal utilisé provient des mêmes traitements utilisés pour le dosage des peroxydases (voir 5.1.2.2), mais nous nous sommes limités au traitement témoin sans auxines et au traitement avec ANA 2mg/L et β -cyclodextrine 2g/L. A partir du jour 0 de l'inoculation sur les différents milieux d'enracinement, et jusqu'au jour 12, nous avons prélevé sur les pousses des différents traitements les cinq derniers millimètres de la partie basale. Ces portions de tiges vont subir les différents traitements en vue de préparer les coupes histologiques (voir chapitre II, 2.5). L'épaisseur de ces coupes est de 8 μ m. L'observation des coupes est effectuée sous microscope (Zeiss).

Les observations portent sur les modifications anatomiques survenues durant les 12 premiers jours du traitement auxinique sur les pousses en enracinement.

5.2.3. Résultats et discussion

L'observation des coupes nous laisse penser que les premières modifications histologiques au niveau des pousses en enracinement, ont été notées au 4^{ème} jour après leur inoculation sur un milieu d'enracinement. En effet, nous avons noté une dédifférenciation et un début d'activité mitotique des cellules du parenchyme interfasciculaire avoisinant les faisceaux vasculaires. Cette phase de dédifférenciation marquée par l'augmentation du volume des nucléoles et de la densité cytoplasmique (Favre, 1980), commence vers la 90^{ème} heure, et est suivie d'une activation et un épaissement du cambium intra-fasciculaire, qui par conséquent devient plus épais qu'au jour 0 (figure 5.4-A et B). A ce moment, la plupart des régions interfasciculaires deviennent sujettes à une dédifférenciation qui est particulièrement active aux environs des centres méristématiques fasciculaires (Viane, 2001). Ces mêmes modifications ont été observées mais à des moments plus ou moins précoces par d'autres auteurs. En effet, Auderset *et al.* (1994), les ont observé à partir de la 40^{ème} heure sur pommier, et De Klerk *et al.* (1995) après seulement 24h. Toutefois, Gonçalves *et al.* (1998) confirment nos résultats, puisqu'ils ont noté les premières modifications cytologiques sur châtaignier en enracinement 3 à 4 jours après le début du traitement auxinique.

Nous avons d'autre part observé que le nombre de cellules en division augmente, et on note la formation de ce que certains auteurs ont appelé méristémoïdes (Hicks, 1986; Auderset *et al.*, 1994). Ces méristémoïdes se développent vers l'extérieur en augmentant de volume, et le nombre de cellules augmente, résultat de leurs divisions. Les méristémoïdes continuent progressivement d'être individualisés et la polarité des divisions donne au 12^{ème} jour la forme pointue typique du primordium racinaire (figure 5.4-E). Les divisions périclinales des cellules dans les couches les plus externes du primordium forment une assise tissulaire qui aboutira postérieurement à la coiffe (Viane, 2001) (figure 5.5-A).

D'un autre côté nous avons observé au 6^{ème} jour l'installation au voisinage des tissus conducteurs des champs morphogènes constitués à partir de cellules qui sont devenues compétentes et qui à la suite de nombreuses mitoses ont donné ces petits massifs méristématiques ou méristémoïdes (figure 5.4-C et D). Favre (1980) et Hicks (1986), ont constaté les mêmes événements respectivement sur la vigne et le pommier au cours de leur enracinement *in vitro*.

Au niveau de ces massifs méristématiques, les divisions cellulaires sont d'abord éparses, se localisent ensuite spécifiquement. Divisions et allongement se polarisent: les cellules de la région basale et interne se cloisonnent transversalement et s'allongent d'une façon radiale en constituant l'ébauche du cylindre central. Dans la région apicale et superficielle, des recloisonnements parallèles à la surface du massif méristématique conduisent à la mise en place de l'écorce et de la coiffe de la future racine (Favre, 1980; Viane, 2001).

L'entrée en croissance des racines adventives néoformées, suppose la traversée des tissus dans lesquels elles ont pris naissance. Au niveau du passage de la racine adventive, les cellules corticales se séparent par rupture de la lamelle moyenne, elles s'affaissent et leur contenu en protéines et en acides nucléiques disparaît, ce qui implique l'activité de pectinases, de protéases et d'enzymes hydrolisant les acides nucléiques (Bell et Mc Kully, 1970).

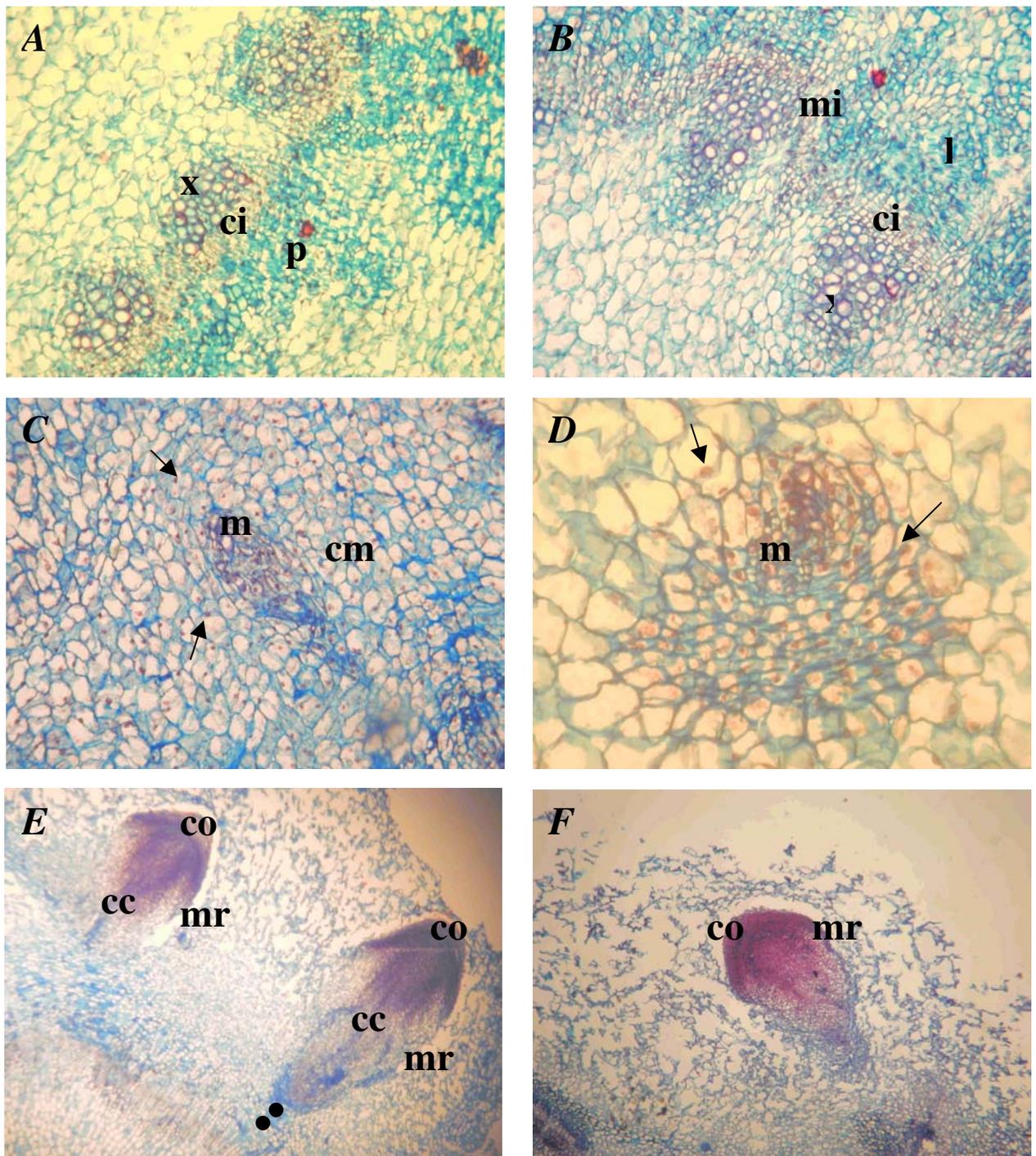


Figure 5.4: Variations anatomiques au cours de l'enracinement *in vitro* de l'artichaut.

P: phloème, x: xylème, ci: cambium intra-fasciculaire, mi: méristème inter-fasciculaire, i → indique les noyaux des cellules ● indique la connexion entre le méristème racinaire et la pousse.

A. Coupe au jour 0. B. coupe au jour 4 après l'inoculation sur milieu d'enracinement, on note la formation de méristèmes inter-fasciculaires et un épaissement du cambium intra-fasciculaire.

C. Formation d'un champ morphogénique et développement d'un méristemoïde au jour 6.

D. Divisions cellulaires intenses au niveau des méristemoïdes (jour 6), les flèches montrent les noyaux des cellules. E. Au jour 12, apparition des méristèmes racinaires qui peuvent naître à partir de la pousse elle-même ou à partir du cal développé à la base de la pousse comme le montre la photo, notez la direction de la racine par rapport à celle de la tige (F).

A, B, C, E et F: grossissement x100; D: grossissement x250

Ceci nous amène à constater que les racines développées *in vitro* chez l'artichaut peuvent avoir deux origines. Elles peuvent naître soit directement à partir des cellules de la tige, plus précisément au niveau du cambium et des méristèmes interfasciculaires, (figure 5.4-E). Dans ce cas la connection vasculaire existe entre la future racine et la pousse, ceci étant confirmé par l'existence de trachéides au niveau de la base de ces méristèmes racinaires (figure 5.5-B).

Une deuxième possibilité est qu'elles naissent indirectement à partir de cellules devenues compétentes, s'étant organisé en champs morphogènes, (figure 5.4-F). Dans ce dernier cas la connection vasculaire entre la racine et la pousse est faible sinon absente et on a à faire à des racines formées à partir des tissus superficiels et des tissus du cal (Bouza *et al.*, 1994).

Ceci aura une répercussion plus tard sur le comportement de la plantule au moment et au cours de l'acclimatation. En effet, Gonçalves *et al.* (1998), ont constaté que des racines ayant pour origine les tissus profonds de la plantule donnent de meilleurs pourcentages de survie et de croissance à l'acclimatation que des racines naissant à partir des tissus superficiels. Ces dernières ayant des connections vasculaires très faibles, risquent d'une part le détachement au moment de l'acclimatation, et d'autre part limitent le mouvement de l'eau et par conséquent le développement de la plante.

Nos résultats sont confirmés par ceux de De Klerk *et al.* (1995) qui ont pu eux aussi constater que les racines adventives formées sur des pousses de pommier *in vitro* peuvent naître soit directement à partir des cellules de la tige, soit indirectement via un cal.

L'ensemble des modifications anatomiques observées sur des pousses d'artichaut en cours d'enracinement *in vitro*, nous conduit à retrouver les différents stades ontogéniques mentionnés en introduction, à savoir, la dédifférenciation, la formation de méristémoïdes et la différenciation de ceux-ci en primordia racinaires.

Nous avons d'autre part noté les variations intervenant au niveau de toute la coupe à différents moments de l'enracinement. L'examen de la figure 5.5 montre qu'au jour 8, nous assistons au début de formation d'un primordium racinaire (C), au jour 10, celui-ci va encore percer les tissus dans lesquels il a pris naissance (D) pour émerger vers l'extérieur, et au jour 12 (E), nous remarquons le développement d'un plus grand

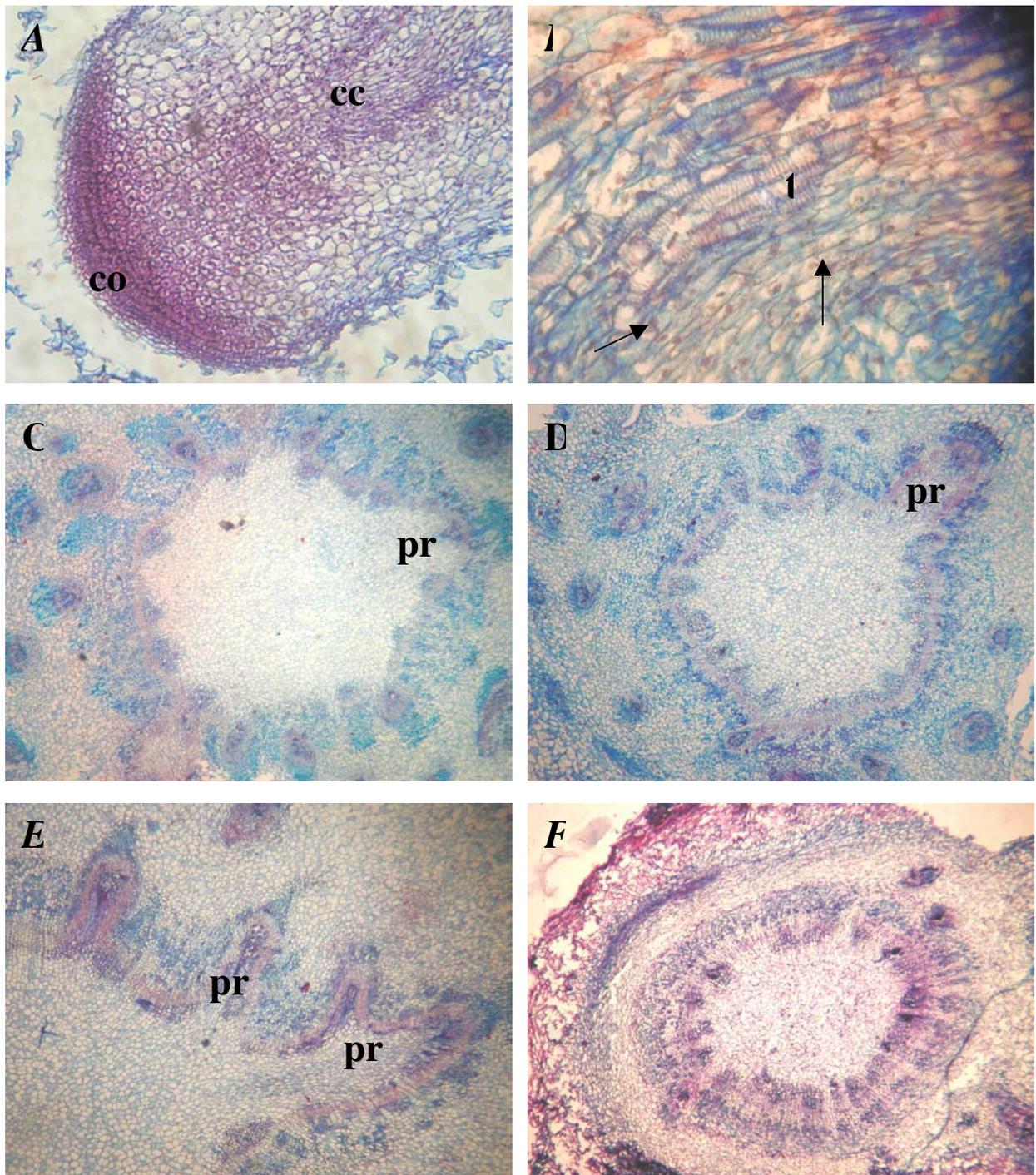


Figure 5.5. Variations anatomiques au cours de l'enracinement *in vitro* de l'artichaut

Co: coiffe, cc: cylindre central, t: trachéide, pr: primordium racinaire, → noyaux

A. Méristème racinaire présentant la structure typique de la racine avec la coiffe et le cylindre central. B. zone de connexion (● sur figure 5.4-E) riche en trachéides et en cellules en intense multiplication. C. coupe au jour 8 après inoculation sur milieu d'enracinement, le primordium racinaire commence à se former. D. au jour 10, le primordium émerge encore plus vers l'extérieur. E. apparition de plusieurs primordia racinaires au jour 12. F. structure anatomique au jour 16 du traitement témoin (milieu sans auxines), on retrouve la structure typique d'une tige sans aucune autre modification.

A et B: grossissement x250; C, D, E et F: grossissement x25

nombre de primordia racinaires émergeant d'un seul côté de la tige, ceci aboutira plus tard à une plantule ayant des racines se trouvant toutes du même côté (figure 5.6).

D'un autre côté l'examen d'une coupe histologique relative au traitement témoin (F) (pousses sur milieu sans auxine), effectuée au jour 16, ne révèle aucune modification anatomique à part celle d'une coupe typique de tige.

5.2.4. Conclusion

L'analyse des modifications cytologiques-anatomiques au cours de l'enracinement *in vitro* de pousses d'artichaut nous laisse conclure que les racines adventives peuvent avoir deux origines, soit les cellules profondes de la tige soit les cellules superficielles appartenant au cal basal. D'autre part nous avons pu identifier les différents stades ontogéniques de l'enracinement adventif: dédifférenciation (figure 5.4-B), organisation en amas méristématiques (figure 5.4-C et D), et différenciation des méristèmes racinaires (figure 5.4-E et F).



Figure 5.6. Apparition des racines sur le même côté (flèche) sur une plantule d'artichaut enracinée *in vitro*

CHAPITRE VI

**ETUDE DE L'ACCLIMATATION DES VITROPLANTS
D'ARTICHAUT**

6.1. INTRODUCTION

La production de plusieurs plantes, entre autres l'artichaut, par micropropagation *in vitro* reste peu exploitée à l'échelle industrielle et commerciale. Ceci est dû principalement au coût élevé de la main d'œuvre nécessaire à l'élaboration de ce type de plantes et aux échecs notés au niveau de l'acclimatation. Cette phase est très critique puisqu'elle concerne le passage des pousses ou plantes d'un environnement à un autre totalement différent, entraînant généralement de grandes modifications morphologiques, anatomiques et physiologiques. Ces changements d'environnement impliquent le passage: d'une mixotrophie vers une autotrophie; d'un milieu avec carbohydrates à un milieu sans; d'une quasi absence de contaminants vers une présence de ceux-ci et d'une lumière faible vers la pleine lumière. Ces modifications vont aboutir au développement d'un phénotype différent de celui développé en conditions de culture normales. C'est pour cette raison qu'il est préférable de soumettre les pousses ou plantules à acclimater à une phase intermédiaire entre le laboratoire et la serre ou le plein champ, afin que l'acclimatation se fasse de manière progressive, et afin d'éviter tout choc physiologique à la pousse ou la plante.

Afin de réussir la phase acclimatation, il est primordial de donner une importance particulière aux facteurs température, lumière et surtout humidité relative. En effet, suite aux conditions de confinement créées *in vitro*, les feuilles des vitroplants ont une couche cireuse sur l'épiderme qui diffère de celle d'une plante *ex vitro*; de plus, la morphologie et la densité des stomates est souvent modifiée et leur fonctionnement est altéré. Les cellules palissadiques sont moins abondantes et contiennent moins de chlorophylle (Wetzstein et Sommer, 1982, 1983). Toutes ces modifications anatomiques au niveau des feuilles rendent les vitroplants sujets au problème de pertes d'eau excessives par transpiration. L'exposition des vitroplants à des conditions de température, lumière et humidité relative proches de celles auxquelles elles étaient exposées au laboratoire, particulièrement les premiers jours qui suivent la sortie des récipients de culture amoindrit ce risque, quoique cette étape soit assez onéreuse.

L'artichaut est une espèce très difficile à enraciner et à acclimater. Les résultats obtenus au chapitre IV nous ont permis de surmonter le problème de l'enracinement; en effet, nous avons pu obtenir des pourcentages d'enracinement de 100%. Dans ce

chapitre, nous allons étudier l'acclimatation. Différents aspects seront traités: les conditions de l'environnement propices à l'acclimatation et leurs effets sur la réussite de la reprise; les modifications anatomiques intervenant au niveau de la feuille et de la racine quand on passe de l'*in vitro* à l'*ex vitro*.

6.2. MATERIELS ET METHODES SPECIFIQUES

6.2.1. Matériel végétal

Les pousses soumises à l'acclimatation sont soit des pousses ayant été enracinées *in vitro* (voir chapitre 4) soit des pousses sans racines et qui devraient s'enraciner pendant la phase d'acclimatation. Dans les deux cas, se sont des pousses à feuilles entières d'un vert foncé et couvertes dans leur majorité par un duvet; elles ont toutes une taille supérieure à 30 mm.

6.2.2. Acclimatation

6.2.2.1. Réipients et substrats de culture

Les pousses obtenues *in vitro*, qu'elles soient enracinées ou non, sont d'abord lavées et débarrassées de leur gélose. Celles qui n'ont pas de racines sont débarrassées de leur partie basale généralement callogène, et immergées dans une solution d'ANA (4 mg/L) pendant 6 heures. Les pousses sont ensuite repiquées dans des plaques alvéolées "multi-trays" contenant un substrat formé de 90% tourbe et 10% sable (Structural™ 9A). Deux semaines après, les pousses et/ou plantules sont transplantées dans des pots de 11cm de diamètre contenant un substrat formé de 85% tourbe, 7.5% perlite et 7.5% de tourbe grossière (50% Structural™ 6A type 1 + 50% Structural™ 8A type 3; le Structural™ 6A contient 1kg NPK/m³), où elles vont séjourner encore pendant 15 jours.

Enfin, les plantules sont transplantées dans des pots de 25cm de diamètre contenant un substrat formé de 75% de tourbe et 25% de compost.

En traitement préventif contre les champignons, les jeunes plantes sont arrosées dès les premiers jours de la phase d'acclimatation avec une solution fongicide à 0.25g/L

d'OrthocideTM (80% captane). Ces doses sont augmentées à 0.5g/L quand les plantules sont plus développées (à partir de la 5^{ème} semaine).

6.2.2.2. Conditions d'acclimatation

Les premiers essais orientatifs d'acclimatation ont été effectués directement en serre sous bâche plastique (Gent, Belgique), et ils ont tous abouti à l'échec (0% de reprise). Nous avons alors mis en place un dispositif d'acclimatation assurant le passage progressif des vitroplants du milieu confiné du laboratoire aux conditions de culture en serre ou au champ. Ce dispositif nécessite le passage par trois étapes:

- Etape 1: elle dure du jour 0 au jour 15 et a lieu dans une cellule d'acclimatation (cellule 1). Les pousses ou plantules plantées en plaques alvéolées sont placées sur une tablette en chambre climatique où l'humidité relative (HR), la lumière et la température suivent les courbes présentées en figure 6.1, mesurées au niveau de la tablette. L'HR est assurée par un "fog system" et la lumière par des lampes Philips HPI-Tplus. Dans la cellule 1, la tablette portant les plantes est couverte par un film plastique.
- Etape 2: elle dure du jour 15 au jour 30 et a lieu dans la cellule 2 d'acclimatation se trouvant dans la même chambre climatique que la cellule 1. Les plantules sont transplantées dans des pots de 11cm de diamètre qui sont placés sur une 2^{ème} tablette dans la chambre climatique, où l'HR, la lumière et la température varient selon les courbes de la figure 6.2. L'HR et la lumière sont obtenus par le même type de matériel que pour la cellule 1; cependant, la tablette et les plantules sont couvertes par un film plastique troué (400 trous de 1cm de diamètre/m²) (figure 6.3).
- Etape 3: c'est la dernière étape, elle commence au premier jour qui suit la sortie de la chambre climatique et les facteurs température, lumière et HR ne sont plus contrôlés. Les plantes sont transplantées dans des pots de 25 cm de diamètre et placées sur une tablette dans une serre standard (Gent, Belgique) où la température est de l'ordre de 23 à 25°C le jour et 17 à 18°C la nuit et l'HR de 65%. A partir de la 3^{ème} semaine d'acclimatation (étape 2), les plantes sont arrosées (une

irrigation/trois) avec une solution fertilisante contenant 1g/L de NPK 15-5-30 + 3MgO + microéléments (Flory 3).

6.2.3 Etude histologique

Nous avons effectué une étude histologique comparative sur des feuilles et des racines *in vitro* et en acclimatation. Des morceaux de feuilles et de racines ont alors subi les traitements mentionnés au chapitre II (2.5). Les coupes au microtome ont été faites à une épaisseur variant de 10 à 14µm selon le cas.

6.2.4. Dosage des chlorophylles

A différents moments de l'acclimatation, nous avons effectué le dosage des chlorophylles: chlorophylle a (C_a) et chlorophylle b (C_b). Nous avons utilisé la méthode préconisée par Arnon (1949) et Lichtenthaler (1987) basée sur l'extraction dans de l'acétone à 80%. Les quantités de C_a et de C_b (en $\mu\text{g.ml}^{-1}$) sont calculées selon les formules suivantes:

$$C_a = 12.25 A_{663.2} - A_{646.8}$$

$$C_b = 21.5 A_{646.8} - 5.1 A_{663.2}$$

(A: absorbance)

Les résultats sont ensuite reportés en $\mu\text{g.mg}^{-1}$ de matière fraîche.

Trois répétitions ont été effectuées pour chaque échantillon.

6.3. PARAMETRES OBSERVES

Les paramètres que nous avons observé et/ou quantifié au cours de ces essais sont:

- le pourcentage de reprise après acclimatation, consiste à compter 15 jours après sortie des récipients de culture, le nombre de plantes qui ont survécu à l'acclimatation, ceci est indiqué par la formation de nouvelles feuilles par les plantules;
- les modifications anatomiques survenues dans les feuilles et les racines après acclimatation. Ces modifications sont évaluées visuellement sur les coupes histologiques et aussi en effectuant certaines mesures sur les coupes de feuilles: épaisseur de la feuille, épaisseur de l'épiderme supérieur et de l'épiderme inférieur,

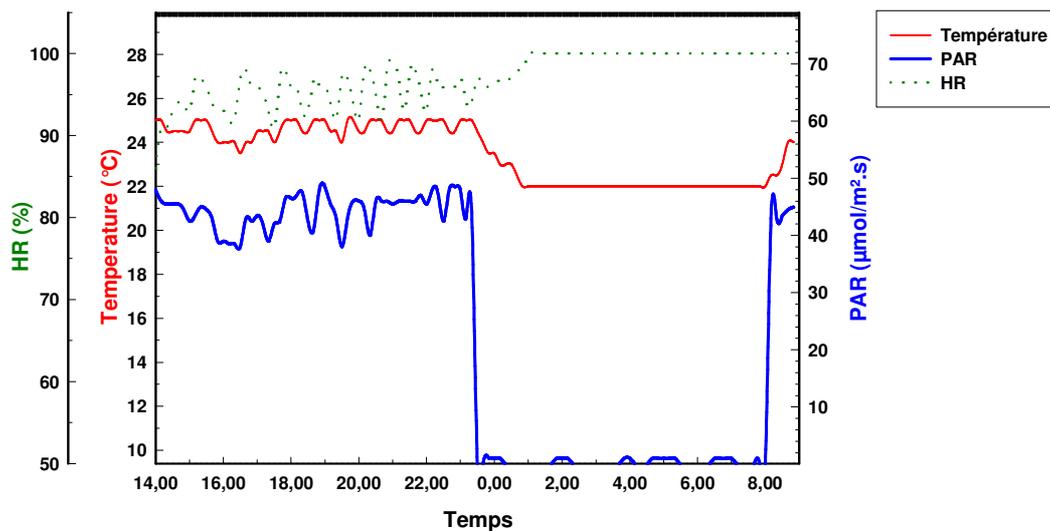


Fig. 6.1. Variation de la température, lumière et humidité dans la cellule 1 d'acclimatation

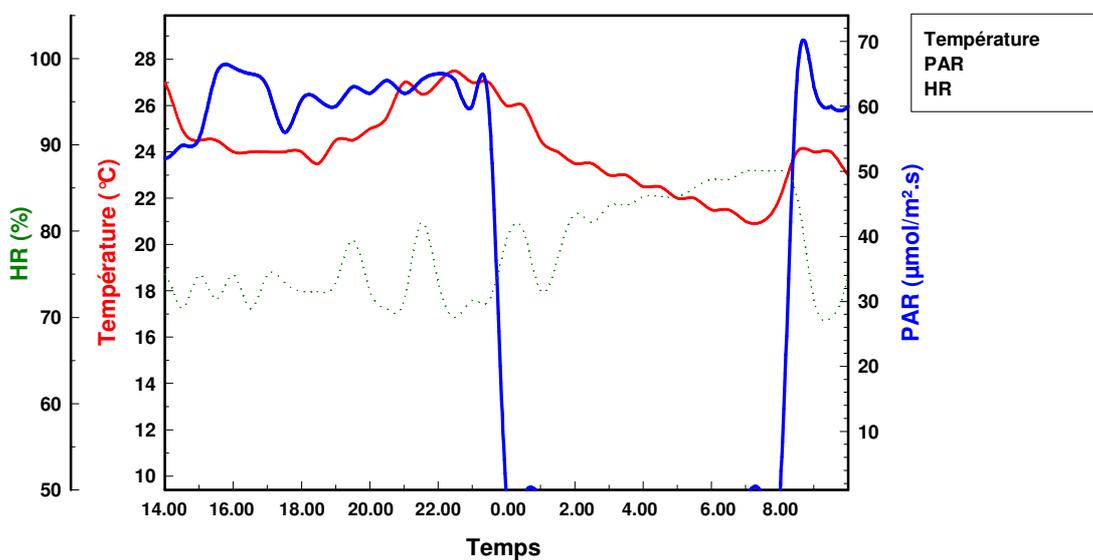


Fig. 6.2. Variation de la température, lumière et humidité dans la cellule 2 d'acclimatation

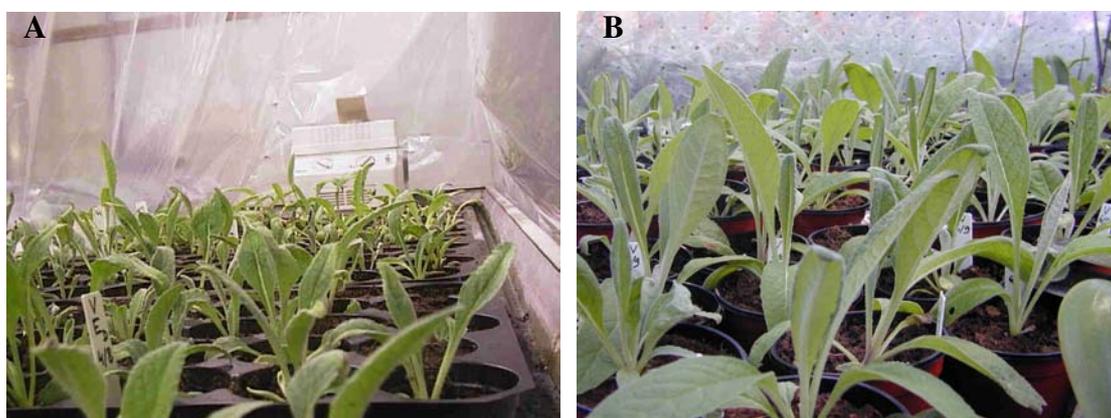


Figure 6.3. Cellule 1 (A) et cellule 2 (B) d'acclimatation

taille de l'espace inter-cellulaire et nombre de chloroplastes;

- quantité de chlorophylles dans les feuilles des plantes d'artichaut à différents moments de l'acclimatation.

6.4. RESULTATS ET DISCUSSION

6.4.1. Effet du type de pousses sur la réussite de l'acclimatation

Deux types de pousses ont été mis en acclimatation:

- des pousses n'ayant aucune racine, dans ce cas l'enracinement se ferait en même temps que l'acclimatation;
- des plantules ayant des racines développées *in vitro* au cours du stade III d'enracinement.

La méthode d'enracinement des pousses *ex vitro* résulte de certaines constatations mettant en cause les racines formées *in vitro*:

- les racines formées *in vitro* ne sont pas toujours totalement fonctionnelles quand les plantes sont transférées au sol;
- les racines produites *in vitro* n'ont généralement pas de chevelu racinaire;
- elles peuvent être formées sur les tiges après le développement d'un cal, et dans ce cas les connections vasculaires entre racines et pousse sont défailantes; ceci se traduit par un passage adéquat de l'eau et des minéraux des racines vers la partie aérienne des pousses contre un passage insuffisant des carbohydrates de la partie aérienne vers les racines (George, 1993).

Cette méthode d'enracinement des pousses *ex vitro* a été utilisée et recommandée par plusieurs auteurs, puisqu'elle offre ainsi l'opportunité de combiner l'enracinement et l'acclimatation dans une seule étape; ceci élimine les frais causés par l'enracinement *in vitro* surtout que les racines formées peuvent mourir en cours d'acclimatation (Debergh et Maene, 1981). Rogers et Smith (1992) ont constaté que l'enracinement *ex vitro* du rosier permet le développement de racines plus longues, plus minces, plus flexibles et plus fasciculées, avec une plus grande surface vasculaire que les racines formées *in vitro*, permettant ainsi d'avoir des plantes se développant plus rapidement et par conséquent commercialisables dans de moins longs délais.

Néanmoins, pour les espèces difficiles à enraciner, cette méthode s'avère peu efficace. En effet, dans le cas de l'artichaut, tous nos essais effectués avec des pousses non enracinées se sont soldés par des échecs, aucune pousse sur un total de plus de 400 pousses n'a pu émettre des racines et survivre.

Cela est certainement dû au fait que ces pousses difficiles à raciner, mettent beaucoup de temps pour émettre des racines. Dans notre cas, les pousses d'artichaut n'ont donné aucune racine après 5 semaines d'acclimatation. Pendant toute cette période, le prélèvement d'eau et de minéraux à partir du substrat demeure impossible; ceci a entraîné un jaunissement des feuilles suivi d'une nécrose (figure 6.4) et a abouti à la mort des pousses.



N: Nécrose des feuilles

Figure 6.4. Jaunissement et nécrose des feuilles de pousses non enracinées d'artichaut en cours d'acclimatation

Les plantules enracinées *in vitro* ont toutes survécu (100% de reprise), même celles qui n'avaient qu'une seule racine, 4 semaines après le début de l'acclimatation, ces plantules qui avaient au départ 1 à 5 racines (tableau 4.6) ont développé un système racinaire important avec des racines fines et fasciculées (figure 6.5). Apter *et al.* (1993) confirment nos résultats puisqu'ils ont constaté que sur jasmin asiatique, une connection vasculaire complète s'établit entre la pousse et les racines et que celles-ci sont physiologiquement fonctionnelles. Gribaudo *et al.* (1995) ont eux aussi démontré

que la plupart des racines de vigne formées *in vitro* continuent de croître pendant l'acclimatation et contribuent activement à la croissance des plantes.



Figure 6.5 Développement d'un système racinaire important au cours de l'acclimatation (4 semaines après sortie des récipients) sur les plantules d'artichaut enracinées *in vitro*

6.4.2. Modifications anatomiques observées sur les plantules au cours de l'acclimatation

6.4.2.1. Feuilles

6.4.2.1.1. Epaisseur de la feuille et de l'épiderme

L'examen de la figure 6.6, relative à la variation de l'épaisseur de la feuille selon les conditions de l'environnement, montre qu'il y a une différence significative (au seuil de 5%) entre l'épaisseur de la feuille *in vitro* d'une part et celle des feuilles en cellule 2 et en serre d'autre part. Toutefois, dans la cellule 1, l'épaisseur de la feuille a une valeur significativement différente et intermédiaire entre les valeurs relatives à ces deux environnements. Nous remarquons que plus l'humidité relative diminue, plus la feuille s'amincit. Nos résultats sont conformes à ceux constatés par la plupart des auteurs qui ont étudié la relation entre les conditions de l'environnement où se trouvent les plantes, et particulièrement l'humidité relative et les modifications anatomiques intervenant au niveau des feuilles de ces plantes (Capellades *et al.*, 1990; Johansson *et al.*, 1992; Van Huylenbroeck, 1997; Majada *et al.*, 2000). En effet, tous

ces auteurs ont constaté que des humidités relatives élevées entraînent des modifications au niveau de la structure anatomique et du fonctionnement des feuilles. Majada *et al.* (2000) ont constaté que les feuilles de plantules d'oeillet cultivées sous une forte humidité relative sont plus épaisses que celles des plantules cultivées sous faible humidité.

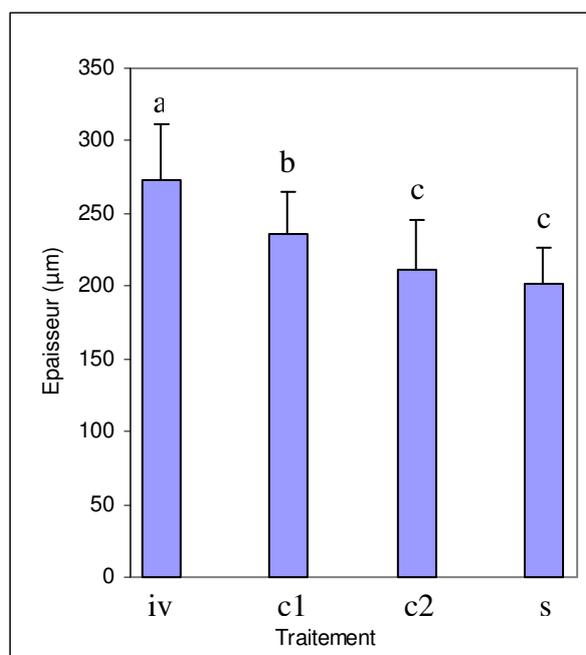


Figure 6.6. Effet des conditions de l'environnement sur l'épaisseur de la feuille

iv: in vitro (HR=90%); c1: cellule 1 (HR=95 à 100%); c2: cellule 2 (HR=80%); s: serre (HR=65%)

Nous avons d'autre part mesuré l'épaisseur de l'épiderme inférieur et de l'épiderme supérieur. Les figures 6.7 et 6.8 montrent que leurs valeurs augmentent progressivement en passant des récipients de culture *in vitro* à la serre. Pour l'épiderme inférieur, nous n'avons noté aucune différence significative entre les valeurs de la feuille *in vitro*, en cellule 1 ou en cellule 2. Cependant en serre, l'épaisseur de l'épiderme inférieur augmente et devient significativement différente des trois premières. L'observation de la figure 6.9 montre en effet que les feuilles des plantes en serre présentent un épiderme inférieur plus épais que les feuilles des autres plantes. En outre, l'observation de l'épaisseur de l'épiderme supérieur (figure 6.8) montre qu'il n'y a pas de différence entre l'épaisseur de l'épiderme supérieur des

feuilles *in vitro* ou en cellule 1; en effet, dans les récipients de culture *in vitro*, les conditions de température, de lumière et d'humidité avoisinent de très près les conditions en cellule 1. Toutefois, nous notons une différence significative entre l'épaisseur de l'épiderme supérieur dans ces deux milieux pré-cités et celle dans la cellule 2 d'une part et la serre d'autre part. Quand l'humidité relative diminue (cellule 2) on commence à distinguer un épiderme supérieur sur les feuilles (figure 6.9-C). Celui-ci devient encore plus épais en serre où l'humidité n'est que de 65% (figure 6.9-D).

Nous avons aussi noté la formation de poils glanduleux sur cet épiderme supérieur en serre. Ces poils sont au début unicellulaires (figure 6.9-D), deviennent ensuite formés de plusieurs cellules (figure 6.9-E).

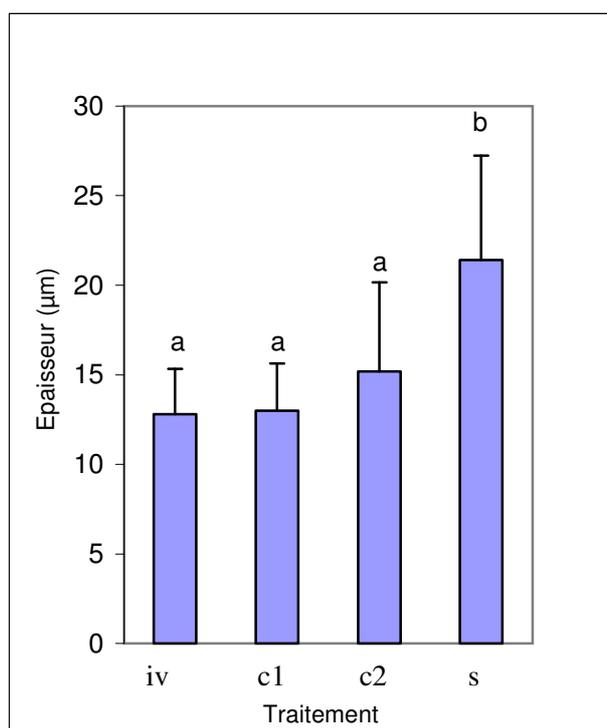


Figure 6.7. Effet des conditions de l'environnement sur l'épaisseur de l'épiderme inférieur

iv: *in vitro* (HR=90%); *c1*: cellule 1 (HR=95 à 100%); *c2*: cellule 2 (HR=80%); *s*: serre (HR=65%)

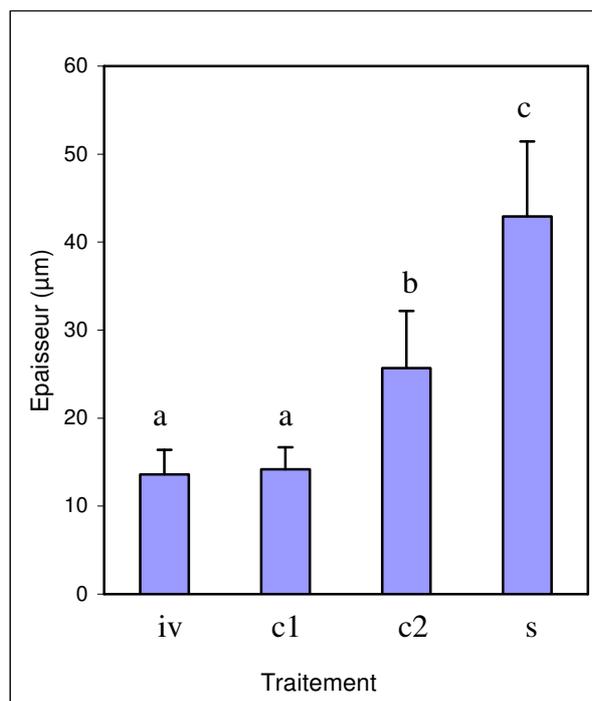


Figure 6.8. Effet des conditions de l'environnement sur l'épaisseur de l'épiderme supérieur

iv: in vitro (HR=90%); c1: cellule 1 (HR=95 à 100%); c2: cellule 2 (HR=80%); s: serre (HR=65%)

6.4.2.1.2. Structure anatomique des feuilles

L'examen de la figure 6.9, qui présente la structure anatomique de la feuille *in vitro* et au cours des différents stades de l'acclimatation, montre que *in vitro*, on peut distinguer un parenchyme palissadique formé de deux à trois couches de cellules, un parenchyme spongieux et des faisceaux vasculaires répartis tout au long de la feuille. Dans la cellule 1 d'acclimatation, cette structure se perd et laisse la place à un mésophylle modifié avec très peu de cellules palissadiques et beaucoup plus d'espaces inter-cellulaires. Pennell (1987) et Ziv (1986) avaient abouti à ce même genre de structure anatomique avec les plantules placées sous de fortes humidités relatives dans les récipients de culture. Dans notre cas, il y a eu une réversion de la structure des feuilles, puisque dans les récipients de culture qui étaient placés sur un système "bottom cooling", l'humidité relative était de 90% , alors que dans la cellule 1, elle était presque à saturation (entre 95 et 100%, figure 6.1). Cette structure anatomique va s'améliorer vers les étapes ultérieures. En effet, l'observation de la figure 6.9 (C), montre que les espaces inter-cellulaires sont moins importants dans la cellule 2 et

encore moins importants dans la serre où l'humidité relative n'est que de 65%. Ces résultats visuels sont confirmés par l'analyse statistique des mesures de l'espace inter-cellulaire effectuées sur les feuilles des plantes *in vitro* et aux différentes étapes de l'acclimatation. En effet, la figure 6.10 relative à ces mesures montre qu'il y a une différence hautement significative entre la taille des espaces inter-cellulaires *in vitro* ou en serre et celle des feuilles des plantes des cellules 1 et 2. Néanmoins, au cours de l'acclimatation, plus l'humidité relative dans l'atmosphère baisse, plus la taille des espaces inter-cellulaires diminue. Il reste néanmoins une certaine ambiguïté pour les pousses cultivées *in vitro*, où l'humidité relative est assez élevée dans les récipients de culture, mais les espaces inter-cellulaires des feuilles restent peu importants. Nos résultats sont en partie confirmés par ceux de Majada *et al.* (2000) qui ont mis en culture des plantules d'œillet dans des récipients plus ou moins ventilés. Ils ont constaté que les feuilles des pousses sous faible ventilation (humidité relative élevée) étaient plus épaisses que les feuilles développées en récipients ventilés (humidité relative faible); en plus, les cellules du mésophylle et les espaces inter-cellulaires étaient plus grands.

Nous avons observé d'autre part l'absence de cire sur la cuticule des feuilles, ceci pourrait être dû à leur dissolution au cours des traitements histologiques, mais le plus admis est que les feuilles manquent de cire, particulièrement sous des atmosphères à forte humidité.

En effet, Sutter et Langhans (1980, 1982) ont constaté que pour la plupart des espèces, les feuilles développées *in vitro* produisent beaucoup moins de cire sur leur cuticule que les feuilles développées en serre.

Cette incapacité des feuilles à développer des quantités normales de cire semble être due à l'environnement *in vitro*. L'humidité élevée à l'intérieur des récipients de culture est un des facteurs qui contribuent à ce phénomène (Grout et Aston, 1977).

La cire épicuticulaire est en effet formée en réponse aux différentes atmosphères et elle peut être induite sur les feuilles *in vitro* en réduisant l'humidité relative durant la formation des feuilles (Wardle *et al.*, 1983).

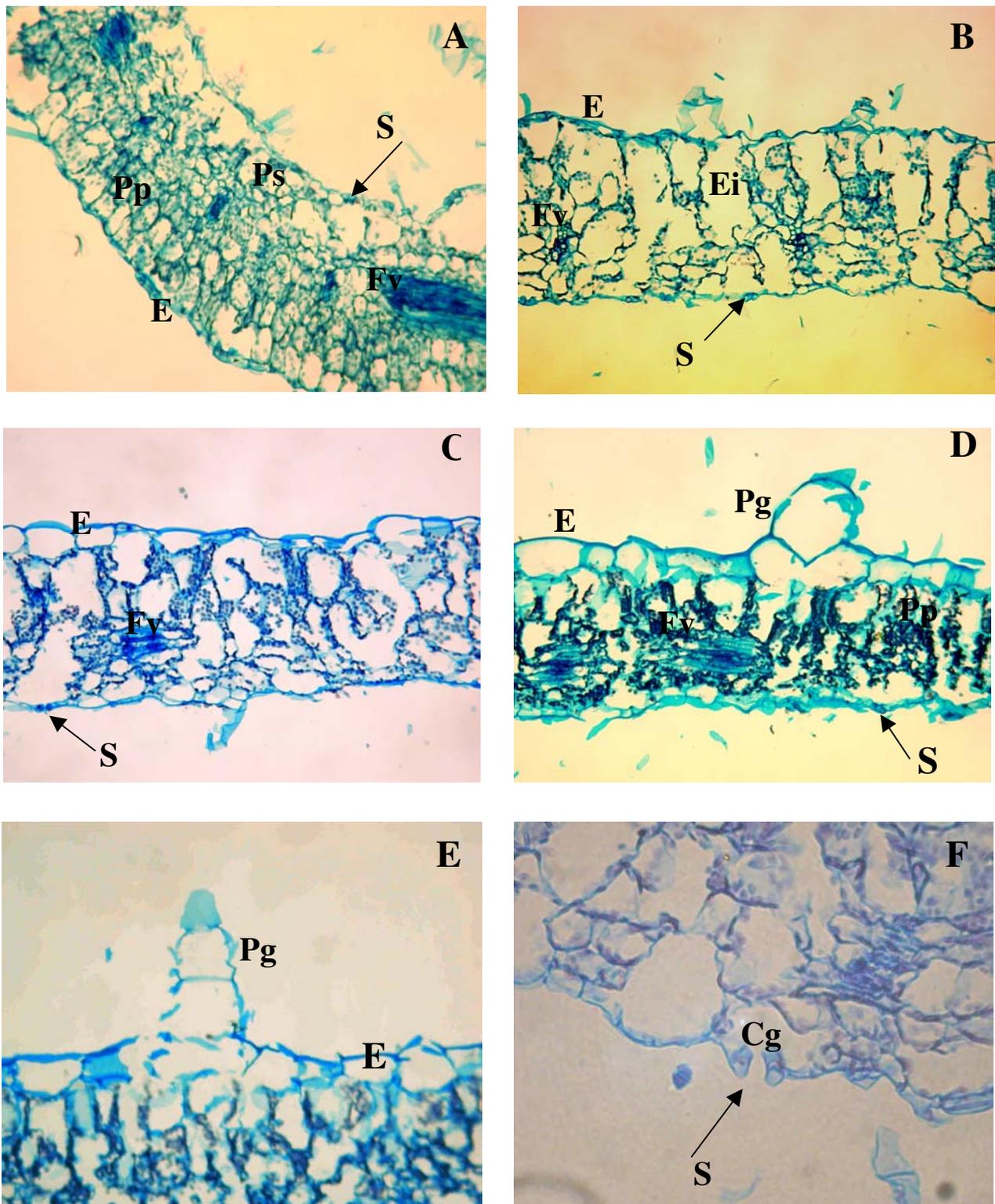


Figure 6.9. Structure anatomique d'une feuille d'artichaut *in vitro* (A) et au cours de l'acclimation (B-E). A. feuille d'une pousse *in vitro* (HR=90%); B. feuille d'une plantule en cellule 1 d'acclimation (HR=95 à 100%); C. feuille d'une plantule en cellule 2 d'acclimation (HR=80%); D. feuille d'une plante en serre (HR=65%).

E. Détail d'un poil glanduleux sur une feuille d'une plante en serre. F. Détail d'une stomate.

Pp: parenchyme palissadique; S: stomate; Cg: cellule de garde; Ps: parenchyme spongieux; Fv: faisceau vasculaire; E: épiderme; Ei: espace inter-cellulaire; Pg: poil globuleux.

A-E: grossissement x100; F: grossissement x250.

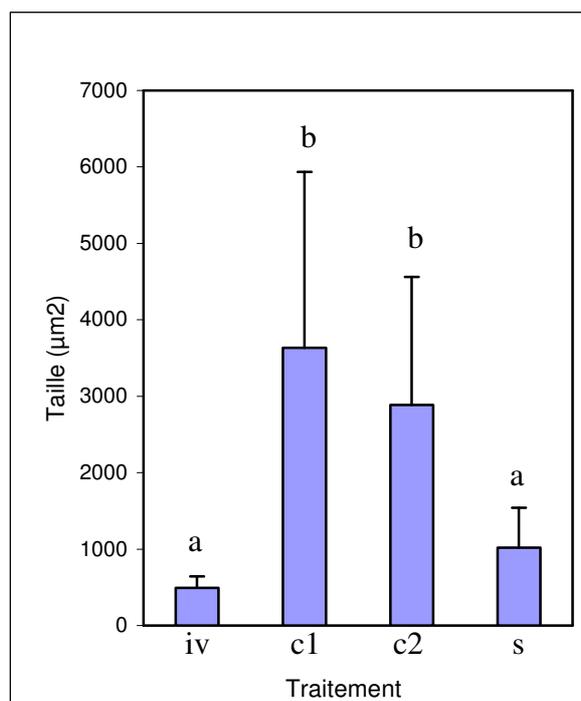


Figure 6.10. Effet des conditions de l'environnement sur la taille des espaces inter-cellulaires (μm^2)

iv: *in vitro* (HR=90%); *c1*: cellule 1 (HR=95 à 100%); *c2*: cellule 2 (HR=80%); *s*: serre (HR=65%)

Cette absence de cire sur les feuilles a une répercussion négative sur la survie des plantes au cours de l'acclimatation. En effet, l'absence de cire cause aux plantules une perte rapide d'eau à travers la transpiration quand elles sont transférées à un environnement relativement sec *ex vitro* (Sutter, 1982). D'où a émané l'idée de l'acclimatation *in vitro* par la réduction de l'humidité (Maene, 1985; Maene et Debergh, 1987; Capellades *et al.*, 1990; Majada, 2000) aboutissant à des plantules moins fragiles. En effet, en baissant l'humidité relative, les plantules vont commencer au cours de cette phase à acquérir une structure anatomique similaire à celle des plantes en serre, avec particulièrement une cire épicuticulaire mieux développée permettant de limiter les pertes d'eau par transpiration (Donnelly *et al.*, 1987, Fabbri *et al.*, 1986).

6.4.2.1.3. Nombre de chloroplastes et contenu en chlorophylles

Un comptage des chloroplastes sur les coupes relatives aux feuilles des différentes plantes (figure 6.11) révèle une différence significative (au seuil de 5%) entre les

feuilles des plantules de la cellule 1 et celles de la cellule 2 et les plantules *in vitro* d'une part, et les plantes en serre d'autre part, avec un plus grand nombre de chloroplastes pour ces dernières. L'observation de la figure 6.9 confirme ces constatations; en effet, on note beaucoup plus de chloroplastes dans les feuilles des plantules *in vitro* et en serre que dans celles des plantules en cellule 2. Dans les feuilles des plantules en cellule 1 où l'humidité relative est presque à saturation, on note le plus faible nombre de chloroplastes. Ceci se répercute sur le contenu en chlorophylles des plantules au cours de l'acclimatation. La figure 6.12 montre en effet que le contenu en chlorophylle a (chl.a) et b (chl.b) évolue en augmentant au cours de l'acclimatation. La chl.a qui était à $650 \pm 85 \mu\text{g/g}$ de matière fraîche deux semaines après la sortie des récipients de culture a augmenté jusqu'à $1480 \pm 89 \mu\text{g/g}$ de matière fraîche à la fin de la 10^{ème} semaine de l'acclimatation. De même, la chl.b, qui était à seulement $200 \pm 54 \mu\text{g/g}$ de matière fraîche en début d'acclimatation, a atteint $711 \pm 48 \mu\text{g/g}$ de matière fraîche à la 10^{ème} semaine. Ceci indique que les plantes acquièrent une photosynthèse de plus en plus efficace au cours de l'acclimatation.

Van Huylenbroeck et De Riek (1995) confirment nos résultats et mentionnent qu'une humidité relative élevée entraîne un faible contenu en pigments dans les plantes de *Spathyphyllum*, et qu'un contenu élevé en chlorophylles est indicatif de l'efficacité de la photosynthèse. D'autre part Grout et Aston (1977) et Wetzstein et Sommer (1982) ont constaté que des plantules de chou fleur cultivées *in vitro* ont de très faibles contenus en chlorophylles et une faible activité photosynthétique, celle-ci augmente dans les feuilles nouvellement formées après le transfert en serre.

La défaillance photosynthétique au niveau des plantules *in vitro* et au cours des premiers stades de l'acclimatation a été attribuée non seulement à la nature de l'atmosphère à laquelle ces plantules sont soumises mais aussi à l'altération de la structure anatomique et physiologique de la feuille au cours de cette phase de la multiplication. En effet, Brainerd et Fuchigami (1982) et Wardle *et al.* (1983) ont mentionné un faible développement des stomates et une défaillance de leur mécanisme de fermeture sur des plantules de chou-fleur et de pommier cultivées *in vitro*; ceci a entraîné des pertes d'eau élevées à partir des feuilles.

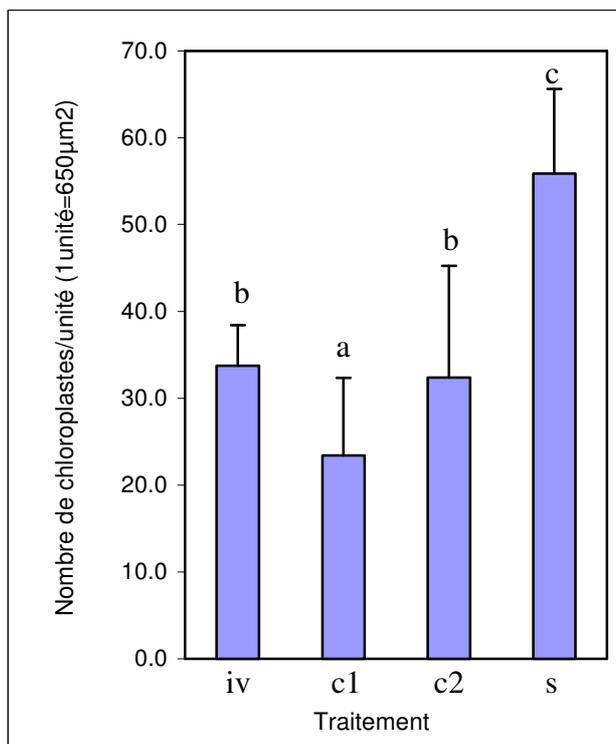


Figure 6.11. Effet des conditions de l'environnement sur le nombre de chloroplastes

iv: in vitro (HR=90%); *c1*: cellule 1 (HR=95 à 100%); *c2*: cellule 2 (HR=80%); *s*: serre (HR=65%)

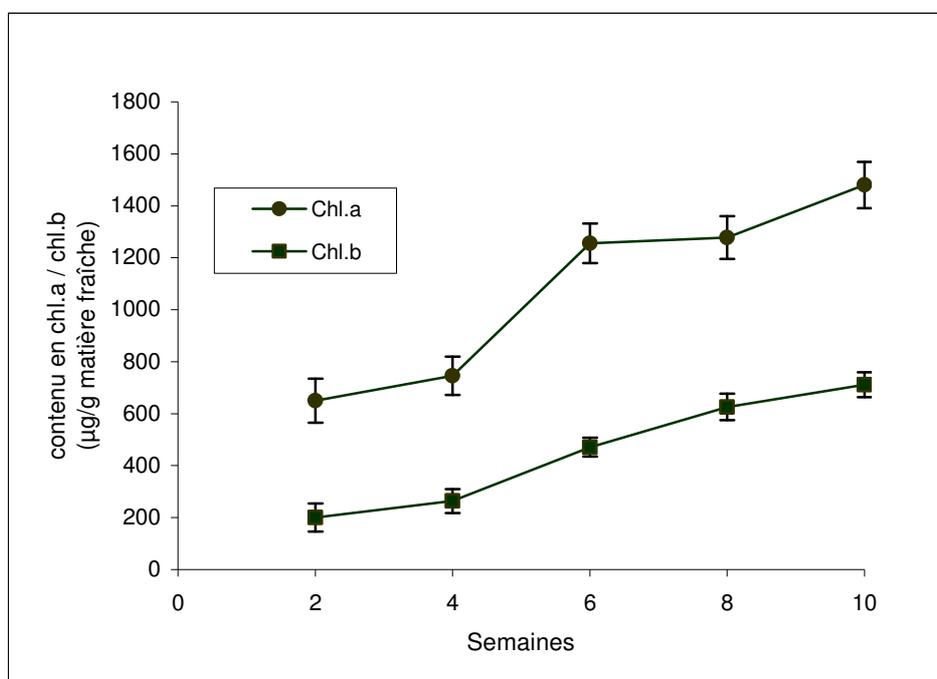


Figure 6.12. Evolution de la chlorophylle a et b au cours de l'acclimatation des vitroplants d'artichaut

Nous avons noté nous aussi que plusieurs stomates restent ouvertes au cours de l'acclimatation des plantules d'artichaut (figure 6.9-F). Le mauvais fonctionnement des stomates et du selon Wardle *et al.* (1981) à de fortes concentrations de sodium dans les cellules de garde au cours de la culture *in vitro*, ce qui aboutit à un effet sur le mouvement du potassium et sur le mécanisme de fermeture des stomates. Ziv (1991) a parlé de callose qui serait déposée dans les cellules de garde de feuilles vitrifiées de cerisier et d'œillet les empêchant de se fermer.

6.4.2.2. Racines

Nous avons observé la structure anatomique des racines formées *in vitro* et celles formées *ex vitro* au cours de l'acclimatation. La figure 6.13 nous permet de retrouver pour les deux types de racines la structure typique d'une racine de dicotylédone, à savoir, un épiderme, un cortex et un cylindre central ou cylindre vasculaire formé justement de tissus vasculaires (Raven *et al.*, 1976). L'extrémité de la racine est couverte par une coiffe derrière laquelle se trouve une masse de cellules qui protège le méristème apical (figure 6.13-A et C).

Néanmoins, une première différence concernant la taille des deux types de racines a été relevée; en effet, nous avons noté que les racines formées *in vitro* (figure 6.13-A et B) sont très épaisses et sont entourées d'un tissu callogène, conférant aux coupes transversale et longitudinale une taille beaucoup plus importante que celle des racines formées *ex vitro*. Mc Clelland *et al.* (1990) ont constaté les mêmes faits, en effet, ils ont observé sur des sections anatomiques de racines formées *in vitro* des cellules corticales hypertrophiques contenant de nombreux grains d'amidon et plusieurs espaces inter-cellulaires donnant ainsi une surface sectionnée anormalement importante.

La coupe transversale de la racine formée *ex vitro* permet d'apprécier la taille de la racine, mais malheureusement pas de bien distinguer les tissus. Cependant, il apparaît que les racines formées *ex vitro* ont plus de tissus vasculaires que celles formées *in vitro*; elles ont aussi un cambium vasculaire et des tissus vasculaires secondaires, contrairement aux racines formées *in vitro*, qui elles présentent des tissus vasculaires primaires (Mc Clelland *et al.*, 1990).

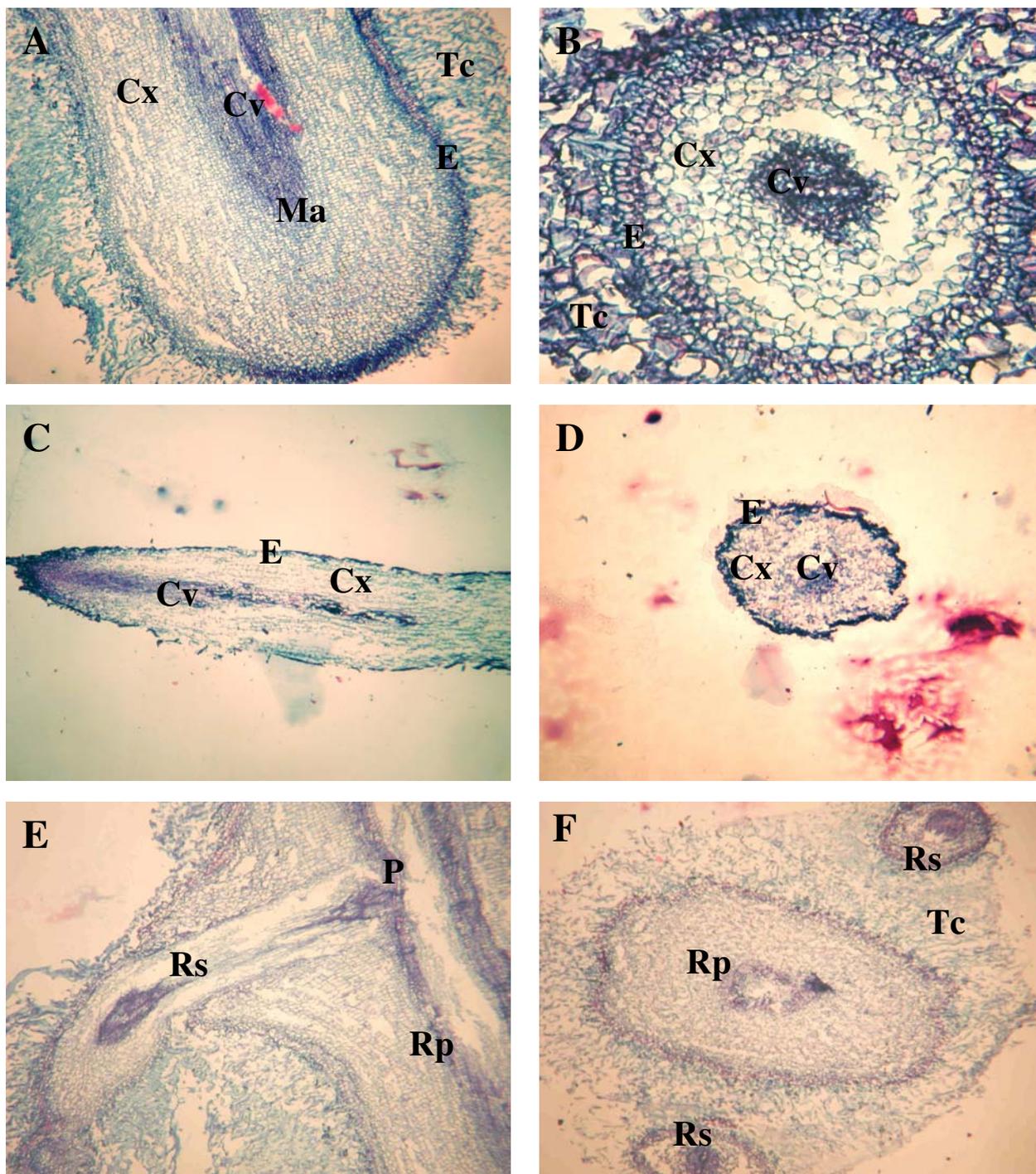


Figure 6.13. Structure anatomique de la racine formée *in vitro* (A, B, E et F) et au cours de l'acclimatation (C et D).

A. coupe longitudinale d'une racine formée *in vitro*; B. coupe transversale d'une racine formée *in vitro*; C. coupe longitudinale d'une racine formée au cours de l'acclimatation;

D. coupe transversale d'une racine formée au cours de l'acclimatation; E. coupe longitudinale d'une racine ramifiée formée *in vitro*; F. coupe transversale d'une racine ramifiée *in vitro*.

E: épiderme; Tc: Tissu callogène; Cx: cortex; Cv: cylindre vasculaire; Ma: méristème apical

C: coiffe; Rp: racine principale; Rs: racine secondaire; P: péricycle.

Grossissement: x25

D'autre part, certains auteurs ont remarqué que les racines formées *in vitro* manquent généralement de ramifications (Donnelly *et al.*, 1985; Mackay et Kitto, 1988); ceci a été le cas pour la plupart des racines formées *in vitro* de nos plantules d'artichaut, mais à notre avis l'initiation des racines secondaires serait faite *in vitro*, alors que l'expression de ces racines a lieu plus tard au cours de l'acclimatation. En effet, sur certaines coupes nous avons noté l'initiation d'une ou même de deux racines secondaires (figure 6.13-E et F), et quelques semaines après la sortie des récipients de culture nous avons observé un système racinaire très développé (figure 6.5). Ces racines secondaires ont une origine endogène puisqu'elles prennent naissance à partir du péricycle de la racine principale (figure 6.13-E). Au début, les cylindres vasculaires de la racine principale et de la racine secondaire ne sont pas connectés; ces deux cylindres se joignent plus tard, quand les dérivés des cellules du péricycle donnant naissance à la racine secondaire se différencient en xylème et phloème (Raven *et al.*, 1976).

6.5. CONCLUSION

L'étude de l'acclimatation des vitroplants d'artichaut nous laisse conclure que:

- pour réussir l'acclimatation, il serait nécessaire de soumettre les vitroplants à des conditions intermédiaires entre celles des récipients de culture *in vitro* et celles de la serre ou du champ, afin que ceux-ci s'acclimatent progressivement aux conditions naturelles de l'environnement;
- les conditions de l'environnement et en particulier l'humidité relative entraînent des modifications anatomiques et physiologiques au niveau des feuilles et des racines. Une meilleure qualité des plantes est obtenue avec de faibles humidités relatives dans l'atmosphère.

CHAPITRE VII

**ETUDE DES PERFORMANCES AGRONOMIQUES AU
CHAMP DES PLANTES D'ARTICHAUT
OBTENUES *IN VITRO***

7.1. INTRODUCTION

Le but de cette étude, est d'étudier les performances agronomiques en plein champ et sous les conditions climatiques et édaphiques tunisiennes, des clones de 'Violet d'Hyères' et de 'Blanc Oranais' obtenus *in vitro* au Laboratoire du Département d'Horticulture de la Faculté d'Agronomie et de Sciences Biologiques Appliquées de Gent (Belgique), et de les comparer avec des clones provenant d'une multiplication classique à partir d'œilletons.

7.2. MATERIELS ET METHODES SPECIFIQUES

7.2.1. Matériel végétal pour l'essai de plein champ

Le matériel végétal que nous avons utilisé a deux origines:

- des plantes de 'Violet d'Hyères' et de 'Blanc Oranais' obtenues par œilletonnage. Les œilletons sont récoltés chez un agriculteur de la région de Jedaïda (Basse vallée de la Medjerda) au mois d'Avril 2000. Nous avons pris le soin de prélever les œilletons sur les meilleures plantes quant à leur développement végétatif et leur production. Ces œilletons sont plantés dans une pépinière dans le domaine de l'Ecole Supérieure d'Horticulture et d'Elevage de Chott-Mariem (ESHE-CM). Ils ont subi tous les traitements, irrigations et fertilisations qu'on donne à une pépinière d'œilletons d'artichaut. La plantation des œilletons a eu lieu après la fin du stade de repos végétatif et juste à la reprise de la végétation (septembre 2000);
- des plantes de ces mêmes cultivars obtenues par micropropagation à partir de méristèmes *in vitro*. Ces vitroplants ont été acclimatés en serre à Gent (Belgique) (Voir chapitre VI). En Octobre 2000, ils ont été dépotés, débarrassés de leurs mottes; les racines ont été recouvertes de morceaux de coton imbibés d'eau pour éviter tout risque de dessèchement, et ont été emballés pour être envoyés en Tunisie. A leur arrivée à l'ESHE-CM (24 heures plus tard), les vitroplants ont été plantés dans des pots de 25 cm de diamètre contenant un substrat formé de tourbe et de sable grossier (50% de chaque). Ils ont ensuite été placés sous abris-serre pour favoriser leur reprise et leur adaptation au

climat en Tunisie; deux mois plus tard (janvier 2001) ils ont été plantés au champ. Puisque cette date de plantation est tardive par rapport à la date normale de plantation (fin août-septembre), donc tous les paramètres ont été mesurés plutôt à la deuxième année de culture pour que les plantes des différentes origines soient au même stade de développement. En effet, en juin 2001, nous avons arrêté les irrigations pour les deux parcelles en question; les plantes sont alors entrées en repos végétatif. Mi-août 2001, nous avons repris les irrigations pour réveiller les plantes. Celles-ci ont repris leur croissance en septembre 2001.

7.2.2. Matériel végétal pour la cytométrie en flux

Nous avons d'autre part étudié le niveau de ploïdie en utilisant la cytométrie en flux des plantes des cultivars 'Violet d'Hyères' et 'Blanc Oranais' provenant des deux origines: œilletons et *in vitro*. Ceci vient à la suite des variations morphologiques observées sur les capitules récoltés sur les vitroplants de 'Violet d'Hyères'.

Pour ces analyses, nous avons utilisé des œilletons prélevés sur les plantes des deux origines, en cours de végétation (février 2002). Les œilletons ont été nettoyés, les racines ont été recouvertes de morceaux de coton imbibés d'eau, emballés et envoyés au Département de génétique et d'amélioration végétales (CLO, DvP) à Merelbeke (Belgique). A leur réception, les œilletons ont été plantés en pots et placés en serre pour qu'ils reprennent leur croissance. Les analyses ont été faites sur les jeunes feuilles.

7.2.3. Protocole expérimental

7.2.3.1. Essai de plein champ

Les plantes des différentes origines ont été plantées dans deux parcelles différentes (l'une est à 250 m de l'autre) pour minimiser les risques de recontamination des vitroplants qui sont supposés être assainis de tous ou du moins de certaines contaminations virales et/ou bactériennes, par la culture de méristèmes.

Dans chaque parcelle, les clones des deux origines sont répartis comme suit:

- pour les plantes issues d'œilletons, nous avons 80 plantes/cultivar, qui ont été réparties dans la parcelle sur 4 blocs au hasard;
- pour les vitroplants, ceux qui ont survécu au transport et ont repris leur croissance sont de 96 pour le 'Violet d'Hyères' et 28 pour le 'Blanc Oranais' (une dizaine de plantes sont mortes après le voyage Gent-Chott-Mariem). Ces plantes ont elles aussi été réparties dans la parcelle sur 4 blocs au hasard.

Les deux parcelles expérimentales ont la même nature de sol: sol sablo-limoneux. La densité de plantation était de un plant/m². Toutes les plantes ont reçu à partir de leur plantation les quantités d'eau et de fertilisants de la même manière, elles ont aussi subi les mêmes techniques culturales: binage, effeuillage, traitements phytosanitaires, etc...

7.2.3.2. Cytométrie en flux

Les analyses de la cytométrie en flux ont été réalisées sur des noyaux isolés à partir de disques de 5 mm² prélevés à l'aide d'une lame tranchante de rasoir (Galbraith *et al.*, 1983), sur de jeunes feuilles appartenant aux deux types de plantes du cultivar 'Violet d'Hyères'. Ces disques sont alors sectionnés dans 400µL d'une solution contenant 0.1 M d'acide citrique et 0.5% de Tween-20 (pH = 2.5) (Otto, 1990). Les échantillons sont ensuite filtrés à l'aide d'un filtre en nylon (100 µm). Le résidu retenu par le filtre est lavé avec 700 µL d'une solution contenant 0.4 M Na₂HPO₄ et 2 mg.L⁻¹ DAPI (4', 6-diamidino-2-phenylindole)

(pH = 8.5) (Otto, 1990). La suspension de noyaux obtenue est alors utilisée pour la cytométrie en flux. Celle-ci est réalisée à l'aide d'un PARTEC Cell Analyser , équipé d'un logiciel DPAC (Data Pool Application for CA-II) et calibré à l'aide d'une suspension de noyaux de ray-gras (2n) comme référence interne.

Nous avons effectué trois répétitions d'analyses/échantillon.

7.2.4. Paramètres mesurés

Les deux types de paramètres, croissance et production, ont été mesurés au cours de la deuxième année de culture.

7.2.4.1. Paramètres de croissance

7.2.4.1.1. La plante

Sur la plante en cours de culture (mars 2002), nous avons mesuré sur un échantillon de 20 plantes/cultivar et par type de plante:

- la hauteur de la plante;
- le nombre de feuilles/plante.

7.2.4.1.2. La feuille

Nous avons mesuré (mars 2002) sur un échantillon de 20 plantes/cultivar et par type de plante:

- la longueur de la feuille (limbe plus pétiole);
- la largeur de la feuille (la plus grande largeur).

Nous avons durant cette même période arraché 10 plantes/cultivar et par type de plante pour déterminer la surface foliaire totale (limbe plus pétiole)/plante, mesurée à l'aide d'un planimètre LI-COR "model 3100 area meter".

7.2.4.1.3. Production de biomasse

Les mêmes plantes arrachées et utilisées pour mesurer la surface foliaire (10 plantes/cultivar et par type de plante) sont aussi utilisées pour déterminer:

- le poids frais et le poids sec de la partie aérienne;
- le poids frais et le poids sec de la partie racinaire.

Le poids sec est déterminé après exposition du matériel végétal dans une étuve à 110° C pendant 20 jours. En effet, après cette durée en étuve, le poids des plantes a cessé de diminuer.

7.2.4.2. Paramètres de production

Les paramètres de production que nous avons mesuré sont:

- le nombre de capitules produits/plante durant la deuxième année de culture. Ce paramètre a été déterminé deux mois avant la fin des récoltes sur un échantillon de 20 plantes/cultivar et par type de plante;

- le poids moyen d'un capitule: à chaque récolte effectuée sur les 20 plantes choisies pour déterminer le nombre de capitules/plante, les capitules sont pesés individuellement (capitule plus 3 à 4 cm de la hampe).

7.3. RESULTATS ET DISCUSSION

7.3.1. Paramètres de croissance

7.3.1.1. La plante

L'observation du tableau 7.1 relatif aux mesures faites sur la plante nous permet de constater que pour les deux cultivars étudiés, 'Violet d'Hyères' et 'Blanc Oranais', la croissance végétative est meilleure pour les plantes ayant pour origine l'*in vitro* que pour celles provenant d'une multiplication traditionnelle à partir d'œillets. En effet, aussi bien pour la hauteur de la plante que pour le nombre de feuilles par plante, il existe une différence hautement significative entre les deux origines en faveur des vitroplants. Cependant cette différence est plus accentuée chez le 'Violet d'Hyères' (rapport=1,8) que chez le 'Blanc Oranais' (rapport=1,3). D'autre part, nous avons noté pour les plantes provenant d'*in vitro*, une meilleure croissance végétative chez les plantes du 'Violet d'Hyères' que chez celles du 'Blanc Oranais'. Il existe en effet une différence significative entre la hauteur et le nombre de feuilles par plante des vitroplants du 'Violet d'Hyères' et celles du 'Blanc Oranais' en faveur des premiers. Toutefois, aucune différence n'a été notée au niveau des paramètres mesurés sur les plantes du 'Violet d'Hyères' ou du 'Blanc Oranais' quand elles ont toutes des œillets comme origine.

Nous avons d'autre part noté une meilleure homogénéité de développement des vitroplants que les plantes issues d'œillets.

Tableau 7.1. Hauteur et nombre de feuilles/plante chez ‘Violet d’Hyères’
et ‘Blanc Oranais’ cultivées au champ

Cultivar	‘Violet d’Hyères’			‘Blanc Oranais’		
	Œilletons	Vitroplants	Rapport vit./œill.*	œilletons	Vitroplants	Rapport vit./œill.*
Origine des plantes						
Hauteur de la plante	63.9 ± 3.2 ab	117.7 ± 4.2 c	1.8	55.0 ± 2.3 a	72.8 ± 4.5 b	1.3
Nombre feuilles/plante	48.8 ± 2.7 a	87.8 ± 5.5 c	1.8	48.2 ± 1.7 a	62.2 ± 2.5 b	1.3

Les moyennes de la même ligne suivies par la même lettre, ne diffèrent pas statistiquement entre elles au seuil de 5%.

** rapport=valeur du paramètre mesuré du vitroplant / valeur du paramètre mesuré de la plante provenant d’œilleton*

7.3.1.2. La feuille

A la suite de l’analyse des différentes mesures faites sur la feuille, nous avons constaté que:

- pour les deux cultivars étudiés, le tableau 7.2 montre qu’il y a une différence hautement significative entre la longueur des feuilles des plantes issues d’œilletons et des plantes issues d’*in vitro* avec des valeurs significativement plus élevées pour ces dernières. Les plantes provenant d’œilletons et appartenant aux deux cultivars ne diffèrent pas significativement entre elles au seuil de 5%, alors que la longueur des feuilles des vitroplants de ‘Violet d’Hyères’ est significativement plus élevée que celle des vitroplants du ‘Blanc Oranais’;

Tableau 7.2. Longueur, largeur et surface foliaire totale/plante
de plantes provenant d’œilletons ou de l’*in vitro*

Les moyennes de la même ligne suivies par la même lettre, ne diffèrent pas statistiquement entre elles au seuil de 5%.

Cultivar	‘Violet d’Hyères’			‘Blanc Oranais’		
	œilletons	Vitroplants	Rapport vit./œill.*	œilletons	Vitroplants	Rapport vit./œill.
Origine des plantes						
Longueur de la feuille (cm)	71.2 ± 2.7 ab	120.1 ± 4.1 c	1.7	63.2 ± 2.7 a	77.0 ± 3.4 b	1.2
Largeur de la feuille (cm)	27.4 ± 1.6 a	48.9 ± 2.7 b	1.8	28.2 ± 1.6 a	32.2 ± 2.5 a	1.1
Surface foliaire par plante (cm ²)	18 404 ± 1693 a	111 029 ± 5674 c	6.0	13 592 ± 1605 a	37 327 ± 4042 b	2.7

** rapport=valeur du paramètre mesuré du vitroplant / valeur du paramètre mesuré de la plante provenant d’œilleton*

- nous n'avons relevé aucune différence significative quant à la largeur des feuilles entre les deux types de plantes pour le cultivar 'Blanc Oranais'; cependant pour le 'Violet d'Hyères', les vitroplants ont une largeur 1.8 fois plus grande que celle des plantes provenant d'œilletons;
- c'est au niveau de la surface foliaire totale/plante que nous avons noté des différences hautement significatives entre les différents types de plantes pour les deux cultivars étudiés. Cette différence est beaucoup plus accentuée pour 'Violet d'Hyères' que pour 'Blanc Oranais'. En effet, si la surface foliaire des plantes provenant d'œilletons ne diffère pas significativement entre les deux cultivars, elle l'est pour les vitroplants. Celle-ci n'est que de $37\,327 \pm 4042 \text{ cm}^2$ pour les vitroplants du 'Blanc Oranais' (tableau 7.2), alors qu'elle est multipliée par trois ($111\,029 \pm 5674 \text{ cm}^2$) pour les vitroplants du 'Violet d'Hyères'. D'autre part, il existe pour les deux cultivars une différence hautement significative (au seuil de 5%) entre la surface foliaire des plantes provenant d'œilletons et celle des vitroplants, en faveur de ces derniers (figure 7.1-1). En outre, cette différence est beaucoup plus accentuée pour le 'Violet d'Hyères' (un rapport de 6) que pour le 'Blanc Oranais' (un rapport de 2.7).

7.3.1.3. Production de biomasse

Le tableau 7.3 indiquant l'analyse de la variance des mesures des différents paramètres se rapportant à la production de biomasse montre qu'il n'y a aucune différence significative pour tous les paramètres mesurés entre les plantes provenant d'œilletons et les vitroplants pour le cultivar 'Blanc Oranais', alors que pour ces mêmes paramètres, il existe une différence significative entre les deux types de plantes du cultivar 'Violet d'Hyères'. Ce dernier a une meilleure capacité à produire de la biomasse et à stocker beaucoup plus de réserves au niveau des racines que le cultivar 'Blanc Oranais'. Néanmoins, il est à signaler que les vitroplants du 'Violet d'Hyères' sont excessivement vigoureuses et ont un feuillage vert foncé et couvert d'un duvet reflétant un bon état phytosanitaire (figure 7.1-2), ceci est aussi le cas pour les vitroplants de 'Blanc Oranais' mais dans une moindre ampleur. Cependant, les plantes provenant d'œilletons des deux cultivars, étaient peu vigoureuses, avaient un feuillage

jaunâtre et présentaient des symptômes de viroses pour la plupart des plantes (figure 7.1-5).

7.3.2 Paramètres de production

7.3.2.1. Précocité

Nous avons noté les dates des premières récoltes pour les deux types de plantes et pour les deux cultivars:

- ‘Blanc Oranais’ provenant d’œilletons: le 07/12/2001;
- ‘Blanc Oranais’ provenant d’*in vitro*: le 14/12/2001;
- ‘Violet d’Hyères’ provenant d’œilletons: le 15/01/2001;
- ‘Violet d’Hyères’ provenant d’*in vitro*: le 20/01/2001.

Tableau 7.3. Poids frais et poids sec de la partie aérienne et de la partie racinaire des plantes provenant d’œilletons ou de l’*in vitro*

Cultivar	‘Violet d’Hyères’			‘Blanc Oranais’		
	œilletons	Vitroplants	Rapport vit./œill.*	œilletons	Vitroplants	Rapport vit./œill.*
Poids frais partie aérienne (g)	3626 ± 416 a	18 382 ± 1254 b	5.0	2432 ± 404 a	5054 ± 1000 a	2.1
Poids frais partie racinaire (g)	1950 ± 42 b	5490 ± 312 c	2.8	865 ± 140 a	1365 ± 175 a	1.6
Poids sec partie aérienne (g)	423 ± 56 a	1224 ± 84 b	2.9	302 ± 32 a	391 ± 44 a	1.3
Poids sec partie racinaire (g)	643 ± 19 b	1844 ± 124 c	2.9	271 ± 41 a	401 ± 46 a	1.5

Les moyennes de la même ligne suivies par la même lettre, ne diffèrent pas statistiquement entre elles au seuil de 5%.

* rapport=valeur du paramètre mesuré du vitroplant / valeur du paramètre mesuré de la plante provenant d’œilleton



Figure 7.1. (1). Différence de taille entre une feuille d'une plante issue d'œilleton et une feuille d'un vitroplant (barre: 20 cm); (2).Aspect d'une culture en production de plantes de 'Violet d'Hyères' issues d'œilletons; (3). différence morphologique entre les capitules de vitroplants (A) et ceux de plantes issues d'œilletons (B); (4). aspect d'une culture en production de vitroplantes de 'Violet d'Hyères'; (5). aspect virosé (flèches) des plantes provenant d'œilletons.

Nous constatons d'après ces dates de récolte que le cultivar 'Blanc Oranais' est plus précoce que le 'Violet d'Hyères' pour les deux origines de plantes, mais ceci était attendu puisque le 'Blanc Oranais' est connu pour être un cultivar précoce et il produit habituellement avant le cultivar 'Violet d'Hyères'. Cependant, ce qui est remarquable, c'est le fait que pour les deux cultivars, les plantes issues d'œilletons sont plus précoces que les vitroplantes, autrement dit, qu'il y a eu une perte de la précocité pour les plantes produites par micropropagation *in vitro*.

7.3.2.2. Production

Le tableau 7.4 présente les différents paramètres de production mesurés. Nous pouvons constater que pour le 'Blanc Oranais', aucune amélioration significative n'a été notée en passant des plantes provenant d'œilletons aux vitroplantes, aussi bien pour le nombre de capitules produits/plante que pour le poids moyen d'un capitule. Cependant pour le cultivar 'Violet d'Hyères', il existe une différence significative entre les paramètres de production relatifs aux deux types de plantes. En outre, il y a une amélioration aussi bien de la production en capitules/plante que du poids moyen du capitule pour les vitroplantes. En effet, celles-ci ont produit une fois et demi plus de capitules que les plantes provenant d'œilletons, et les capitules produits ont un poids moyen significativement plus élevé que celui des capitules produits par les plantes provenant d'œilletons.

Tableau 7.4. Nombre de capitules produits par plante et poids moyen du capitule pour les plantes provenant d'œilletons et d'*in vitro* cultivées au champ des cultivars 'Violet d'Hyères' et 'Blanc Oranais'

Cultivar	'Violet d'Hyères'			'Blanc Oranais'		
	œilletons	Vitroplantes	Rapport vit./œill.	œilletons	Vitroplantes	Rapport vit./œill.
Nombre de capitules produits/plante	14.1 ± 1.0 a	20.6 ± 0.8 b	1.5	13.3 ± 1.0 a	12.3 ± 1.2 a	0.9
Poids moyen d'un capitule	127.5 ± 8.6 a	160 ± 6.5 b	1.3	150 ± 10.5 ab	164 ± 8.9 b	1.1

Les moyennes de la même ligne suivies par la même lettre, ne diffèrent pas statistiquement entre elles au seuil de 5%.
rapport=valeur du paramètre mesuré du vitroplant / valeur du paramètre mesuré de la plante provenant d'œilleton

La plupart de nos résultats concernant les différents paramètres mesurés sont confirment ceux obtenus par Harbaoui (1982). Toutefois, nos plantes toutes origines confondues et pour les deux cultivars étudiés, ont présenté des valeurs beaucoup plus élevées pour les différents paramètres. Ceci est peut être dû au fait que notre essai a été mené en Tunisie où les conditions écologiques conviennent mieux à la croissance des plantes d'artichaut que les conditions à Gent où Harbaoui avait mené ses essais.

Les différents paramètres ont révélé une croissance végétative beaucoup plus importante pour les vitroplants que pour les plantes issues d'œilletons. Ceci est certainement dû à l'assainissement des vitroplants de tous sinon de la plupart des virus et bactéries par la culture de méristèmes. En effet, à part la meilleure croissance végétative, les vitroplants ont présenté un état phytosanitaire visuellement meilleur que les plantes issues d'œilletons. Harbaoui (1982) a lui aussi obtenu une amélioration de la vigueur des vitroplants.

Nous avons d'autre part noté une perte de la précocité des vitroplantes par rapport aux plantes provenant d'œilletons; ceci constitue un très grand inconvénient pour les agriculteurs, puisque ceux-ci recherchent toujours les productions précoces qui arrivent sur le marché quand les prix de vente sont encore élevés. Harbaoui (1982) infirme nos résultats, puisqu'il n'a observé aucun effet du passage *in vitro* sur la précocité des plantes.

7.3.3. Cytométrie en flux

Des variations morphologiques ont été observées sur les capitules des vitroplantes du cultivar 'Violet d'Hyères' (figure 7.1-3). Ces capitules présentent une plus grande pigmentation au niveau des bractées qui paraissent alors plus violettes que les bractées des capitules récoltés sur les plantes provenant d'œilletons (figure 7.1-2 et 4). Nous avons voulu vérifier si cette vitrovariation est en relation ou non avec une éventuelle modification du niveau de ploïdie des plantes.

Nous avons effectué les analyses de cytométrie en flux pour les deux types de plantes des deux cultivars 'Violet d'Hyères' et 'Blanc Oranais'. Nous avons obtenu le même type de graphique que celui de la figure 7.2 avec les échantillons des suspensions de noyaux appartenant à toutes les plantes testées ('Violet d'Hyères'-vitroplant; 'Violet

d'Hyères'-œilleton, 'Blanc Oranais'-vitroplant et 'Blanc Oranais'-œilleton). La figure 7.2 montre deux zones, la première à grand pic correspond à des cellules en phase G0/G1 du cycle cellulaire caractérisée par une synthèse des protéines et un contenu 2C d'ADN. La deuxième zone correspond à des cellules en phase G2 ou M où celles-ci vont contrôler que la réplication de l'ADN a bien été réalisée et préparent la division cellulaire, les chromosomes sont alors séparés (phase M) et les cellules vont se diviser chacune en deux cellules filles, elles sont alors à 4C d'ADN. Les cellules situées entre les deux zones pré-citées, sont à la phase S.

L'aire de ces zones est corrélée avec le nombre de cellules excitées pas la même intensité de fluorescence et par conséquent contenant le même niveau d'ADN (De Schepper, 2001).

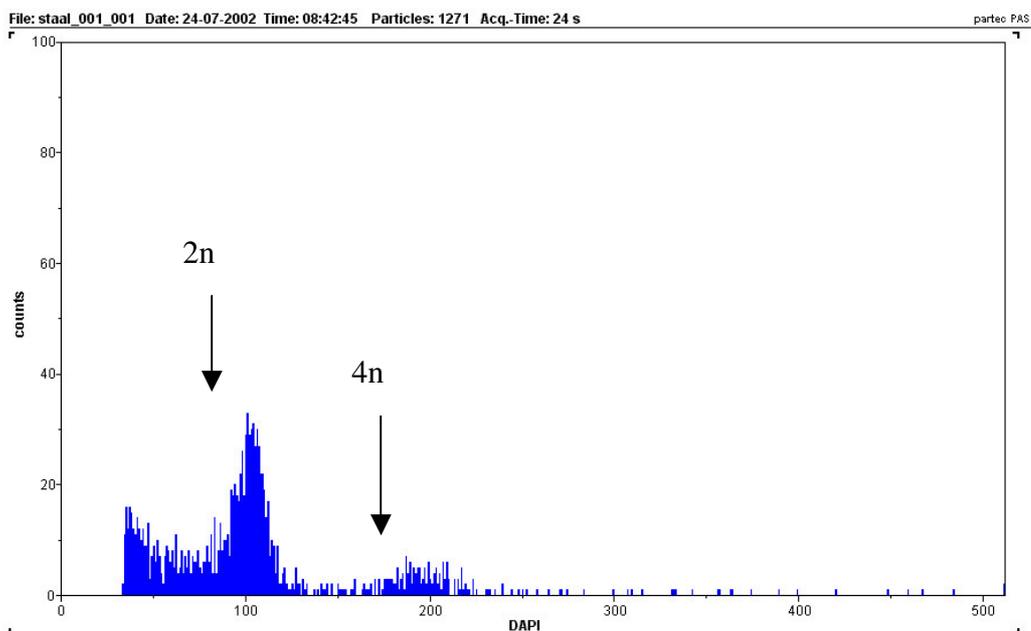


Figure 7.2. Histogramme relatif au contenu en ADN obtenu après analyse de la cytométrie en flux à partir de vitroplantes du cultivar 'Violet d'Hyères'

Ces résultats montrent que les vitroplants ont gardé le même niveau de ploïdie que les plantes issues d'œilletons (2n). Ceci nous laisse déjà constater que les vitrovariations observées au champ sur des vitroplantes de 'Violet d'Hyères', ne sont pas génétiques, mais des altérations épigénétiques de l'expression du génome, liées peut être à la

méthylation de l'ADN. Cependant, deux techniques demeurent très fiables pour confirmer si les variations observées sur les capitules sont hérissables ou non, les hybridations ou les marqueurs moléculaires (micro-satellites) (Rival, 2003).

Jagannathan et Marcotrigiano (1986); Preil (1986) et Schaeffer *et al.*, (1980) ont eux aussi obtenu des variations de couleur sur les phénotypes obtenus après micropropagation *in vitro* de certaines espèces ornementales et fruitières.

En effet, il a été depuis longtemps démontré que l'utilisation des techniques de la culture *in vitro* peut induire des variations somaclonales; ceci se passe généralement et avec une plus grande fréquence quand les pousses dérivent de cellules dédifférenciées (Lee et Phillips, 1988; Scowcroft *et al.*, 1983). Toutefois, même quand on part de structures organisées, on aboutit parfois à des variations sur les plantes obtenues (Swartz, 1990).

Ces variations peuvent avoir comme causes:

- Des variations pré-existantes dans les plantes: elles varient entre les différents type de tissus, organes, individus et génotypes. Un explant contient toujours une population hétérogène de cellules et c'est cette hétérogénéité qui semble être responsable des variations qui ont lieu dans la plante (Sree Ramulu et Dijkhuis, 1986).
- La fréquence des subcultures entraîne souvent des variations. Cassels et Morrish (1987) ont constaté que pour des explants de *Begonia*, plus le nombre de subcultures augmente, plus le degré de variation augmente.
- La composition du milieu de culture: beaucoup d'auteurs ont indiqué la nature stressante du milieu de culture; en effet, les régulateurs de croissance, les sels inorganiques et les produits utilisés comme source de carbone (saccharose, glucose) entraînent un développement des tissus ou à des divisions cellulaires en conditions artificielles de survie et peuvent tous induire des variations au niveau des plantes micropropagées (Swartz, 1990).
- Les facteurs physiques: température lumière, viscosité et osmolarité du milieu de culture, ont tous des effets sur le cycle de division cellulaire en culture, et peuvent par conséquent entraîner des variations (Gould, 1986).

Néanmoins, les vitrovariations peuvent donner naissance à de nouveaux phénotypes ou vitrovariants qui peuvent être considérés comme des éléments originaux de diversification, mais qui peuvent aussi constituer des déviations indésirables vis-à-vis du standard (Sibi, 1995).

Ainsi, soit la vitrovariabilité est recherchée, soit elle va créer un handicap lors de l'utilisation des cultures *in vitro*.

La modification de la couleur des capitules obtenue dans le cas de nos vitroplantes est à notre avis recherchée par le consommateur Tunisien, en effet celui-ci préfère d'une part les artichauts violets aux artichauts blancs et d'autre part apprécie cette couleur violet foncé des capitules.

7.4. CONCLUSION

L'étude des performances agronomiques des plantes obtenues *in vitro* des deux cultivars d'artichaut 'Violet d'Hyères' et 'Blanc Oranais' montre que ces plantes sont supérieures aux plantes obtenues par multiplication classique par œilletons quant à tous les paramètres de croissance étudiés. Ceci prouve que le passage *in vitro* permet aux plantes une grande amélioration de leur vigueur. Toutefois, pour les paramètres de production, l'inconvénient de la perte de précocité causé par le passage *in vitro* demeure très important et limiterait l'utilisation de cette voie biotechnologique pour la multiplication de l'artichaut.

CHAPITRE VIII

**DISCUSSION ET CONCLUSIONS
GENERALES**

L'objectif de notre étude était de trouver un système adéquat de micropropagation de l'artichaut. Cette espèce est d'une assez grande importance, dans le monde généralement, et en Tunisie particulièrement, pour ses propriétés culinaires, thérapeutiques et industrielles; toutefois, elle est confrontée à des problèmes qui limitent sa culture et son développement. En effet, pour l'artichaut, la multiplication végétative demeure la seule voie de multiplication pour le moment. Néanmoins, de nombreux efforts ont été déployés pour réaliser une multiplication générative, mais jusqu'à présent les succès restent limités. En outre, même pour la multiplication générative, il sera nécessaire de disposer d'une technique adéquate de multiplication végétative pour multiplier les lignées parentales. Cependant, vu le faible taux de multiplication d'une part et les attaques parasitaires, particulièrement virales d'autre part, la culture est confrontée alors à des limites que seules les techniques de la culture *in vitro* sont capables de résoudre.

Ces problèmes ont pu être partiellement résolus par les travaux de plusieurs auteurs (Harbaoui, 1982; Pécaut *et al.*, 1983; Moncousin et Ducreux, 1984; Draoui *et al.*, 1993), mais les résultats sont toujours restés très peu brillants quant aux taux de multiplication, d'enracinement et de survie à l'acclimatation ce qui handicapait une application commerciale de ces techniques.

Nous avons essayé au cours de cette étude de résoudre ces différents problèmes en vue de mettre en place un système intégré de multiplication de l'artichaut par les techniques de la culture *in vitro*. Ce système devrait permettre de bons résultats capables de rentabiliser cette méthode de multiplication, vu le coût élevé de ces techniques.

Différentes étapes ont été suivies afin d'établir ce système. Nous avons mis en culture des méristèmes des deux cultivars les plus cultivés en Tunisie, 'Violet d'Hyères' et 'Blanc Oranais', afin de minimiser les contaminations bactériennes et virales et pour constituer un stock de plantes mères qui serviront aux différentes expérimentations.

En utilisant des pousses provenant de ces méristèmes, nous avons essayé en premier lieu d'améliorer le taux de multiplication *in vitro* moyennant différentes substances, et différents régulateurs de croissance. Ensuite, plusieurs essais ayant pour but l'amélioration du taux d'enracinement ont été menés en adoptant différentes

substances et différentes techniques. Nous nous sommes par la suite intéressés à deux phénomènes importants qui ont lieu au moment de l'enracinement, l'évolution des peroxydases dans la pousse et les modifications anatomiques survenant au niveau de la base de cette pousse au cours de l'enracinement.

L'acclimatation est une phase très critique dans la chaîne de production de plantes par micropropagation; nous avons étudié cette phase pour l'artichaut et enfin nous avons étudié les performances agronomiques des vitroplants des deux cultivars en question sous les conditions écologiques Tunisiennes.

8.1. INITIATION

Nos résultats confirment ceux obtenus par d'autres auteurs qui ont travaillé sur cette espèce (Harbaoui et Debergh, 1980; Pécaut *et al.*, 1983, Draoui *et al.*, 1993) et qui ont réussi à établir des cultures d'artichaut à partir de méristèmes. Toutefois, le problème des polyphénols qui constituait au début un obstacle pour le développement du méristème a pu être maîtrisé par l'utilisation de l'acide citrique et de l'acide ascorbique soit pendant la stérilisation du matériel végétal, soit dans le milieu de culture.

8.2. MULTIPLICATION *IN VITRO* DE L'ARTICHAUT

Dans le but d'améliorer la qualité des pousses et le taux de multiplication *in vitro*, nous avons utilisé différentes cytokinines: BAP, 2iP et K déjà testées sur l'artichaut par d'autres auteurs, et la mT, qui n'était pas encore disponible du temps des travaux publiés antérieurement sur cette espèce, mais qui s'est révélée performante avec d'autres espèces. Avec l'artichaut aussi, cette cytokinine a donné les meilleurs résultats aussi bien pour la qualité des pousses que pour le taux de multiplication. En effet, l'addition de 0.5 mg/L de mT au milieu de prolifération a permis l'obtention des touffes (explant primaire et pousses axillaires) d'un vert foncé, à feuilles peu ou pas hyperhydriques et présentant un duvet. Les pousses sur le milieu additionné de mT ont développé la plus faible callogenèse au niveau de leur base par rapport aux pousses sur BAP, 2iP ou K. D'autre part, nous avons pu améliorer le taux de multiplication avec la mT, qui a passé de 1.9 avec la BAP à 2.5. Quoiqu'il reste assez faible, ce taux peut

être considéré comme acceptable vu qu'il s'agit de pousses d'une bonne qualité, donc capables de mieux s'enraciner.

Afin d'améliorer encore plus le taux de multiplication obtenu avec la mT, nous avons utilisé le paclobutrazol dans le milieu de culture. En effet, Werbrouck et Debergh (1996) ont montré que cette substance augmente l'effet inducteur du bourgeonnement dû aux cytokinines ajoutées au milieu de culture. Ceci a été confirmé par nos expériences, car nous avons pu obtenir un taux de multiplication de 4.5 quand nous avons ajouté 2 mM/L de paclobutrazol au milieu de culture contenant la mT, tout en maintenant une bonne qualité des pousses. Le paclobutrazol a en effet beaucoup de similarités avec des fongicides appartenant à la famille des imidazoles, et pour ces derniers Werbrouck *et al.* (2003) ont démontré que de telles substances interfèrent dans la biosynthèse des gibbérellines et des brassinolides. Des essais plus approfondis sont nécessaires pour étudier l'impact de cet inhibiteur de croissance sur l'artichaut.

Enfin une technique efficace qui a contribué à l'obtention d'une bonne qualité de vitroplants quand ceux-ci sont inoculés sur un milieu adéquat, c'est le refroidissement de la base des récipients ("bottom cooling") recommandé par Vanderschaeghe et Debergh (1987).

L'utilisation d'un milieu de multiplication composé des macro et micro éléments de Murashige et Skoog (1962) additionné de 0.1 mg/L AIB, 0.5 mg/L mT et 2 mM/L paclobutrazol donne les meilleurs résultats aussi bien au niveau de la qualité des pousses obtenues qu'au niveau du taux de multiplication.

8.3. ENRACINEMENT *IN VITRO* DE L'ARTICHAUT

Les travaux faits jusqu'à maintenant sur l'enracinement de l'artichaut *in vitro* ont été peu brillants (Harbaoui, 1982; Moncousin, 1981; Draoui *et al.*, 1993). Cette espèce présente de grandes difficultés pour s'enraciner. Différentes substances et méthodes ont été adoptées pour essayer d'améliorer le taux d'enracinement *in vitro* de cette espèce:

- Pour les deux cultivars étudiés, 'Violet d'Hyères' et 'Blanc Oranais', nous avons réussi à améliorer les pourcentages d'enracinement en ajoutant 30 µM/L de riboflavine dans le milieu de culture; ils ont en effet passé de 0 à 30% pour 'Blanc

Oranais' et de 3 à 43% pour 'Violet d'Huyères'. En effet, Gorst *et al.*(1983) et Drew *et al.* (1991), ont montré que cette substance peut en présence de lumière photo-oxyder l'auxine contenue dans le milieu de culture, vu que la présence d'auxine dans le milieu a des effets bénéfiques sur l'enracinement en phase d'induction et pas en phase d'expression, au moment du développement des racines.

- Nous avons étudié l'effet du moment de l'exposition à l'auxine sur l'enracinement *in vitro* de l'artichaut et nous avons constaté que les pousses s'enracinent mieux (66.7%) quand elles passent en premier temps sur un milieu contenant une auxine pendant quelques jours, suivi d'un repiquage sur un milieu neuf sans auxines; l'opération inverse entraîne d'une part une mauvaise qualité de pousses (jaunes, nécrosées, etc...) et d'autre part de très faibles taux d'enracinement (30.6%). Cette technique qui fait appel à un passage successif sur deux milieux de culture, le premier contenant l'auxine et le second pas, a été suggérée depuis qu'on avait constaté que les plantes en enracinement passent par deux phases, une phase d'initiation, où la plante a besoin d'auxine et une phase d'expression et d'émergence des racines, où la présence d'auxine est défavorable à la croissance de celles-ci (Drew *et al.*, 1993).
- Les auxines ont été toujours utilisées pour promouvoir l'induction des racines *in vitro*; cependant, vu leurs spécificité vis à vis des différentes espèces, il est toujours nécessaire d'établir des essais avec les différentes auxines pour sélectionner celle qui donne les meilleurs résultats. Pour les cultivars d'artichaut 'Violet d'Hyères' et 'Blanc Oranais', nous avons testé l'effet de quatre auxines, l'AIA, l'AIB, l'ANA et la BSAA, sur l'enracinement *in vitro*. Les résultats obtenus montrent que ce sont l'ANA et la BSAA à 2 mg/L qui ont donné les pourcentages d'enracinement significativement les plus élevés (91.7% avec 2 mg/L ANA et 69.4% avec 2 mg/L BSAA). Si l'ANA a déjà prouvé ses compétences en tant qu'auxine promotrice de l'enracinement de l'artichaut *in vitro* (Ancora *et al.*, 1981; Draoui *et al.*, 1993), la BSAA a été utilisée pour la première fois et elle a donné des résultats satisfaisants tout comme ceux obtenus par d'autres auteurs sur d'autres espèces avec cette nouvelle auxine sélénée (Gaspar, 1995; Tadino *et al.*, 2003).

- Une autre substance qui a permis d'améliorer l'enracinement *in vitro* en qualité et en quantité de plusieurs espèces, sont les cyclodextrines (Mura *et al.*, 1995; Butti *et al.*, 2000; Apostolo *et al.*, 2001). Ce sont des carbohydrates cycliques qui augmentent la perméabilité membranaire des cellules et par conséquent une meilleure assimilation et action des auxines (Uekama *et al.*, 1998). Ajoutée à 2 g/L dans le milieu d'enracinement du cultivar 'Violet d'Huyères', la β -cyclodextrine a permis d'avoir des pourcentages d'enracinement significativement plus élevés que ceux obtenus avec les milieux ne contenant pas cette substance. En outre, nous avons noté une amélioration de la qualité du système racinaire formé par les pousses en présence de β -cyclodextrine.
- Nous avons enfin testé une technique assez courante en enracinement *in vitro*, l'effet de la dilution des macroéléments sur l'enracinement et nous n'avons pas relevé de grandes différences entre le milieu avec MS complet ou MS/2, puisque tous les pourcentages d'enracinement étaient supérieurs à 85%. Cependant, l'effet de la dilution des macroéléments a été remarqué sur le nombre de racines. Avec MS/2, nous avons obtenu un nombre de racines significativement plus élevé qu'avec MS complet. Plusieurs auteurs ont attribué cette amélioration à la baisse de la concentration de l'élément NH_4NO_3 particulièrement, qui paraît avoir un effet inhibiteur sur la croissance des racines (Halperin, 1967; Druart, 1992).

A côté de cette série d'expériences qui ont abouti à des résultats assez intéressants concernant l'enracinement, il y a eu une autre série d'essais qui étaient non concluants. Ces essais ont étudié les effets de la taille de l'explant, de la qualité de la lumière, et de la méthode "double layer" sur l'amélioration de l'enracinement *in vitro* de l'artichaut.

Il est important à préciser que les essais non concluants ont été tous faits en partant de pousses provenant de rangs de subcultures inférieurs aux autres essais. En effet, ce n'est qu'à la 9^{ème} subculture que nous avons commencé à avoir des taux d'enracinement supérieurs à 40%. Ces taux vont en augmentant, en avançant dans le rang de subculture pour atteindre et se stabiliser à 100% vers les derniers rangs (à partir du 12^{ème} rang). Ceci est du probablement à un effet de rajeunissement du matériel végétal, dont plusieurs auteurs ont parlé depuis plusieurs décennies (Doorenbos, 1953, 1965; Franclet, 1969). En outre Druart (1994, 1995) a précisé que

les espèces difficiles à enraciner réagissent mieux après plusieurs passages successifs en multiplication. Toutefois, on se trouve devant un dilemme, puisque le nombre élevé de subcultures entraîne parfois des variations somaclonales au niveau des phénotypes obtenus, surtout lorsque des bourgeons adventifs sont produits. Il serait donc important de choisir à quel rang de subculture il faudrait arrêter la multiplication pour qu'il y ait un équilibre entre l'aptitude à l'enracinement et des variations somaclonales limitées.

Par ailleurs, nous pouvons recommander l'utilisation des différentes méthodes d'enracinement capables de minimiser les frais de production dans la chaîne de multiplication *in vitro* et qui n'ont pas abouti lors de nos essais, entre autres la méthode à double phase ("double layer") et la méthode d'enracinement *ex vitro*. Ces méthodes doivent en effet être reprises moyennant des pousses issues de rangs de subculture supérieurs à 10. En effet, l'efficacité des techniques d'enracinement pour l'artichaut reste apparemment tributaire du rang de subculture duquel proviennent les pousses à enraciner.

8.4. UTILISATION DES PEROXYDASES COMME MARQUEUR

BIOCHIMIQUE DE L'ENRACINEMENT *IN VITRO*

Nous avons utilisé les peroxydases comme marqueur biochimique de l'enracinement *in vitro* de l'artichaut. En effet, ces enzymes peuvent modifier la balance hormonale et moduler la morphogénèse des plantes (Gaspar *et al.*, 1982). En outre, pendant la phase d'enracinement, ces enzymes suivent une évolution typique qui correspond aux différents stades de l'enracinement, l'induction et l'initiation racinaire. Nous avons en effet réussi à retracer cette courbe typique avec des pousses du cultivar 'Violet d'Hyères' en enracinement. Nous avons alors constaté que les premiers jours qui suivent l'inoculation sur le milieu rhizogène, l'activité peroxydasique des pousses a augmenté pour atteindre un pic vers le 5^{ème}-6^{ème} jour, suivi d'une baisse. Moncousin et Gaspar (1983, 1988), Mato *et al.* (1988), et Hausman (1989), ont tous trouvé ces mêmes résultats et ont qualifié de phase d'induction de la rhizogénèse la première partie de la courbe (avant le pic) et de phase d'initiation sa 2^{ème} partie (après le pic). Ces résultats sont importants puisqu'à partir du moment où on peut déterminer les différentes phases de l'enracinement on pourrait d'une part déterminer le moment de

l'application du traitement rhizogène pour que celui-ci intervienne au moment opportun et d'autre part appliquer des traitements capables d'augmenter ou de baisser l'activité peroxydasique qui a son tour module la rhizogénèse.

8.5. CHANGEMENTS ANATOMIQUES AU COURS DE LA RHIZOGENESE

L'étude des changements anatomiques se déroulant après un traitement rhizogène n'a jamais été étudiée auparavant pour l'artichaut. Nous avons fait des coupes histologiques au niveau de la base des pousses en enracinement à différents moments à partir du jour de l'inoculation sur le milieu d'enracinement. Nous avons alors pu déterminer trois stades ontogéniques:

- un premier stade de dédifférenciation des cellules se déroulant au niveau du parenchyme inter-fasciculaire, et suivi d'une activation et d'un épaissement du cambium intra-fasciculaire;
- un deuxième stade d'organisation en amas méristématiques qui va aboutir par la suite à la formation des méristèmes;
- au 12^{ème} jour, on note déjà l'apparition des primordia racinaires, c'est le troisième et dernier stade ontogénique de l'enracinement.

D'autre part, nous avons constaté d'après ces mêmes coupes que les racines adventives d'artichaut peuvent avoir deux origines; elles peuvent soit naître directement à partir des cellules de la tige, précisément au niveau de l'activité cambiale et des méristèmes inter-fasciculaires, dans ce cas, les racines ont pour origine les tissus endogènes; soit indirectement à partir de cellules devenues compétentes et dans ce cas les racines sont formées à partir des tissus superficiels et des tissus du cal (Bouza *et al.*, 1994).

Par conséquent, les racines formées sont dans le premier cas à bonne connection vasculaire permettant un bon développement de la plante pendant la phase d'acclimatation; dans le deuxième cas, sont à très pauvre connection vasculaire ce qui engendre des répercussions négatives sur la future plante.

En outre, nous avons remarqué que pour l'artichaut l'induction se fait dans les deux semaines qui suivent le traitement rhizogène, puisque nous avons repéré des primordias racinaires sur les coupes histologiques au 12^{ème} jour. Toutefois l'expression et l'émergence des racines durent longtemps; en effet, pour les essais d'enracinement

où nous avons obtenu 100% d'enracinement, ce n'est qu'après 5 semaines qu'on obtient des pousses bien enracinées. Il serait donc intéressant dans le but de réduire les charges, d'essayer d'acclimater les pousses après la phase induction dans le but de les faire enraciner *ex vitro*, puisque les primordias racinaires sont déjà existants dans ces pousses. Une étude anatomique sur des pousses en enracinement issues des premiers rangs de subculture serait intéressante à réaliser dans le but de voir s'il y aurait induction racinaire ou non durant toute la phase d'enracinement, après laquelle aucune racine n'a pu être observée.

8.6. ACCLIMATATION DES VITROPLANTS D'ARTICHAUT

A part l'enracinement, l'acclimatation demeure une phase assez difficile à maîtriser chez l'artichaut. Le passage direct des pousses du laboratoire vers la serre a abouti à leur mort. D'autre part, tous nos essais d'enracinement *ex vitro* se sont soldés par un échec, surtout que dans ce cas là les pousses provenaient des premiers rangs de subculture. Cette technique, proposée par Debergh et Maene (1981), a été menée et réussie avec certaines espèces, mais s'est avérée inefficace pour l'artichaut dans nos conditions de culture. Afin de réussir l'acclimatation de cette espèce, les plantules doivent avoir au moins une racine. D'autre part, l'acclimatation doit se faire progressivement afin d'éviter des chocs physiologiques aux plantules. Pour cela, la modification des différents facteurs de l'environnement doit se faire par étapes. Le plus important de ces facteurs est l'humidité relative. En effet, c'est elle qui entraîne le plus des modifications anatomiques au niveau de la plante. A la suite d'une étude anatomique de la feuille *in vitro* et pendant les différentes phases de l'acclimatation, nous avons constaté qu'une humidité relative élevée entraîne des modifications au niveau de la structure anatomique et du fonctionnement des feuilles. Celles-ci deviennent alors épaisses, mais avec un épiderme fin et une cuticule peu ou pas couverte de cire; elles présentent aussi peu de cellules palissadiques et beaucoup d'espaces inter-cellulaires; le contenu en chlorophylles a et b dans ces feuilles baisse aussi. Ces modifications entraînent des plantes très fragiles et sujettes à de grands risques de pertes d'eau par transpiration lors de l'acclimatation (Sutter, 1982), d'où l'importance d'un passage progressif des conditions d'atmosphère confinée à

l'intérieur des récipients aux conditions relativement sèches *ex vitro*. Nous avons en effet obtenu 100% de réussite à l'acclimatation en plaçant les vitroplants enracinés à la sortie des récipients de culture dans une atmosphère à humidité relative presque saturée. Celle-ci était diminuée progressivement pour tendre vers une humidité relative similaire à celle qui se trouve dans les conditions de culture au champ.

Une autre méthode à essayer, serait de baisser l'humidité relative à l'intérieur des récipients (par ventilation par exemple, ou "bottom cooling") durant les derniers jours qui précèdent l'acclimatation. De cette manière les feuilles des vitroplants acquièrent une structure anatomique normale les exposant moins aux chocs physiologiques et aux risques de pertes d'eau par transpiration.

8.7. PERFORMANCES AGRONOMIQUES DES VITROPLANTS

D'ARTICHAUT

Il est important d'assurer un système permettant la micropropagation de l'artichaut pour résoudre les problèmes de multiplication et des maladies virales, mais le plus important, c'est que les clones obtenus présentent une bonne croissance au champ et surtout une bonne production. Dans le but d'étudier les performances agronomiques des clones obtenus par culture *in vitro*, nous les avons planté au champ sous les conditions écologiques Tunisiennes. Nous avons planté en parallèle, des plantes provenant d'œilletons afin de pouvoir comparer les deux types de plantes.

Les résultats obtenus montrent que les vitroplantés ont une croissance végétative significativement supérieure à celle des plantes témoin et ce pour les deux cultivars étudiés. Nous avons noté aussi une meilleure homogénéité de croissance et un meilleur état phytosanitaire des vitroplantés. Ceci est certainement dû à l'élimination de la plupart ou de toutes les contaminations bactériennes et/ou virales. Au niveau de la production, les résultats étaient différents pour les cultivars étudiés; en effet, pour 'Violet d'Hyères', nous avons noté une amélioration significative de la production de capitules par plante, alors que pour 'Blanc Oranais' on n'a noté aucune différence significative entre les deux types de plantes. Toutefois, pour les deux cultivars, nous avons noté une amélioration du calibre du capitule.

Le plus grand inconvénient qui a été relevé au niveau de l'essai de plein champ, est la perte de précocité pour les vitroplantes. En effet, pour les deux cultivars, les plantes provenant d'oeilletons ont produit leurs premiers capitules 5 à 7 jours avant les vitroplantes. Ce retard n'est pas en lui même important mais les agriculteurs recherchent toujours une précocité leur permettant d'être les premiers sur le marché. Ce même phénomène a déjà été rapporté pour d'autres plantes propagées *in vitro*, entre autres le fraisier.

Les capitules des vitroplantes de 'Violet d'Huyères' ont d'autre part présenté des variations morphologiques par rapport aux capitules des plantes témoin. En effet, ils ont une couleur violette beaucoup plus accentuée et une légère variation de la forme. Des analyses par cytométrie en flux effectuées sur les différents types de plantes n'ont montré aucune variation du niveau de ploïdie. Il s'agit probablement de variations somaclonales résultant des différents stress et traitements que les vitroplants ont subi au cours de la chaîne de production *in vitro* (composition du milieu, facteurs physiques, fréquence des subcultures, etc...); ceci avait peut être entraîné des altérations épigénétiques de l'expression du génome, liées peut être à la méthylation de l'ADN. D'autre part, il faut considérer le phénomène de réjuvenilisation qui pourrait être responsable de ces altérations phénotypiques.

Néanmoins, les variations obtenues peuvent être considérées comme bénéfiques vu que le consommateur Tunisien recherche et apprécie cette couleur violette des capitules. Il serait donc intéressant d'étudier de plus près l'origine de ces variations et leur héritabilité.

Par l'élaboration d'un système de micropropagation de l'artichaut, nous avons pu améliorer le taux de multiplication (2 à 3 /plante et par an pour la multiplication traditionnelle contre 4.5 vitroplants/ touffe et par cycle (1cycle=5semaines) pour la multiplication *in vitro*). Sur un milieu MS/2 additionné de 2 mg/L ANA ou BSAA et 2 g/L β -cyclodextrine, et en partant de pousses d'un rang de subculture supérieur à 10, nous avons obtenu 100% d'enracinement; et grâce à un protocole d'acclimatation progressif, 100% des plantules acclimatées ont survécu et poursuivi leur croissance. Au champ, les caractéristiques des vitroplantes montrent qu'elles sont supérieures aux

plantes témoin quant à leur vigueur, leurs croissance végétative, leurs état phytosanitaire et leurs production (pour 'Violet d'Hyères' surtout). Toutefois, une légère perte de précocité et une variation morphologique des capitules ont été observés.

Il serait à notre avis intéressant d'approfondir les études autour de la perte de précocité et de ces variations somaclonales observés sur les vitroplantes. Il faudrait également améliorer l'acclimatation dans le sens que maintenant il y a beaucoup d'étapes pour aboutir à un taux de succès de 100%, ce qui rend la production onéreuse.

CURRICULUM VITAE

Nom et prénom: Bouthaina DRIDI

Date et lieu de naissance: 12/11/1962 à Sousse - Tunisie

Nationalité: Tunisienne

Adresse: Ecole Supérieure d'Horticulture et d'Elevage de Chott-Mariem, 4042 Sousse-Tunisie

Tel: bureau: 00 216 73 348 544/546

domicile: 00 216 73 348 238

Fax: 00 216 73 348 691

E-mail: bouthaina2@yahoo.com

FORMATION

- ◆ Doctorat d'état en Sciences Agronomiques et Biologiques appliquées. Université de Gent-Belgique (en cours). Sujet: Un système intégré de micropropagation de l'artichaut (*Cynara scolymus* L.).
- ◆ Diplôme d'Ingénieur Horticole. Ecole Nationale Supérieure d'Horticulture de Versailles, France. Septembre 1988.
- ◆ Diplôme d'Ingénieur des Travaux de l'Etat. Ecole Supérieure d'Horticulture de Chott-Mariem. Juin, 1986.
- ◆ Baccalauréat, section Maths-sciences. Lycée de garçons de Sousse. Juin, 1982.

STAGES

- ◆ Stages dans le cadre de la préparation du Doctorat d'état. Faculté des Sciences Agronomiques et Biologiques Appliquées de Gent- Belgique. Octobre 1998, Juin à Septembre 1999, Juin à Octobre 2000, Juillet à Septembre 2001, et Janvier à Mars 2003..
- ◆ Stage à la Faculté des Sciences Agronomiques et Biologiques Appliquées de Gent-Belgique. Novembre 1996.
- ◆ Stage de formation à l'Institut National de la Recherche Agronomique (INRA) d'El Menzah au Maroc. Microgreffage d'apex d'agrumes *in vitro*. Avril 1996.
- ◆ Stage de formation au Centre de Coopération Internationale en Recherche Agronomique pour le Développement (CIRAD) à Montpellier et à la Station de Recherche Agronomique de Corse. Microgreffage d'apex d'agrumes *in vitro*. Octobre 1994.
- ◆ Stage de recherche au laboratoire de physiologie végétale de l'Ecole Nationale Supérieure d'Horticulture de Versailles, France. Multiplication et conservation *in vitro* du pêcher. Septembre 1987 à Septembre 1988
- ◆ Stage d'études au Centre National Interprofessionnel de l'Horticulture (CNIH) de l'île de France. Culture *in vitro* et acclimatation du fraisier et du rhododendron. Juillet et Août 1987.
- ◆ Stage d'études au Sud de la France (Bordeaux et Agen). Culture du fraisier. Juin 1987.
- ◆ Stage d'étude à la station d'appui de Mannouba (SAM). Culture *in vitro* de l'artichaut et du fraisier. Mars et Avril 1985.
- ◆ Stage de formation à la pépinière Gandouz à Chott-Mariem. Multiplication des plantes ornementales, production de fleurs coupées, aménagement d'espaces verts. Juillet et août 1984.
- ◆ Stage d'études au centre de formation agricole d'Essaïda. Etude des machines agricoles, culture de l'artichaut, topographie et nivellement des terrains agricoles. Février 1984.

COURS

- ◆ Participation à un cours sur l'utilisation des plantes médicinales en médecine traditionnelle, organisé par le gouvernement Chinois, à Tianjin, en Chine. Septembre-Octobre 2001.
- ◆ Participation à la 3^{ème} Ecole doctorale de biochimie et biologie moléculaire: les outils moléculaires (électrophorèse, PCR, séquençage d'ADN, etc...), organisé par l'Association Africaine de Microbiologie et d'Hygiène Alimentaire à l'Ecole Supérieure d'Horticulture de Chott-Mariem. Mars, 1998.
- ◆ Participation à un cours sur les applications des biotechnologies en agriculture, organisé par le CIHEAM à l'IAM, Chania en Grèce. Mai 1997.
- ◆ Participation à un cours sur l'utilisation des techniques de mutation et de culture *in vitro* en agriculture, organisé par l'Agence Internationale de l'Energie Atomique (AIEA) au Ghana. Décembre 1994.

PARTICIPATION A DES SEMINAIRES

- ◆ Séminaires organisés chaque année sur les acquis de la recherche agricole. Depuis 1993.
- ◆ Colloque sur les biotechnologies en Tunisie: état et perspectives. 1994.
- ◆ Atelier sur le développement de la culture de l'asperge en Tunisie. 1997.
- ◆ Symposium des Doctorants (PhD Students). Gent, 2001.

EXPERIENCE PROFESSIONNELLE

- ◆ Assistante de l'Enseignement Supérieur en Cultures Maraîchères à l'Ecole Supérieure d'Horticulture (ESHE) de Chott-Mariem. Avril 1997 à ce jour.
- ◆ Ingénieur principal (chercheur) à l'ESHE de Chott-Mariem. Septembre 1995 à Mars 1997.
- ◆ Ingénieur principal (chercheur) à l'INRA de Tunis, laboratoire des biotechnologies. Mai 1993 à Septembre 1995.
- ◆ Responsable du laboratoire *in vitro* des Orchidées chez les Etablissements Marcel Lecoufle. France, Mai à Octobre 1992.
- ◆ Assistante de recherche au Museum National d'Histoires Naturelles de Paris. Novembre 1990 à Mai 1991.
- ◆ Professeur de Sciences du sol dans un institut agricole à Jouy-en-josas en France (chambre du commerce et de l'industrie de paris). Janvier à Juin 1989.

PUBLICATIONS

- ◆ Dridi B., 1991. La conservation des graines par lyophilisation. Revue du Museum National d'Histoires Naturelles de Paris. Décembre 1991. P 85-96.
- ◆ Dridi B., 1994. Essais préliminaires sur l'amélioration de la micropropagation *in vitro* de deux variétés de pêcher (*Prunus persica* L.). Annales de l'INRAT, vol 67 (1,2), pp113-124.
- ◆ Dridi B., Jridi C., Saïd A. et Hannachi C., 2000. Essai d'une nouvelle technique de conduite de la tomate en hors sol : la conduite en double bras. Effet sur le développement et le rendement. 7^{èmes} journées nationales sur les acquis de la recherche agricole, organisé par l'IRESA. Nabeul, 23-24 décembre 2000. 137p.
- ◆ Hannachi C., Mehouchi T., Denden M. et Dridi B., 1999. Amélioration de la productivité du melon cantaloup (*Cucumis melo* L.) par l'acide gibbérellique. Revue de l'INAT, vol 14, n°1, 175-186. Juin 1999.
- ◆ Zgallai H., Rojas-Beltran J., Dridi B. et Dujardin P., (à paraître). Comparaison de l'activité spécifique de la catalase au cours d'un stockage à faible température des tubercules de pomme de terre *Solanum tuberosum* L., cv. 'Bintje'.

POSTERS

- ◆ Dridi B., 1993. Essais de conservation *in vitro* et à basse température de deux variétés de pêcher. Premières Journées sur les acquis de la recherche agricole, organisé par l'IRESA.
- ◆ Dridi B., 1995. Assainissement viral de quelques variétés d'agrumes par microgreffage d'apex. Colloque «Biotechnologies en Tunisie: état et perspectives», 1995.
- ◆ Dridi B., 2001. Effect of paclobutrazol concentration on quality and development of globe artichoke (*Cynara scolymus* L.) plantlets *in vitro*. PhD symposium, organise par la Faculté des Sciences agronomiques et biologiques appliquées. Gent, octobre 2001.

LANGUES

- ◆ Arabe (langue maternelle)
- ◆ Français
- ◆ Anglais

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Abbate V. & Noto G., 1979.** Variabilità ambientale e genotipica in popolazioni siciliane di *Cynara scolymus* L. ed isolamento di nuovi cloni di violetto di sicilia. In: Atti 3rd Congr. Int. Stud. Carciofo, Bari Ind. Grafica Laterza, Bari, pp 843-852.
- Adzet T., Camarasa J. & Laguna J.C., 1987.** Hepatoprotective activity of polyphenolic compounds from *Cynara scolymus* against CC14 toxicity in isolated rat hepatocytes. *Journal of Natural Products*. 50(4): 612-617.
- Al-Bahrany A.M., 2002.** Effect of phytohormones on *in vitro* shoot multiplication and rooting of lime *Citrus aurantifolia* (Christm.) Swing. *Scientia Horticulturae*, 95: 285-295.
- Ancora G., Belli-Donini M.L. & Cuozzo L., 1981.** Globe artichoke plants obtained from shoot apices through rapid *in vitro* micropropagation. *Scientia Hort.*, 14 : 207-213.
- Ancora G., 1986.** Globe artichoke (*Cynara scolymus* L.). In: Bajaj Y.P.S. (Ed) *Biotechnology in Agriculture and Forestry*. Vol. 2 Crops 1, pp 471-484. Springer Verlag, Berlin/Heidelberg.
- Ancora G. & Saccardo F., 1987.** Globe artichoke: new propagation techniques. *Informatore Agrario*. 43(4): 77-78.
- Anderson J.M. & Osmond C.B., 1987.** Shade-sun responses: compromises between acclimation and photoinhibition. In: *Photoinhibition* (eds. Kyle D.J., Osmond C.B., Arntzen C.J.) Elsevier, Amsterdam, 237-244.
- Anderson W.C., 1982.** Tissue culture propagation of *Lilium*. *In vitro*, 18: 293-294.
- Andrade L.B., Echeverrigaray S., Fracaro F. Pauletti G.F. & Rota L., 1999.** The effect of growth regulators on shoot propagation and rooting of common lavender (*Lavandula vera* DC). *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 56: 79-83.
- Apostolo N.M., Brutti C, Ferrarotti S.A., Llorente B.E. & Krymkiewicz N., 2001.** Stimulation of root development with cyclodextrins on jojoba shoots *in vitro*. *In vitro Cell Dev. Biol.- Plant*, 37: 414-418.
- Appiani A. et Pennazio S., 1972.** Electron microscopy of potato meristem tips infected with potato virus X *J. Gen. Virol.* 14: 273-276.

- Apter R.C., Davies Jr. F. T. & McWilliams E.L., 1993.** *In vitro* and *ex vitro* adventitious root formation in asian jasmine (*Trachelospermum asiaticum*) II. Physiological comparisons. J. Amer. Soc. Hort. Sci., 118: 906-909.
- Arnon A.I., 1949.** Copper enzymes in isolated chloroplasts: polyphenol oxidase in *Beta vulgaris*. Plant Physiol. 24: 1-15.
- Auderset G., Gavillet S., Micheli J., O'Rourke M. & Moncousin Ch., 1994.** Histological analysis and the evolution of biochemical markers during the *in vitro* rooting of *Malus domestica* Borkh. 'Jork 9'. Adv. Hort. Sci. 8: 5-10.
- Baldini, 1953.** Ricerche sulla biologia fiorale del cardo, Rivista Ortofloro-frutticoltura. Ital. N° 1 et 2: 61-101.
- Baraldi R., Cohen J.D., Bertazza D. & Predieri S., 1993.** Uptake and metabolism of indole-3-butyric acid during the *in vitro* rooting phase in pear cultivars (*Pyrus communis* L.). Acta Horticulturae.
- Basly L., 1998.** Situation actuelle de la multiplication de l'artichaut en Tunisie. Projet de fin d'études. Ecole Supérieure d'Horticulture et d'Élevage de Chott-Mariem. 126p.
- Basnizky J., 1979.** Exigences écophysiological communes à l'artichaut (*Cynara scolymus* L.) et aux Cynarées sauvages. In: Atti 3rd Congr. Int. Stud. Carciofo, Bari Ind. Grafica Laterza, Bari, pp 197-206
- Basnizky Y. & Zohary D., 1987.** A seed planted cultivar of globe artichoke. HortScience. 22(4): 678-679.
- Bayouhdh C., 1995.** Morphogenèse *in vitro* de l'artichaut. Diplôme d'études approfondies. Faculté des Sciences de Tunis. Univ. Tunis II, pp 68.
- Belaizi M., Bolen M.R & Boxus P., 1994.** Régénération *in vitro* et acclimatation du caroubier (*Ceratonia siliqua* L.). In: Quel avenir pour l'amélioration des plantes? Ed. AUPALF-UREF, John Libbey Eurotext, Paris, 1994, pp 227-232.
- Bell J.K. & Mc Cully M.E., 1970.** A histological study of lateral and root initiation and development in *Zea mays*. Protoplasma, 70: 179-205.
- Benoit H. & Ducreux G., 1981.** Etude de quelques aspects de la multiplication végétative *in vitro* de l'artichaut (*Cynara scolymus* L.). Agronomie, 1: 225-230.
- Bertazza G., Baraldi R., & Predieri S., 1995.** Light effects on *in vitro* rooting of pear cultivars of different rhizogenic ability. Plant Cell, Tiss. Org. Cult., 41: 139-143.

- Berthon J.Y., Battraw M.J., Gaspar Th. & Boyer N., 1993.** Early test using phenolic compounds and peroxidase activity to improve *in vitro* rooting of *Sequoiadendron giganteum* (Lindl.) Buchholz. Société Botanique de Genève. pp 7-13.
- Bigot C. & Foury C., 1984.** Multiplication *in vitro* d'artichaut (*Cynara scolymus* L.) à partir de semences; comparaison au champ de quelques clones à la lignée dont ils sont issus. *Agronomie*, 4: 699-710.
- Blakesley D., Weston G.D. & Hall J.F., 1991.** The role of endogenous auxin in root initiation. Part I: Evidence from studies on auxin application and analysis of endogenous levels. *Plant Growth Reg.* 10: 341-353.
- Bonanno A., Alicata M.L., Alabiso M. & Leto G., 1994.** Dried Artichoke bracts in the feeding of meat rabbits. *Rivista di Coniglicoltura*. 31 (11) : 35-40.
- Bouza L., Jacques M. & Miginiac E., 1994.** Requirements for *in vitro* rooting of *Paeonia suffruticosa* Andr. Cv. 'Mme de Vatry'. *Scientia Hort.*, 58: 223-233.
- Boxus P., 1971.** La culture de méristèmes de *Prunus*. Note préliminaire relative à l'espèce *P. Pandora*. *Bull. Rech. Agron. GX*, 6: 3-5.
- Boxus P. & Quoirin M., 1974.** La culture de méristèmes apicaux de quelques espèces de *Prunus*. *Bull. Soc. R. Bot. Belg.*, 107: 91-101.
- Boxus P. & Quoirin M., 1977.** Comportement en pépinière d'arbres fruitiers issus de culture *in vitro*. *Acta Hortic.*, 78: 373-379.
- Bozzini A. & Lachelli G., 1973.** Results and perspectives of cross and self fertilization in the globe artichoke. In *Atti 2nd Congr. Int. Stud. Carciofo, Bari*. Ed. Minerva Medica, Torino, pp 695-702.
- Bradford M.M., 1976.** A rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.*, 72: 248-254.
- Brainerd K. E. & Fuchigami L. H., 1982.** Stomatal functioning of *in vitro* and greenhouse apple leaves in darkness, mannitol, ABA, CO₂. *J. Expt. Bot.*, 33: 388-392.
- Brunner H., 1978.** Influence of various growth substances and metabolic inhibitors on root generating tissue of *Phaseolus vulgaris* L. *Z. Pflanzenphysiol.* 88: 13-23.

- Brutti C., Apostolo N.M., Ferrarotti S.A., Llorente B.E. & Krymkiewicz N., 2000.** Micropropagation of *Cynara scolymus* L. employing cyclodextrins to promote rhizogenesis. *Scientia Horticulturae*, 83: 1-10.
- Buta J.G. & Isaac R.R., 1972.** *Phytochemistry*, 11: 1188-1189.
- Cabanne F., Dalebroux M., Martin-Tanguy J. & Martin C., 1981.** *Physiol. Plant.*, 53: 399-404.
- Capellades M., Fontarnau R., Carulla C. & Deberg P., 1990.** Environment influences anatomy of stomata and epidermal cells in tissue-cultured *Rosa multiflora*. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.*, 115: 141-145.
- Cassels A. C. & Morrish F. M., 1987.** *Sci. Hortic. (Amst.)*, 32: 135-144.
- Chabbouh N., 1989.** Mise en évidence de quatre virus présents sur l'artichaut en Tunisie. *Annales de l'Institut National de la recherche Agronomique de Tunisie*. 62 (16): 1-16.
- Chabbouh N. & Cherif C., 1990.** Cucumber mosaic virus in artichoke (CMV). *FAO Plant Protection*. 38(1): 1-3.
- Chabbouh N., Cherif C. & Martelli G.P., 1990.** Natural infections of artichoke by potato virus X in Tunisia. *Journal of Phytopathology*. 129(3): 257-260.
- Chaux C. & Foyru C., 1994.** *Productions légumières, Tome 2. Agriculture d'aujourd'hui*. Lavoisier, Paris, pp 639.
- Choffe K.L., Murch S.J. & Saxena P.K., 2000.** Regeneration of *echinacea purpurea*: induction of root organogenesis from hypocotyl and cotyledon explants. *Plant Cell, Tissue and Organ culture*, 62: 227-234.
- Cirnu I., 1988.** Globe and Jerusalem artichokes as valuable sources of nectar and pollen. *Apicultura Romana*. 63(7): 7-8.
- Collet G.F. & Le C.L., 1988.** Micropropagation de porte-greffes de pommier et de poirier. II Enracinement *in vitro* de *Pyrus malus* L. (M25, 26, 27, MM106, M9 type Jork) et de *Cydonia oblonga* Mill. *Rev. Suisse Vitic. Arboric. Hortic.* 20: 131-138.
- Corre J., Foury C., Guimbard C., Martin F., Moulin J.C. & Rico F., 1976.** Les clones d'artichaut: Camerys et Caribou. *Pépiniéristes, Hortic., Maraîchers*, 171, 13-24.
- CRDA Ariana, 2001.** Rapport d'activités 2001. P 243.

- Costa A.S., Duffus J.E., Morton D.Y., Yarwood C.E. & Bardin R., 1959.** A latent virus of California artichoke. *Phytopathology*. 49: 49-53.
- Davis T.D., Steffens G.L. & Sankhla N., 1988.** Triazole plant growth regulators. *Hort. Rev.* 10, 63-105.
- Debergh P.C., 1983.** Effects of agar brand and concentration on the tissue culture medium. *Physiol. Plant.*, 59: 270-276.
- Debergh P.C., 1991.** Acclimatisation techniques of plants from *in vitro*. *Acta Hort.* 289, 291-300.
- Debergh P.C. & Maene L.J., 1981.** A scheme for commercial propagation of ornamental plants by tissue culture. *Sci. Hort.*, 14: 335-345.
- Debergh P.C. & Maene L.J., 1983.** Contribution of tissue culture techniques to horticultural research and production. *Acta Hort.*, 131: 23-37.
- Debergh P.C. & Maene L.J., 1985.** Some aspects of stock-plant preparation for tissue culture propagation. *Acta Hort.*, 166: 21-23.
- Debergh P.C., Aitken-Christie J., Cohen D., Grout B., Von Arnold S., Zimmerman R. & Ziv M., 1992.** Reconsideration of the term 'vitrification' as used in micropropagation. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 30: 135-140.
- De Candolle A., 1886.** Origin of cultivated plants. Hafner Publishing Comp. New York. 92-95.
- De Klerk G.J., Brugge J.T. & Marinova S., 1997.** Effectiveness of indoleacetic acid, indolebutyric acid and naphthaleneacetic acid during adventitious root formation *in vitro* in *Malus* 'Jork 9'. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 49: 39-44.
- De Klerk G.J., Keppel M., Ter Brugge J. & Meekes H., 1995.** Timing of the phases in adventitious root formation in apple microcuttings. *J. Exp. Bot.* 46: 965-972.
- De Klerk G.J., Smulders R. & Benschop M., 19??.** Basic peroxidases and rooting in microcuttings of *Malus*.
- De Leo P. & Greco B., 1976.** Nuova tecnica di propagazione del carciofo: coltura *in vitro* dei meristemi apicali. In: *Atti 2nd Congr. Int. Sul Carciofo*, Bari. Ed. Minerva Medica Torino, pp 657-667.

Dellacecca V. & Bianco V.V., 1967. Valore agronomico delle gemme in relazione alla loro posizione sul rizoma di carciofo. Atti 1° Congr. Int. Stud. Carciofo, Bari. 23-24 Novembre 1967. Minerva Medica (Ed.), Torino, Italia. pp 21-25.

Dellacecca V., Magnifico V., Marzi V., Porceddu E. & Mugnozza G.T.S., 1976. A contribution to the study of globe artichoke cultivars grown throughout the world. Atti 2° Congr. Int. Stud. Carciofo, Bari e Polignano a Mare, 1974. Ed Minerva Medica, Torino, Italia. 199-316.

De Proft M.P., Maene M.L. & Debergh P.C., 1985. Carbon dioxide and ethylene evolution in the culture atmosphere of *Magnolia* cultured *in vitro*. *Physiol. Plant.* 65: 375-379.

De Schepper S., 2001. Molecular analysis of the induction of sports in azalea. Thèse de Doctorat en Sc. Biol. Appl. Univ. Gent, pp173.

Devos P., Langhe E. & Bruijne E., 1975. Influence of 2,4-D on the propagation of *Cynara scolymus* L. *in vitro*. Mededelingen van de Faculteit Landbouwwetenschappen, Rijksuniversiteit Gent. 40(2): 829-836.

Dhondt J.L. Tafani M., Cartigny B. & Farriaux J.P., 1974. Phenolic compounds in plant foods; interference in study of aromatic amino acid metabolism. *Cahiers de Nutrition et de Diététique.* 9(2): 139-143.

Donnelly D.J., Skelton F.E. & Nelles J.E., 1987. Hydathode anatomy and adaxial water loss in micropropagated 'Silvan' blackberry. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.*, 112 (3): 556-569.

Donnelly D.J., Vidaver W.E. & Lee K.Y., 1985. The anatomy of tissue culture red raspberry prior to and after transfer to soil. *Plant Tiss. Cell Org. Cult.*, 4: 43-50.

Doorenbos J., 1953. Rejuvenation of *Hedera helix* in graft combination. *Preb.* 115, Wageningen, nov. 1953, 99.

Doorenbos J., 1965. Juvenile and adult phases in woody plants. *Handb. Pflanzenphysiol.*, 15(1), 1222.

Draoui N., Ghorbel A. & Kchouk M.E., 1993. *In vitro* culture of Globe artichoke (*Cynara scolymus* L.) in Tunisia: utilization of vitromethods in artichoke improvement. *Agricoltura Mediterranea.* 123(2): 139-145.

Drew R.A., 1987. The effects of medium composition and cultural conditions on *in vitro* root initiation and growth of papaya (*Carica papaya* L.). *J. Hortic. Sci.* 62: 551-556.

- Drew R.A., Simpson B.W. & Osborne W.J., 1991.** Degradation of exogenous indole-3-butyric acid and riboflavin and their influence on rooting response of papaya *in vitro*. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* 26: 29-34.
- Drew R.A., McComb J.A., Considine J.A., 1993.** Rhizogenesis and root growth of *Carica papaya* L. *in vitro* in relation to auxin sensitive phases and use of riboflavin. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* 33: 1-7.
- Druart P., 1987.** Contribution à l'élaboration de techniques de production en masse *in vitro* d'espèces ligneuses utilisables en culture fruitière. Thèse, Fac. Sci. Agron., Gembloux (Belgique), 329p.
- Druart P., 1992.** Etude de l'enracinement. In: Rapport d'activités 1991-1992, Centre de Recherches Agronomiques de l'Etat, Gembloux (Belgique), pp 45-46.
- Druart P., 1994.** Role of the leaves and apex in the *in vitro* rooting of *Malus domestica* Borkh. cv. 'Compact Spartan'. *Adv. Hortic. Sci.*, 1: 43-44.
- Druart P., 1995.** Optimization of culture media components for rooting *Malus domestica* Borkh. cv. 'Compact Spartan' *in vitro*. *Biol. Plant.*
- Druart P., Kevers C., Boxus P. & Gaspar Th., 1982.** *In vitro* promotion of root formation by apple shoots through darkness effect on endogenous phenols and peroxidase. *Z. Pflanzenphysiol.* 108: 429-436.
- Epstein E. & Ludwig-Müller J., 1993.** Indole-3-butyric acid in plants: occurrence, synthesis, metabolism and transport. *Physiologia Plantarum*, 88: 382-389.
- Fabbri A., Sutter E. & Dunston S.J., 1986.** Anatomical changes in persistent leaves of tissue-cultured strawberry plants after removal from culture. *Scientia Hort.*, 28: 331-337.
- FAO, 1998.** FAOSTAT database (<http://www.fao.org>).
- FAO, 2002.** FAOSTAT database (<http://www.fao.org>)
- Favre J.M., 1973.** Thèse d'état. Centre scientifique d'Orsay, Université de Paris-Sud, 89p.
- Favre J.M., 1980.** Rhizogenèse et bouturage. In: "La multiplication végétative des plantes supérieures". Eds R. Chaussat et C. Bigot, Gauthier-Villars, Bordas, Paris, pp. 51-75.
- Fortunato I.M., 1981.** Cyto-histological aspects of *in vitro* vegetative propagation of globe artichoke. *Annali della Facolta di Agraria, Universita di Bari.* 1981-1982, 32: 367-376.

Fortunato I.M., Lattanzio V. & Vanadia S., 1981. Primi risultati sulla micropropagazione del carciofo. Atti 3° Congr. Int. Stud. Carciofo, Bari 27-30 Nov. 1979. Ind. Grafica Laterza, Bari, Italia. 247-254.

Foury C., 1967. Etude de la biologie florale de l'artichaut (*Cynara scolymus* L.); application à la sélection 1- Données sur la biologie florale. Ann. Amélior. Plant. 17: 357-373.

Foury C., 1978. Quelques aspects de l'histoire des variétés d'artichaut (*Cynarascolymus* L.). Journal d'agriculture traditionnelle et de botanique appliquée, 25, 25-50.

Foury C. & Delage C., 1984. Possibilities of using honeybees (*Apis mellifera* L.) for seed production in globe artichoke (*Cynara scolymus* L.) and cardoon (*Cynara cardunculus* L.). Compte rendu du V ème symposium international sur la pollinisation, Versailles, France, 27-30 Septembre 1983. 329-333.

Foury C., 1989. Some characteristics of globe artichoke (*Cynara scolymus* L.) seeds. Acta horticulturae. Fourth international symposium on seed research in horticulture, Angers, France, 5-9 Sep. 1988. 253: 45-54.

Foury C., 1997. Propos sur l'origine de l'artichaut et du cardon. Journ. D'Agric. Trad. Et de Bot. Appl., vol. 39(1): 133-147.

Francllet A., 1969. Vers une production en masse de cyprès de forme contrôlée. Proceed. 2nd FAO/IUFRO World. Consult. For tree breeding, Washington FO/FTB 69, 11.

Galbraith D. W., Harkins K. R., Maddox J. M., Ayres N. M., Sharma D. P. & Firozabady E., 1983. Rapid flow cytometric analysis of the cell cycle in intact plant tissues. Science, 220: 1049-1051.

Gaspar T., 1981. Rooting and flowering, two antagonistic phenomena from a hormonal point of view. In: Aspects and prospects of plant growth regulators, monograph 6 (ed. B. Jeffcoat), pp. 39-49. British Plant Growth Regulator Group, Wantage.

Gaspar T., 1995. Seleniated forms of Indolylacetic Acid, new powerful synthetic auxins. Acros Organics Acta, 1, 2, 65-66.

Gaspar T., Kevers C. & Hausman J.F., 1997. Indissociable chief factors in the inductive phase of adventitious rooting. Biology of root formation and development. Edited by Altman and Waisel. Plenum Press, New York.

Gaspar T., Penel C., Thorpe T.A. & Greppin H., 1982. Peroxidase 1970-1980. A survey of their biochemical and physiological roles in higher plants. Université de Genève, Genève, 1982.

Gaspar T. & Van Hoof P., 1976. Application d'un test peroxydasique dans le choix des plantes d'asperge à propager *in vitro*. Revue Agriculture, 3: 583-592.

Gebhardt R., 1995. Artichoke extracts *in vitro* evidence of an inhibitory effect on cholesterol biosynthesis. Medizinische Welt. 46(6): 348-350.

George E.F., 1993a. Plant propagation by tissue culture - part I- The technology. 574 pp. Exegetics Ltd., Edington, Wilts, England.

George E.F., 1993b. Plant propagation by tissue culture - part II- In practice. 1361 pp. Exegetics Ltd., Edington, Wilts, England.

George E.F., 1996. Plant propagation by tissue culture. Part 2. In Practice. Exegetics Ltd., Eddington.

Ghorbel A., Zitouni B. & Draoui N., 1987. Problèmes posés par la culture *in vitro* de l'artichaut (*Cynara scolymus* L.) e Tunisie. Séminaire Régional sur les cultures maraîchères. Fondation Internationale pour la Science. 21-26 Sept 1987. Tunis.

Ghorbel A., Chabbouh N., Draoui N., Cherif C. & Kchouk M.E., 1993. *In vitro* culture of globe artichoke (*Cynara scolymus* L.) in Tunisia: contribution of the *in vitro* propagation in globe artichoke cleansing. Agricultura Mediterranea. 123(2): 133-138.

GIL, 2002. Rapport d'activités du Groupement Interprofessionnel des Légumes.

Gonçalves J.C., Diogo G. & Amâncio S., 1998. *In vitro* propagation of chestnut (*Castanea sativa* x *C. crenata*): effects of rooting treatments on plant survival, peroxidase activity and anatomical changes during adventitious root formation. Scientia Horticulturae, 72: 265-275.

Gorst J.R., Slaytor M. & De Fossard R.A., 1983. The effect of indole-3-butyric acid and riboflavin on the morphogenesis of adventitious roots of *Eucalyptus ficifolia* F. Muell grown *in vitro*. J. Exp. Bot. 34:1503-1515.

Gould A.R., 1986. Cell culture and somatic cell genetics of plants, vol. 3 (eds. I. K. Vasil), p. 549.

Granado F., Olmedilla B., Blanco I. & Rojas Hidalgo E., 1996. Major fruit and vegetable contributors to the main serum carotenoids in the Spanish diet. European Journal of Clinical Nutrition. 50(4): 246-250.

Gribaudo I., Morte M.A. & Schubert A., 1995. Use of gentian violet to differentiate *in vitro* and *ex vitro* formed roots during acclimatization of grapevine. Plant Cell Tiss. Org. Cult., 41: 187-188.

Grout B.W.W. & Aston M.J., 1977. Transplanting of cauliflower plants regenerated from meristem culture. I. Water loss and water transfer related to changes in leaf wax and to xylem regeneration. Hort. Res., 17: 1-7.

Guyot L. & Gibassier P., 1967. Les noms des plantes. PUF. Collection 'Que sais-je'. N° 856: 89-90.

Halperin W., 1967. Population density effects on embryogenesis in carrot cell cultures. Exp. Cell Res., 48: 170-173.

Hammouda F.M., Seif El Nasr M.M. & Shahat A.A., 1993a. Flavonoids of *Cynara scolymus* L. cultivated in Egypt. Plant Foods for Human Nutrition. 44(2): 163-169.

Hammouda F.M., El Nasr M.M.S., Ismail S.I. & Shahat A.A., 1993b. Quantitative determination of the active constituents in Egyptian cultivated *Cynara scolymus*. International Journal of Pharmacognosy. 31(4): 299-304.

Harbaoui Y., 1982. Multiplication *in vitro* et assainissement viral de l'artichaut, *cynara scolymus*, L. Thèse Doct. Sci. Agron., Rijksuniversiteit Gent, 159p.

Harbaoui Y., 1982. Multiplication *in vitro* et assainissement viral de l'artichaut *Cynara scolymus* L. Thèse de Doctorat en Sciences Agronomiques. Faculté des Sciences Agronomiques et Biologiques Appliquées de Gent. Belgique. 159 pp.

Harbaoui Y. & Debergh P.C., 1980. Multiplication *in vitro* de clones sélectionnés d'artichaut (*Cynara scolymus*, L.). In: Application de la culture *in vitro* à l'amélioration des plantes potagères. Eucarpia, section légumes, Versailles, 1-7.

Harbaoui Y., Smaïyn G., Welvaert W. & Debergh P.C., 1982. Assainissement viral de l'artichaut (*Cynara scolymus* L.) par la culture *in vitro* d'apex méristématiques. Phytopathologie Méditerranée 21, 15-19.

Hartmann H.T., Kester D.E. & Davies F.T., 1990. Plant propagation: principles and practices, pp. 246-247. Prentice Hall, Englewood Cliffs, NJ. ISBN 0-13-681007-1.

Hartrath H., Wilke K., Bongartz H. & Penthin A., 1982. Summer flowers as cut flowers. Rare species and cultivars, attractive and popular. Gb+Gw. 82(2): 28-33.

Hausman J.F., 1989. Enracinement du rhododendron cv. Album cultivé *in vitro* en rapport avec l'activité peroxydasique, les isoperoxydases et les phénols. Mémoire. pp 114-129.

Hausman J.F., 1993. Changes in peroxidase activity, auxin level and ethylene production during root formation by poplar shoots raised *in vitro*. Plant Growth Regul. 13: 263-268.

- Hayami A., Misco S. & Matsubayashi M., 1984.** Studies on the freeing of potato clones from viruses by meristem-tip culture. I. Some factors affecting plantlet regeneration from meristem-tip cultures and virus eradication in plants regenerated. *Sci. Rept. Fac. Agr. Kobe Univ.* 16:43-53.
- Hernandez R.F., Pulgar Gutierrez M.A., Cid Diaz J.M., Moreno Rios R. & Ocio Trueba E., 1992.** Nutritive value of residues of the artichoke (*Cynara scolymus*) crop: sun-dried leaves and whole-plant silage. *Archivos de Zootecnia.* 41(153): 257-264.
- Hertel R., Evans M.L., Leopold A.C. & Sell H.M., 1969.** The specificity of the auxin transport system. *Planta*, 85: 238-249.
- Hicks G.S., 1986.** Adventitious rooting of apple microcuttings *in vitro*, an anatomical study. *Can. J. Bot.*, 1913-1920.
- Ibrahim A.M., Youker J.C. & Ryder E.J., 1977.** In vitro propagation of Globe artichoke (*Cynara scolymus* L.), *HortScience*, Aug 1977, 12(4): 397.
- Ippolito R. & Parenzan P., 1978.** Contribution to the knowledge of the European species of *Gortyna* Ochs. (Lepidoptera, Noctuidae). *Entomologica.* 14: 159-202.
- Jagannathan L. & Marcotrigiano M., 1986.** Phenotypic and ploidy status of *Paulownia tomentosa* trees regenerated from cultured hypocotyls. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* 7: 227-236.
- James DJ, (1983).** Adventitious root formation *in vitro* in apple rootstocks (*Malus pumila*). I. Factors affecting the length of the auxin-sensitive phase in M9. *Physiol. Plant.* 57: 149-153.
- Johansen D.A., 1940.** *Plant microtechnique.* Ed. by McGraw Hill. New York. 521pp.
- Johansson M., Kronstedt-Robards E.C. & Robards W., 1992.** Rose leaf structure in relation to different stages of micropropagation. *Protoplasma*, 166: 165-176.
- Jones O.P. & Hopgood M.E., 1979.** The successful propagation *in vitro* of two rootstocks of *Prunus*: the plum rootstock pixy (P; Insitiata) and the cherry rootstock F12/1 (P. Sativum). *J. Hort. Sci.* 54: 495-499.
- Jouanneau J.P., 1975.** Protein synthesis requirement for the cytokinin effect upon tobacco cell division. In: *Plant propagation by tissue culture - part I The technology*, E.F. George. Exegetics Ltd., Edington, Wilts, England. pp 574.

- Kaldewey H., 1984.** Transport and other modes of movements of hormones (mainly auxins). In Encyclopedia of plant physiology, New series, Vol 10, Hormonal Regulation of Development II (T.K. Scott, ed.), pp. 80-148. Springer-Verlag, Berlin.
- Kanakis A.G. & Demetriou K., 1993.** In vitro shoot regeneration of globe artichoke from shoot apices treated with thidiazuron and from mature zygotic embryos treated with cytokinins. Journal of Horticultural Science. 68(3): 439-445.
- Kchouk M.E., 2000.** Néoformation et transfert génétique chez l'artichaut *Cynara scolymus* L.). Thèse de Doctorat d'Etat. Faculté des Sciences de Tunis. Université de Tunis II. 494 p.
- Kevers C., Hausman J.F., Hagège D. & Gaspar Th., 1991.** Post-effects of thidiazuron on peroxydase activity and rooting of microcuttings of *Kalmia latifolia*. Société Botanique de Genève, pp 27-31.
- Kevers C., Jacques P. & Thonart P., et al. 1999.** In vitro root cultures of Panax ginseng and P. Quinquefolium. Plant Growth Regul., 27(3): 173-178, Mars 1999.
- Kiraly I., Balla I., Jakab J., Tamas L. & Sarvari E., 2001.** Responses of the photosynthetic system and peroxydase activity to the rooting conditions of oak micropropagation. Plant Cell Tiss. Org. Cult. 66: 155-158.
- Kuliev A.A., Gigienova E.I., Ismailov N.M. & Ibragimov A. Sh., 1985.** Fatty acid composition of *Cynara scolymus* L. Seeds grown in the Nakhichevan ASSR. Rastitel'nye Resursy. 21(3): 346-349.
- La Malfa G. & Foury C., 1968.** Essai de décapitation sur artichaut. Station d'Amélioration des Plantes Maraîchères Montfavet. France.
- Lattanzio V.D., Lafiandra D. & Morone-Fortunato I., 1981.** Composizione chimica e valore nutritivo del carciofo (*Cynara scolymus* L.). Extrait du 3^{ème} Congrès International sur l'Artichaut, Bari, Italie, pp117-125. Industria Grafica Laterza.
- Lauzer D. & Vieth J., 1990.** Micropropagation of seed-derived plants of *Cynara scolymus* L. cv. Green Globe. Plant Cell Tissue and Organ Culture 21, 237-244.
- Lee M. & Phillips R. L., 1988.** The chromosomal basis for somaclonal variation. Ann. Rev. Plant Physiol. Plant. Mol. Biol. 39: 413-437.
- Le Floc'h E., 1983.** Contribution à une étude ethnobotanique de la Flore Tunisienne. Publications Scientifiques Tunisiennes. 402p.

- Legrand B. & Bouazza A., 1991.** Changes in peroxidase and IAA-oxidase activities during adventitious bud formation from small root explants of *Cichorium intybus* L.: influence of glucose. J. Plant Physiol. 138: 102-106.
- Lichtenthaler H.K., 1987.** Chlorophylls and carotenoids: pigments of photosynthetic bio-membranes. Meth. Enzym., 148: 350-382.
- Limasset P. & Cornuet P., 1950.** Ann. Epiphyties. 1: 274-285.
- Liu J.H. & Reid D.M., 1992.** Adventitious rooting in hypocotyls of sunflower (*Helianthus annuus*) seedlings. IV. The role of changes in endogenous free and conjugated indole-3-acetic acid. Physiol. Plant. 86:285-292.
- Mackay W.A. & Kitto S.L., 1988.** Factors affecting *in vitro* shoot proliferation of French tarragon. J. Am. Soc. Hort. Sci. 113: 282-287.
- McClelland M.T., Smith M. A.L. & Carothers Z.B., 1990.** The effects of *in vitro* and *ex vitro* root initiation on subsequent microcutting root quality in three woody plants. Plant Cell Tiss. Org. Cult., 23: 115-123.
- Mc Cready C.C., 1963.** Movement of growth regulators in plants. I. Polar transport of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid in segments from the petiols of *Phaseolus vulgaris*. New Phytol. 62: 3-18.
- Maene L.J., 1985.** Optimalisering van de overgang van weefselteelt-plantjes naar *in vivo* omstandigheden. PhD Diss., Gent State Univ., Belgium.
- Maene L.J. & Debergh P.C., 1985.** Liquid medium additions to established tissue cultures to improve elongation and rooting *in vivo*. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 5, 23-33.
- Maene L.J. & Debergh P.C., 1987.** Optimisation of the transfer of tissue cultured shoots to *in vivo* conditions. Acta Hort., 212: 335-348.
- Majada J.P., Tadeo F., Fal M.A. & Sanchez-tames R., 2000.** Impact of culture vessel ventilation on the anatomy and morphology of micropropagated carnation. Plant Cell, Tiss. Org. Cult., 63: 207-214.
- Majorana G. & Rana G.L., 1970.** Un nuovo virus latente isolato da carciofo in Puglia. Phytopathologia Mediterranea. 9: 193-196.
- Marino G., 1981.** Plant Growth Regulation, 7, 237-246
- Marrou J. & Mehani S., 1964.** Etude d'un virus parasite de l'artichaut. C.R. Acad. France. 50: 1053-1064.

- Martinelli G.P., Russo M. & Rana G.L., 1979.** The virological problems of *Cynara* species. In: Atti 3rd Congr. Int. Stud. Carciofo, Bari, Ind Grafica Laterza, Bari, pp: 895-927.
- Martin C., Dulieu H. & Carré M., 1967.** Sur la possibilité de rendre des plantes virosées indemnes de virus par la culture de méristèmes inflorescentiels et floraux. Comptes rendus de l'Académie des Sciences Paris, série D. 264: 1994-1996.
- Martin C., 1985.** Culture de méristèmes et multiplication végétative in vitro. Symp. Intern. Cult. *in vitro* Tissus Vég. Tenerife 8-15 Déc. 1985.
- Martin-Tanguy J., Martin C., Gallet M. & Vernoy R., 1976.** Comptes rendus de l'académie des Sciences, Paris. 282: 2231-2234.
- Mato M.C., Rue M.L. & Ferro E., 1988.** Changes in levels of peroxidases and phenolics during root formation in *Vitis* cultured *in vitro*. *Physiol. Plant.* 72: 84-88.
- Mathur G. & Nadgauda R., 1999.** *In vitro* plantlet regeneration from mature zygotic embryos of *Pinus wallichiana* A.B. Jacks. *Plant Cell Reports*, 19: 74-80.
- Mehani S., 1969.** La dégénérescence infectieuse des artichauts en Tunisie. Documents techniques INRAT, 41: 30.
- Mianiati E., Colir R. & Fidanza A., 1994.** Studies on the total diet in the Perugia area for monitoring contaminants and antinutritional factors in foods. *Rivista della Societa Italiana di Scienza dell'Alimentazione.* 23(1): 13-19.
- Miceli A. & De Leo P., 1996.** Extraction, characterization and utilization of artichoke-seed oil. *Bioresource Technology.* 57(3): 301-302.
- Migliori A., Lot H. & Pecaut P., 1984.** PHM Revue Horticole, 249.
- Mitsubishi Kato M, Shibaoka H et Shimokoriyama M, (1978).** The nature of the dual effect of auxin on root formation in *Azuki* cuttings. *Plant Cell Physiol.* 19: 1535-1542.
- Mohammed S & Eriksen E.N, (1974).** Root formation in pea cuttings IV. Further studies on the influence of indole-3-acetic acid at different developmental stages. *Physiol. Plant.* 32: 94-96
- Moncousin C., 1981.** Multiplication végétative accélérée de *Cynara scolymus* L., *Rev. Hort. Suisse*, 54, 105-111.
- Moncousin C., 1991.** Rooting of microcuttings: fundamental aspects. *Acta Hortic.* 289: 311-317.

- Moncousin C. & Ducreux G., 1984.** Activité peroxydasique et rhizogenèse dans le cas de *Cynara scolymus* L.: évolution au cours de repiquages successifs de boutures cultivées *in vitro*. Comparaison avec de jeunes plantes issues de graines. *Agronomie*, 1984, 4(2), 105-111.
- Moncousin C., Favre J.M. & Gaspar Th., 1988.** Changes in peroxidase activity and endogenous IAA levels during adventitious root formation in vine cuttings. In: *Physiology and biochemistry of auxins in plants* (M. Kutacek, R.S. Bandurski, J. Krekule, eds) Academia Praha. pp 331-337.
- Moncousin C. & Gaspar Th., 1983.** Peroxidase as a marker for rooting improvement of *Cynara scolymus* L. cultured *in vitro*. *Biochem. Physiol. Pflanzen*. 178: 263-271.
- Montemurro O. & Cianci D., 1976.** L'utilizzazione dei sottoprodotti del carciofo nell'alimentazione del bestiame. *Atti 2° Congr. Int. Stud. Carciofo, Bari e Polignano a Mare, 1974.* Ed Minerva Medica, Torino, Italia. 1035-1041.
- Monteuuis O. & Bon M.C., 2000.** Influence of auxins and darkness on *in vitro* rooting of micropropagated shoots from mature and juvenile *Acacia mangium*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 63: 173-177.
- Morel G. & Muller J.F., 1964.** La culture *in vitro* du méristème apical de la pomme de terre. *C.R. Acad. Sci.* 258: 5250-5252.
- Morsli A., Bellal M. & Ammouche A., 1985.** A study of the milk coagulating power of some local plants. *Annales de l'Institut National Agronomique El Harrach*. 9(1): 63-64.
- Morzadec J.M. & Hourmant A., 1997.** In vitro rooting improvement of globe artichoke (cv. Camus de Bretagne) by GA₃. *Sci. Hortic. Amsterdam*, 72(1): 59-62, Dec.8, 1997.
- MullerA., Diemann E. & Sassenberg P., 1988.** Chromium contents in medicinal plants used for treating diabetes mellitus type II. *Naturwissenschaften*. 75(3): 155-156.
- Mura P., Ceccarelli L., Faucci M.T., Rinaldelli E. & Mancuso S., 1995.** Improvement of solubility of indolbutyric acid by complexation with alpha-cyclodextrin and rhizogenic activity in *Olea europea* L. cv. Leccio del Corno. *Advance Horticultural Science* 9, 119-121.
- Murashige T. & Skoog F., 1962.** A revised medium for rapid growth and bioassays wth tobacco tissue culture. *Physiologia Plantarum.* , 473-497.

Nemeth G., 1986. Induction of rooting. In: Biotechnology in Agriculture and Forestry. Vol.1: Trees I (ed. by Y.P.S. Bajaj). Springer Verlag, Berlin/Heidelberg.

Noiton D., Vine J.H. & Mullins M.G., 1992. Endogenous indole-3-acetic acid and abscisic acid in apple microcuttings in relation to adventitious root formation. *Plant Growth Regul.* 11: 63-67.

Nozeran R., 1978. Réflexions sur les enchaînements de fonctionnement au cours du cycle des végétaux supérieurs. *Bull. Soc. Bot. Fr.*, 125, 263.

Nozeran R., Ducreux G. & Rossignol-Bancilhon L., 1982. réflexions sur les problèmes de rajeunissement chez les végétaux. *Bull. Soc. Bot. Fr.*, 129, 107-130.

Otto F., 1990. DAPI staining of fixed cells for high-resolution flow cytometry of nuclear DNA. In: *Methods in Cell Biology*, 33 (eds) Darzynkiewicz, Z & Crissman, HA Academic Press, New York, 105-110.

Pécaut P., Dumas de Vault R. & Lof H., 1983. Virus-free clones of globe artichoke (*Cynara scolymus*, L.) obtained after *in vitro* propagation. 21^o Congrès Int. Hort. Hambourg. 29 août-4 septembre 1982. *Acta Horticulturae*, 131, 303-309.

Pécaut P., Foury C., Rico F. & Martin F., 1979. Bilan d'un premier cycle de sélection de variétés d'artichaut à semer. 3^o Cong. Int. Sul Carciofo, Bari, Industria Grafica Laterza, Bari, 615-627.

Pécaut P. & Martin F., 1992. Non-conformity of *in vitro* propagated plants of early Mediterranean varieties of globe artichoke (*Cynara scolymus* L.). *Acta Horticulturae*. In vitro culture. XXIIIrd International Horticultural Congress, Florence, Italy, 30 August 1990. 300: 363-366.

Pécaut P. & Martin F., 1993. Variation occurring after natural and *in vitro* multiplication of early Mediterranean cultivars of globe artichoke (*Cynara scolymus* L.). *Agronomie*. 13(10): 909-919.

Pena-Iglesias A. & Ayuso P., 1974. The elimination of viruses from globe artichoke (*Cynara scolymus*, L.) by etiolated meristem culture. Proc. XIX Int. Hort. Cong. , Warszawa, 1A, 63.

Pennazio S. & Redolfi P., 1973. Factors affecting the culture *in vitro* of potato meristem tips. *Potato Res.* 16: 20-29.

Pennell D., 1987. Micropropagation in horticulture. Grower books, London (Growth Guide N^o 29).

PHM, 1969. L'amélioration de l'artichaut, PHM 96.

Pochard E., Foury C. & Chambonnet D., 1967. Il miglioramento genetico del carciofo. Atti 1° Cong. Int. Sul Carciofo, Bari, 117-143.

Popov Yu G., Vysotsky V.A. & Truschechkin V.G., 1976. Kul'tura izolirovannih stebleviih verhusek vischni. Sov. Plant Physiol., 23: 513-518.

Preil W., 1986. *In vitro* propagation and breeding of ornamental plants: advantages and disadvantages of variability. In: Semal J. (Ed). Genetic manipulation in plant breeding, pp 377-403. Martinus Nijhoff, Dordrecht.

Quoirin M., Lepoivre P. & Boxus P., 1977. Un premier bilan de 10 années de recherche sur les cultures de méristèmes et la multiplication *in vitro* de fruitiers ligneux. C. R. Rech. 1976-1977. Stn. Cult. Fruit. Maraich., Gembloux, pp93-117.

Rana G.L. & Cherif C., 1981. Occurrence of artichoke mottled crinkle virus in Tunisia. Phytopathologia Mediterranea. 20 (2-3): 179-180.

Raven P.H., Evert R.F. & Curtis H., 1976. Biology of plants (second edition). Worth Publishers, Inc., New York.

Rival A., 2003. Communication personnelle.

Rogers R.B. & Smith M.A.L., 1992. Consequences of *in vitro* and *ex vitro* root initiation for miniature rose production. J. Hort. Sci., 67: 535-540.

Rossi F., Baraldi R., Fagini O. & Lercari B., 1993. Photomorphogenic effects of *in vitro* rooting of *prunus* rootstock GF 655-2. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 32: 145-151.

Rugini E., Bazzoffia A. & Jacoboni A., 1988. A simple *in vitro* method to avoid the initial dark period and to increase rooting in fruit trees. Acta Hort., 227: 438-440.

Rugini E. & Verma D.C., 1982. Micropropagation and cell suspensions of a difficult to propagate almond (*Prunus amygdalus* Batsch) cultivar. In: Fujiwara A. (Ed.) Plant tissue culture 1982. Maruzen, Tokyo, pp 741-742.

Saccardo F. & Ancora G., 1984. Il contributo della micropropagazione al miglioramento della coltura del carciofo. Informatore Agrario. Recenti aquisizioni del miglioramento genetico italiano in orticoltura e floricoltura. Ferrara 9/12/1983. 24-26.

Sayed M.D. & Marini Bettolo G.B., 1980. Traditional medicine in health care. Journal of Ethnopharmacology. Traditional medicine: a world survey on medicinal plants and herbs. 2(1): 19-22.

- Scaramella P.R. & Ricci A., 1981.** Micropropagazioni di *Cynara scolymus* L. var. Sativa, da tessuti in vitro. Atti 3° Congr. Int. Stud. Carciofo, Bari. 27-30 Nov. 1979. Ind. Grafica Laterza, Bari, Italia. 231-238.
- Scarpa G.M., Milia M. & Satta M., 2000.** The influence of growth regulators on proliferation and rooting of *in vitro* propagated myrtle. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 62: 175-179.
- Schaeffer G.W., Damiano C., Scott D.H., McGrew J.R., Krul W.R. & Zimmerman R.H., 1980.** Transcription of panel discussion on genetic stability of tissue culture propagated plants: applications and feasibility, pp 64-79, US Dept. Agr., Agr. Res. Results, ARR-NE-11, Beltsville, MD.
- Scowcroft W.R., Larkin P.J. & Brettel R.I.S., 1983.** Genetic variation from tissue culture. In: Use of tissue culture and protoplasts in plant pathology, p. 139-161.
- Sibi M., 1995.** Vitrovariations et potentialités nouvelles. In: Biotechnologies végétales. CNED, AUPELF-UREF, Rennes, pp 11-43.
- Smith D.R & Thorpe T.A, (1975).** Root initiation in cuttings of *Pinus radiata* seedlings. II. Growth regulator interactions. *J. Exp. Bot.* 26: 193-202.
- Snir I., 1983.** A micropropagation system for sour cherry. *Sci. Hortic.* 19: 85-90.
- Spengler G., 1976.** Mededelingen van de Faculteit Landbouwwetenschappen, Rijksuniversiteit Gent. 41: 831-839.
- Sree-Ramulu K. & Dijkhuis P., 1986.** Flow cytometric analysis of polysomata and *in vitro* genetic instability in potato. *J. Plant Cell Rep.*
- Starrantino A. & Caruso A., 1988.** The *in vitro* culture technique for the micropropagation of citranges and trifoliate orange cv. Flying dragon. *Istituto Sperimentale Perl Agrumicoltura, Italy* 17/18, 259-271.
- Strnad M., 1992.** Aromatic cytokinins, a new family of naturally occurring plant growth regulators. *Physiol. Plant.* 85: A170.
- Suelzu R., Tognoni F. & Lercari B., 1989.** Further studies on the micropropagation of globe artichokes. *Informatore Agrario.* 45(41): 70-72.
- Sutter E., 1982.** Problems posed by microplant morphology. *Comb. Proc. Int. Plant Prop. Soc.* 1981, 31: 563-566.

Sutter E. & Langhans R.W., 1980. Formation of epicuticular wax and its effect on water loss in cabbage plants regenerated from shoot tip culture. *HortScience*, 15: 429 (Abst. 428).

Sutter E. & Langhans R.W., 1982. Formation of epicuticular wax and its effect on water loss in cabbage plants regenerated from shoot tip culture. *Can. J. Bot.*, 60: 2896-2902.

Swartz H.J., 1990. Post culture behavior: genetic and epigenetic effects and related problems. In: *Micropropagation, technology and application*, Debergh P. C. et Zimmerman R. H. (eds). Kluwer Academic Publishers, Netherlands. Pp 95-121.

Tadino V.L.A., Faez J.M., Christiaens L.E., Kevers C., Gaspar Th. & Dommes J., 2003. Synthesis and activity of another selenated auxin: 2,4-dichlorophenylselenoacetic acid. *Plant Growth Regul.*, in press.

Tran Thanh Van K.M., 1981. Control of morphogenesis *in vitro* cultures. *Annu. Rev. Plant Physiol.* 32: 291-311.

Uekama K., Hirayama F. & Irie T., 1998. Cyclodextrin drug carrier systems. *Chemical Review*, 98: 2045-2076.

Vanderschraeghe A.M. & Debergh P.C., 1987. Technical aspects of the control of the relative humidity in tissue culture containers. *Med. Fac. Landbouww. Rijksuniv. Gent.* 52: 1429-1437.

Van Huylenbroeck J., 1997. Physiology of micropropagated plants during acclimatization. Thèse Doct. Sci. Biol. Appl., Faculté des Sciences Agron. Et Biol. Appl. Gent, 118p.

Van Huylenbroeck J.M. & De Riek J., 1995. Sugar and starch metabolism during *ex vitro* rooting and acclimatization of micropropagated *Spathiphyllum* 'Petite' plantlets. *Plant Science*, 111: 19-25.

Van Loo J., Coussement P., De Leenher L., Hoebregs H. & Smits G., 1995. On the presence of inulin and oligofructose as natural ingredients in the Western diet. *CRC Critical Reviews in Food Science and Nutrition.* 35(6): 525-552.

Viane R., 2001. Communication personnelle.

Vietiez A.M., Sanchez C. & San-Jose C., 1989. Prevention of shoot-tip necrosis in shoot cultures of chestnut and oak. *Scientia Horticulturae (Amsterdam)* 41: 151-160.

Wardle K., Dixon P.A. & Simpkin I., 1981. Sodium accumulation by leaves of cauliflower plantlets and the effect on the mode of plant formation. *Ann. Bot.* 47: 653-659.

Wardle K., Dobbs E.B. & Short K.C., 1983. *In vitro* acclimatization of aseptically cultured plantlets to humidity. *J. Am. Soc. Hort. Sci.*, 108: 386-389.

Welbaum G.E., 1994. Annual culture of globe artichoke from seed in Virginia. *HortTechnology*. 4(2): 147-150.

Welvaert W. & Van Vaerenbergh J., 1979. Recherches sur la dégénérescence infectieuse en Tunisie. In: *Atti 3rd Congr. Int. Stud. Carciofo, Bari*. Ind Grafica Laterza, pp 929-942.

Welvaert W. & Zitouni B., 1976. Investigations on infectious degeneration of artichokes in Tunisia. *Atti 2° Congr. Int. Stud. Carciofo, Bari e Polignano a Mare, 1974*. Ed Minerva Medica, Torino, Italia. 865-875.

Went F.W., 1939. The dual effect of auxin on root formation. *Am. J. Bot.* 26: 24-29

Went F.W. & Thimann K.V., 1937. Root formation. In: *Phytohormones* (pp 183-206). MacMillan, New York.

Werbrouck S.P.O & Debergh P.C., 1996. Imidazole fungicides and Paclobutrazol enhance cytokinin-induced adventitious shoot proliferation in Araceae. *J. Plant Growth Regul.* 15:81-85.

Werbrouck S.P.O, Strnad M., Van Onckelen H.A & Debergh P.C., 1996. Meta-topolin, an alternative to benzyladenine in tissue culture? *Physiologia Plantarum*. 98:291-297.

Werbrouck S.P.O, Saibo N.J.M., Dhuyvetter H., Van Der Straeten D., De Schepper S. & Debergh P.C., 2003. Physiological and morphological evidence of brassinosteroid-biosynthesis inhibition by the fungicide imalazil. *Physiologia Plantarum* (sous presse).

Wetzstein H.Y. & Sommer H.E., 1982. Leaf anatomy of tissue cultured of *Liquidambar styraciflua* (Hamamelidaceae) during acclimatization. *Amre. J. Bot.*, 69: 1579-1586.

Wetzstein H.Y. & Sommer H.E., 1983. Scanning electron microscopy of the *in vitro*-cultured *Liquidambar styraciflua* plantlets during acclimatization. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 108: 475-480.

Wiesman Z., Riov J. & Epstein E., 1989. Characterization and rooting ability of indole-3-butyric acid conjugates formed during rooting of mung bean cuttings. *Plant Physiol.* 91: 1080-1084.

White P.R., 1934. Phytopath. 24: 1003-1011.

Yu T.A., Yeh S.D., Cheng Y.H. & Yang J.S., 2000. Efficient rooting for establishment of papaya plantlets by micropropagation. Plant Cell, Tiss. And Org. Cult. 61: 29-35.

Zimmerman R.H., 1984. Rooting apple cultivars *in vitro*: interactions among light, temperature, phloroglucinol and auxin. Plant cell, Tiss. Org. Cult., 3: 301-311.

Ziv M., 1986. *In vitro* hardening and acclimatization of tissue culture plants. In: Withers L. A., Alderson P. G. (eds) Plant tissue culture and its agricultural application. Butterworths, London, pp 187-196.

Ziv M., 1991. Vitrification: morphological and physiological disorders of *in vitro* plants. In: Micropropagation, technology and application, Debergh P. C. et Zimmerman R. H. (eds). Kluwer Academic Publishers, Netherlands. Pp 45-69.

Ziv M., Kahany S. & Lilienkipnis H., 1994. Scaled-up proliferation and regeneration of nerine in liquid cultures. 1. The induction and maintenance of proliferating meristematic clusters by paclobutrazol in bioreactors. Plant Cell, Tiss. And Org. Cult., 39(2): 109-115.

Zohary D. & Basnizky J., 1975. The cultivated artichoke *Cynara scolymus* its probable wild ancestors. Economic Botany. 29(3): 233-235.

