



الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية
République Algérienne Démocratique et Populaire
وزارة التعليم العالي والبحث العلمي
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche
Scientifique
جامعة زيان عاشور- الجلفة
Université Ziane Achour – Djelfa
كلية علوم الطبيعة والحياة
Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie
Département de Biologie
Projet de fin d'études
En vue de l'obtention du Diplôme de Master Filière : Biotechnologie
Spécialité : Biotechnologie végétale

Thème

**L'étude de la germination des grains du pollen du Pin
d'Alep (*Pinus halepensis* Mill.)**

Présenté par : Mme. KELLAL SIHAM
Mme. LATERCHI HADJER

Devant le jury composé de :

Président: Mr. ADLI .B M.C.B .U.Z.A.D

Promotrice : Mme. NAAS. O M.C.B .U.Z.A.D

Examineurs : Mme. BENCHERIF.K M.C.A .U.Z.A.D

Mme. OUALHA .D M.A.A .U.Z.A.D

Année Universitaire 2020 / 2021

Dédicace :

*Je dédie ce modeste travail mon très cher père **Belkheir***

Autant de phrases et d'expressions aussi éloquentes soit-elles ne sauraient exprimer ma gratitude et ma reconnaissance. Tu as su m'inculquer le sens de la responsabilité, de la confiance en soi face aux difficultés de la vie. Tes conseils ont toujours guidé mes pas vers la réussite. Ta compréhension et ton encouragement sont pour moi le soutien. Je te dois ce que je suis aujourd'hui et ce que je serai demain et je ferai toujours de mon mieux pour rester ta fierté et ne jamais te décevoir. Que Dieu le tout puissant te préserve, t'accorde santé, bonheur, quiétude de l'esprit et te protège de tout mal.

A ma très chère mère **Zohra*

Autant de phrases aussi expressives soient-elles ne sauraient montrer le degré d'amour et d'affection que j'éprouve pour toi. Tu m'as comblé avec ta tendresse et affection tout au long de mon parcours. Tu n'as cessé de me soutenir et de m'encourager durant toutes les années de mes études, tu as toujours été présente à mes côtés pour me consoler quand il fallait. En ce jour mémorable, pour moi ainsi que pour toi, reçoit ce travail en signe de ma vive reconnaissance et mon profond estime. Puisse le Dieu tout puissant te donner santé, bonheur et longue vie afin que je puisse te combler à mon tour.

A mon cher mari **Mohamed*

. Merci pour ton amour, ton soutien et tes encouragements qui ont toujours été pour moi d'un grand réconfort. Merci pour ta gentillesse et ton sens du sacrifice.

A mon petit cœur, mon fils **Sofiane Adam Merci d'avoir donné un sens à ma vie, Puisse dieu te protéger, te procurer santé et longue vie.*

∴

** A ma grande mère maternelle : **Saadia** Une grand-mère est comme une seconde maman .Que Dieu vous préserve santé et longue vie.*

A ma grande mère paternelle : **Fadia, tu vis dans mon cœur, jamais je ne t'oublierai. Allah yarhmek*

**A mes chères sœurs*

***Nesrin, Ikram, Racha et Lina** pour leurs encouragements permanents, et leur soutien moral*

**A mes chères tantes*

***Sabrina, Soumia et Farida** qui n'ont cessées d'être pour moi des exemples de persévérance, de courage et de générosité.*

A ma chère tante **Yamna. Que Dieu tu préserve santé et longue vie.*

A mon cher oncle **Ahmed et A mon cher oncle Le mari de ma tante **Loubna Samir***

A toute ma belle famille **Said*

A mes chères amies : **Abir, Aicha, Marwa et Zineb.*

A mes deux chères collègues et amies : **Khadidja et sarah*

*A mon cher binôme **Latrechi hadjer***

Kellal Siham

Dédicace

Je dédie ce modeste travail à ma très chère mère MINA, qui m'a accompagné durant les moments les plus pénibles de ce long parcours de mon éducation, celle qui a fait preuve de ces plus copieux desseins pour me permettre de goûter le fardeau de ce monde et de chercher la voie de ma vie avec ces précieux conseils, donc je devais incessamment être de grande compétence et motivation. Cependant. Je prie ALLAH le Miséricordieux qu'il portera récompense, car la mienne ne sera guère .complète. Et te protège et le garde en bonne santé

A mon père SALIM qui a sacrifié sa vie afin de me voir grandir et réussir dans le parcours de l'enseignement. Celui qui est toujours resté à mes côtés dans les moments rudes de ma vie

A Mon cher mari Said d'être toujours à mes côtés pour me soutenir et qui a été une source de force et d'encouragement pour moi

A mon coupe de cœur mon fis Ahmed Ilyes

A mes cher soeur : Imane , Asma et hadil

A mon cher frère : idris Et l'homme de ma soeur djamel

A ma belle mère

A mon très cher binôme : sihem

Noubliez pas des enfants de la famille mohamed Açyle et Adam

À tout le membre de ma famille grande et petite

A toutes ma belle famille

Laterchi hadjer

REMERCIEMENTS

Avant de commencer, nous tenons à remercier « ALLAH » de nous avoir donné la santé, le courage et la volonté pour réaliser notre rêve et de mener à terme ce travail.

Nous présentons nos sincères remerciements à notre promotrice Madame. **NAAS OUMSAAD** Maître de conférences à l'université de Djelfa pour son aide, ses précieux conseils et son suivi qu'elle nous a prodigués tout au long de notre recherche.

Nous tenons également à remercier le président du jury Mr. **ADLI.B. M.C.B** et le chef de spécialité de biotechnologie végétale à l'université de Djelfa, ainsi que les examinatrices Mesdames : **BENCHERIF K. M.C.A** et **OUALHA .D. M.A.A** à l'université de Djelfa pour leur contribution à l'évaluation et l'examinations de notre travail.

Nos remerciements s'adressent également à tous les enseignants du département de biologie de l'université de Djelfa, qui ont contribué à notre formation.

Nous remercions également à tous le corps d'enseignants, et tous les étudiants de biotechnologie végétale.

A la fin nous tenons à exprimer notre gratitude et nos sincères remerciements à tous ceux qui ont contribué, de près ou de loin, à l'élaboration de ce modeste travail.

Merci

Sommaire:

Liste des abréviations	
Liste des figures	
Introduction	1
Chapitre I : Généralités sur la plante	
I .1.Généralités	3
I .2. Répartition géographique du Pin d'Alep	3
I.3.Taxonomie	5
I .4. Description botanique de la plante	6
I .5. Cycle de reproduction et fructification	8
I .6. Intérêt économique de <i>Pinus halepensis</i>	9
I.7. Les propriétés thérapeutiques et usage traditionnel	10
Chapitre II: Pollen : Morphologie, fertilité et conservation	
II.1. Définition du pollen	11
II.2. Morphologie	11
II.2.1. L'exine	11
II.2.2. L'intine	12
II.2.3. Sporopollénine	12
II.3. Classification et identification des pollens	12
II.3.1. Les apertures	12
II.3.2. Ornementation de l'exine	13
II.3.3. La forme	14
II.3.4. La taille	15
II.4. Pollen des conifères	15
II.5. Fertilité du pollen	17
II.6. Conservation du pollen	17
II.6.1. Les différentes techniques de conservation	17
II.6.1.1.La lyophilisation	17
II.6.1.2. Conservation dans des solvants organiques	18
II.6.1.3. Conservation dans l'huile	18
II.6.2. Processus de conservation des pollens d'arbres résineux	18
II.6.2.1. Récolte des cônes mâles	20
II.6.2.2. Premier séchage	20

II.6.2.3. Tamisage	20
II.6.2.4. Conservation à court terme	20
II.6.2.5. Seconde séchage	20
II.6.2.6. Test de germination et test de viabilité	20
II.6.2.7. Mesure de la teneur en eau	21
II.6.2.8. Lyophilisation et conservation à long terme	21
II.6.2.9. Prélèvement du pollen	21

Chapitre III : Germination in vitro des grains du pollen du Pin d'Alep

III.1. La culture in vitro	22
III.1.1. Définition	22
III.1.2. Historique	22
III.2. Définition de la germination in vitro du pollen.	25
III.3. Les conditions de germination in vitro du pollen	25
III.4. Le test de viabilité du pollen et pouvoir germinatif	25
III.4.1. Le test de coloration vitale	26
III.4.2. Le test de germination " <i>in vitro</i> "	26
III.4.2.1. Acclimatation	26
III.4.2.2. Réhydratation	27
III.4.2.3. Le milieu de culture	27
III.5. Facteurs affectant la viabilité du pollen pendant le stockage	28
III.6. La germination in vitro des grains du pollen du Pin d'Alep	28
III.6.1. Méthodes de préparation du pollen des différents auteurs su-cités	29
III.6.2. Milieux de culture	30
III.6.3. Resultats	32
Conclusion	36
Références bibliographiques	38

Liste des abréviations

%: Pourcentage

C°: Degrés celsius

CaCl₂: dichlorure de calcium

Ca(NO₃)₂ · 4H₂O: Calcium nitrate tetrahydrate

Cm: Centimètre

F.A.O : Organisation des Nations Unies pour l'Alimentation et l'Agriculture

G : Germination

Gr: Grossissement.

KNO₃: Nitrate de Potassium

H: Heure

H₃BO₃: Acide Borique

m: Mètre

mm : Millimètre

MgSO₄ · H₂O: Magnesium sulfate monohydrate

nm; Nanomètre

PEG: Polyéthylène glycol

pH : Potentiel d'Hydrogène.

T°: Température

μm : Micromètre

Liste des figures

Figure 1. Aire de répartition du Pin d'Alep en région méditerranéenne	4
Figure 2. Répartition du Pin d'Alep en Algérie	5
Figure 3. Arbre du Pin d'Alep	6
Figure 4. L'écorce du Pin	6
Figure 5. Les feuilles du Pin d'Alep	7
Figure 6. Les chatons mâles du Pin	7
Figure 7. Les cônes femelles et les graines du Pin	8
Figure 8. Cycle de reproduction du Pin d'Alep	8
Figure 9. La structure de grain du pollen bicellulaire.	11
Figure 10. Détail de la paroi du pollen	12
Figure 11. Apertures et vues caractéristiques des grains du pollen	13
Figure 12. Ornementation de l'exine	13
Figure 13. Les trois classes de forme des grains du pollen	14
Figure 14. Coupe longitudinale d'un cône mâle de <i>Pinus halepensis</i> Mill.	15
Figure 15. Coupe transversale d'une écaille de <i>Pinus halepensis</i> Mill.	16
Figure 16. Grain du pollen de <i>Pinus halepensis</i> Mill.	16
Figure 17 : Processus de conservation à court et à long terme du pollen des arbres résineux	19
Figure 18. Pollen en germination d'un essaim hybride à Suchá Hora (A) et <i>P. mugo</i> à Roháče (B)	34

Liste des tableaux

Tableau 01 : Conditions optimales de conservation du pollen de quelques espèces du genre <i>Pinus</i>	22
Tableau 02 : Facteurs affectant la viabilité du pollen pendant le stockage.....	28
Tableau 03 : préparation du pollen pour les expériences.....	29
Tableau 04 : description du milieu de culture nécessaire à la germination in vitro du pollen utilisé pour chaque espèce de conifère.....	31
Tableau 05 : description du milieu de culture nécessaire à la germination in vitro du pollen du Pin d'Alep (<i>Pinus halepensis</i> Mill.).....	31
Tableau 06 : description du milieu de culture nécessaire à la germination in vitro du pollen du Pin sylvestre (<i>Pinus sylvestris</i> L.) et Pin suisse (<i>Pinus mugo</i> Turra).....	31
Tableau 07 : description du milieu de culture nécessaire à la germination in vitro du pollen de <i>Picea abies</i> (L.).....	32
Tableau 08 : description du milieu de culture nécessaire à la germination in vitro du pollen de Le Pin gris (<i>Pinus banksiana</i>).....	32
Tableau 09 : STANLEY et LINSKENS (1974) indiquant la taille de l'échantillon à dénombrer pour obtenir un pourcentage de germination du pollen qui soit statistiquement valable au seuil de 5%.....	33

Introduction

Introduction

Introduction :

Au cours de la vie de toutes les espèces végétales, à un moment ou l'autre, des éléments de très petite taille, entourés d'une membrane résistante interviennent toujours dans leur cycle de vie ; ce sont les spores ou les grains de pollen (Pons, 1970).

Il existe des milliers de variétés de pollens. Chaque espèce de plante à fleurs en produit un de spécifique - véritable "empreinte digitale" de la plante concernée - dont les caractéristiques permettent l'identification précise au microscope (CHARRIER, 1990), par exemple, en taille, forme, nombre d'ouverture ; ces caractéristiques sont particulièrement diverses dans certains taxons végétaux et peuvent être diagnostiques.

Le pollen représente une multitude de corpuscules microscopiques contenus dans les sacs polliniques de l'anthere de la fleur, ces grains minuscules constituant les éléments fécondants mâles de celle-ci. (CHARRIER, 1990)

La germination du pollen dans le tissu stigmatique de *Portulaca* a été observée pour la première fois dès 1824 par Amici et plus tard, il a observé le tube pollinique en germination entrant dans l'ovule. Le pollen agit comme un véhicule pour le transfert des gamètes mâles à l'embryon de la plante femelle. L'évaluation de la viabilité du pollen est très cruciale dans la pollinisation artificielle impliquant en particulier différentes espèces ou genres. (JAYAPRAKASH P et SARLA, 2001 et JAYAPRAKASH P., 2015).

En examinant la littérature scientifique sur la viabilité du pollen, il a été constaté que la viabilité du pollen est principalement affectée par la sécheresse, la déshydratation, le stress thermique et le rayonnement UV-B. Ces facteurs affectent non seulement la viabilité du pollen après la déhiscence, lorsque le pollen est exposé à l'environnement, mais aussi pendant son développement à l'intérieur de l'anthere. L'effet de chaque facteur affecte la viabilité du pollen d'une manière spécifique à l'espèce, en fonction de la physiologie des grains de pollen et de la présence ou de l'absence de modifications structurelles spécifiques. Un facteur de complication pour la comparaison de diverses expériences était l'absence de protocoles standardisés et de conditions expérimentales utilisées. (BOTS et MARIANI, 2005).

Parmi les diverses techniques utilisées pour évaluer la viabilité du pollen, la germination du pollen *in vitro* est la méthode la plus fiable. Le pollen a germé dans une variété de milieux qui diffèrent d'une espèce à l'autre et même pour différentes variétés d'une culture. (JAYAPRAKASH P et SARLA, 2001 et JAYAPRAKASH P, 2015).

Introduction

Notre espèce d'étude est le pollen de Pin d'Alep (*Pinus halepensis* Mill.). Cette espèce appartient à la famille des Pinaceae, répartie dans le monde entier et essentiellement autour des côtes méditerranéennes. *Pinus halepensis* est l'espèce la plus abondante en Algérie. Constitue l'essence principale des formations forestières, il occupe plus de 35% de la superficie forestière globale du pays, et le plus important dans le bassin méditerranéen par rapport à leurs intérêts et leurs rôles écologiques, économiques et aussi médicaux. (NEDJMI, DIFI et HADDIOUI, 2014).

Ce travail s'articule sur trois chapitres dont, le premier chapitre présente des généralités sur la plante de Pin d'Alep (*Pinus halepensis* Mill.) ; dans le deuxième chapitre nous allons voir la morphologie du pollen, sa fertilité et les méthodes de sa conservation.

Ensuite et dans le chapitre trois, la germination *in vitro* du pollen et ses conditions ; ont été réalisés par une synthèse de quelques références consistantes et en fin une conclusion générale pour faire ressortir des perspectives clôturées de la présente étude.

Chapitre I :

Généralités sur la plante

Chapitre I : généralités sur la plante

I.1. Généralités :

Le Pin d'Alep (*Pinus halepensis* Mill.) fut décrit pour la première fois en 1755 par Duhamel sous le nom de *Pinus hierosolimitana*. Philip Miller le décrit en 1768 sous le nom de *Pinus halepensis*, et après plusieurs autres descriptions par différents auteurs, les botanistes sont retenus l'appellation donnée par Miller. Ainsi, il est à noter que le Pin d'Alep n'existe pas à l'état naturel dans la région d'Alep, au nord de la Syrie où se trouve plutôt le Pin de Calabre (*Pinus brutia*), avec lequel il a été confondu (NAHAL, 1986).

Le Pin d'Alep, ou pin blanc de Provence, est un conifère de la famille des Pinacées qui regroupe environ 250 espèces. Le sous-genre *Pinus* de genre *Pinus* est divisé en cinq sections et chaque section est spécifique à une aire biogéographique.

Le Pin d'Alep appartient à la section des Halepensoïdes qui est divisée en trois groupes, dont le pin d'Alep (*Pinus halepensis* Mill.) est renfermé dans le groupe *Halepensis*. Ainsi, ce groupe renferme quatre autres espèces: *Pinus brutia* Ten., *Pinus eldarica* Medw., *Pinus stankewiczii* Sukaczew., et *Pinus pithyusa* Stevenson. Du point de vue descriptif, ce groupe est caractérisé par des pins à deux aiguilles et à cônes caduques habitant la région Méditerranéenne et sont souvent connus sous le nom des pins méditerranéens du groupe *Halepensis*.

En outre, certains botanistes ont vu dans ces Pins des espèces distinctes, alors que d'autres ont abaissé certains d'entre eux au rang de variétés. (DJERRAD, 2016)

I.2. Répartition géographique du Pin d'Alep :

- Dans le monde :

L'aire géographique du Pin d'Alep est trouvée à l'état spontané autour du bassin méditerranéen (Figure01), sauf en Egypte. Son centre de gravité est nettement le bassin méditerranéen en occidental, surtout l'Afrique du Nord, ou plus exactement l'Algérie et la Tunisie.

Le Pin d'Alep s'étend de l'Afrique du Nord (Maroc, Algérie, Tunisie et Libye) et du Moyen Orient (Syrie, Liban, Jordanie, Palestine et Turquie), jusqu'à l'Europe méridionale méditerranéenne (Grèce orientale, Croatie, Italie du Nord, Est de la France et Espagne orientale) (ABLOUL et LADJAL, 2020)

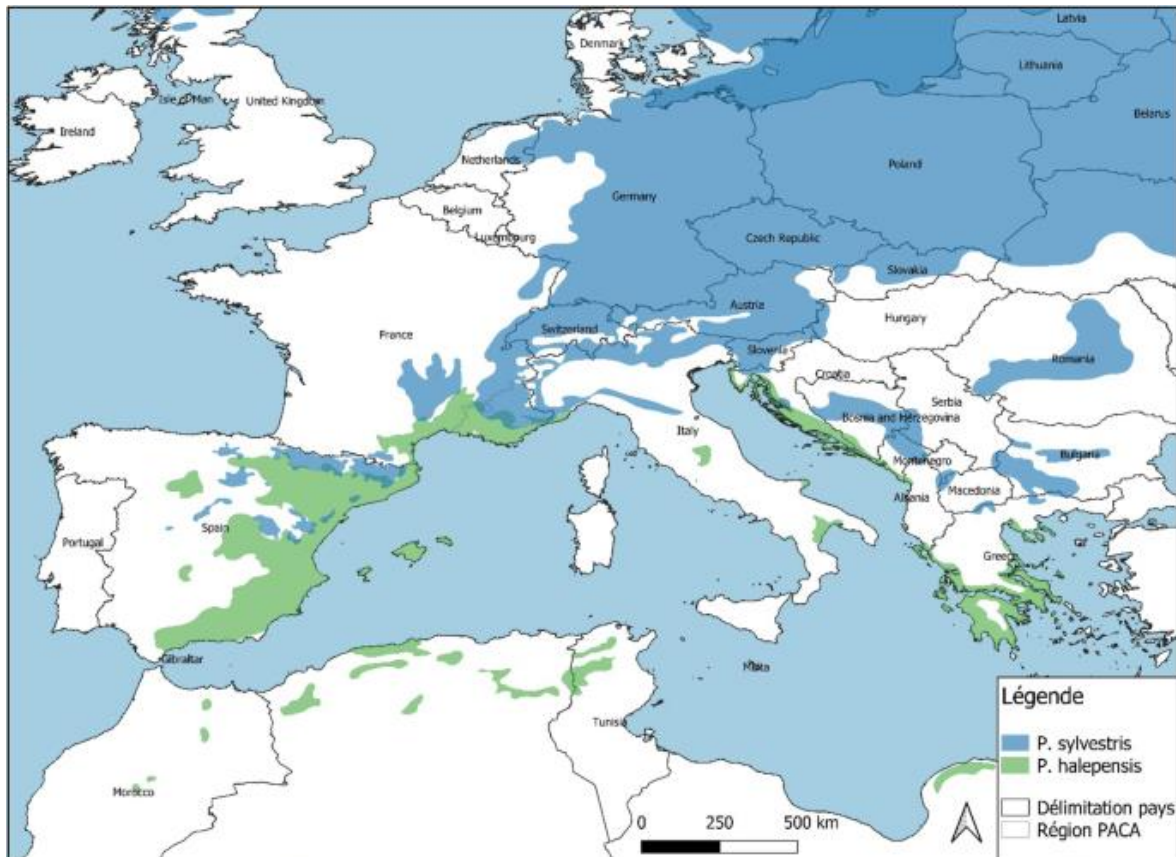


Figure 01 : Aire de répartition du Pin d'Alep en région méditerranéenne (GHOUGALI, 2011)

- **En Algérie :**

Le Pin d'Alep est fréquent dans la surface forestière de l'Algérie (Figure 02), avec 35% de couverture.

Il existe dans toutes les variantes bioclimatiques avec une prédominance dans l'étage semi-aride où il est localisé principalement dans les régions suivantes (GUIT, 2015) :

- La région de Tessa, les plateaux constantinois et les Aurès ;
- La région d'Algérie (les forêts de Médéa, Monts des Bibans- sont une chaîne de montagnes du Nord de l'Algérie);
- Les forêts de monts de Saida, de mascara, de sidi bel Abbés et De Telagh ;
- L'atlas saharien ; la région de Djelfa (mont d'Oulad Nail).

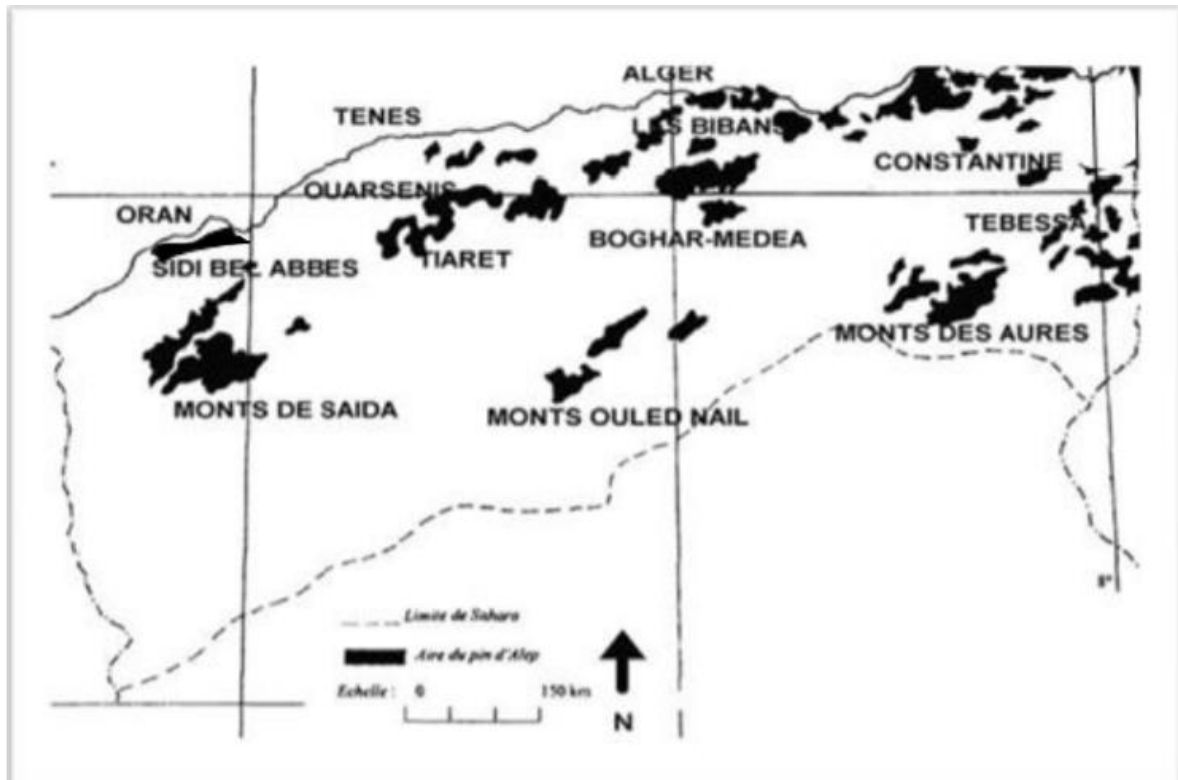


Figure 02 : Répartition du Pin d'Alep en Algérie (BRAKCHI-OUAKOUR, 2015)

I.3.Taxonomie :

Le *Pinus halepensis* fut décrit pour la première fois par Duiiamel en 1755 sous le nom de *Pinoshiero, soliviitana*, puis Philip Miller la réécrivit plus tard en 1768 sous le nom de *Pinus halepensis*

La position systématique du taxon selon différentes approches morphologiques et phylogéniques APGII est décrite selon :(ABLOUL et LADJAL, 2020)

Règne: Plantae.

Sous-règne: Tracheobionta.

Embranchement: Pinophyta.

Sous-embranchement: Gymnospermes.

Classe: Pinopsida.

Ordre: Pinales.

Famille: Pinaceae.

Sous-famille: Pinoideae.

Genre: Pinus.

Espèce: *Pinus halepensis* Mill. (1768) subsp. *Halepensis*. (BOUAZZA, 2013)

I.4. Description botanique de la plante :

Le Pin d'Alep est un arbre toujours vert (Figure 03), d'hauteur totale allant de 25 à 27m, sa longévité ne dépasse pas 150 ans. Au tronc tortueux, irrégulier et branchu. (ABLOUL et LADJA, 2020).



Figure 03 : Arbre du Pin d'Alep (PRAT et RUBINISTIEN, 2015)

- L'écorce des arbres jeunes est lisse et d'un gris argenté (Figure04) ; chez les adultes, elle forme un rhytidome plus ou moins gerçure en écailles minces, larges et aplaties de couleur rougeâtre (ABLOUL et LADJAL, 2020) ;



Figure 04 : l'écorce du Pin (SAGET, 2014)

Chapitre I : généralités sur la plante

- Bourgeons cylindro-coniques ,7-8 mm, non résineux (ABLOUL et LADJAL, 2020) ;
- Aiguilles très fines (< 1 mm) ; mesurent 5 à 10 cm de long ; réunies par deux, rarement par trois dans une gaine ; groupées en pinceaux à l'extrémité des rameaux (Figure 05); de couleur verte jaunâtre., Ces pseudophylles sont persistantes . . (ABLOUL et LADJAL, 2020);



Figure 05 : Les feuilles du Pin d'Alep (GARRIGE, 2003)

- Les cônes mâles de 6 à 7 cm rassemblant à des chatons dressés, produisent une grande quantité de pollen jaune orangé dispersé par le vent (Figure 06) (NAHAL, 1983) ;



Figure 06 : les chatons males de Pin (GESLOT, 2018)

Chapitre I : généralités sur la plante

- Les cônes femelles ligneux ovoïdes coniques à écailles dures, pédonculés, isolés ou par paires, Ils mûrissent au cours de la deuxième année et laissent le plus souvent échapper leurs graines au cours de la troisième année. Le cône doit avoir subi de forte chaleur qui détruit les joints de résine

entre les écailles pour pouvoir s'ouvrir. Ce dernier renferme des graines mates de 7 mm de taille, brun gris sur une face et gris moucheté de noir sur l'autre. Munie d'une aile allongée 4 fois plus longue qu'elle, qui facilite leur dissémination rapide (ABLOUL et LADJAL, 2020).



Figure 07: Les cônes femelles (NOVIKOVA, 2019).

I .5. Cycle de reproduction et fructification :

Le Pin d'Alep se reproduit en général vers l'âge de 8-12 ans, cependant la maturité sexuelle peut être plus précoce vers 4 ans et peut même se déclencher plus tôt à l'âge de deux ans, La maturité sexuelle est très variable dans le temps ; elle dépend des conditions du milieu, et semble surtout liée à la croissance de l'arbre : plus l'arbre est vigoureux plus l'aptitude à la fructification est précoce .Le Pin d'Alep est une espèce monoïque ; les organes sexuels mâles et femelles sont nettement séparés dans l'architecture de l'arbre, les inflorescences femelles (cônes) apparaissent en position terminale sur des pousses vigoureuses, alors que les inflorescences mâles (chatons) sont regroupées en un pseudo verticille généralement sur des rameaux (CHOKRI, 2005).

Inférieur la figure 08 reproduit le cycle de reproduction du Pin d'Alep ; ce cycle a été établi au départ d'observations régulières sur une période de 3 ans. Mûrs de l'année même de leur

Chapitre I : généralités sur la plante

formation, les chatons mâles tombent après l'émission de leur pollen au printemps, alors que les cônes femelles continuent à se développer après la fécondation (mars - avril), ne mûrissent qu'à la deuxième année et ne laissent échapper leurs graines qu'au cours de la troisième année. Quant à la pollinisation, elle est assurée essentiellement par le vent.

Le Pin d'Alep est une espèce diploïde qui compte 24 chromosomes (2n), comme c'est le cas pour la plupart des pins. (CHOKRI, 2005)



Figure 08 : Cycle de reproduction du Pin d'Alep (EINSTEIN, 2020)

I.6. Intérêt économique de *Pinus halepensis* :

Ecologiquement *P. halepensis* est l'espèce forestière la plus importante dans de nombreux pays méditerranéens. Il est utilisé généralement dans des programmes de reboisement des sols dégradés, cas de la « ceinture verte » dans le sud de l'Algérie, où 1 million de hectares ont été plantés de pins d'Alep il y a plus de 20 ans.

Le bois du Pin est utilisé en construction, industrie, menuiserie, bois et pâte à papier, pour l'étagage des mains, la construction navale et la charpenterie.

Le Pin est utilisé aussi dans le domaine cosmétique grâce à sa richesse en acide gras, vitamine E, polyphénols et antioxydants naturels.

Chapitre I : généralités sur la plante

Les grains de Pin sont utilisés dans le domaine agroalimentaire, (la pâtisserie). Le Pin d'Alep donne environ 3 kg de résine (la gomme) par arbre et par an ; la gomme pure contient 20 à 24 % d'essence de térébenthine et 75 à 80% de cellophane, elle a aussi des usages médicaux.(CHEIKH-ROUHOU et al 2006)

I.7. Les propriétés thérapeutiques et usage traditionnel :

Les rameaux feuillés de *Pinus halepensis* renferment une huile essentielle riche en pinène, puissant antiseptique apprécié en cas d'affections respiratoires, dépuratifs en décoction, balsamique et amère (appréciés alors en cas d'inflammation intestinale).

L'huile de pin est utilisée en aromathérapie dans les massages de la peau ; dans le soulagement de problèmes gastro-intestinaux comme les ulcères de l'estomac. Cette huile se comporte également comme un inhibiteur de l'appétit, un stimulant de l'absorption des protéines, ainsi comme un produit naturel dans le traitement des maladies cardio-vasculaires parce qu'elle contient l'acide pinolénique ; qui régule le taux des lipides totaux du sang, en réduisant la consolidation des plaquettes, ce qui aboutit à une diminution de la pression sanguine. Aussi elle contient des antioxydants qui sont bénéfiques à l'organisme tout entier.

L'huile essentielle est utilisée dans le traitement de la leishmaniose qui est une maladie Infectieuse causée par différent espèces de parasite protozoaire du genre leishmania.

La décoction des bourgeons, de l'écorce et des cônes matures ou jeunes ainsi que la poudre des résines et des cônes verts sont utilisées pour le soulagement de l'asthme, la bronchite et la toux.

Selon la tradition kabyle trois cuillerées à soupe de résine pilée et tamisée, incorporées à un pot de miel pur de 500g, constituent le traitement complet de la bronchite. (ABLOUL et LADJAL, 2020).

Chapitre II :
**Pollen : Morphologie,
fertilité et conservation**

Chapitre II. Morphologie, fertilité et conservation

II.1. Définition du pollen :

Le mot pollen dérive du grec « *pâle* » qui désignait à la fois la farine et la poussière Pollinique (DONADIEU, 1982). Il est un organe anatomiquement simple comparé à d'autres tissus hautement différenciés et à d'autres organes végétaux. (GOKUL, 2016)

Le pollen est un gamétophyte mâle, donc un producteur de gamètes, Contenu dans l'anthère de la plantes à l'extrémité des étamines. (NICOLSON, 2011). Ce sont des grains microscopiques contenant deux ou trois cellules (NAAS, 2017). Les pollens sont formés de deux noyaux et de cytoplasme entouré par une couche interne fine appelée intine et une paroi plus rigide et/ou plus épaisse appelé exine (Figure 09). (NICOLSON, 2011)

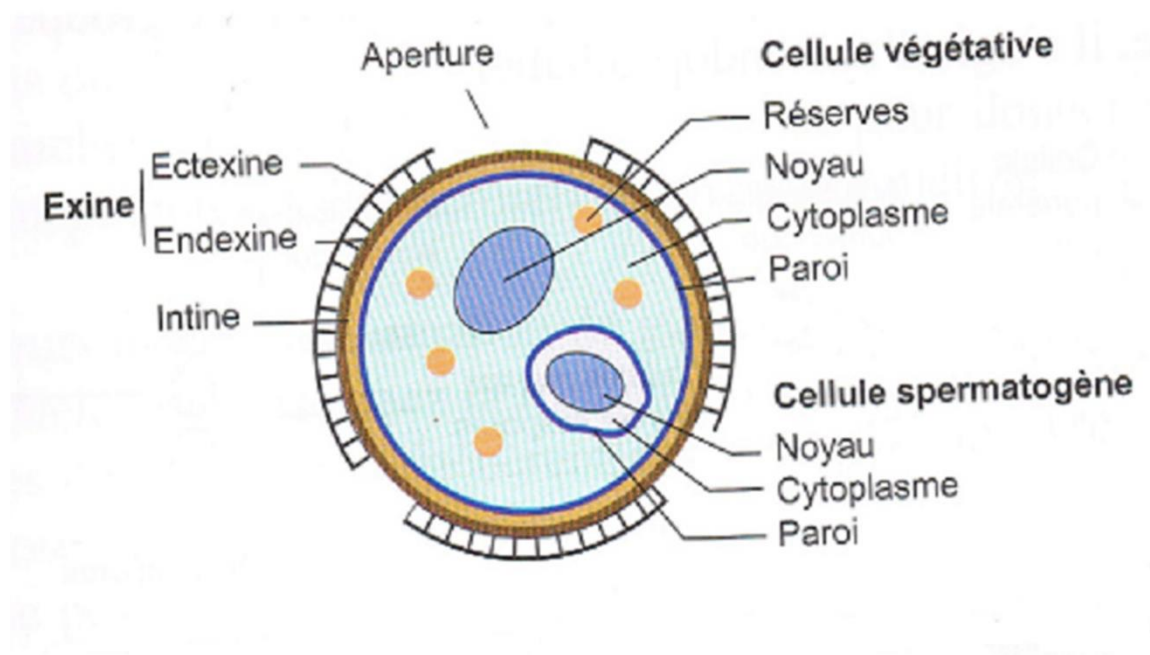


Figure 09: La structure de grain du pollen bicellulaire (ELHAMIDI, 2017).

II.2. Morphologie :

Le grain de pollen mûr est composé d'une cellule qui contient une masse cytoplasmique et deux noyaux à n chromosomes chacun, un noyau végétatif volumineux généralement central et un noyau reproducteur petit, plus ou moins aplati (YOUNSI et LAZIZI, 2016), et elle est entourée de l'enveloppe pollinique est appelée sporoderme, (KETFI, 2016) comportant essentiellement deux couches concentriques : l'intine et l'exine (Figure 10) (CHARPIN, 1986).

II.2.1. L'exine :

C'est la couche extérieure constituée principalement de sporopollénine, un matériau extrêmement résistant. C'est une couche rigide, qui assure une protection mécanique, elle est

Chapitre II. Morphologie, fertilité et conservation

subdivisée en deux sous couches : l'endexine (couche la plus interne) et l'ectexine (couche la plus externe). (JABRANI et OULMAN, 2016).

II.2.2. L'intine :

Dont la structure est parfois complexe, est toujours formée par l'association de la cellulose et des composés pectiques (MANGIN, 1889) ; c'est la couche interne du sporoderme. Celle-ci entoure la partie centrale constituée par le cytoplasme qui contient les noyaux, c'est la partie vivante du grain de pollen. (NAAS, 2017).

II.2.3. Sporopollénine :

Les sporopollénines sont probablement les matières organiques d'origine biologique directe les plus résistantes trouvées dans la nature et dans les échantillons géologiques. Ce sont les composants chimiques qui constituent la paroi externe des grains de pollens, spores et de nombreux micro-organismes apparentés. La résistance des sporopollénines à la dégradation microbiologique, chimique et physique permet d'étudier la morphologie et la microstructure de ces palynomorphes et est donc la base de la science de la palynologie.

Les premières études chimiques portées sur l'exine des grains de pollen ont été réalisées par John (1814) et Braconnot (1829). Ils ont tous deux remarqué la résistance du composant de la paroi aux réactifs chimiques et ont introduit le terme pollenine (pollénine) pour décrire le matériau chimique résistant et dur qui constitue la paroi externe des grains de pollen. (BROOKS et SHAW, 1978).

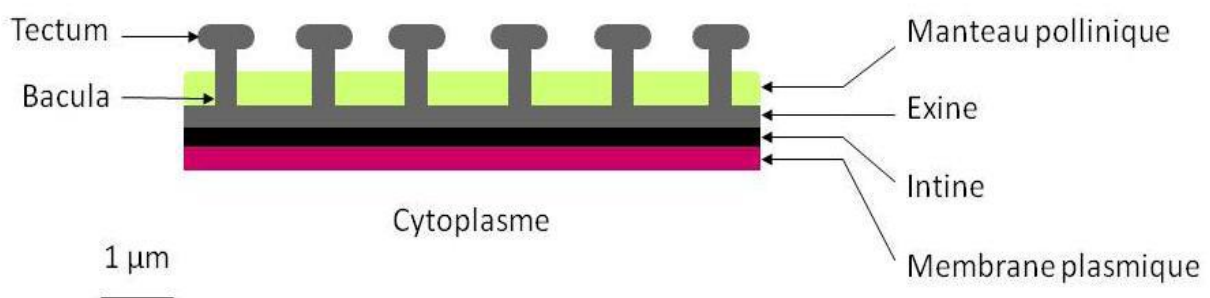


Figure10 : Détail de la paroi du pollen (PRIEU, 2015).

II.3. Classification et identification des pollens :

Les différentes tailles, formes et ornementsations de surface des pollens et des spores présentent une large diversité morphologique, ce qui permet de classer les différentes plantes.

II.3.1. Les apertures :

Les grains de pollen sont pourvus ou non d'apertures : ce sont des ouvertures dans l'exine par où sort le tube pollinique au moment de la germination. Ces ouvertures permettent également la régulation du volume des grains de pollen en fonction de l'humidité ambiante.

Chapitre II. Morphologie, fertilité et conservation

Quand les ouvertures sont arrondies, ce sont des pores, quand elles sont allongées, ce sont des sillons ou colpés (Figure 11). Ces ouvertures sont situées au pôle quand le grain n'a qu'un seul pore ou qu'un seul sillon, elles sont sur toute la surface du grain quand celui-ci est polyporé ou

ou polycolpé. Dans la majorité des cas, les ouvertures sont régulièrement réparties au niveau de l'équateur et sont au nombre de trois. Le type d'ouverture le plus courant est la superposition D'un sillon et d'un pore : le pollen est colpore (CHAPRIN ,1986 et CHIBANI, 2018).




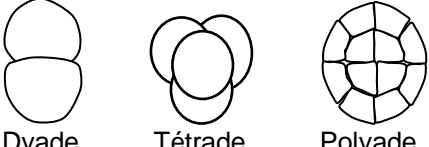
















Pollen inaperturé : 	Grains isolés sans sillon ni pore 	Grains isolés sans sillon ni pore avec ballonnets 	Grains multiples 		
Pollen poré : Pollen avec pore 	Monoporé 	Diporé 	Périporé 	Triporé 	Stéphanoporé 
Pollen colpé : 	Monocolpé 	Dicolpé 	Tricolpé 	Stéphanocolpé 	Syncolpé 
Pollen colpore : avec pore et sillon 	Tricolporé 	Péricolporé 		Stéphanocolporé 	

Figure 11: Apertures et vues caractéristiques des grains du pollen (DEBIEVE, 2014)

II.3.2. Ornementation de l'exine :

La complexité de la structure exinique et son ornementation en surface entraînent de nombreuses différences entre les grains de pollen (LEZINE, 2008). Elle peut être lisse, psillée (petits points irrégulièrement répartis), scabré (légères ondulations inférieures à 1 micron), échinulée (épines supérieures à 1 micron), gemmulée, verruquée, clavulée, baculée, réticulée (avec un réseau) sont présentés dont la figure 12 (SAIDANI, 2011).

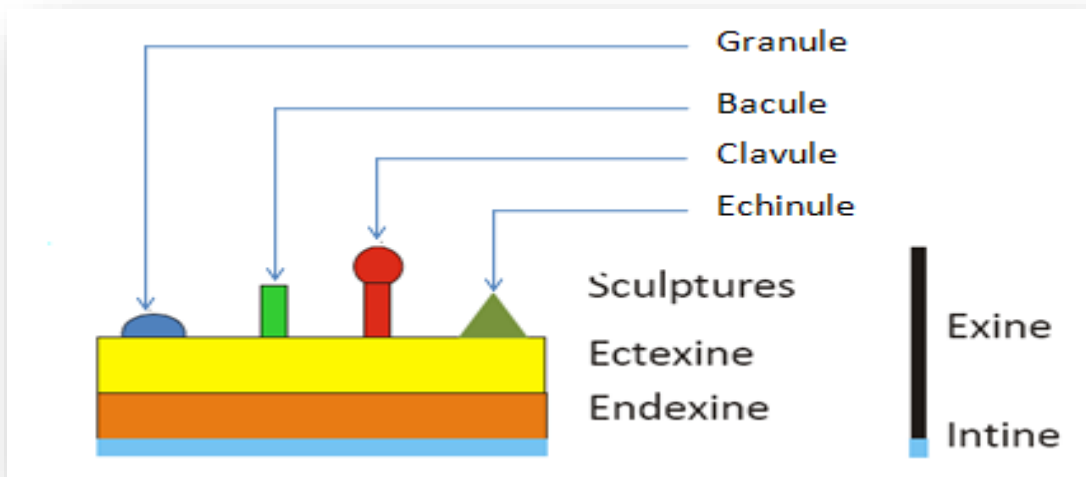


Figure12 : Ornementation de l'exine (PUNT et al, 2006)

II.3.3. La forme :

Les grains de pollen sont sphériques ou ovoïdes, plus ou moins déformés généralement Jaunes, parfois rouges, noirs ou bleuâtres (LAAIDI, LAAIDI et BESANCENOT, 1997).

La forme du pollen dépend de son orientation dans la tétrade initiale qui permet de reconnaître un pôle proximal, proche du centre et un pôle distal diamétralement opposé qui permettent de construire un axe polaire P et un axe équatorial, E. La forme du grain de pollen est définie par le rapport qui existe entre les dimensions des deux axes : le grain est dit sphéroïdal quand les deux axes sont égaux, prolé quand P' est > à E, oblé quand P' est < à E (Figure 13). (SAIDANI, 2011).

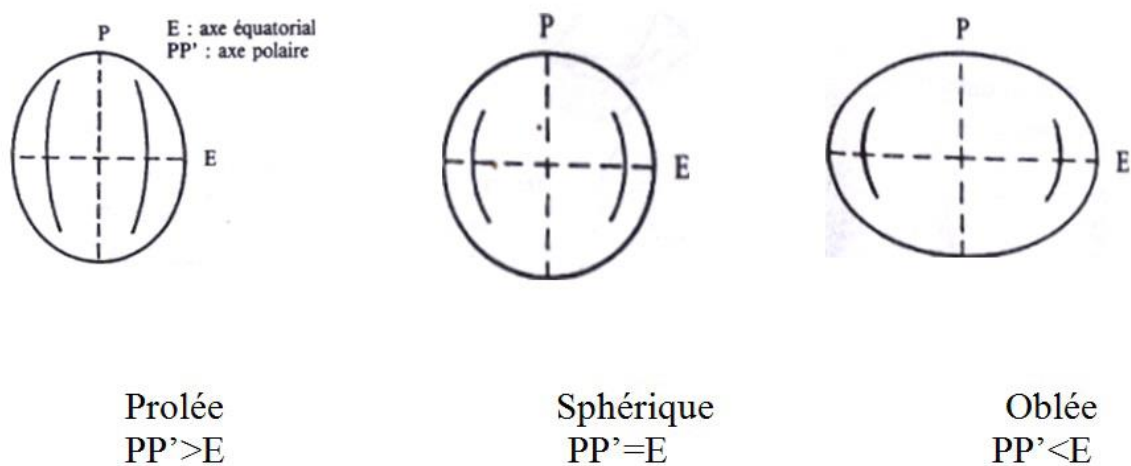


Figure13 : Les trois classes de forme des grains du pollen (RENAULT MISKOVSKY et PETZOLD 1989).

Chapitre II. Morphologie, fertilité et conservation

II.3.4. La taille :

La taille change d'une espèce à l'autre peut varier avec l'âge et les conditions de végétation de la plante, mais les rapports P/E restent pratiquement constants pour une même espèce et s'expriment toujours en microns (Pons, 1970). A l'exception de la taille des grains, tous les caractères étudiés (forme, relief tectal, stratification du sporoderme) montrent une grande homogénéité au sein du genre. De plus, la structure de l'exine liée à la souplesse exinique, à la minceur de l'endexine et au type apertural, permettrait d'expliquer les transformations réversibles de la forme des grains selon leur état d'hydratation. Parmi les petits grains de pollen, nous citons celui de *Mysotis* avec un diamètre de 5 μm . les plus gros pollens ont une taille variante entre 200 et 250 μm , se rencontrent chez les Gymnospermes et quelques Angiospermes. (CHIBANI, 2018 et NAAS, 2017).

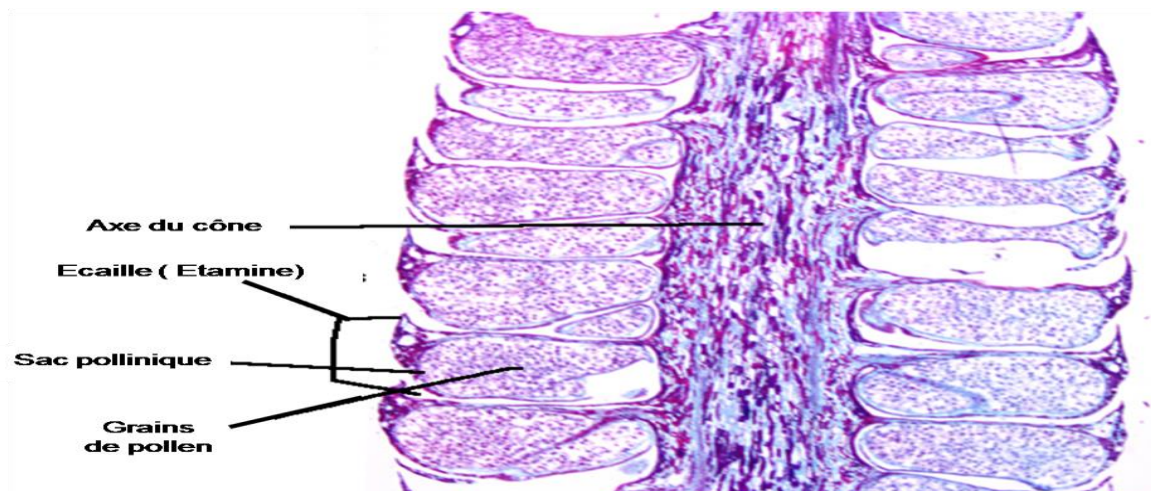
II.4. Pollen des conifères :

La plupart des Gymnospermes sont des Conifères, tels que les Sapins, les Pins, les Génévriers, les Cyprès, les Thuyas ... (FATHI, 2019).

Les gymnospermes produisent cinq types de pollen, dont le type bi-ailé et le type polyplicatue sont absolument caractéristiques, tous présentent une originalité et marquent bien la singularité de ce groupe végétal (KORMUTAK et al, 2008).

Notre espèce d'études est le pollen bi-ailé qui caractérise les conifères

.Le cône mâle est constitué d'un axe, portant des écailles disposées en spirale dont chacune d'elle porte à leur face inférieure deux sacs polliniques contenant le pollen (voir les figures 14-15-16 ci-dessous). (FATHI, 2019).



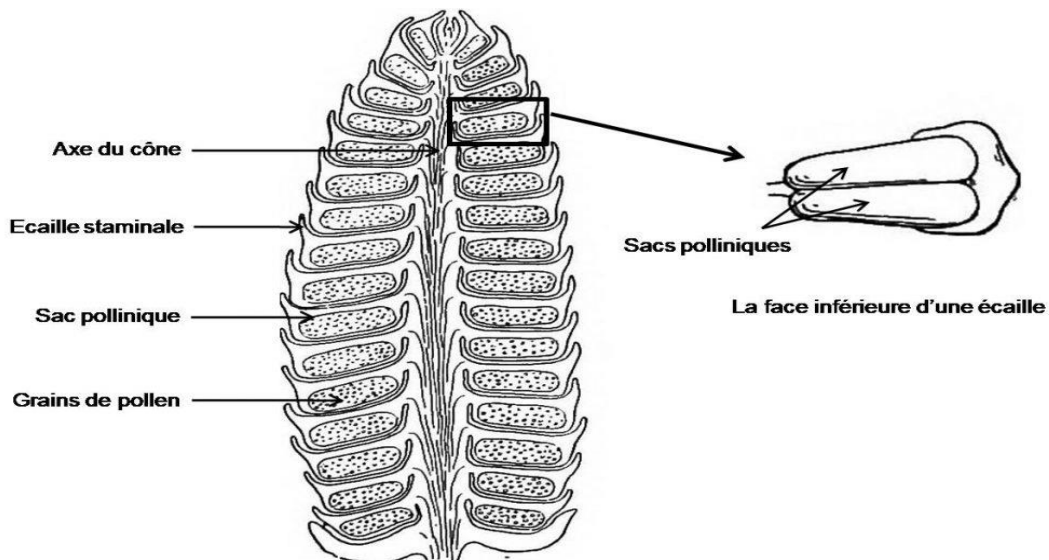


Figure14 : Coupe longitudinale d'un cône mâle de *Pinus halepensis* Mill. (FATHI, 2019)

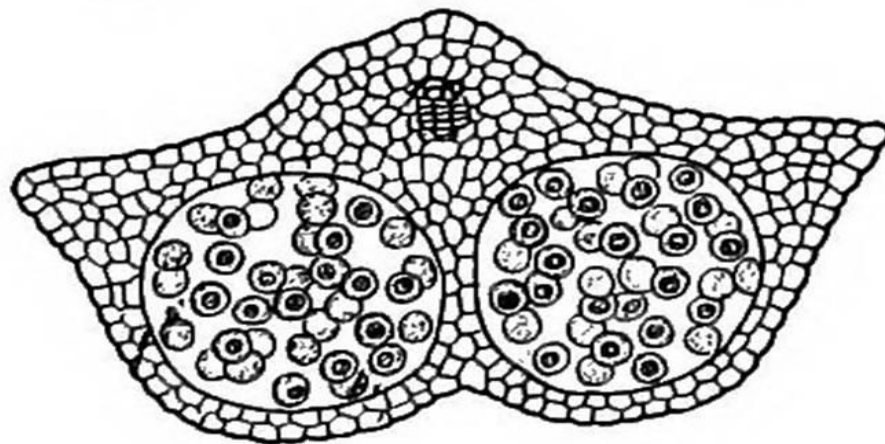


Figure15: Coupe transversale d'une écaille de *Pinus halepensis* Mill. (FATHI, 2019)

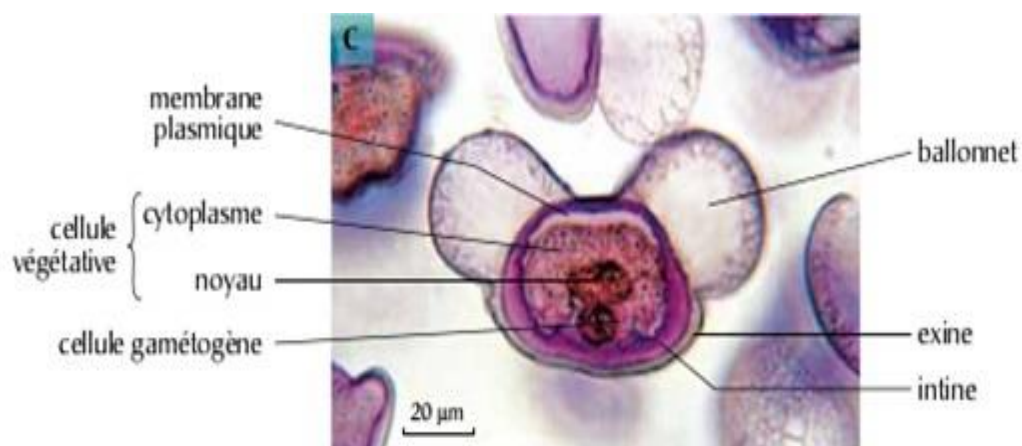


Figure 16 : Grain du Pollen de *Pinus halepensis* Mill. (NAAS, 2017)

II.5. Fertilité du pollen :

La viabilité ou la fertilité du pollen, c'est à dire sa capacité à germer une fois arrivé sur le stigmate, varie selon les conditions climatiques extérieures lors de la libération des grains. (JAROSZ, 2003). La fertilité est fortement affectée par la température et l'humidité, mais ces effets dépendent du groupe taxonomique (WALTER et *al*, 2001). L'évaluation de ce paramètre se fait en testant la capacité de germination du pollen, son activité métabolique (enzymatique) ou la présence du cytoplasme. (NAAS, 2017).

II.6. Conservation du pollen :

En 1975, le PNUE (Programme des Nations Unies pour l'environnement) et la FAO ont réalisé une étude pilote sur la méthodologie de conservation à long terme des ressources génétiques forestières dans un contexte global. Une étude du rôle réel potentiel des méthodes de conservation *ex situ* a été effectuée pour la cinquième session du Groupe FAO d'experts des ressources génétiques forestières, qui a eu lieu en 1981. A la Septième session du même groupe, en décembre 1989, celui-ci a recommandé que soient mises à jour les études antérieures relativement à la conservation *ex situ* de semences, de pollen et de cultures *in vitro* d'essences forestières, utilisée pour compléter les stratégies de conservation *in situ* (WANG, CHAREST et DOWNIE, 1994).

Les grains de pollen ont une durabilité physique remarquable et sont biochimiquement inertes. C'est l'un des matériels les plus résistants du monde organique à condition d'en bien maîtriser les conditions de conservation.

La conservation du pollen a donc essentiellement deux objectifs : Le premier est d'obtenir des collections de pollens très variés, notamment d'espèces menacées ou en voie d'extinction, de façon à conserver la variabilité génétique .Le second objectif concerne l'accumulation de « réserves » de pollen (COLAS et MERCIER, 2000).

II.6.1. Les différentes techniques de conservation :

II.6.1.1.La lyophilisation :

La lyophilisation, autrefois appelée cryodessiccation (dessiccation “des séchages” et cryo “froid”) (GRUGIER, 2013). La lyophilisation est une technique de séchage à froid, basée sur le principe de la sublimation, qui consiste à retirer l'eau, elle est utilisée pour la conservation de différents organes végétaux. (COLAS et MERCIER, 2000 et GRUGIER, 2013)

Chapitre II. Morphologie, fertilité et conservation

La lyophilisation comprend 3 phases successives :

1. la congélation qui est la solidification par le froid de la phase aqueuse des tissus (à -30 °C) ;
2. la sublimation qui est le passage de l'eau libre de l'état solide à l'état de vapeur ;
3. la désorption qui est l'élimination des molécules (BENARD, 1973).

II.6.1.2. Conservation dans des solvants organiques :

L'utilisation de solvants organiques pour conserver le pollen a été peu étudiée. Selon JAIN et SHIVANNA (1988), les solvants organiques confèrent des conditions de conservation anhydres et limitent la quantité d'oxygène disponible pour la cellule. Ces propriétés seraient adéquates pour que les solvants soient largement utilisés.

IWANAMI (1972) a conservé du pollen de différents taxons dans des solvants comme l'acétone, le benzène et le chloroforme.. (COLAS et MERCIER, 2000).

II.6.1.3. Conservation dans l'huile :

Les huiles sont des liquides qui ne se mélangent pas à l'eau. Cette particularité leur confère les mêmes propriétés que les solvants organiques. (COLAS et MERCIER, 2000).

II.6.2. Processus de conservation des pollens d'arbres résineux :

Le processus de conservation du pollen des arbres résineux est présenté sous forme d'organigramme dans la figure 17

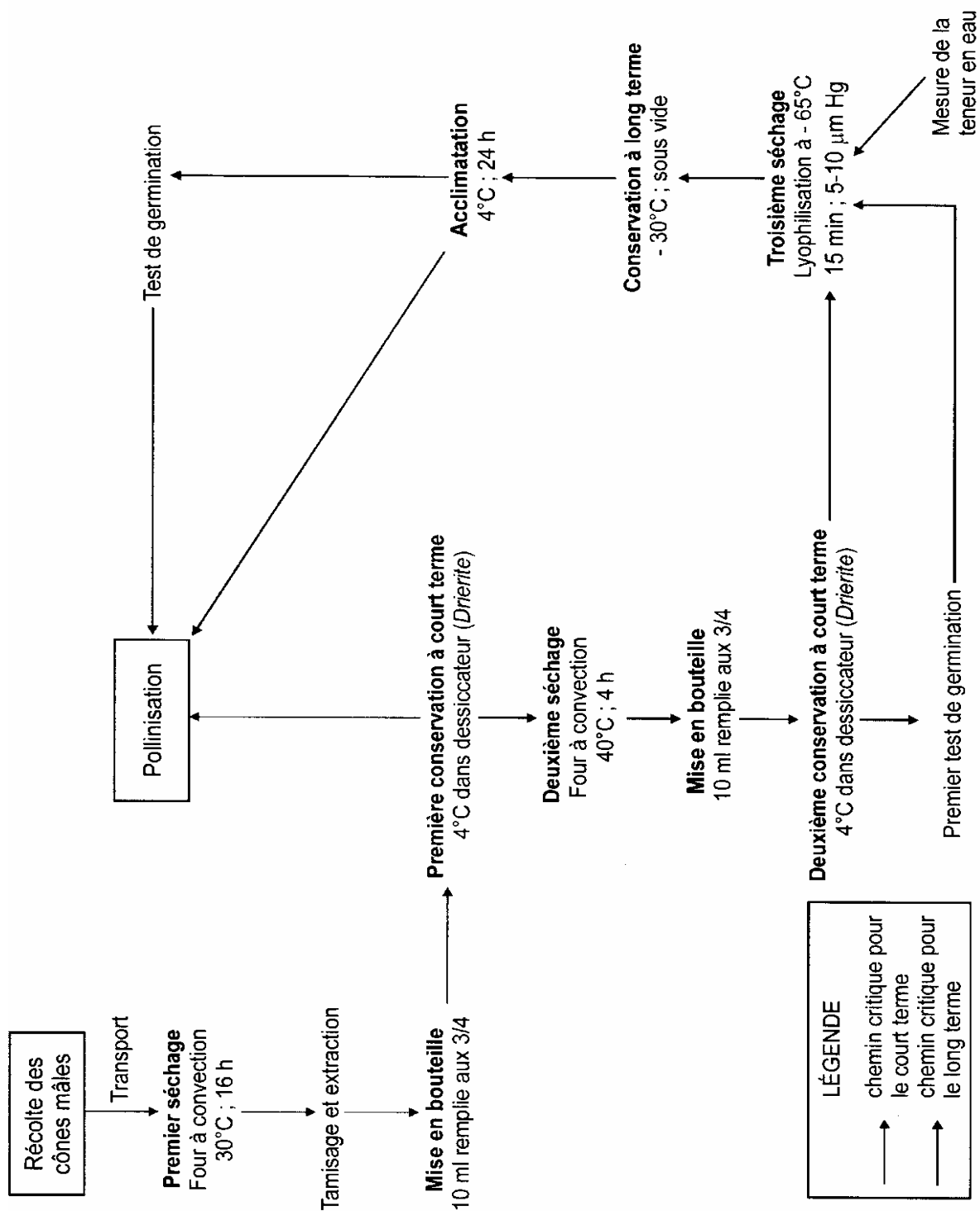


Figure17 : Processus de conservation à court et à long terme du pollen des arbres résineux (COLAS et MERCIER, 2000).

II.6.2.1. Récolte des cônes mâles :

C'est une opération qui consiste à cueillir les inflorescences mâles au moment de leur Maturité. On estime généralement que les spathes mâles sont bonnes à prélever lorsque, Comprimée entre les doigts, elles font entendre un crissement «bruit » caractéristique. (SAIDANI, 2012).

Les équipes de travail récoltent les fleurs mâles manuellement dans des sacs en papier kraft qui sont ensuite placés dans une glacière. Les lots sont expédiés la journée même à une salle d'extraction ou, si ce n'est pas possible, ils sont conservés dans des dessiccateurs contenant de la *Drierite* (agent dessiccant préalablement réactivé) à 4 °C et à l'obscurité jusqu'à leur expédition

Le lendemain.

II.6.2.2. Premier séchage :

Premier séchage (30 °C, la durée :16h) destiné à éliminer l'eau libre contenue dans les sacs polliniques de manière à les faire éclater et permettre ainsi la libération du pollen.

II.6.2.3. Tamisage :

Après ce premier séchage, les pollens sont extraits par brassage dans des tamis dont le diamètre des mailles varie de 45 à 106 μ m selon les espèces. De manière générale, les inflorescences mâles sont seulement brassées à l'intérieur des tamis, ce qui est suffisant pour en extraire le pollen.

II.6.2.4. Conservation à court terme :

Qui correspond à une durée de quelques semaine (les arbres résineux durent environ un mois); Après l'extraction, les échantillons sont répartis dans des flacons de type pénicilline de 10 ml remplis aux trois quarts.

II.6.2.5. Seconde séchage :

Les pollens destinés à la conservation à long terme subissent un second séchage servant à éliminer l'eau libre contenue dans les grains.

Le traitement consiste en un séchage à 40 °C durant 4 heures dans un four ventilé.

II.6.2.6. Test de germination et test de viabilité :

Il est nécessaire de déterminer la viabilité du pollen avant sa conservation. Après le second séchage, une très faible quantité de pollen est prélevée (environ 0,05 cm³), pour être destinée aux tests de germination ou aux tests de viabilité selon le cas (bien détailler dans le chapitre 3).

Chapitre II. Morphologie, fertilité et conservation

II.6.2.7. Mesure de la teneur en eau :

La mesure de la teneur en eau par différence entre la masse fraîche et la masse sèche (selon la formule sous dessous) fournit des résultats très reproductibles lorsque le pollen est séché à l'aide d'une lampe à infrarouges. Cette technique consiste en un séchage complet du pollen sans toutefois éliminer l'eau de constitution : des parois et des molécules.

$$TE = \frac{\text{(masse humide- masse sèche)}}{\text{masse humide}} \times 100$$

II.6.2.8. Lyophilisation et conservation à long terme :

Cette lyophilisation correspond à un troisième et dernier séchage du pollen. Les échantillons sont trempés aux trois quarts durant environ une minute dans l'azote liquide (-196 °C).

Par la suite, la lyophilisation a lieu à -65 °C durant 15 minutes à partir du moment où la pression contenue dans le lyophilisateur a atteint un vide équivalent à 5 ou 10 mm de Hg. Les échantillons sont par la suite fichés sur ordinateur et conservés dans une chambre froide maintenue à -30 °C.

Ces conditions de conservation sont établies afin de maintenir la viabilité du pollen durant une période supérieure à un an.

II.6.2.9. Prélèvement du pollen :

Le prélèvement des échantillons se fait en procédant à une acclimatation des lots. Ceux-ci sont déposés dans un dessiccateur placé à son tour dans un réfrigérateur maintenu à 4 °C durant 24 heures. (COLAS et MERCIER, 2000).

Le Table 01 présent des exemples sur les conditions optimales de conservation du pollen de notre espèce d'étude le Pin.

Chapitre II. Morphologie, fertilité et conservation

Tableau 01: Conditions optimales de conservation du pollen de quelques espèces du genre *Pinus* (AGASHE, 2009 in NAAS, 2017)

Espèce	Température de stockage (°C)	Humidité relative (HR)	Durée de stockage	Référence
<i>Pinus nigra</i>	5	0 (vacum)	2,5 ans	Jensen, 1964
<i>P. strobes</i>	18	25	14 mois	Duffield et Snow, 1941
<i>P. resinosa</i>	0-4	25-50	14 mois	Duffield et Snow, 1941
<i>P. sylvestris</i>	2	25-75	1 ans	Johnson, 1943
<i>P. banksiana</i>	2	25-75	1 ans	Johnson, 1943

Chapitre III :
Germination in vitro des
grains du pollen du Pin
d'Alep

Chapitre III. Germination in vitro des grains du pollen du Pin d'Alep

III.1. La culture in vitro :

III.1.1. Définition :

La culture *in vitro* est une technique utilisée au laboratoire qui consiste à cultiver un fragment de plante appelé « explant » sur un milieu synthétique, dans un espace réduit et dans des conditions stériles. Les paramètres de développement de l'explant sont contrôlés tels que la température, l'humidité relative ainsi que l'éclairement (photopériode) (RAFAMANTANANA, 2004). Nous pouvons retenir qu'il s'agit globalement d'une méthode de culture des plantes en conditions aseptiques, c'est à dire sans champignon et sans bactérie, utilisant des milieux de culture assez complexes (hormones, sucres, vitamines, acides aminés, sels minéraux) qui peuvent être liquides, gélifiés, voire même solides avec l'emploi de la vermiculite (LACHACHI, 2010).

Son principe repose sur la totipotence cellulaire végétale, une caractéristique propre aux végétaux. Certaines cellules végétales différenciées peuvent revenir à un stade indifférencié. Elles ont alors les mêmes qualités que les cellules embryonnaires et peuvent régénérer dans les conditions adéquates, une nouvelle Plante identique à la plante mère. (MANUELLE, 2020).

III.1.2. Historique :

Sont retracées ci-dessous les grandes étapes de l'histoire des cultures *in vitro* végétales dans le monde.

- 1902, Haberlandt, chercheur allemand, énonce le concept de la totipotence cellulaire végétale. Il réussit à faire survivre *in vitro*, quelques mois, de petits amas cellulaires (poils staminaux ou glanduleux ou des fragments d'épiderme) mais sans multiplication ;
- 1912, Carrel réussissait la culture indéfinie de cellules de cœur d'embryon de poulet par repiquages successifs ;
- 1922, Aux Etats-Unis, Robbins et en Allemagne : Kott, obtiennent la croissance de pointes de racines pendant quelques mois seulement ;
- 1932, White (U.S.A.), réussit une culture de racines de tomates ;
- 1934, Gautheret, en France, cultive et multiplie des cellules cambiales de saule en introduisant des auxines dans le milieu ;

Chapitre III. Germination in vitro des grains du pollen du Pin d'Alep

- 1936, Orsos en Hongrie induit des cals et des organes à partir de tissus de tubercule de chou-navet. F.G. Gustafson obtient avec un grand succès les premiers fruits parthénocarpiques, (tomate, raisin, figue), par application d'auxine sur des ovaires non fécondés ;
- 1939, Gautheret réussit des cultures indéfinies de tissus de carotte ;
- 1941, BRAUN en étudiant les tumeurs végétales ou crown-gall, a amorcé les travaux qui ont conduit aux premières manipulations génétiques végétales ;
- 1944, Buvat par les techniques de culture de tissus met en évidence le phénomène de dédifférenciation: la rejuvénation ;
- 1946, Ball aux Etats-Unis obtient la régénération de plants de lupin et de capucine à partir d'apex ;
- 1949, Limasset et Cornuet notent l'absence de virus dans les méristèmes de tabacs virosés.
- 1952, Mettant à profit les travaux précédents, Morel et Martin à l'I.N.R.A. de Versailles, régénèrent des plantes entières saines de Dahlia, variété «le Rêve» indemne de virus à partir de culture de méristèmes de plants infectés par trois virus différents. De la même manière ils sauveront la variété de pomme de terre "la Belle de Fontenay" en 1954 ;
- 1954, Muir obtient les premières cultures de cellules isolées à partir de cals friables, cultivées en milieu liquide agité ;
- 1957, Skoog et Muller régénèrent des racines et des tiges à partir de cals sous l'influence de l'auxine et de cytokinine ;
- 1958, Stewart et Reinert obtiennent des embryons somatiques de carottes à partir de culture de racines et mettent ainsi en évidence le principe de totipotence cellulaire énoncé par Haberlandt en 1902 ;
- 1962, Murashige et Skoog mettent au point pour des cultures de tissus de tabac le fameux milieu de culture M.S. utilisé largement en culture *in vitro* ;
- 1964, Guha et Maheshwari, en Inde, obtiennent des plantes haploïdes de *Datura innoxia* Mill. à partir de culture d'anthères ;
- 1971, Au Japon, Takebe régénère des plantes entières de *Nicotiana tabacum* à partir de protoplastes ;
- 1972, Carlson obtient le premier hybride somatique interspécifique par fusion de protoplastes entre différentes espèces de tabac ;
- 1975, Pandey utilise du pollen irradié de tabac pour réaliser des croisements interspécifiques ;
- 1976, San Noeumdans (l'équipe du Pr. Demarly à Orsay) réussit la première culture d'ovaires d'orge non fécondés. Cette même année, Seibert réussit à initier des pousses d'œillets à partir

Chapitre III. Germination in vitro des grains du pollen du Pin d'Alep

d'apex conservés à -196°C. C'est le début de la cryoconservation pouvant être utilisée pour la constitution de banques de gènes ;

- 1983, Van Montaigne crée en Belgique les premières plantes transgéniques transformées par *Agrobacterium tumefaciens*. (TABTI, 2010 et LACHACHI, 2010).

Depuis le début du XX^{ème} siècle avec les travaux d'Haberlandt, de nombreux chercheurs ont œuvré et continuent à travailler au sein de leur laboratoire afin d'améliorer les techniques mises au point par les pionniers dans les différentes techniques de cultures *in vitro*. L'objectif étant d'utiliser ces outils

Sur le plus grand nombre d'espèces possibles et avec le meilleur rendement, à des fins d'amélioration des plantes au service de l'homme et de son environnement. (TABTI, 2010).

III.2. Définition de la germination in vitro du pollen :

La germination du pollen in vitro est une méthode fiable pour tester la viabilité du pollen. De nombreux milieux de germination du pollen allant des sucres simples au complexe contenant des vitamines, des régulateurs de croissance, etc. en plus de divers minéraux ont été standardisés pour faire germer le pollen artificiellement. (JAYAPRAKASH, 2017).

III.3. Les conditions de germination in vitro :

Le succès de la germination in vitro dépend de certains facteurs dont :

- * le prétraitement du pollen (pré-humidification ou réhydratation), dans certains cas de pollens conservés ou lyophilisés ;
- * la technique et la densité d'ensemencement ;
- * la température d'incubation ;
- * la constitution du milieu de culture (BOUNAB, 2019).

III.4. Le test de viabilité du pollen et pouvoir germinatif :

Le pouvoir germinatif est une mesure de la fertilité masculine. Le pollen viable est responsable du rendement élevé des cultures. Dans le programme d'hybridation, la fertilité et la viabilité du pollen ont une importance primordiale (GOKUL, 2016).

La qualité du pollen doit être contrôlée à chaque étape du programme de fécondation : hydratation, germination, pénétration et croissance du tube pollinique dans le pistil puis fusion des gamètes. Les tests couramment utilisés pour évaluer la qualité permettent de déterminer l'aptitude du grain de pollen à réaliser une ou plusieurs séquences de ce programme de fécondation. (DIGONNET-KERHOAS et GAY, 1990).

Chapitre III. Germination in vitro des grains du pollen du Pin d'Alep

Il existe des mesures directes et indirectes de la viabilité du pollen. Les tests directs consistent à déposer le pollen sur des stigmates réceptifs et à déterminer si des graines sont produites. Un tel test a l'avantage de fournir une mesure sans équivoque pour la population de grains de pollen déposés sur le stigmate, mais il présente plusieurs inconvénients, tels qu'un temps, une main-d'œuvre et un plus grand nombre d'échantillons frais. La germination du pollen peut également être évaluée in vitro. Les méthodes indirectes reposent sur la corrélation entre la capacité à féconder un ovule et certaines caractéristiques physiologiques ou physiques qui peuvent être déterminées plus rapidement (GOKUL, 2016).

Trois types des tests indirects nous permettent d'estimer cette viabilité, à savoir:

- ▶ Les tests de coloration vitale ;
- ▶ Le test de germination "*in vitro*" ;
- ▶ Le test de germination "*in vivo*" (BOOT et MARIANI, 2005 et GOKUL, 2016 et DIGONNET-KERHOAS et GAY, 1990).

III.4.1. Le test de coloration vitale :

Ils éprouvent les fonctions vitales du pollen sans l'entremise du gynécée. On distingue :

* **Les colorants cytoplasmiques**, spécifiques à un organite ou à une substance présente dans la cellule végétative ;

***Les colorants enzymatiques** qui font appel à une réaction enzymatique etc... (BOUNAB, 2019).

III.4.2. Le test de germination "*in vitro*" :

Ce test permet d'évaluer aptitude intrinsèque des grains de pollen à germer en dehors de toutes interactions pollen-stigmate (BOUNAB, 2019). Selon BOTS et MARIANI, 2005 C'est un protocole plus précis et plus simple pour la plupart des espèces

III.4.2.1. Acclimatation :

La germination du pollen sec est influencée par les variations de température auxquelles il est soumis avant le test de viabilité ou avant une pollinisation. Des chocs thermiques où l'écart de température est supérieur à 20 °C réduisent la capacité de germination. Une exposition du pollen sec à la température de germination durant 24 heures avant la réalisation des tests peut augmenter jusqu'à 10 % sa capacité de germination.

Chapitre III. Germination in vitro des grains du pollen du Pin d'Alep

III.4.2.2. Réhydratation :

Le pollen doit également être réhydraté avant la réalisation des tests de germination. Lors de la déshydratation avant la conservation, le pollen augmente son aptitude à absorber très rapidement une grande quantité d'eau. Cette absorption se produit normalement au début de la germination. On peut réaliser un prétraitement du pollen en atmosphère saturée à 25 °C, ce qui assure une première phase de réhydratation lente au cours de laquelle le métabolisme se réactive et les membranes retrouvent leur perméabilité. Durant cette phase, la teneur en eau s'élève progressivement pour atteindre, au bout de quelques heures, une valeur voisine de celle d'un pollen au moment de sa dissémination dans les conditions naturelles. L'introduction de cette phase de réhydratation permet à certains lots conservés de retrouver un pourcentage élevé de germination. Toutefois, la réhydratation n'est nécessaire que lorsque la teneur en eau est inférieure à 10 %. Ainsi, il n'est pas essentiel de réhydrater le pollen frais qui n'a pas été séché (COLAS et MERCIER, 2000).

III.4.2.3. Le milieu de culture :

D'autre part, le milieu de culture doit comprendre en général:

- * un sucre, le plus souvent le saccharose qui joue le rôle de substrat respiratoire et d'agent osmotique ;
- * de l'acide borique, d'après Vasil (1958), il mobilise les tissus de réserve et augmente le taux d'ATP (BOUNAB, 2019) ;
- * des ions minéraux dont le plus important l'ion calcium joue un rôle dans la rigidité, la perméabilité et la sélectivité de la paroi pollinique; D'autres ions (potassium K^+ , magnésium Mg^{++} et sodium Na^+) jouent un rôle de support dans l'absorption ou la fixation du calcium sur la paroi du tube pollinique (BREWBAKER ET KWACK, 1963) ;
- * un pH défini, 5.9 dans le cas du pollen de Pin d'Alep (*Pinus halepensis* Mill.) (NAAS, 2017).

Ce qui concerne la température et les conditions d'incubation, l'analyse bibliographique montre que la très grande majorité des tests de germination se fait à 25°C (COLAS et MERCIER, 2000). Mais dans notre espèce d'étude le Pin d'Alep (*Pinus halepensis* Mill.) la température optimale d'incubation se fait à 27°C (NAAS, 2017).

Enfin Toutes les espèces ne germent pas facilement, le milieu de germination optimal peut différer d'une espèce à l'autre. Les taux de germination in vitro peuvent être inférieurs à ceux du stigmate (germination *in vivo*). Pas toujours une bonne corrélation avec la germination,

Chapitre III. Germination in vitro des grains du pollen du Pin d'Alep

mais généralement plus fiable que les colorations vitales (BOTS et MARIANI, 2005).

III.5. Facteurs affectant la viabilité du pollen pendant le stockage :

Les données accumulées ont indiqué que la viabilité du pollen était influencée par l'humidité relative avant la germination, car elle affecte probablement le potentiel de soluté interne et les propriétés de la paroi du grain de pollen et elle a un effet subséquent sur la germination du pollen (GOKUL, 2016) ; d'autre part la température, la composition atmosphérique et la pression d'oxygène ont un effet remarquable.

Les tendances générales, énumérées dans la table 2, comprenaient l'observation que le pollen de la plupart des espèces restait viable plus longtemps lorsqu'il était stocké à une faible humidité relative, une exception notable étant le pollen de graminées (BOTS et MARIANI, 2005).

Tableau 02 : Facteurs affectant la viabilité du pollen pendant le stockage (STANLY et LINSKENS, 1974 in BOTS et MARIANI, 2005)

Facteur	Effet
Humidité relative	Une faible humidité pendant le stockage du pollen a généralement un effet positif sur la viabilité du pollen.
Température	Le stockage à basse température a généralement un effet positif sur la viabilité du pollen.
Composition de l'atmosphère	L'augmentation du CO a un effet positif sur la viabilité du pollen après stockage
Pression d'oxygène	La diminution de l'oxygène pendant le stockage a un effet positif sur la viabilité du pollen.

III.6. La germination in vitro des grains du pollen du Pin d'Alep :

Dans ce chapitre, nous allons présenter quelques travaux importants pour notre thématique :

Le travail effectué par COLAS et MERCIER (1994 et 2000) sur l'évaluation et le maintien de la viabilité des pollens utilisés dans le programme d'amélioration des arbres en prenant en considération le test de germination et le test de viabilité du pollen de *Pinus halepensis* Mill. et l'établissement d'une gamme de viabilité du pollen de Pin gris

En suite pour mieux détailler dans cette partie, nous allons présenter le travail de recherche de NAAS (2017), qui est basé sur la germination des grains du pollen du Pin d'Alep (*Pinus halepensis* Mill.).

Deux autres études ont été choisies, celle de KORMUTAK et VOOKOVA et *al.* (2008) : Qui ont étudié la viabilité du pollen des populations hybrides de Pin sylvestre (*Pinus sylvestris* L.) et Pin suisse (*P. mugo Turra*).

Chapitre III. Germination in vitro des grains du pollen du Pin d'Alep

L'autre étude est celle de LAZZARO (1999) qui a travaillé sur l'organisation des microtubules du pollen germé des conifères (*Picea abies*).

III.6.1. Méthodes de préparation du pollen des différents auteurs su-cités :

Selon les références consultées pour cette partie un ensemble des étapes a été suivi pour la préparation du pollen aux expériences, voir le tableau ci-dessous

Tableau 03 : préparation du pollen pour les expériences

Espèce	La date	La région	Mode d'extraction	La référence
*Epinette de Norvège *Epinette Noir *Epinette Rouge *Mélèze sp. Pin gris	-	-	1. Déposer les cônes mâles secs dans un tamis ; 2. Secouer les cônes de façon à faire sortir tout le pollen (sans écraser) ; 3. - Répartir le pollen extrait dans des bouteilles en verre de type pénicilline de 10 ml remplies aux trois quarts (7 ml) ; 4. Fermer avec un bouchon de caoutchouc qui sera percé par une aiguille de seringue de façon à permettre le dégagement des gaz émis lors de la conservation. Les aiguilles seront retirées après 7 jours ; 5. Identifier les bouteilles pour les faire correspondre aux données contenues ; 6. Placer les bouteilles dans un dessiccateur contenant de la <i>Drierite</i> . Appliquer le vide et mettre au réfrigérateur ; 7. Nettoyer soigneusement la surface de travail ainsi que les tamis et les outils utilisés après chaque extraction.	COLAS et MERCIER, (2000)
<i>Pinus halepensis</i> Mill.	Le mois d'Avril 2014	*Djelfa ; ville et forêt de Senlba *Alger: ville de Benaknoun et forêt de Bouchaoui	1. Un séchage préalable a température du laboratoire a été appliqué sur les cônes collectés de 2 a 4 jours ; 2. un brassage de ces cônes avait eu lieu dans un tamis de diamètre de 90 µm ; 3. le pollen a subi une déshydratation pendant 4h à l'étuve à 37°C puis a été	NAAS, (2017)

Chapitre III. Germination in vitro des grains du pollen du Pin d'Alep

			conservé au froid à 4 °C ; 4. Conservation du pollen dans les meilleures conditions. * L'opération d'extraction a été effectuée selon : -Des conditions de températures (25-30 °C) ; -Humidité relative (40%).	
Pin suisse <i>Pinus mugo</i> <i>Turra</i>	Au printemps 2007.	à Habovka et Suchá Hora dans la partie occidentale des Hautes Tatras	Les microstrobiles matures de chaque arbre ont été récoltés peu de temps avant l'excrétion du pollen. Le pollen a été extrait des microstrobiles desséchés par tamisage. En suite il a été stocké dans un dessiccateur sur gel de silice à 4°C pendant une période de 3 semaines et ensuite utilisé dans le test de germination.	KORMUTAK et VOOKOVA et al (2008)
<i>Picea abies</i> (L.)	-	un verger à graines à 10 km de Stockholm, en Suède	Les cônes mâles ont été collectés et conservés au laboratoire à 20 °C pendant 10 jours tandis que les écailles s'ouvraient pour répandre le pollen, qui était ensuite stocké à -20 °C.	LAZZARO, (1999).
Le Pin gris (<i>Pinus banksiana</i>)	Le 17 mai 1993	Dans un parc à clones situé à L'arboretum de Lotbinière	Après un séchage des fleurs de 16 heures à 25 °C dans un four à convection, le pollen a été extrait, séché à 40 °C durant 4 heures, puis réparti dans des flacons en verre de 10mL.	COLAS et MERCIER, (1994)

III.6.2. Milieux de culture :

Les tableaux 4-5-6-7-8 montrant les milieux de culture nécessaires à la germination *in vitro* du pollen de chaque espèce de conifère utilisée. Il importe que toutes les opérations soient réalisées dans des conditions strictes de stérilité afin d'éviter les risques de

Chapitre III. Germination in vitro des grains du pollen du Pin d'Alep

contamination des champignons.

Tableau 04 : description du milieu de culture nécessaire à la germination in vitro du pollen utilisé pour chaque espèce de conifère (COLAS et Mercier, 2000)

Espèces	Concentrations (mM.)						pH	Agar %	Jours de culture à 25 C° et à l'obscurité
	H ₃ BO ₃	Ca(NO ₃) ₂ · 4H ₂ O	KNO ₃	MgSO ₄ · H ₂ O	Saccharose				
Epinette de Norvège	8.09	1.27	1.0	1.45	292.14	5.3	0.6	2	
Epinette Noir	8.09	1.27	1.0	1.45	146.07	5.3	0.6	2	
Epinette Rouge	8.09	1.27	1.0	1.45	146.07	5.3	0.6	2	
Mélèze sp	8.09	1.27	1.0	1.45	0	5.3	0.6	2	
Pin gris	8.09	1.27	1.0	1.45	146.07	5.3	0.6	3	

Tableau 05 : description du milieu de culture nécessaire à la germination in vitro du pollen du Pin d'Alep (*Pinus halepensis* Mill.) (NAAS, 2017)

Espèces	milieux	Saccharose (g)	PEG (g)	H ₃ BO ₃ ml	Ca(NO ₃) ₂ Ml	pH	Température C°	Jours de la culture a l'obscurité
<i>Pinus halepensis</i> Mill.	M1	05 g	-	10 ml	10 ml	6.10	27 c°	1 j (24 h)
	M2	-	10 g	05 ml	05 ml	5.99	27 c°	1 j (24 h)

Tableau 06 : description du milieu de culture nécessaire à la germination in vitro du pollen du Pin sylvestre (*Pinus sylvestris* L.) et Pin suisse (*Pinus mugo* Turra) (KORMUTAK et VOOKOVA et al. 2008)

Espèces	Saccharose %	Agar %	Température C°	Jours de la culture
Pin suisse (<i>Pinus mugo</i> Turra)	3	1.5	25	2j (48h)
	5			
	10			
	13			
	15			

Chapitre III. Germination in vitro des grains du pollen du Pin d'Alep

Tableau 07: description du milieu de culture nécessaire à la germination in vitro du pollen de *Picea abies* (L.) (LAZZARO ,1999).

Espèce	Saccharose %	H3BO3 m.mol/L	Agar %	CaCl ₂ m.mol/L	Température C°	Jours de la culture
<i>Picea abies</i> (L.)	10	1	1	1	30 c°	1 j (24 h)

Tableau 08: description du milieu de culture nécessaire à la germination in vitro du pollen de Le Pin gris (*Pinus banksiana*) (COLAS et MERCIER, 1994)

Espèce	Saccharose %	Agar %	pH	Température C°	Jours de la culture à l'obscurité
Le Pin gris (<i>Pinus banksiana</i>)	5	1	5.3	25 c°	3 j

NB : La viabilité du pollen de Pin gris a été testé avec un traitement de température à : 60°C, 65°C et 73°C.

III.6.3. Resultats :

- Selon COLAS et MERCIER, (1994 et 2000) Le pH du milieu de culture doit idéalement se situer entre 5,5 et 6,25 ; Un grain est considéré germé lorsque la longueur du tube pollinique est supérieure à deux fois le diamètre du grain ; Le taux de germination a été estimé selon le rapport suivant :

$$G(\%) = \frac{\text{Nombre de grains germés}}{\text{Nombre total des grains}} \times 100$$

La taille de l'échantillon à dénombrer est en corrélation avec le pourcentage de germination déterminé ; STANLEY et LINSKENS (1974) ont fourni une table (Table 9) qui donne la taille minimale de l'échantillon à observer pour avoir un résultat statistiquement significatif au seuil de 5 % ; Les échantillons présentant un pourcentage de germination inférieur à 20 % sont généralement éliminés;

Chapitre III. Germination in vitro des grains du pollen du Pin d'Alep

Tableau 09 : STANLEY et LINSKENS (1974) indiquant la taille de l'échantillon à dénombrer pour obtenir un pourcentage de germination du pollen qui soit statistiquement valable au seuil de 5% (COLAS ET MERCIER, 2000).

Pourcentage de germination (%)	Nombre de grains à compter
1 ou 99	15
5 ou 95	73
10 ou 90	138
15 ou 85	196
20 ou 80	246
25 ou 75	288
30 ou 70	323
35 ou 65	350
40 ou 60	369
45 ou 55	380
50	384

- Selon NAAS (2017) et pour la mise au point de la durée de réhydratation et d'incubation idéale, pour obtenir un taux de germination de pollen important (64%); la réhydratation pendant 16heures et l'incubation pendant 24heures (sur un milieu constitué de : 10% saccharose + 200 mg/L H_3BO_3 + 200 mg/L $Ca(NO_3)_2$ et pH =6,10) ont été retenues.
- KORMUTAK et VOOKOVA et *al.* (2008) ont testé dans leur travail l'effet de concentration du saccharose dans les milieux de culture.
Parmi les cinq concentrations testées, la teneur en saccharose de 15 % est la plus faible pour la germination in vitro du pollen de *Pinus mugo* 71%, et la concentration de 13% a donné un taux de germination de 82.16%, en suite les deux concentrations 5 et 3% ont Presque la même valeur de 84%. La teneur en saccharose de 10 % s'est avérée optimale pour la germination in vitro du pollen de *Pinus mugo* avec le taux de germination de 92% (voir figure 18);
- Après 24h en chambre humide, 95% des grains de pollen de *Picea abies* (L.) Avaient germé, avec des tubes polliniques de 200 mm de long. (LAZZARO ,1999)

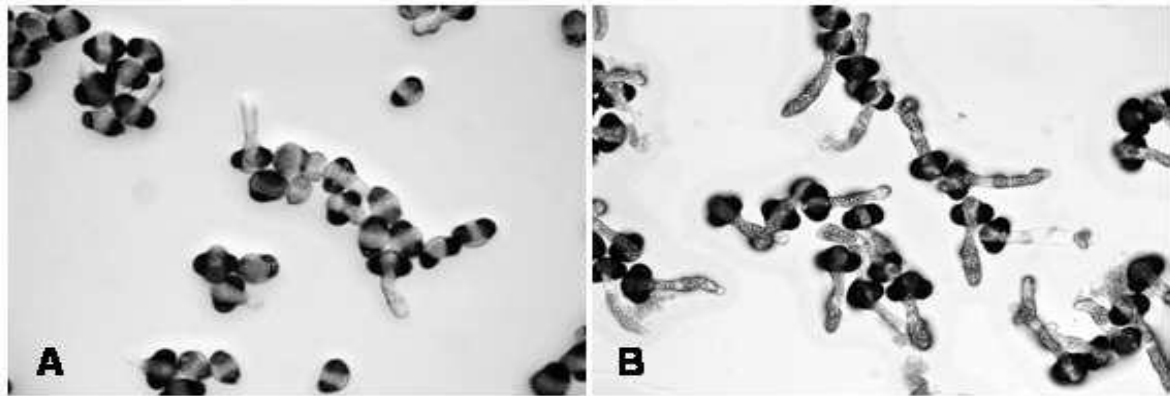


Figure 18 : Pollen en germination d'un essaim hybride à Suchá Hora (A) et *P. mugo* à Roháče (B) (KORMUTAK et VOOKOVA *et al.* 2008).

- Enfin le travail réalisé par COLAS et MERCIER, (1994) sur l'effet des températures d'incubation sur le taux de germination a permis d'obtenir les résultats suivants :

- Traitement a 60 °C:

Au cours de la première heure de traitement, le taux de germination passe, en moyenne, de 69,8 à 22,6 %. Par la suite, il devient à 5,8%. Au bout de 30 minutes, le taux de germination mesuré est supérieur à celui observé au prélèvement précédent (20 minutes). Une telle augmentation est aussi observée à 90 et 180 minutes ;

- Traitement a 65 °C :

La chute du taux de germination est très forte durant les soixante premières minutes. Le taux de germination passe en moyenne de 58,9 à 19,8%. Entre 90 et 150 minutes, il devient à 15 .et puis ils ont observés une augmentation du taux de germination à 50 minutes ;

-Traitement a 73 °C :

Les dix premières minutes d'exposition entraînent une très forte réduction du taux de germination, qui passe, en moyenne, de 78,6 à 9,2 %. Au bout de 150 minutes, le taux de germination est nul ;

Les trois traitements appliqués entraînent une réduction significative du taux de germination du pollen. Celle ci est plus ou moins rapide selon la température.

Chapitre III. Germination in vitro des grains du pollen du Pin d'Alep

La valeur du taux de germination initial n'est pas très importante mais ils devraient tous être déjà supérieurs à 60% Le but de cette étude est d'identifier les conditions dans lesquelles une diminution progressive de la viabilité peut être observée.

Conclusion générale

Conclusion générale

Au terme de ce travail, nous rappelons que l'intérêt pivot de notre recherche est l'étude de la germination *in vitro* des grains du pollen de *Pinus halepensis* Mill. Et vu les conditions de la pandémie COVID 19 et la difficulté de travailler au laboratoire l'ensemble des manipulations a été suspendu ; néanmoins différentes études menées sur la germination *in vitro* du pollen ont été l'objet d'une analyse afin de détailler notre thème.

Ces études menées sur la germination *in vitro* du pollen, ont montrés qu'une multitude de paramètres et conditions (Déshydratation ; Réhydratation ; acclimatation) pourrait être à l'origine de la variabilité du comportement des grains de pollen de *Pinus halepensis* Mill. durant les différentes étapes de préparation pour ce type d'analyse.

Le travail de COLAS et MERCIER (2000) sur 5 espèces de conifères; consiste a ce que le pollen passe par des étapes avant de s'étendre à l'intérieur du milieu de culture qui est riche en $H_3BO_3 = 8.09$ (mM), $Ca(NO_3)_2 = 1.27$ (mM), $KNO_3 = 1.0$ (mM), $MgSO_4 = 1.45$ (mM), en Ph = 5.3 pour toutes les espèces qui va étudier avec la concentration de 10 % d'agar et de différentes concentrations de saccharose.

La taille de l'échantillon à dénombrer est fonction du pourcentage de germination déterminé et le grain du pollen est considéré germé lorsque la longueur du tube pollinique est supérieure à deux fois le diamètre du grain primaire (COLAS et MERCIER, 2000).

D'autre part NAAS (2017), et dans son travail le pollen qu'elle a extrait est passé par plusieurs étapes : séchage et extraction ; conservation (congélation et lyophilisation) jusqu'à la mise en culture.

Le test de germination *in Vitro* a été réalisé sur 2 milieux de différentes concentrations :

- Le milieu 1 du : 10% saccharose + 200 mg/L H_3BO_3 + 200 mg/L $Ca(NO_3)_2$ et pH =6,10 ;
- le milieu 2 du: 2g de PEG 4000 (Serva) + 100mg/100ml H_3BO_3 + 300mg/100ml $CaCl_2$ et pH=5,9

Les résultats ont confirmé que la durée de réhydratation et d'incubation idéale, pour obtenir un taux de germination du pollen important est celui de :

La réhydratation pendant 16heures et l'incubation pendant 24heures.

Conclusion générale

L'analyse statistique des résultats du travail de KORMUTAK et VOOKOVA et *al.* (2008) sur la germination faite dans des conditions de $T^{\circ} = 25^{\circ}\text{C}$, sur un milieu constitué de 1,5 % d'agar et de 10 % de saccharose et durée de germination 48 h, indique qu'il existe une relation entre la teneur en saccharose et la germination in vitro du pollen du *P. mugo* ainsi la longueur des tubes polliniques après germination.

LAZZARO (1999) aussi a fait une étude de germination du pollen des cônes mâles de *Picea abies* (L.) sur un milieu de 1 % d'agar et 10 % de saccharose, 1 mmol/L de chlorure de calcium et 1 mmol/L d'acide borique. Les résultats estiment que la majorité des graines de pollen germé avec élongation des tubes polliniques.

Selon COLAS et MERCIER (1994), le traitement avec les températures : 60°C , 65°C et 73°C a été testé.

Les intervalles de temps entre chaque prélèvement ont varié au cours de l'expérience. Cette étude est l'étape préliminaire a la mise au point de tests rapides permettant une évaluation quasi instantanée de la viabilité du pollen. Le pollen de Pin gris traité durant sept heures à 65°C présente une réduction progressive de la viabilité qui correspond bien au but visé.

En général, on conclut que il existe une relation linéaire entre les conditions favorables et les concentrations des compositions du milieu de culture et la capacité de germination chez de nombreuses espèces de *Pinus halepensis*.

Dans la perspective de notre travail des études et des mesures au laboratoire seraient indispensables pour mieux comprendre et maîtriser la technique de germination du pollen de Pin d'Alep (*Pinus halepensis* Mill.).

Références bibliographiques

Références bibliographiques

- 1. BEHIIH et BEN AMROUCHE S, 2017-** Screening phytochimique et analyse pédologique de la plante « *Pinus halpensis* Mill. » récolté de trois régions. (Ghilassa, Ksour, Ouacif)
En vue de l'obtention du Diplôme de Master. 5-6 P
- 2. BENARD G., 1973-** Quelques aspects de la lyophilisation du pollen de cocotier. Oléagineux,
28e année, n° 10.447-451
- 3. BOOTS M et MARIAN C., 2005** -Pollen viability in the field. Radboud Universiteit Nijmegen.7 - 13p
- 4. BOUAZZA F., 2013-** Intérêt de la mycorhization contrôlée du Chêne vert (*Quercus ilex* L.) et du Pin d'Alep (*Pinus halepensis* Mill.) par deux espèces de Terfez, en conditions gnotoxéniques et axéniques. Mémoire de Magister en Biotechnologie Dépar de Biotechnologie. Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie. Université d'Oran Es-senia. 45p
- 5. BOUNAB W., 2019-** Etude palynologique des pollens du palmier dattier (*Phoenix dactylifera* L.) de la région de Biskra. Mémoire de fin d'étude pour l'obtention du diplôme de Master .Dépr de Biologie. Fclt des sciences exactes et sciences de la nature et de la vie. Univ Mohamed Khider de Biskra.9 ,10 , 21 p
- 6. BRAKCHI-OUAKOUR L., 2015** - Etude de la biodiversité des formations à Pin d'Alep (*Pinus halepensis* Mill.) en relation avec les facteurs de perturbation dans le nord de l'Algérie thèse présentée de doctorat .8p
- 7. BREWBACKER J. L. et B. H. KWACK, 1963-** The essential role of calcium ion in pollen germination and tube growth. Amer. J. Bot., 50: 859-865.
- 8. BROOKS J et SHAW B, 1978-** Sporopollenin: a review of its chemistry, palaeochemistry and geochemistry. -Grana 17: 91-97.
- 9. CHARPIN J., 1986** - Allergologie. éd2 p. 218-241.7.0
- 10. CHARRIER A., 1990** Pollen et ressources génétiques. Bulletin de la Société Botanique de France, 137, p
- 11. CHIBANI F., 2018-** La caractérisation des pollens récoltés par l'abeille dans la région de BLIDA. Mémoire de fin d'étude pour l'obtention du diplôme de Master. Dépr de Biotechnologie. Fclt des Sciences de la Nature et de la vie .Univ Saad Dahlab - BLIDA 1.21 p
- 12. COLAS F et MERCER S, 1994-** Etablissement d'une gamme de viabilité du pollen de pin gris. Note de recherche forestière N°58.

Références bibliographiques

13. COLAS F et MERCER S, 2000- Evaluation et maintien de la viabilité des pollen utilisés dans des programme d'amélioration des arbres. Mémoire de recherche forestière. Ed Québec .Canada N°135. 35, 36, 37, 41, 43, 50,53 p
14. DEBIEVE S., 2014 (page consultée le : 18/06/2021)- pollens clef de détermination simplifiée. Banque de Schémas - SVT - Académie de Dijon, [En ligne] Adresse URL : http://svt.ac-dijon.fr/schemassvt/IMG/pollen_determin.gif
15. DIGONNET- KERHOAS C et GAY G, 1990-Qualité du pollen: définition et estimation, Bulletin de la Société Botanique de France. Actualités Botaniques, 137:2, 97-100.
16. DJERRAD Z., 2016 - étude phytoécologique des provenances de Pin d'Alep (*pinus halepensis* Mill.) de la partie centrale de l'Atlas Saharien, comparaison de la variabilité morphologique et chimique avec les pinedes du semi-aride est algerien) thèse présentée de doctorat 3ème cycle page , 3-4p
17. DONADIEU Y. 1982. Le Pollen. Ed. 5 Maloine. 17p
18. EINSTEIN L, 2020, (page consulté en 12-09-2021) - Reproduction du Pin d'Alep - animateur-nature , en ligne Adresse URL : <https://www.animateur-nature.com/index.html>
19. ELHAMIDI N-A ., 2017-Etude du pollen de quelques espèces allergisantes de la région de Tlemcen. Mémoire de fin d'étude pour l'obtention du diplôme de Docteur en Pharmacie. Dépr de Pharmacie .Fclt de Médecine. Univ ABOU BEKR BELKAÏD. Tlemcen 4 p
20. FATHI M., 2019 (page consultée le : 25-08-2021) - la reproduction sexuée chez les gymnospermes.Khaymasvt des sciences de la vie et de terre. [En ligne] Adresse URL : https://khaymasvt.ma/plante_repro2/
21. FERNANDES P, 2020 (page consulté le: 10-08-2021) - Does recent fire activity impact fire-related traits of *Pinus halepensis* Mill. and *Pinus sylvestris* L. in the French Mediterranean area? - Springer link - Annals of Forest Science volume 77, Article number: 106 (2020) enligne(adresse URL: <https://link.springer.com/article/10.1007/s13595-020-01016-1#change-history>
22. GARRIGUE G, 2003 (page consulté le : 01 -08-2021) - Le Pin d'Alep – garrigue association gourmande – (En ligne) adresse URL : http://garriguegourmande.fr/index.php?option=com_content&view=article&id=1267&catid=10:autres-plantes&Itemid=110

Références bibliographiques

- 23. GESLOT C, 2018** (page consulté le 01-08-2021) Pin maritime (*Pinus pinaster*) – jardin secrets - (en ligne) adresse URL : <https://jardin-secrets.com/pin-maritime.html>
- 24. GHOUGALI F, 2011** - Contribution à l'évaluation de la diversité et du contrôle génétique de la croissance et de la fructification chez les pins de types halepensis (*Pinus brutia-Pinus halepensis*). Mémoire En vue de l'obtention du Diplôme de Master. 7p
- 25. GOKUL S., 2016-** Pollen germination methods .The University of Trans-disciplinary Health Sciences and Technology · Centre for Conservation of Medicinal Resources.2 p
- 26. GRUGIER J., 2013-** La lyophilisation et les enjeux pour les métiers de la santé. La vague 22-23p
- 27. GUIT B, 2015-** Croissance et état sanitaire des peuplements de Pin d'Alep (*Pinus halepensis Mill.*) dans le massif forestier de senalba (région de Djelfa). Thèse de Doctorat en Sciences Agronomiques, page 156-167
- 28. JABRANI R et OULMENE Y., 2016-** Caractérisation de deux types de pollen de trappe« mono et multifloral » de la région de Tizi ouzou et essai de formulation d'un yaourt diététique à base de pollen. Mémoire En vue de l'obtention du diplôme de Master. Dépr Technologie Alimentaire. Univ M'hamed Bougara Boumerdes 3p
- 29. JAROSZ N., 2003-**Etude de la dispersion atmosphérique du pollen de maïs :Contribution à la maîtrise des risques de pollinisation croisée. Présentée en vue de l'obtention du Doctorat de l'Institut National Agronomique Paris-Grignon.23 p
- 30. JAYAPRAKASH P et SARLA N., 2001-**Development of an improved medium for germination of *Cajanus cajan* (L.) Mill sp. Pollen in vitro. Journal of Experimental Botany;52:851-855
- 31. JAYAPRAKASH P., 2015** -An improved in vitro germination medium for recalcitrant bread wheat pollen (*Triticum aestivum L.*). Indian Journal of Genetics and Plant Breeding ;75 (4):446-452
- 32. JAYAPRAKASH P., 2018** - Pollen germination in vitro in Pollination plants. *Open access peer-reviewed Edited Volume. Pp* :82-96
- 33. KETFI L., 2016-** Le contenu pollinique atmosphérique de la région de Annaba et sa relation avec la pollinose, Thèse De Doctorat de l'Université Badji Mokhtar Annaba

Références bibliographiques

- 34. KORMUTAK A et VOOKOVA B al ., 2008-** Pollen size and viability in hybrid swarm populations of *Pinus mugo* Turra and *Pinus sylvestris* L. Thaszia Journal of Botany. Košice, 18: 93-100
- 35. LAAYDI M, LAAYDI K et BESANCENOT J-P, 1997-** Pollens, pollinoses et météorologie in La Météorologie 8^e série - n° 20. pp :41-56
- 36. LACHACHI S., 2010-** Organogénèse et embryogénèse somatique directe chez la tomate. Mémoire de fin d'étude pour l'obtention du diplôme de magister. Dépr de Biologie. FcIt des sciences. Univ Oran 21 p
- 37. LADJAL I et ABLOUL D-A , 2019 .** Les propriétés de *Pinus Halepensis* Mill Mémoire En vue de l'obtention du Diplôme de Master, page 3-8.
- 38. LALEG A, 2017-** Contribution à l'étude de la productivité du pin d'Alep dans la forêt de Zariffet (Wilaya de Tlemcen). 04p
- 39. LAZZARO D-M ., 1999-** Microtubule organization in germinated pollen of the conifer *Picea abies* (Norway spruce, *Pinaceae*). American Journal of Botany 86(6): 759–766.
- 40. LEZINE A-M., 2008.** Le pollen outil d'étude de l'environnement et du climat au quaternaire. Société Géologique de France VUIBERT. 114p.
- 41. MANGIN L., 1889-** Observations Sur La Membrane Du Grain De Pollen Mur, Bulletin de la Société Botanique de France, 36:5, 274-284.
- 42. MANUELLE B., 2020** (page consultée le :15/08/2021) - la culture in vitro, Retour aux bases –Vegenov. [En ligne] Adresse URL : <https://blog.vegenov.com/2020/03/culture-in-vitro-retour-aux-bases/>
- 43. NAAS O., 2017-** Le grain de pollen de pin d'Alep (*pinus halepensis* Mill) comme bio-indicateur de la pollution atmosphérique : variabilité structurale et morphologique. Thèse présentée en vue de l'obtention du diplôme de Docteur en sciences agronomiques. ENSA EL Harach. Alger 8,10,11,12,56,57 p
- 44. NEDJMI B, DIFI M et HADDIOUI A, 2014-** Effet des différents prétraitements sur la germination des semences de Pin d'Alep (*pinus halepensis* Mill). Revue de BioResource. Vol 4 N 2.40-45
- 45. NICOLSON S.W., 2011.** Bee food: the chemistry and nutritional value of nectar, pollen and mixtures of the two. Department of Zoology and Entomology, University of Pretoria, Pretoria, 0002 South Africa. 197-204
- 46. NOVIKOVA K, 2019** (page consulté le 01-08-2021) - Les pives de nos forêts – sciences et environnement (en ligne) adresse URL :

Références bibliographiques

<https://www.rts.ch/decouverte/sciences-et-environnement/animaux-et-plantes/la-foret/10339476-les-pives-de-nos-forets.html>

47. PONS A ., 1970- Le pollen –Que sais-je ?. éd 3°. France 125p

48. PRAT R ET RUBINSTEIN P-J, 2015 (page consulté le 01-08-2021) -Pin d'Alep (*Pinus halepensis*, Pinacées) – B Media dresse URL :

http://www.snv.jussieu.fr/bmedia/arbres/pin_alep.htm

49. PRIEU C., 2015- Evolution et Développement des grains de pollen chez les angiospermes. Thèse de Doctorat. Spécialité de doctorat en biologie .Université Paris Saclay. 4-5 p

50. PUNT W et al ., 2006 -Glossary of pollen and spore terminology.81p

51. RAFAMANTANANA M-H., 2004- Multiplication d'Eugenia *jambolana* Lamarck (*Myrtaceae*) par la méthode de la culture in Vitro. Mémoire de diplôme d'étude approfondie .Départ de biologie et écologie végétale. Univ d'Antananarivo.13p

52. RENAULT MISKOVSKY J et PETZOLD M 1989 -Spores et pollen .Ed. La Duraulié ,360p.

53. SAGET I, 2014 (page consulté le 01-08-2021) - Les nombreuses vertus de l'extrait d'écorce de pin – plantes et santé – (en ligne) Adresse URL : <https://www.plantes-et-sante.fr/articles/plantes-medicinales/2171-les-nombreuses-vertus-de-l'extrait-decorce-de-pin>

54. SAIDANI Z., 2011- Etude du comportement du pollen sous l'influence de différentes conditions de stockage. Mémoire de fin d'étude pour l'obtention du diplôme de magister. FcIt des sciences de la nature et de la vie. Univ Ziane Achour de Djelfa.12-25p

55. STANLEY R.-G. et LINSKENS H-F., 1974- Pollen: Biology Biochemistry and Management. Springer, Berlin.

56. TABTI D., 2010 (page consultée le 14/08/2021) - Régénération in vitro de plants sains à partir d'Apex caulinaire d'olivier *Olea europaea* L.var.Chemlal -Historique de la culture in Vitro –AGRONOMIE info. [En ligne] Adresse URL : <https://agronomie.info/fr/historique-de-la-culture-in-vitro/>

57. TOUABA C., 2018 -Valorisation du Pin pignon (*Pinus pinea* L.) dans la région de Djebel Ouahch – Constantin Mémoire En vue de l'obtention du Diplôme de Master. 11p

58. VIRCHOW R., 2011 - Définition Tube pollinique .aquaportail. [en ligne] adresse URL: <https://www.aquaportail.com/definition-10734-tube-pollinique.html#definition>

Références bibliographiques

<https://www.aquaportail.com/definition-10734-tube-pollinique.html>

59. WALTER S et al., 2001- Botanique systématique : Une perspective phylogénétique .

De Boeck Université. 448p.

60. WANG P, CHAREST P-J et DOWNIE B., 1994- Conservation *ex situ* de pollen et de graines,

et de cultures *in vitro* de plantes. Etude FAO forêts 113.Rome .1p

61. YOUNSI D et LAZIZI N., 2016- Etude des caractéristiques physico-chimiques du pollen d'abeille de la région de Naciria (W.Boumerdes). Mémoire de fin d'étude pour l'obtention du diplôme de Master. Dépr d'agronomie .Fclt des sciences biologique et des sciences agronomique. Univ Mouloud Mammeri de Tizi-Ouzou. 10p.

Résumé :

La recherche intitulée a été réalisée par une synthèse de quelques références importantes pour étudier l'effet de différents milieux de cultures comme le saccharose, l'agar, l'acide borique (H_3BO_3), nitrate de calcium ($Ca NO_3$), nitrate de potassium (KNO_3) et sulfate de magnésium ($MgSO_4$), et ainsi que d'autres facteurs comme la température et l'humidité sur la germination des grains de pollen du Pin d'Alep (*Pinus halepensis* Mill.). C'est différents milieux de cultures contenant des concentrations faibles et élevés sont préparés pour la culture in vitro des grains de pollen pendant 24h d'incubation. Le taux de germination a été varié selon la composition du milieu. La teneur en saccharose de 10 % s'est avérée optimale pour la germination in vitro du pollen de *Pinus*.

Mots clefs : Pollen ; *Pinus halepensis* Mill. ; germination in vitro ; milieu de culture.

الملخص:

تم إجراء البحث بعنوان توليف بعض المراجع الهامة لدراسة تأثير وسائط الاستزراع المختلفة مثل السكروز , الأجار وحمض البوريك , نترات الكالسيوم , نترات البوتاسيوم وكبريتات المغنيسيوم وعوامل أخرى مثل درجة الحرارة والرطوبة على إنبات حبوب اللقاح لصنوبر حلب ، وهي عبارة عن وسط استزراع مختلف يحتوي على تركيزات منخفضة وعالية يتم تحضيرها للزراعة المخبرية لحبوب اللقاح لمدة 24 ساعة حضانة. كان معدل الإنبات متنوعاً وفقاً لتكوين الوسط. وجد أن محتوى السكروز 10% هو الأمثل لإنبات حبوب لقاح الصنوبر في المختبر.

كلمات مفتاح: حبوب اللقاح؛ صنوبر الحلبي. *Pinus halepensis* Mill.؛ إنبات في المختبر؛ وسط زراعة

Summary:

The research was carried out by a synthesis of some important references to study the effect of different crop media such as sucrose, agar, boric acid (H_3BO_3), calcium nitrate ($Ca NO_3$), potassium nitrate (KNO_3) and magnesium sulphate ($MgSO_4$), and other factors such as temperature and humidity on the germination of Aleppo Pine pollen grains (*Pinus halepensis* Mill.). It is different media of cultures containing low and high concentrations are prepared for in vitro cultivation of pollen grains for 24 hours of incubation. The germination rate was varied according to the composition of the medium. The sucrose content of 10% was found to be optimal for in vitro germination of *Pinus* pollen.

Keywords: Pollen ; *Pinus halepensis* Mill. ; germination in vitro ; the culture medium .