MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE
UNIVERSITE AKLI MOHANDOULHADJ–BOUIRA

FACULTE DES SCIENCES DE LA NATURE ET DE LA VIE ET DES SCIENCES DE LA TERRE DEPARTEMENT DE BIOLOGIE

Réf:……./UAMOB/F.SNV.ST/DEP.BIO/2023

MEMOIRE DE FIN D'ETUDES

EN VUE DE L'OBTENTION DU DIPLOME MASTER

Domaine : SNV **Filière** : Biotechnologies

Spécialité : Biotechnologie microbienne

Présenté par :

Mme Bendiaf Rahil

Thème

Initiation à l'optimisation du protocole cytogénétique du pin d'Alep (*Pinus halepensis* Mill.)

Soutenu le : 04/07/2022 **Devant le jury composé de**

Nom et Prénom	*Grade*	
M. LEKBAL Farouk	*MAA* *Président*	*Univ. de Bouira*
M. MAHDJOUB Mohamed Malik	*MCB* *Promoteur*	*Univ. de Bouira*
M. KADRI Nabil	*Prof* *Examinateur*	*Univ. de Bouira*
Mme. ZAMOUM Nadjet	*Doctorante* *Co-Promotrice*	*Univ. de Ouargla*

Année Universitaire : 2022/2023

Remerciements

Avant tout, je remercie Allah « Tout Puissant » qui m'a donné la force, la volonté, le courage pour accomplir ce modeste travail.

A

Monsieur MAHDJOUB Mohamed Malik mon promoteur chef de département de biologie à l'Université de Bouira, pour avoir accepté de m'encadrer, je le remercie également pour son aide, ses orientations, ses conseils et pour tout le savoir dans le cadre de ce travail, qu'il trouve ici l'expression de ma gratitude et de mon respect.

Je tiens à remercier Mme. Nadjet ZAMOUM doctorante en écologie et environnement, Co promotrice pour avoir pris le temps de guider et accompagner mes recherches pour leur disponibilité, leur orientation, leur conseil, leur encouragement. Je lui exprime ma profonde gratitude pour m'avoir fait profiter de leurs connaissances.

Je remercie monsieur M. LEKBAL pour avoir accepté de présider le jury de ma soutenance et M. KADRI pour avoir accepté d'examiner et de juger le travail.

Afin de n'oublier personne, je remercie également l'ensemble du personnel des laboratoires de la faculté des sciences de la nature et de la vie et des sciences de la terre de l'université de Bouira pour leurs aides.

Rahil

DEDICACES

Je dédie ce mémoire à,

Mes chers parents, pour leur soutien tout au long du chemin, pour votre amour et vos mots qui me donnent de la force et me font sourire, pour votre sacrifice et votre présence au moment où j'en ai besoin, merci. Vous tellement.

Ma sœur Hafsa qui m'avez toujours soutenue et encouragé, que Dieu te protège et ne te réserve que du bonheur dans ton avenir.

Mon frère et leurs enfants, source de joie et de bonheur.

Je dédie ce travail à islam mon mari, à Toufik et Youcef Iyad mes enfants, et mes proches qui m'ont rapportée le réconfort, les encouragements et le soutien sans lesquels ce travail n'aurait pas été réalisée avec autant de bonheur.

Rahil

Liste des Abréviations

Liste des abréviations

A: Adénine.

ADN : Acide Désoxyribon Nucléique.

ADNr : Acide Désoxydions Nucléique ribosomique.

ARNase : Acide Ribonucléase ARNr : acide ribonucléique ribosomique.

ASAT : Aspartate Amin transférase.

ALAT: Alanine aminotransférase .

C: Cytosine

DAPI : Di-Amino-Phénil-Indol.

FISH : fluorescence in situ hybridization.

G: Guanine.

I**CN** : Code International de Nomenclature des algues, champignons et plantes.

LDH : Lactate déshydrogénase.

min : minute.

Pb : paires de bases Pg : picogrammes.

S et **T** 24 h : scarification et trempage dans l'eau pendant 24 heure

T: Thymine.

V : Volume.

S et **T** 24 h : scarification et trempage dans l'eau pendant 24 heure.

Liste des tableaux

Liste des Tableaux

Tableau I: Classification du pin d'Alep selon la morphologie et la phylogénie…….5

Tableau II : représente l'effet de la variation de la température de l'hydrolyse sur le nombre de cellules en divisions……. 41

Tableau III : représente l'effet des variations de temps de l'hydrolyse sur les méristèmes racinaires de graines germées et le nombre des cellules en division…… .43

Tableau IV : représente l'effet des variations de temps de coloration sur les méristèmes racinaires de graines germées et le nombre des cellules en division ……44

Liste des figures

Listes des figures

Figure 1: Répartition de pin d'Alep dans le monde …… 6

Figure 2: Répartition du pin d'Alep en Algérie ……7

Figure 3: Arbre de pin d'Alep……..9

Figure 4: L'écorce de pin d'Alep…….....10

Figure5: Les feuille de pin d'Alep …… ……..…… 10

Figure 6: Les cônes de pin d'Alep……11

Figure 7: les graines de pin d'Alep……12

Figure 8: Idéogramme de *(A) P.bungeana (B) P.koraiensis ,(c) P.armandii. (D) P.wallichiana and (E) P. Qing Cai,Daming Zhang*……17

Figure 9*:* Scéma représente les états de la chromatine ……18

Figure10 : Présentation schématiques des différents types de chromosomes humains….……20

Figure11*:* principe de l'Hybridation In Situ en Fluorescence (FISH*)*……...25

Figure 12 : Répartition géographique du pin d'Alp dans la région de bouira……29

Figure13 : Les grains de pin d'Alep stockés ……...… …..30

Figure 14 : Trempage des graines du pin d'Alep (**A** : pendant 24h), (**B** : pendant 48h), (**C** : pendant 72h), (**D** : scarification et trempage pendant 24h)…… *31*

Figure 15 : Les différents lots de graines de pin d'Alep ……..32

Figure 16 : Matériel utilisé durant l'expérimentation cytogénétique. **A:** coupure de la coiffe racinaire sous la loupe binoculaire microscope optique, **B** : Hydrolyse par l'HCL**, C** : coloration avec l'orceine, **D** : observation microscopique…….……. 34

Figure 17: Effet des différents prétraitements sur le taux de germination des graines de pin d'Alep.Les barres représentent la moyenne ± écart type (n=4 répétition…… 36

Figure 18 : : Effet des différents prétraitements sur la vitesse de germination des graines du pin d'Alep (*n*=4 répétitions ……37

Figure 19 : Graphe représentatif de l'effet de la variation de la température de l'hydrolyse sur le nombre de cellules en division ……..……38

Figure 20 : *:* L'effet des variations de température sur le nombre et la visibilté des cellules en divisions. **A** : (0_10) °C, **B** :(15-25) °C, **C**:(30-40) °C **, D** :(45-55) °C. (Grossissement X40Echelle 10µm …… …….....39

Figure 21 : L'effet des variations de température sur le nombre et la visibilité des cellules en divisions. **A** et **B** :(60-70) °C Grossissement X40, Echelle : 10µm ....…… 39

Figure 22 : Graphe représente l'effet de la variation de temps de l'hydrolyse sur le nombre de cellules en divisio*n.*…… …… 40

Figure 23: **:** L'effet des variations de temps de l'hydrolyse sur le le nombre et la visibilité des cellules en division Grossissement :**A** :(0-4) min, **B** (6-10)min ,**C** (12-16) min,**D** (18-22)min X40,Echelle : 10µm ……. .. 41

Figure 24 Graphe représente l'effet de la variation de temps de coloration sur le nombre de cellules en division ……. 42

Figure25 : L'effet des variations de temps de la coloration sur le nombre et la visibilité des cellules en division :**A** :4 min ,**B** :8 min, **C** : 14 min ,**D** : 22)min Grossissement X40,Echelle : 10µm …….. 43

Figure26: Les différentes phases des divisions cellulaires chez le pin d'Alep. **A** : Prophase, **B** : Métaphase**, C** : Anaphase, **D** : Télophase. (Grossissement X100) Echelle : 10µm …… …… .44

Table des matières

Table des matières

Introduction 1
Synthèse bibliographique……3
Chapitre I : Pin d'Alep……..…4
I.1Généralité…… ...4
I.2.Taxonomie……... .4
I.3 Aire de répartition naturelle du pin d'Alep……5
I. 3 .1 Aire de répartition du pin d'Alep dans le monde..…….....5
I.3 .2Aire de répartition en Algérie……...6
I.4 Plasticité écologique…… 7
I.5 Phénologie de l'espèce……...8
I .6 -Description botanique de la plante…… 9
I.7 Intérêt économique de pin d'Alep…… 12
I.8 Les propriétés thérapeutiques et usage traditionnel …… 13
I.9 Les propriétés pharmacologiques de Pin d'Alep …… 14
I.9.1 Activité anti-cancéreuse …… 14
I. 9.2 Activité antibactérienne…… 14
I.9.3 Activité antifongique …… 14
I.9.4 Activité hépato et néphroprotectrice…… 14
I.9.5 Activité neuroprotectrice …… …… 15
I.9.6 Activité antioxydante …… 15
I .9.7Activité anti-inflammatoire……... 15
Chapitre II : La cytogénétique……... 16
II La Cytogénétique …….... 16
II.1 Caryotype …… 16
II.2 Notion génétique ……... 17
II.2.1 La chromatine …… 17
a) L'euchromatine (chromatine diffuse) …… 18
b) L'hétérochromatine (chromatine condensée)……..... 18
II.2.2Taille du génome …… 19
II.2.3 Le cycle cellulaire…… 20
II.3 Techniques de cytogénétiques classiques……23
II.3.1 Coloration de Feulgen…… 23
II.3.2 Coloration de Giemsa…… 23
Chapitre III : Matériels et méthodes ……..…… 28
III.1 Origine géographique des espèces étudiées……... 29
III.2 Récolte des cônes du Pin…… 29
III. 3 Récupération des graines…… 30
III.4 Mise à germination des graines…… 30
III.5 Etude cytogénétique…… 33
III.5.1 Etude de la mitose…… 33

a) Préparation des échantillons…… 33
b) L'hydrolyse……... 33
c)Préparation du colorant et coloration des échantillons ……33
d)Ecrasement…… 34
c)Observation…… 34
IV. Résultats et discussion…… …35
IV.1 Résultats……36
IV.1.1 Germination……36
IV.1.2 Cytogénétique du Pin d'Alep…… 37
A) Etudes préliminaire sur l'optimisation du protocole cytogénétique du pin d'Alep ……. 37
1)Détermination de l'intervalle des températures …… 38
2)Détermination de l'intervalle de temps de l'hydrolyse …… 40
3)Détermination de l'intervalle de temps de la coloration……..... 41
B) Analyse de la mitose…… 43
IV.2 Discussions……... 45
IV.2.1Germination…… 45
IV.2.2 Etude cytogénétique…….. 46
Conclusion…… 48
Références bibliographiques
Résumes

Introduction générale

Introduction

Les conifères sont des plantes de grande importance écologique, elles se trouvent dans le monde entier : les forêts tropicales d'Asie et les régions chaudes d'Afrique et d'Australie, ainsi que dans les forêts fraîches du nord de l'Europe, de l'Asie et de l'Amérique du Nord. Ces plantes sont ligneuses à croissance monopodiale, leur nom vient de ces cônes qui sont des fruits contiennent des graines. Elles poussent à des fluctuations de température qui leur conviennent, une valeur critique faible ou élevée de cette dernière arrêtera ou redémarrera la végétation **(K.B.F, 2007).**

Parmi les sept familles des conifères on trouve les Pinacées *(Pinaceae)* qui compte 220-250 espèces repartis en 11 genres, Parmi ces 11 genres, on distingue le genre *Pinus* dont Le pin d'Alep est parmi les espèces d'arbres les plus communément plantées à cause de leur croissance rapide, de leur résistance aux conditions les plus xériques, de leurs aptitudes à reconstituer les zones dégradées et à occuper les terrains nus **(Zavala et Zea, 2004).**

Le pin d'Alep est considéré comme un élément le plus important de la forêt méditerranéenne et représente un capital forestier de grande valeur dans la plupart des pays du pourtour méditerranéen, notamment l'Algérie **(Boudy, 1950; Nahal, 1962).**

Ecologiquement, c'est une espèce du semi-aride qui peut supporter les températures élevées **(Quézel, 1980 et Nahal, 1962),** et donc c'est un élément essentiel qui aide à protéger la région méditerranéenne en cas de réchauffement climatique **(Vennetier, 2011).**

Economiquement le bois de Pin d'Alep est de qualité et de coût élevé dans les marchés régionaux et mondiaux**.**

En Algérie le pin d'Alep couvre 35% des surfaces boisées au nord, soit environ 850 000 ha. Il forme des forêts importantes dont les valeurs écologiques sont variables **(Bentouati, 2006 ; Guit, 2015)**. Il est localisé en grande partie à l'état naturel dans les régions de l'est et du centre du pays principalement sur les Atlas, tellien et saharien **(Guit, 2015).** Cette espèce qui est présentée dans tous les étages bioclimatiques, depuis le littoral jusqu'à l'Atlas saharien, trouve son optimum de croissance essentiellement en zone semi-aride **(Kadik, 2005 ; Djerrad, 2016).**

Vu l'importance des superficies occupées par le peuplement de pin à travers le monde et en Algérie, plusieurs études ont été réalisés sur cette espèce, particulièrement l'étude

cytogénétique qui est l'une de nombreuses disciplines sur lesquelles s'appuie l'amélioration des plantes **(Jahier et *al*., 1992).**

Les études cytogénétiques réalisées chez les *Pinaceae* ont été limitées par la difficulté d'identifier les chromosomes individuels **(Pederick, 1966).** Cependant, certaines études ont montré que la famille des *Pinaceae* se compose principalement d'espèces diploïdes (2n=24) et ne contient pas de véritables espèces aneuploïdes ou polyploïdes (**Khoshoo, 1961 ; Pederick, 1970 ; Muratova et Kruklis, 1988).**

À travers cette étude nous avons tenté de réaliser des initiations pour optimiser le protocole cytogénétique du pin d'Alep afin d'améliorer la connaissance de cette essence, et favoriser sa gestion et son aménagement.

Cette étude présente deux parties, La première partie est consacrée à la synthèse bibliographique et se compose de deux chapitres, l'un sur des généralités sur l'espèce étudié et l'autre sur la cytogénétique.

La 2^{e} partie présente deux chapitres, le premier est consacré à la partie expérimentale : matériel végétal analysé ainsi que la méthodologie utilisée. Le 2^{e} chapitre présente les résultats obtenus et leurs interprétations. L'étude se termine par une conclusion générale et quelques perspectives.

Synthèse bibliographique

I.1 Généralité

Le pin est le nom générique des arbres du genre *Pinus.* Le nom pin vient du mot indo-européen « pit », qui signifie résine. Le pin est une gymnosperme de la famille des *pinacées*. Il est le plus important de tous les conifères en terme de nombre de ses espèces (plus de 90), en raison de la phyllotaxie unique et prétendue des forêts qu'il constitue, et aussi son utilisation excessive dans le reboisement et l'importance économique de ses produits. **(Judd *et al*, 2002 *;* Jacues , 2003).**

Pinus halepensis Mill, communément appelé Pin d'Alep est le plus répandu des pins méditerranéens.

Les pins du groupe « *halepensis* » représentent les essences forestières les plus importantes de Méditerranée, de par leur superficie et leur rôle dans l'économie des pays et de la région, ils sont utilisés dans divers domaines (taxonomie, phytogéographie, écologie et sylviculture) **(Nahal,1962).**

I.2. Taxonomie

Le pin d'Alep ou pin blanc a été décrit pour la première fois par Duiiamel en 1755 sous le nom de Pinos hiero, soliviitana, avec le temps Miller l'a réécrit en 1768 sous le nom de *Pinus halepensis* Mill. **(Nahal, 1962).**

Pinus halepensis Mill appartient au sous règne des *Tracheobionta,* à l'embranchement des *Spermaphytes,* au sous-embranchement des *Gymnospermes,* à la classe des *Pinopsida,* à l'ordre des *Coniferales* et à la sous-famille des *Pinoideae,* au genre *Pinus* **(Camus, 1914).** Ce genre est représenté essentiellement par deux espèces *Pinus halepensis* Mill et *Pinus brutia Ten*. **(Lieutaghi, 2004).**

Le pin d'Alep *(Pinus halepensis* Mill*)* appartient à un groupe de pins dans lequel plusieurs espèces ont été décrites, actuellement seulement *Pinus halepensis* Mill, *et Pinus brutia Ten*, sont considérés comme de véritables espèces par la majorité des taxonomistes**, (Quézel et Barbero, 1992)**. D'après Le HOUÉROU (1990), ces deux espèces occupent près de 6,8 millions d'hectares sur l'ensemble du bassin méditerranéen. Ces deux espèces couvrent environ 6,8 millions d'hectares à travers la Méditerranée. *Pinus halepensis et Pinus brutia* sont deux taxons génétiquement très similaires qui étaient auparavant inclus dans des sections ou sous-sections distinctes de Halepensis**. (Price *et al*., 1998 ; Lopez *et al*., 2002).**

La classification récente du genre Pinus, sous-genre *Dyploxylon*, ou pins « durs » à regrouper les deux espèces *P. halepensis* et *P. brutia* avec *P. heldreichii*, *P. pinaster*, *P. pinea*, *P. canariensis* et *P. roxburghii* dans la soussection *pinaster*, également appelée le groupe des pins méditerranéens **(Gernandt *et al.*, 2005).**

La position systématique du taxon selon différentes approches morphologiques (Maire, 1952) et phylogéniques APGII (**Dobignard et Chatelain ,2012**) est décrite dans le tableau 01.

Tableau01: Classification du pin d'Alep selon la morphologie et la phylogénie.

	Morphologie (Maire,1952)	**APGII (Dobignard et Chatelain, 2012)**
Règne	Plantae	Plantae
Embranchement	Spermatophytes	Spermatophytes
Sous embrenchement	Gymnospermes	Gymnospermes
Classe	Pinopsida	Gymnospermes
Ordre	Pinales	Pinales
Famille	*Pinacées*	*Pinaceae*
Genre	*Pinus*	*Pinus*
Espèce	*Halipensis* Mill.	*Halipensis* Mill.

I.3 Aire de répartition naturelle du pin d'Alep

I. 3 .1 Aire de répartition du pin d'Alep dans le monde

Le pin d'Alep est largement répandu dans la région méditerranéenne **(Fig. 1).** Ces forêts couvrent au total plus de 3,5 millions d'hectares et sont réparties dans certains pays comme suit

- En Algérie, le pin d'Alep est fréquent, occupe de vastes zones depuis la côte jusqu'à l'Atlas saharien. Selon Kadik (1987), la superficie de cette espèce est d'environ 850 000 ha.
- En Tunisie, il occupe une superficie de 340 000 hectares, et se localise essentiellement dans les Monts de la dorsale tunisienne **(Souleres, 1969).**
- Au Maroc, le pin d'Alep est rare à l'état sauvage, occupant une surface de 65 000 ha répartis en peuplements séparés il occupe littorale méditerranéenne au niveau du Rif, du moyen et du haut Atlas **(Quézel, 1986 ; Bentouati, 2006).**
- Il est très développé en Espagne, occupant 15% de la superficie forestière **(Montéro, 2001).**
- En France, la surface des peuplements de pin est augmentée de 36 000 ha à 232 000 ha en un siècle (**Brochiero et al., 1999).**

- En Italie, le pin d'Alep touche environ 20 000 ha et reste à proche de la cote **(Seigue, 1985).**

Figure 1: Répartition de pin d'Alep (*pinus halpensis*) **(Caudullo *et al.*, 2017).**

I.3 .2Aire de répartition en Algérie

Le pin d'Alep est largement répandu dans les zones forestières algériennes, avec 35% de couverture **(Boudy, 1952).** Il se trouve dans toutes les variantes bioclimatiques avec une dominance dans l'étage semi-aride **(Guit, 2015),** Où il s'installe principalement dans les régions suivantes :

- La région de Tbessa, les plateaux constantinois et les Aurès.
- Les forêts de Médéa, Monts des Bibans.
- 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).

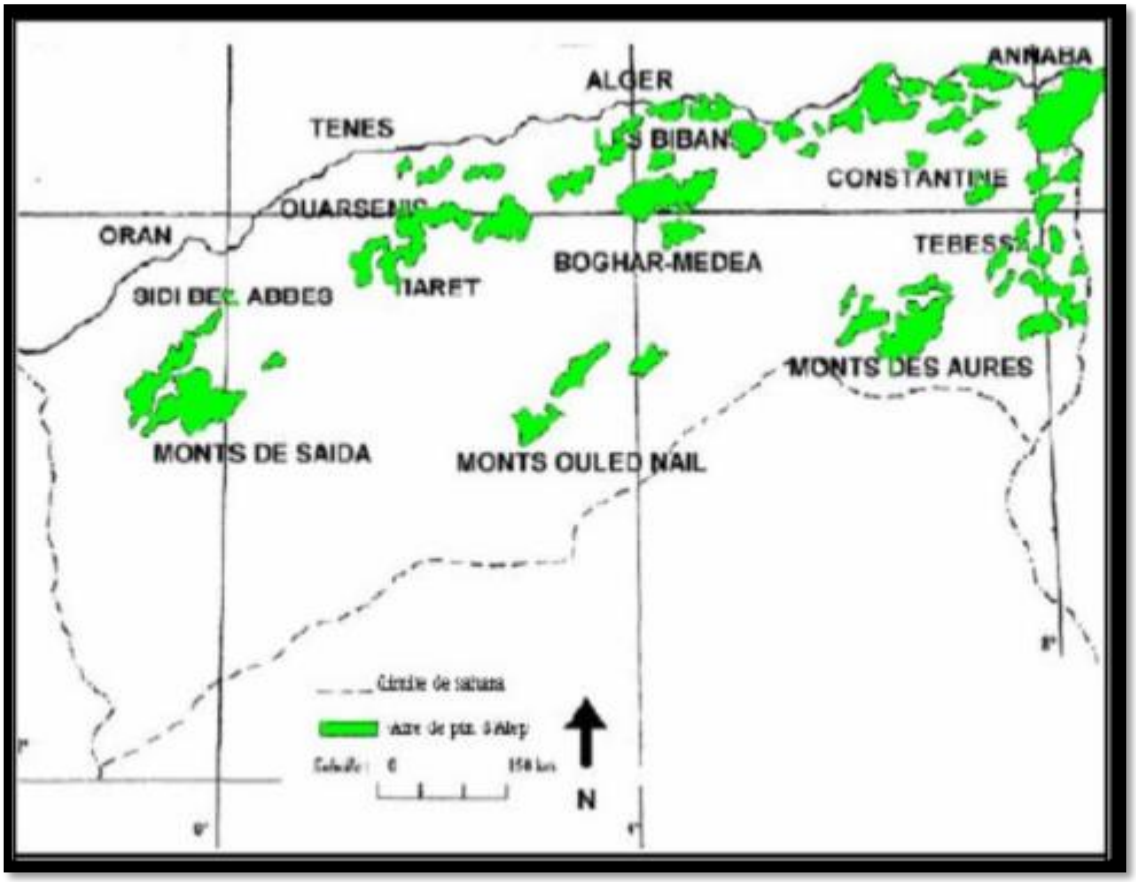

Figure2 : Répartition de pin d'Alep en Algérie **(Bentouati, 2006).**

I.4 Plasticité écologique

Le pin d'Alep fait partie des espèces méditerranéennes à plasticité écologique, car il s'installe sur n'importe quel substrat et est également présent dans la plupart des bioclimats méditerranéens. **(Quézel, 1986, Kadik, 2005).**

Le pin d'Alep pousse dans des zones où les précipitations annuelles sont comprises entre 200 et 1500 mm. Les précipitations ne semblent pas être un facteur qui influe la répartition des espèces et conviennent mieux aux périodes de sécheresse **(Kadik, 2005., Djerrad, 2016).**

L'un des principaux facteurs climatiques limitant la propagation du pin d'Alep est la température. On le trouve dans les régions où les températures moyennes annuelles se situent entre 11 et 19 °C. Cela correspond à peu près à la température minimale moyenne du mois le plus froid entre -3 et +10 °C. Selon Quezel (1986), le Pin d'Alep peut supporter des températures froides occasionnelles de -15 à -18 °C, à condition qu'ils restent exceptionnels et de courte durée **(Nahal, 1962).**

Le pin d'Alep est également présent dans une grande variété de sols, des lithosols (recolonisation d'éboulis par exemple) aux sols évolués profonds (recolonisation de terrasses par exemple**) (Abbas *et al*., 1985).**

Le pin d'Alep supporte des taux importants de calcaire **(Marion et Poupon, 1974),** atteignant 90% de calcaire total et 40% de calcaire actif **(Loisel, 1976),** c'est une espèce calcicole.

Outre sa plasticité, il a également la particularité de supporter des déficits hydriques sévères et persistants, lui conférant une excellente résistance à la sécheresse, notamment en été. **(Bariteau, 1992).**

I.5 Phénologie de l'espèce :

Plusieurs études ont été réalisé par plusieurs auteurs sur la phénologie du pin d'Alep ces études ont permis de déceler les observations phénologiques suivantes :

- La reprise de la végétation du pin d'Alep est relativement tardive, se produisant entre février et mars. Les mois de mai et juin correspondent à la période de croissance maximale (radiale et apicale), la période de croissance est stoppée par la sécheresse vers le mois de juillet. Le pin d'Alep est un arbre polycyclique, produisant éventuellement plusieurs pousses par an et formant de faux cernes **(Serre 1976a et b).**
- Les cônes mûrissent au cours de leur deuxième année et déposent généralement des graines au cours de leur troisième année **(Nahal, 1962).**
- La dispersion naturelle des graines a lieu de la fin août à la fin octobre. Pour s'ouvrir, le cône doit être soumis à une chaleur intense pour rompre le joint de résine entre les écailles (**Francelet, 1970).**
- La germination a lieu à la fin de l'automne ou au début du printemps **(Calamassi *et al.*, 1984).**
- Le Pin d'Alep fructifie dès l'âge de 10 à 12 ans, mais les graines qu'il produit ne sont aptes à germer qu'à l'âge de 18 à 20 ans **(Nahal, 1962).**

I .6 -Description botanique de la plante :

Le Pin d'Alep est un arbre toujours vert, très caractéristique présent naturellement dans la majeure partie du nord de l'Algérie et pouvant atteindre une hauteur de 30 m, **(Boudy, 1950 ; Pardé, 1957 ; Gaussen, 1960 ; Mathieu, 1897)**, la durée de vie ne dépasse pas 150 ans.il est caractérisé par un tronc tortueux, irrégulier et branchu (**Seigue, 1985) (Fig 3).**

Figure 3: Arbre de pin d'Alep **(Talbi 2019).**

- **L'écorce** : L'écorce des jeunes arbres est lisse de couleur gris-argenté (**Fig 4)** chez les adultes, les écailles minces, larges et aplaties et de couleur rougeâtre. Elle est très inflammable et contient une grande quantité de tannins **(Kadik, 1983; Nahal, 1962).**

Figure 4 : L'écorce de pin d'Alep **(Talbi 2019).**

- **Bourgeons** : sont non résineux, ovoïdes, aigus, bruns avec des écailles libres frangées de blanc.
- **Les feuilles** : persistantes, associées par 2 (parfois 3 et 4) et groupées en pinceau aux extrémités des rameaux **(Maire ,1952).** Sont des aiguilles fines d'un vert clair de 1 mm d'épaisseur maximum et de 4 à 10 cm de longueur **(Nahal, 1962) (Fig 5).**

Figure 5 : Les feuilles de pin d'Alep **(Talbi 2019).**

- **Les cônes** : ils sont gros avec une taille de 6 à 12 cm avec un pédoncule épais de 1 à 2 cm **(Kadik, 1987).** Ils sont pourpres puis brun lustré avec des écussons aplatis, restant plusieurs années sur l'arbre, la maturité des cônes est remarquée par le changement de couleur de vert à brun rougeâtre (**Fekih, 2015) (Fig 6),** et les graines qui se trouvent à l'intérieur de ces derniers n'ont pas la capacité de germer que lorsque l'arbre atteint l'âge de 18 à20 ans **(Rathgeber, 2002).**

Figure 6 : Les cônes de pin d'Alep **(Talbi 2019) .**

- **Les graines** : sont de petite taille de 5 à 7 mm à aile longue, brun gris sur une face et gris moucheté de noir sur l'autre **(Kadik, 1987).** Munie d'une aile allongée 4 fois plus longue qu'elle, qui facilite la dissémination rapide **(Nahal, 1962) (Fig7).**

Figure 7 : Les graines de pin d'Alep.

- **La résine** : grâce à une opération appelée gemmage l'arbre de pin d'Alep peu synthétiser une substance appelé la résine, le tronc de l'arbre exsude la résine pour sa cicatrisation en cas de blessure **(Venet, 1986).**

I.7 Intérêt économique de pin d'Alep

Sur le plan écologique, le pin d'Alep est l'espèce forestière la plus importante dans les pays méditerranéens. Il est utilisé pour la plantation des sols dégradés, comme c'est le cas dans la « ceinture verte » du sud algérien **(Lahouati, 2000 ; Maestre et Cortina, 2004).**

La résine exsudée par le tronc de l'arbre de pin d'Alep donne deux produits essentiels qui sont l'essence de térébenthine et la colophane ou brai, Ces deux produits peuvent à leurs tours être transformés en produits dérivés. L'essence de térébenthine se trouvent principalement dans les peintures, les vernis et de nombreux détergents, et leurs dérivés permettent également la production de composés utilisés dans la parfumerie et les formulations de parfums. La colophane est principalement utilisée dans la fabrication d'adhésifs, de colle, de papier et d'encres d'imprimerie **(Venet, 1986).**

Les bourgeons de pin, très résineux, ont aussi une utilisation médicinale, comme balsamiques et diurétiques, transformés notamment en sirops et pastilles **(Zenzen, 2016).**

Le bois de *Pinus halepensis* Mill. peut être utilisé, après élimination de la résine, pour la fabrication de la pâte à papier **(Nahal, 1962).** Il est utilisé pour la confection de caisses et des charpentes, c'est aussi un bon bois de chauffage. Il était utilisé par les scieurs pour faire de la palette et de l'emballage (où la production fruitière est importante) et notamment des carrelets, pièces d'assemblage de cageots utilisant largement du bois déroulé **(Bedel, 1986).**

Grâce à sa richesse en acide gras, vitamine E, polyphénols et antioxydants naturelles Le pin est utilisé aussi dans le domaine cosmétique. Les grains de pin sont utilisés dans le domaine agroalimentaire (la pâtisserie) **(Cheikh – Rouhou *et al.*, 2006).**

I.8 Les propriétés thérapeutiques et usage traditionnel

L'huile essentielle riche en pinène qui se trouve dans Les rameaux feuillés de *Pinus halepensis* est considérée comme un puissant antiseptique apprécié en cas d'affections respiratoires, dépuratifs en décoction, balsamique et amère (appréciés alors en cas d'inflammation intestinale**) (Boullard, 2001).**

L'huile de pin est utilisée en :

- Aromathérapie dans les massages de la peau.
- Soulagement de problèmes gastro-intestinaux comme les ulcères de l'estomac.
- Un stimulant de l'absorption des protéines.
- Un produit naturel dans le traitement des maladies cardio-vasculaires.

Aussi elle contient des antioxydants qui sont bénéfiques à l'organisme tout en entier **(Kadri, 2013).**

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 (**Kızılarslan et Sevgi, 2013).**

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 **(Dahham *et al,* 2015).**

Plusieurs études ont révélé la présence des vitamines, oligoéléments, métabolites primaires et secondaires douées d'activités biologiques intéressantes dans les différentes parties de *Pinus halepensis* Mill.

I.9 Les propriétés pharmacologiques de Pin d'Alep

Plusieurs études pharmacologiques ont confirmé que *Pinus halepensis* Mill. présente un large éventail d'activités biologiques associées à sa composition chimique.

I.9.1 Activité anti-cancéreuse

L'effet anti-métastatique de l'acides palmitique qui se trouve en pourcentage élevé dans l'huile essentiel de pin d'Alep été étudié sur des lignées cellulaires U-87 MG, le résultat obtenu montre une activité inhibitrice significative sur la prolifération cellulaire et la progression du cycle cellulaire **(Nasri *et al.*, 2005 ; G. Rigane *et al.*, 2016 ; Ghazghazi *et al.*, 2020).**

I. 9.2 Activité antibactérienne

L'activité antibactérienne de l'huile essentielle de *P. Halepensis* a été déterminée contre six souches de référence, les résultats ont révélé que l'huile essentielle de P. halepensis possède des effets inhibiteurs remarquable sur tous les microorganismes testés mais les souches les plus sensibles sont Staphylococcus aureus, Listeria monocytogenes, Proteus mirabilis, l'effet antibactérien est probablement lié à la richesse de cette huile essentielle en β-caryophyllène **(Dahham *et al,* 2015).**

I.9.3 Activité antifongique

Des études ont montré que les huiles essentielles de *Pinus halepensis* Mill. ont un effet fongicide contre *l'Aspergillus flavus*, *l'Aspergillus Niger, le Fusarium oxysporum, le Rhizopus stolonifer*. **(Abi–ayad *et al.*, 2011).**

L'étude de Ghanmi *et al***,** (2007), ont montré le pouvoir antifongique de l'essence de térébenthine contre les micro-organismes connus pour leurs fréquences élevées à contaminer les denrées alimentaires et pour leur pathogénicité. L'efficacité de l'essence de térébenthine est due à sa richesse en pinènes.

I.9.4 Activité hépato et néphroprotectrice

L'effet protecteur de l'huile essentiel de pin d'Alep sur les effets indésirables induit par l'administration de l'aspirine a été étudié par Bouzenna *et al* (2016), les résultats montre une diminution des paramètres biochimiques hépatiques (glucose, cholestérols, ASAT, ALAT, LDH) et rénaux (créatine, protéine, urée) par rapport au groupe témoin traité seulement par l'aspirine.

L'histopathologie de foie et des reins des rats traités par l'huile essentielle de *Pinus halepensis*, révèlent que l'architecture cellulaire normale a été retenue par rapport au groupe témoin, confirmant ainsi l'effet protecteur important de cette huile essentielle contre la toxicité induite par l'aspirine **(Bouzenna *et al*., 2016) .**

I.9.5 Activité neuroprotectrice

La maladie neurodégénérative la plus répandue est la démence d'Alzheimer, elle est caractérisée par les dépôts du peptide β-amyloïde qui conduit à une déficience de la mémoire et à la neurodégénération. Le traitement par l'huile essentielle de *Pinus halepensis* donne une diminution significative de l'action d'AchE et réduit le dépôt du peptide β-amyloïde **(Postu *et al.*, 2019).**

I.9.6 Activité antioxydante

Une activité protectrice contre les dommages de l'ADN pourrait être attribuée à la présence de puissants antioxydants dans les extraits et les composés phénoliques de pin d'Alep **(Meziti *et al.*, 2019).**

I .9.7Activité anti-inflammatoire

L'extrait aqueux de l'écorce de *Pinus halepensis* riche en agent anti-oxydants (polyphénols) y compris principalement les procyanidines et les acides phénoliques **(Zoumpliou *et al*., 2014),** diminue ou inhibe les dommages inflammatoires de la peau causés par le rayonnement UV / et les rayons X (**Petri *et al,* 2012 ; Orazio *et al,* 2013 ; Dimaki *et al* ,2019).**

II La Cytogénétique

La cytogénétique est l'étude des phénomènes génétiques au niveau de la cellule, c'est-à-dire au niveau des chromosomes sans la nécessité d'extraire l'ADN. Elle fait le lien entre la cytologie et la génétique.

La cytogénétique est l'une de nombreuses disciplines sur lesquelles s'appuie l'amélioration des plantes. Elle participe à la connaissance du matériel végétal utilisé (Nombre de chromosomes, polyploïdie) et l'exploitation de la variabilité intraspécifique **(Jahier *et al.*, 1992).**

Les premiers travaux chez les végétaux ont débuté au cours de la seconde moitié du XIXe siècle mais c'est surtout à partir de 1920 que la cytogénétique s'est développée et son importance n'a cessé de croitre par la suite. La cytogénétique est d'abord une science d'investigation, Elle participe à :

- La compréhension des mécanismes héréditaires et la nouvelle classification du monde végétale (taxonomie et phylogénie).
- Dénombrement de chromosomes matériel végétal utilisé.
- L'établissement des cartes génétiques, L'exploitation de la variabilité intra spécifique, interspécifique ou induite et l'amélioration des plantes **(Jahier *et al.*, 1992).**

Le matériel d'étude est constitué de graines, de plantes ou de tissus germés dans des cultures in vitro placées dans des conditions permettant une croissance rapide. Le prélèvement des tissus a lieu au moment où le pourcentage de cellules en division (index mitotique) est élevé **(Jahier *et al.*, 1992).**

II.1 Caryotype

Le caryotype est un examen cytogénétique permettant d'étudier l'ensemble des caractères des chromosomes d'un individu. Il permet d'obtenir une image des chromosomes, en microscopie optique d'une cellule en métaphase. Toutes les cellules d'un individu, qu'il soit animal ou végétal, possèdent le même caryotype (à l'exception des cellules reproductrices). Chaque espèce est caractérisée par un nombre précis de chromosomes.

L'étude de la structure du génome des pins a été entravée par leurs grands génomes et leurs caryotypes uniformes. Par conséquent, notre compréhension de l'organisation du génome et des changements évolutifs dans différents groupes de pins est extrêmement limitée. Cependant, il existe maintenant des techniques qui permettent de surmonter ces difficultés **(Qing Cai, 2006).**

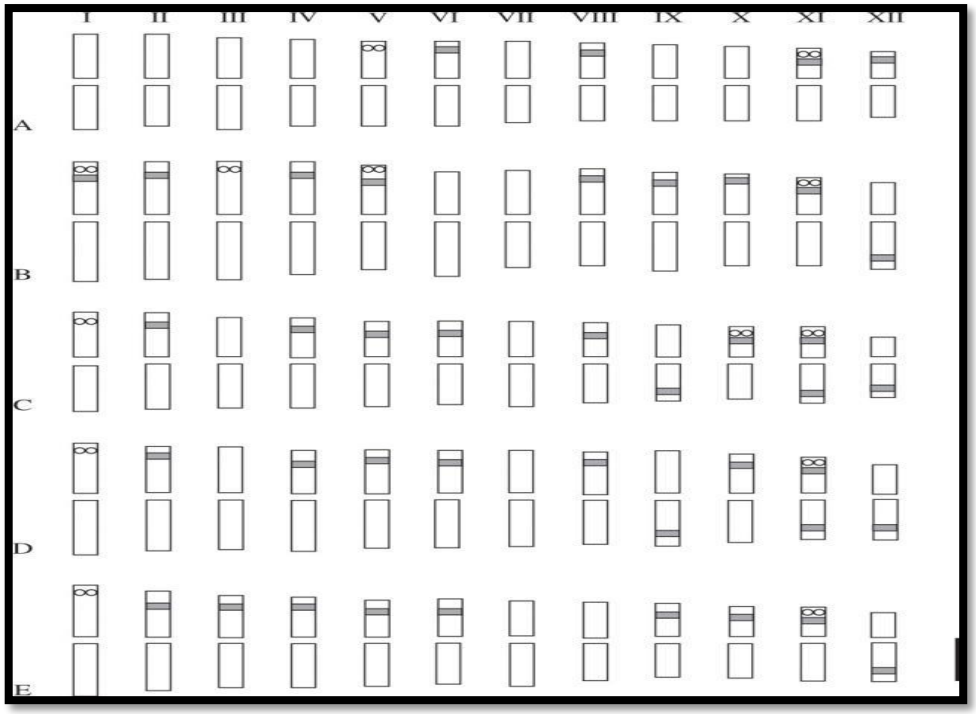

Figure 8: *Idéogramme de (A) P.bungeana (B) P.koraiensis ,(c) P.armandii. (D) P.wallichiana and (E) P. strobus* **(Qing Cai,2006).**

II.2 Notion génétique

II.2.1 La chromatine

La chromatine est la structure dans laquelle l'ADN est empaqueté et condensé en un volume limité dans le noyau des cellules eucaryotes.

La chromatine est composée d'ADN, d'ARN et d'une combinaison de deux protéines. Histones et non histones.

En dehors des divisions cellulaires l'Acide DésoxyriboNucléique (ADN) est sous la forme de chromatine interphasique. A l'aide de colorants, on peut visualiser des zones de couleur plus

ou moins intense sur les chromosomes, reflétant le degré de compaction de la chromatine **(Harry, 2001).** On distingue :

a) L'euchromatine (chromatine diffuse)

Elle est constituée de chromatine décondensée durant l'interphase ce qui permet la transcription des séquences codantes qu'elle contient.

b) L'hétérochromatine (chromatine condensée)

Elle correspond à une zone fortement colorée qui reste condensée dans le noyau cellulaire durant l'interphase. On distingue deux types d'hétérochromatine : hétérochromatine constitutive et hétérochromatine facultative **(Anthony et al., 2002 ; Harry, 2001; Dorkeld, 1994) .**

- **L'hétérochromatine facultative**

Elle correspond à un état de condensation non permanent entraînant l'inactivation des séquences codantes impliquées. (Différences dans le comportement de deux chromosomes homologues).

- **L'hétérochromatine constitutive**

Elle représente, à l'inverse, un état de condensation permanent de certaines zones, affectant les deux chromosomes homologues. Elle est composée des séquences d'ADN moyennement ou hautement répétées riches en paires de bases GC et AT et se trouve dans des régions spécifiques notamment au niveau des centromères et des télomères **(Harry, 2001) (Fig9)** .

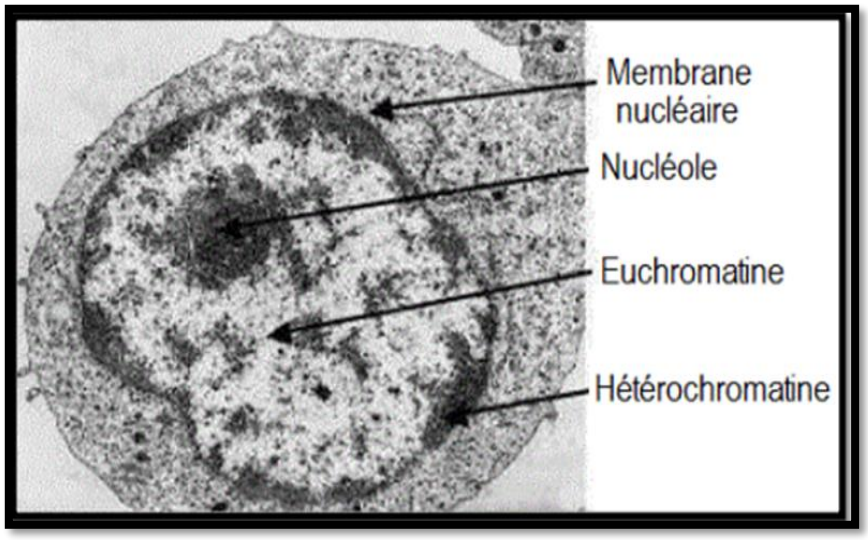

Figure9:Scéma représente les états de la chromatine

II.2.2Taille du génome

La taille du génome haploïde, exprimée en paires de bases (pb) ou en masse d'ADN (pg), varie fortement entre les espèces forestières, les gymnospermes (10-100,109 pb) et les angiospermes (0,2-1,109 pb).

Les grandes tailles de génome ne sont pas nécessairement caractéristiques des arbres forestiers ou des gymnospermes, car on trouve également de grands génomes chez les angiospermes **(Prat *et al.*, 2006).**

La taille du génome présente des variations interspécifiques. Des variations importantes ont été décrites dans différentes publications pour la même espèce.

La taille peut également être considérée comme un facteur de régulation de l'activité mitotique et de la taille des cellules **(Cavalier-Smith, 1978).** Cela signifie que les variations observées peuvent avoir une signification adaptative aux facteurs environnementaux, Donc, la taille du génome semble fluctuer en fonction du tissu, de l'âge de l'arbre, de la date de prélèvement pour un même tissu végétal aussi bien pour des cellules interphasiques que pour des cellules en mitose **(Prat *et al.*, 2006).**

II.2.3Les Chromosomes

Les chromosomes par définition, sont le support de matériel génétique, support de l'hérédité et de l'organisation de la vie cellulaire. Ils sont constitués d'ADN associé à des protéines formant la chromatine.

Chaque chromosome porte une zone de constriction primaire dénommée centromère ; c'est le point de liaison des deux chromatides sœurs.

Les segments chromosomiques situés de part et d'autre du centromère constituent les deux bras du chromosome.

La position de centromère permet de distinguer un bras court ou proximal (bras p) et un bras long ou distal (bras q) **(Anthony *et al.*, 2002).** Si le bras court (bras p) est presque aussi long que le bras long (bras q), le chromosome est dit métacentrique, s'il est nettement plus court, le chromosome est dit submétacentrique. Si ce bras p est très petit, le chromosome est dit acrocentrique. **(Fig 10) (De Robertis EDP et De Robertis EMF, 1983).**

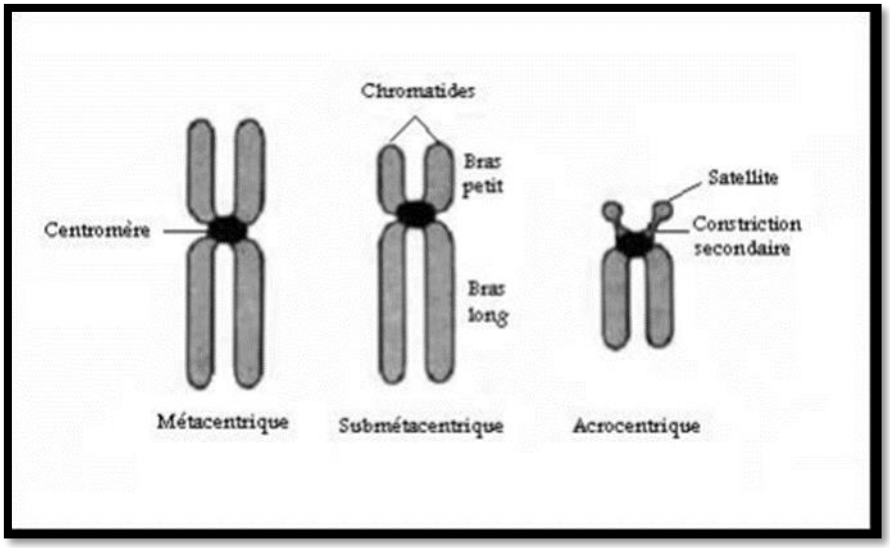

Figure 10 : Présentation schématiques des différents types de chromosomes humains **(De Robertis EDP et De Robertis EMF, 1983).**

Les chromosomes sont des structures visibles à certains moments du cycle cellulaire. Pendent l'interphase, la plupart des régions chromosomiques sont plutôt très étirées ; ce qui permet aux gènes de s'exprimer **(Swynghedauw, 2008).**

II.2.4 Le cycle cellulaire

Le cycle cellulaire est l'ensemble des étapes qui constituent et délimitent la vie d'une cellule **(Vincent, 2007).** Avant la division cellulaire, une cellule doit duplique son contenu, notamment son ADN, ces phénomènes se produisent au cours de l'interphase. L'alternance de la mitose et de l'interphase est qualifiée de cycle cellulaire **(Jorde *et al* ., 2004) .**

- ✓ **Différentes phases du cycle cellulaire :**
- ➢ **L'interphase**

L'interphase est la période comprise entre la fin d'une division et le début de la division suivante : elle correspond, en général, à la plus grande partie du cycle **(Maillet, 2006).** L'interphase se décompose en 3 phases : G1, S, G2.

a) <u>Phase G1</u>

G vient d'un mot anglais "GAP" (intervalle) correspond à l'intervalle qui sépare la fin de mitose et de début de la synthèse de l'ADN. Au cours de cette étape, la cellule synthétisée des molécules des d'ARN **(Maillet, 2006).**

Lors de cette phase la cellule synthétise de l'ARN et des protéines (phase de croissance et de reconstitution des réserves) **(Swynghdauw 2008).**

Cette dernière joue un rôle important dans la régulation du cycle cellulaire, la cellule s'engage de façon irréversible dans le passage de la phase G a la phase S **(Maillet, 2006).**

L'interphase se décompose en 3 phases : G1, S, G2.

b) Phase G1

G vient d'un mot anglais "GAP" (intervalle) correspond à l'intervalle qui sépare la fin de mitose et le début de la synthèse de l'ADN. Au cours de cette étape, la cellule synthétise des molécules d'ARN **(Maillet, 2006).**

Lors de cette phase la cellule synthétise de l'ARN et des protéines (phase de croissance et de reconstitution des réserves). (Swynghdauw, 2008).

Cette dernière joue un rôle important dans la régulation du cycle cellulaire, la cellule s'engage de façon irréversible dans le passage de la phase G a la phase S **(Maillet, 2006).**

c) Phase S

Pendant cette phase on a :

- La réplication de la totalité de l'ADN grâce à l'ARN polymérase.
- La transcription de beaucoup d'ARNm codant pour les protéines d'histones qui seront utilisées pour compacter la molécule d'ADN **(Ghorbal, 2011).**

d) Phase G2

C'est une phase Qui précède la mitose, la cellule continue l'activité transcriptionnelle pour la synthèse des substrats nécessaires à la mitose **(Vincent, 2007).**

La croissance de la cellule est terminée, mais elle continuera à remplir ses fonctions. Cette phase se termine en passant le point de contrôle G2, où la mitose commence (**Jorde *et al.*, 2004).**

- **La phase M (mitose)**

La division cellulaire renferme : une division nucléaire (caryocinèse) ; une division cytoplasmique (cytodiérèse) **(Karp, 1998) .**

- **Caryocinèse**

Elle comprend cinq phases :

a) La prophase :

Est la première phase de la mitose, elle est caractérisée par :

- Une condensation des chromosomes dans le noyau dont l'enveloppe existe en cours.
- Les chromosomes sont constitués par l'association de deux chromatides **(Swynghdauw, 2008).**
- L'organisation des microtubules en fuseau tendu entre les deux centrosomes qui migrent vers chacun des pôles nucléaires.

La prophase prépare la réplication des chromosomes (durées 15 à 30 min) **(Maillet, 2008).**

b) La prométaphase

Cette phase est caractérisée par :

- La rupture de l'enveloppe nucléaire.
- La pénétration des microtubules kinétochoriens et polaires dans la « zone nucléaire » (Swynghdauw, 2008).

c) La métaphase

Formation de la plaque équatoriale : l'ensemble des chromosomes clivés, ainsi rangés, forme une figure appelée plaque équatoriale **(Maillet, 2008).**

d) L'anaphases

Répartition des chromosomes en deux lots identiques, elle est caractérisée par :

- L'allongement des microtubules polaires.
- Le raccourcissement des microtubules kinétochoriens.
- La migration des chromosomes vers les pôles mitotiques **(Ghorbal, 2011) .**

e) La télophase

Pendant cette phase on observe un arrêt de migration des chromosomes vers les poêles et La disparition du fuseau.

Lors de télophase les chromosomes se condensent et la formation de deux noyaux –fils (chacun avec 2n) du noyau initial. La cytokine finale va donner deux cellules filles **(Swynghedauw, 2008).**

- **La cytodiérèse** : (cytocinèse)

Chez la cellule végétale, la cytodiérèse est très différente de par la présence d'une paroi rigide (divisée en paroi primaire, cellulosique et paroi primitive, l'ensemble forment une paroi pectocellulosique) (**Mabuchi, 1986).**

La nouvelle paroi cellulaire se forme à partir du centre (phragmoplaste) et scinde la cellule en deux à deux cellules filles parfaitement identiques. **(Samouelian *et al.*, 2009).**

II.3 Techniques de cytogénétiques classiques

Depuis plus de 50 ans La cytogénétique classique est utilisée dans les laboratoires de recherches, elle est considérée comme une technique principale dans les laboratoires de cellules souches pour évaluer la stabilité génétique des cultures des cellules souches

II.3.1 Coloration de Feulgen :

Cette technique a été utilisée par le chimiste allemand Robert Feulgen, en 1924, elle assure la coloration des chromosomes pour l'observation microscopique,

La coloration de Feulgen est basée sur la dissociation des deux brin d'ADN avec de l'acide chlorhydrique et les colorer ensuite avec de la fuschine.

Les bandes colorées qui apparaissent ensuite, correspondent aux gènes, tandis que les bandes claires correspondent aux régions intergéniques **(Crèvecoeur, 2022).**

II.3.2 Coloration de Giemsa :

Les colorations au Giemsa sont actuellement appliquées en plusieurs domaines **(Wittekind, 1983 ; Barcia, 2007; Horobin, 2011)**, Généralement, l'ADN chromatinien condensé (dans les noyaux et les chromosomes) apparait en couleur violette (magenta), tandis que le cytoplasme basophile et les nucléoles contenant de l'ARN apparaissent en bleu (Wittekind, 1979 ; Horobin et Walter, 1987).

II.4 La cytogénétique moléculaire :

La cytogénétique moléculaire est une nouvelle technique morphologique, c'est une combinaison des outils de la biologie moléculaire et de la cytogénétique **(Nouha *et al.*, 2000).**

Parmi les techniques utilisées actuellement est l'hybridation in situ fluorescente (FISH, de l'anglais fluorescence in situ hybridization) et Fluorochrome binding.

- **Hybridation in situ (Fluorescent In Situ Hybridisation : FISH)** :

L'hybridation in situ permet l'étude de la localisation histologique ou cellulaire de l'expression génique et de son activité. La détection de séquences d'acides nucléiques par hybridation in situ dans les plantes à une variété d'applications, notamment :

- Analyse du caryotype et de ses anomalies
- Analyse de la structure et de l'évolution du génome
- Étude de l'expression des gènes et localisation des séquences introduites dans les plantes transformées **(Schwarzacher et Heslop-Harrison, 2000).**

Cette technique comporte 3 étapes :

1. Dénaturation de l'ADN de la cible chromosomique et de l'ADN de la sonde si cette dernière est sous forme double brin.
2. Hybridation de la sonde sur l'ADN cible.
3. La révélation de l'hybridation qui peut être directe ou indirecte et à la contre-coloration du support, c'est-à-dire les chromosomes ou les noyaux interphasiques.

La sonde hybridée avec la cible est révélée par un signal fluorescent **(Wilkinson DG1994)**

.

Le matériel le plus utilisé dans la FISH pour le caryotype (cartographie physique) des plantes sont les séquences ADNr 5S et 25S répétées en tandem, et qui sont spécifiquement répété près des télomères et centromères **(Kato et al., 2005).**

La FISH permet d'estimer le nombre de copies de gènes ribosomiques de ces séquences, ce qui fait d'elle une technique qualitative et quantitative **(Fig 11).**

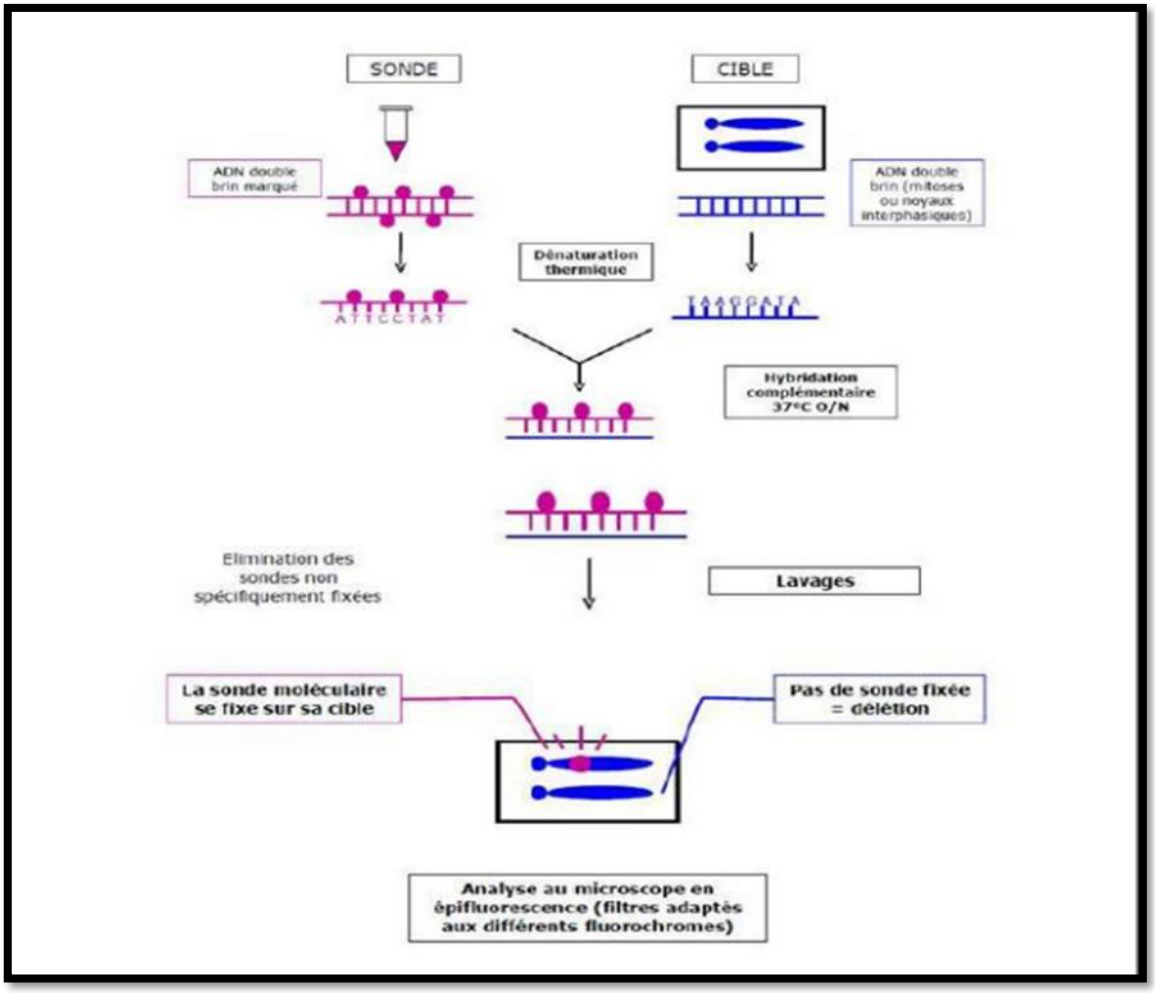

Figure 11: Principe de l'Hybridation In Situ en Fluorescence (FISH) **(Cordier-Courel, 2010).**

- **Le fluorochrome banding**

Les chromosomes représentent des différentes régions et une variation considérable de taille et de contenue en ADN, et leur composition en bases, riche ou pauvre en gènes ceux-là ont un pourcentage élevé en GC et AT respectivement. Une application des colorations et le binding est nécessaire pour marquer ces différentes régions qui se disposent différemment sur les chromosomes, et établir le caryogramme qui est une représentation de la totalité des bandes chromosomiques **(Siljak-Yakovlev et al., 2013)**.

Les bandes reflètent les changements dans la structure longitudinale des chromatides et aident à distinguer plus précisément les chromosomes.

Les colorants spécifiques de l'ADN pour faire apparaitre sur les chromosomes mitotiques sont :

✓ **Chromomycine A3** :

C'est un colorant à l'origine anticorps qui se lient préférentiellement aux régions d'ADN riches en GC, produisant une forte fluorescence à l'hétérochromatine riche en GC. **(Summer, 1994).**

✓ **DAPI :**

Di-Amino-Phénil-Indol colore les régions riches en séquence AT il est utilisé dans cette technique pour le marquage de l'hétérochromatine constitutive non spécifique **(Benblkacem, 2011).**

Établissement de caryogrammes

Chaque espèce possède un complément chromosomique caractéristique qu'on appelle caryotype, qui représente « l'aspect phénotypique des chromosomes somatique **» (Levitzky, 1931).** C'est le plus haut niveau d'organisation structurelle et fonctionnelle du génome nucléaire.

Jahier,a noté la possibilité de l'obtention d'un caryotype par cellule sous forme de dessin ou de photographie de chaque paire chromosomique. L'ensemble de ces caryotypes permet de réaliser une carte d'identité chromosomique ou caryogramme .

Ce dernier peut être recherchée pour :

- L'acquisition d'un nouveau critère de classification.
- L'étude des remaniements chromosomiques.

L'établissement d'un caryograme repose sur l'analyse d'un minimum de15 à 20 plaques métaphasiques complètes présentant des chromosomes bien étales et très nets.

Partie expérimentale

Matériels & Méthodes

III Matériels et méthodes

III.1 Origine géographique de l'espèce étudiée

L'espèce du Pin d' Alep a été récoltée dans wilaya de Bouira au niveau des régions d'Ain El Turk et Tikjda **(Fig 12).**

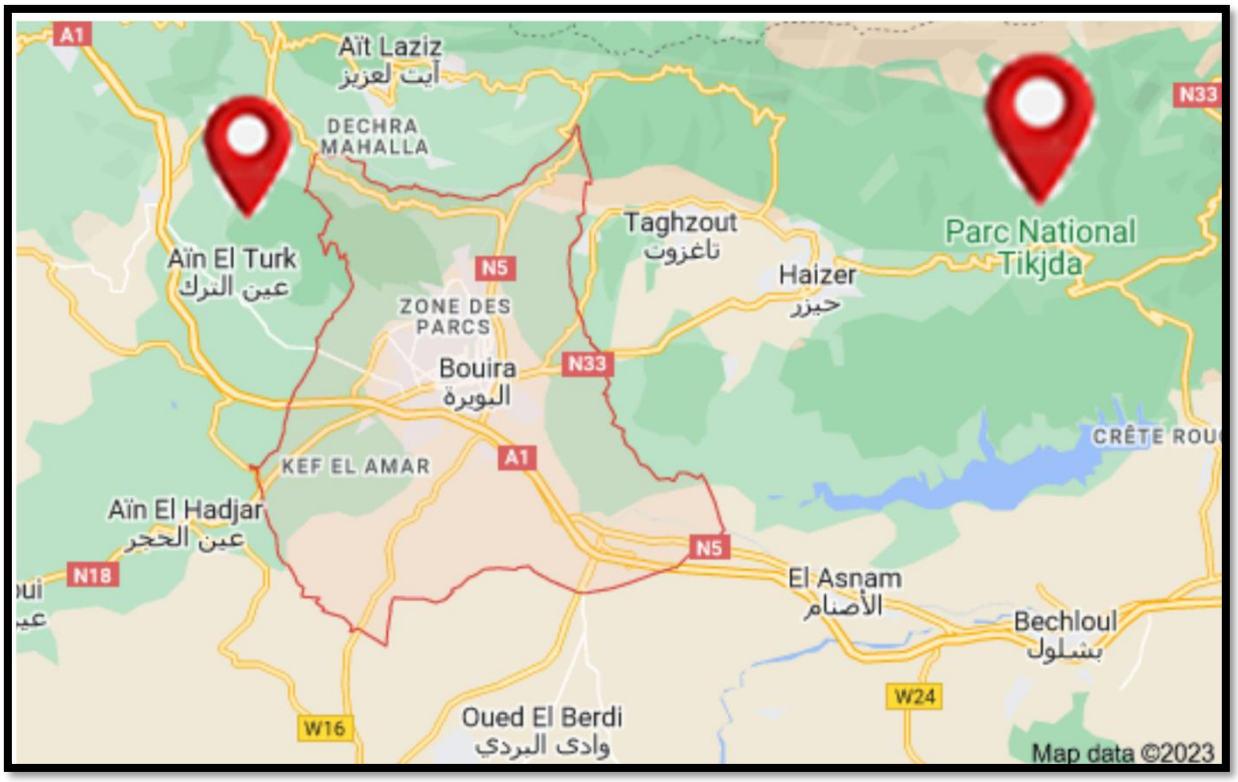

Figure 12 : Répartition géographique du pin d'Alep dans la région de bouira (36° 22' 48" Nord, 3° 54' 5" Est, Map data 2023) .

III.2 Récolte des cônes du Pin

La récupération des cônes du pin d'Alep a été effectuée dans la wilaya de Bouira, au niveau des régions d'Ain El Turk et Tikjda le 03\2022.

Les cônes récoltés sont des cônes dont les écailles ne se sont pas complètement ouvertes, car l'ouverture signifie probablement la libération de graines.

III.4 Récupération des graines

Les graines de pin d'Alep ont été collectées à partir de cônes étalés sur une surface sèche et exposée au soleil et stockés dans des bouteilles contenant de la silice et des étiquettes avec les informations appropriées **(Fig13).**

Figure 13 : Graines de pin d'Alep.

.

III.5 Mise à germination des graines

Les études préliminaires pour L'optimisation du protocole cytogénétique du pin d'Alep commencent dès le stade de la germination des graines. Ce protocole de germination a été inspiré par Nedjimi *et al*.2014 et modifié.

La réalisation de l'expérimentation a été effectuée sur des graines du pin d'Alep qui ont été désinfecté par un séjour de 10 minutes dans une solution d'hypochlorite de sodium à 9%, suivi de 3 rinçages à l'eau distillée stérile. Après la désinfection, les graines ont été exposé à des prétraitements dans le but de faciliter leur germination :

- Un trempage des graines dans l'eau à une température ambiante dans flacon pendant 24h **(Fig14).**

- Un trempage des graines dans l'eau à une température ambiante dans un flacon pendant 48h **(Fig14).**

- Un trempage des graines dans l'eau à une température ambiante dans un flacon pendant 72 h **(Fig 14).**

  •Scarification manuelle : les graines ont été limées jusqu'à ce que la couleur change et trempées dans l'eau pendant 24 heures **(Fig14).**
- Des graines témoins qui n'ont été subi aucune traitement (mise en germination directe).

Figure 14: Trempage des graines du pin d'Alep (**A** : pendant 24h), (**B** : pendant 48h), (**C** : pendant 72h), (**D** : scarification et trempage pendant 24h).

Les graines ont été mises à germer, par lot de 100 graines pour le témoin et pour chaque prétraitement. Les tests ont été effectués dans des boîtes de Pétri stériles à raison de 25 graines/ boîtes, soit 4 répétitions par traitement, sur un papier absorbant imbibé quotidiennement avec 2 ml d'eau distillée.

Lot 1 : graines témoins réparties en quatre boîtes en raison de 25 graines pour chaque boîtes **(Fig 15).**

Lot 2 : Graines qui ont subi une scarification avec trempage dans l'eau pendant 24h répartie en quatre boites en raison de 25 graines pour chaque boite **(Fig 15).**

Lot 3 : graines qui ont subi un trempage dans l'eau pendant 24h réparties en quatre boîtes en raison de 25 graines pour chaque boîte **(Fig 15).**.

Lot 4 : graines qui ont subi un trempage dans l'eau pendant 48h répartie en quatre boîtes en raison de 25 graines pour chaque boîte **(Fig 15).**

Lot 5 : graines qui ont subi un trempage dans l'eau pendant 72h réparties en quatre boîtes en raison de 25 graines pour chaque boîte **(Fig 15).**

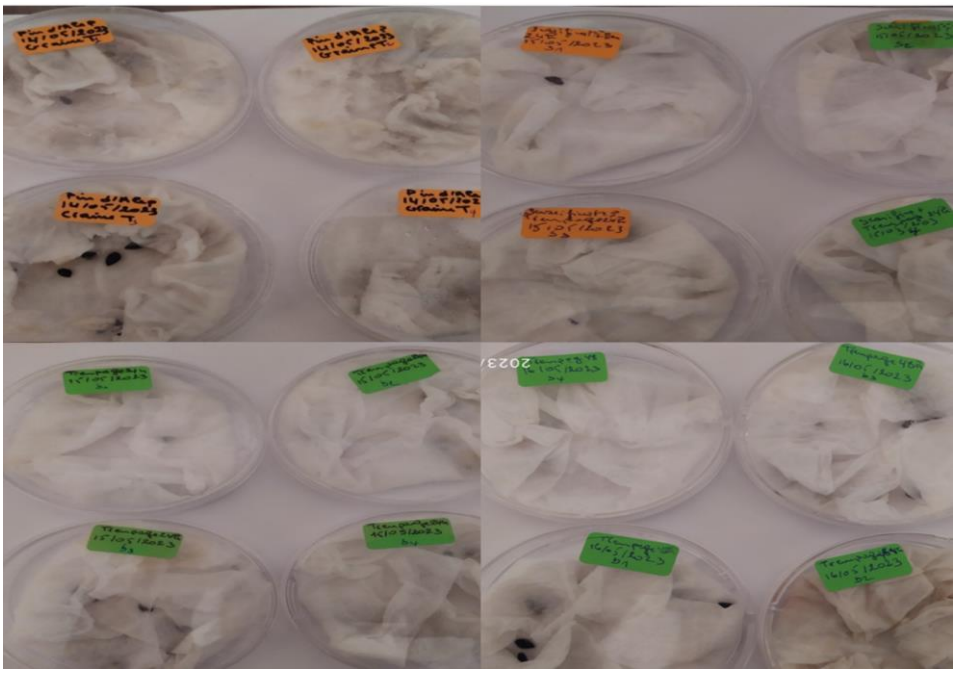

Figure 15: Les différents lots de graines de pin d'Alep.

La durée de l'expérience prise est de 20 jours, pendant laquelle on a compté quotidiennement le nombre de graines germées. L'apparition d'une radicule de 1 mm environ a été utilisée comme critère de germination.

Les paramètres de germination retenus à la fin de l'expérience sont le taux et la vitesse de germination. Le taux de germination a été calculé en utilisant la relation suivante :

Le taux de germination (%) = (a)/(b) x 100.

a : nombre des semences germées.

b : nombre total des semences.

Les résultats sont soumis à une analyse de la variance (ANOVA), à un seul facteur de variation.

III.6. Etude cytogénétique

III.6.1 Etude de la mitose

Prétraitement

Pour bloquer les divisions cellulaires, les racines de longueur comprise entre 1 et 1.5 cm, sont prélevées et plongées dans une solution de colchicine (0.5%) pendant 10min à l'obscurité et à une température ambiante.

La fixation des racines se fait dans un fixateur de type Carnoy II à base de 6 volumes d'éthanol, 3 volumes de chloroforme et 1 volume d'acide acétique **(Löve et Löve, 1975 ., Jahier *et al*., 1992),** qui assure la conservation du matériel végétale pour une longue période à (4 °C, à l'obscurité).

a) Préparation des échantillons

À l'aide d'un scalpel on a coupé environ 1cm de racine ensuite on a mis le matériel sur une lame bien propre **(Fig16**).

b) L'hydrolyse

Les pointes racinaires ont été recouvertes d'une goutte d'HCl (1N) dans un intervalle de température et pendant un temps variable pour déterminer le la température et le temps convenant le mieux au matériel étudié. (**Fig16**).

L'utilisation de l'hydrolyse a permis de ramollir la paroi cellulaire pour une observation plus claire du cytoplasme.

c) Préparation du colorant et coloration des échantillons

La coloration a été effectuée par l'orcéine lacto propionique. La préparation de ce dernier se fait selon Dyer (1963) et modifié selon Löve et Löve (1975).

Dans un grand erlenmeyer, nous avons dessous 2g d'orcéine dans 23ml d'acide propionique et 23ml d'acide lactique, ensuite on a ajouté de l'eau distillée jusqu'à 100ml avec agitation .la solution obtenue a été soumise à une filtration. Ainsi, le colorant obtenue se conserve longtemps dans un flacon en verre fumé.

La coloration des chromosomes améliore leur visibilité et facilite la séparation des cellules.

Après élimination de l'HCl avec du papier filtre, on a ajouté une goutte d'orcéine lacto propionique .

d) Ecrasement

Apres l'élimination de l'excès de colorant à l'aide du papier filtre, La préparation est recouverte d'une lamelle et écrasée doucement en tapotant à l'aide d'une tige de seringue afin d'écraser la coiffe et faire sortir les cellules mères en prenant soin que la lamelle ne se déplace et ne se casse pas.

e) Observation

L'observation des mitoses est réalisée sous microscope optique (Optica B-353A) (Figure28). Les cellules de la coiffe écrasée sont détectées à l'aide d'un objectif à faible grossissement (X 10) puis au grossissement (X 40). Le grossissement (X 100), nous a permis de bien visualiser les différentes phases de la division cellulaire **(Fig 16)**

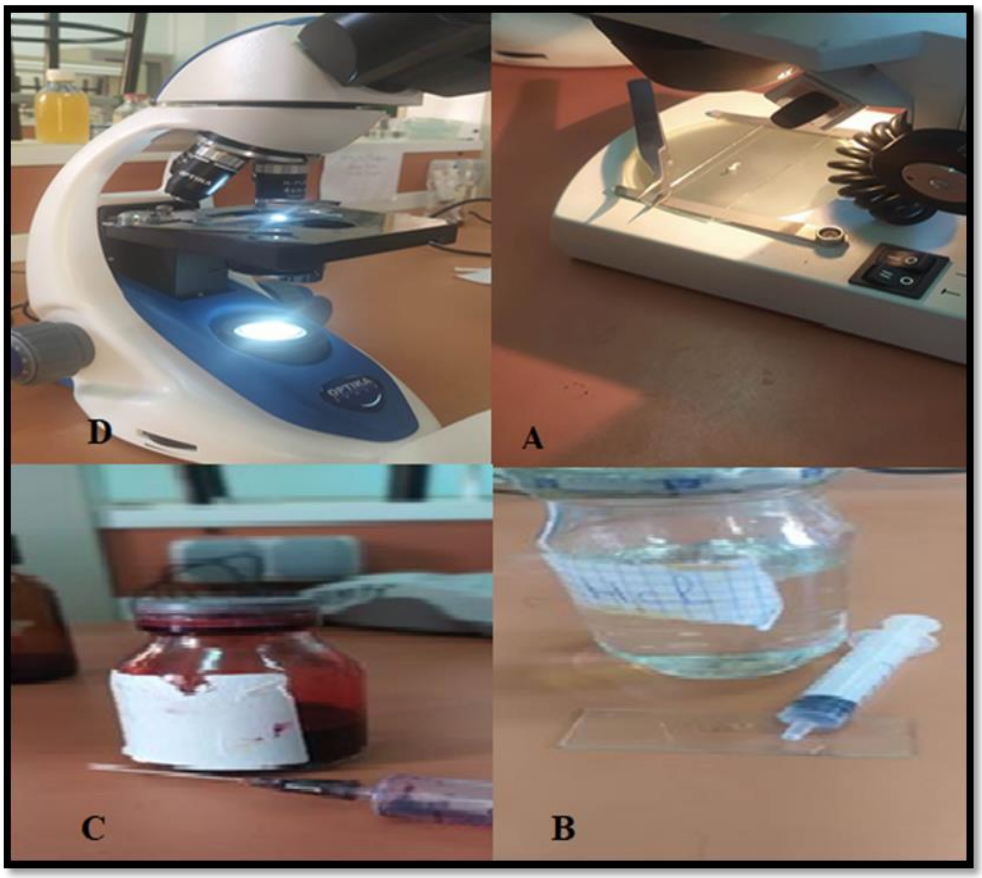

Figure 16: matériel utilisé durant l'expérimentation cytogénétique. A: coupure de la coiffe racinaire sous la loupe binoculaire microscope optique B ; Hydrolyse par l'HCL:, C : coloration avec l'orceine, D : observation microscopique.

Les préparations réussies sont conservées en appliquant du vernis à ongles transparent sur les bords de la lamelle avec les informations adéquate.

Résultats & Discussion

IV. Résultats et discussion

IV.1 Résultats

IV.1.1 Germination

Les études réalisées sur l'effet des différentes durées de trempage dans l'eau sur l'évolution du taux de germination des graines de pin d'Alep montrent un taux de germination égale à 32% pour les graines témoins. Les taux de germination pour les graines qui ont subi les prétraitements suivants : une scarification avec trempage 24 h, un trempage dans l'eau pendant 24 h, un trempage dans l'eau pendant 48 h sont respectivement 35% 39% 49%, Tandis que, la germination atteint son maximum, soit 59% pour les graines qui ont subi un trempage dans l'eau pendant 72 h **(Fig 17).**

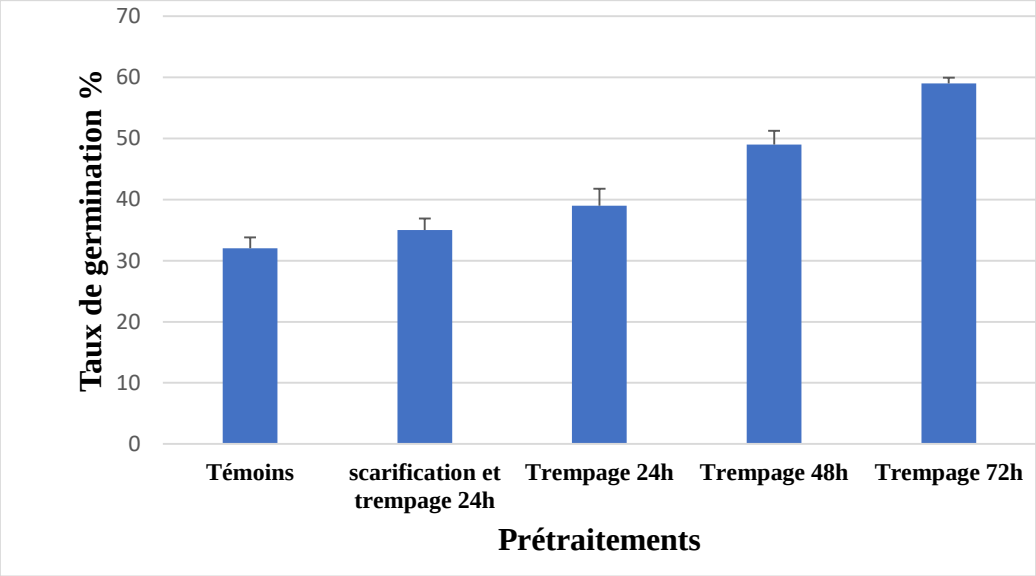

Figure 17 : Effet des différents prétraitements sur le taux de germination des graines de pin d'Alep au 20^{e} jour. Les barres représentent la moyenne avec écart type (n=4 répétitions).

Statistiquement l'analyse de la variance montre qu'il existe un effet significatif ($\rho < 0.05$) des différents prétraitements sur le taux de germination.

Les résultats obtenus montrent que 4 % des graines qui ont subi une scarification et trempage dans l'eau pendant 24h et 72h ont germé dès le 1e jour, tous les autres prétraitements présentent la même allure, la germination commence dès le 5ème jour, à l'exception des graines témoins la germination commence dès le 6ème jour, puis suit une progression jusqu'à la fin de l'expérience. Aux 20e jour, les taux de germination sont de 32 %, 35 %, 39% 49% et 59% respectivement pour le témoin, S et T 24 h, T24 h, T48 h, T72 h **(Fig25).**

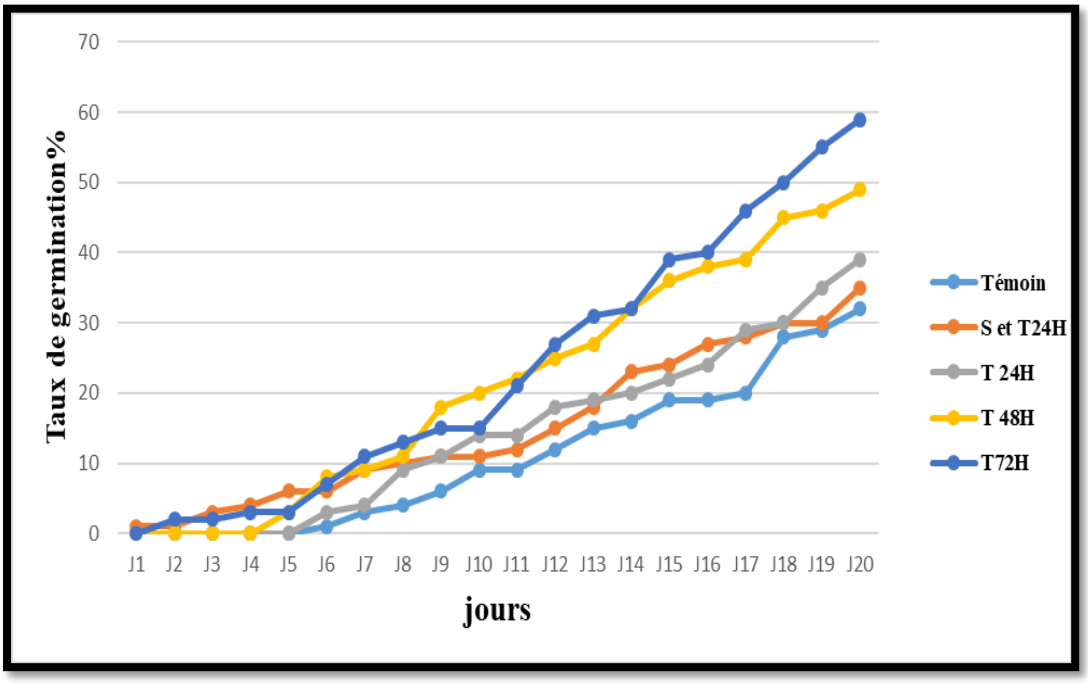

Figure18 : Effet des différents prétraitements sur la vitesse de germination des graines du pin d'Alep (*n*=4 répétitions).

IV.1.2 Cytogénétique du Pin d'Alep

A) Etudes préliminaire sur l'optimisation du protocole cytogénétique du pin d'Alep

1. Détermination de l'intervalle des températures

Les résultats obtenus de l'étude de l'effet des variations de température de l'hydrolyse sur la clarté des lames et le nombre de cellules en division sont représentés dans le tableau II et la figure 19.

Tableau II: représente l'effet de la variation de la température de l'hydrolyse sur le nombre de cellules en division.

T C°	(0_10)	(15_25)	(30-40)	(45-55)	(60-70)
Moyenne de nombre de Cellules	**28**	**61,66**	**75,33**	**36,33**	**5,33**

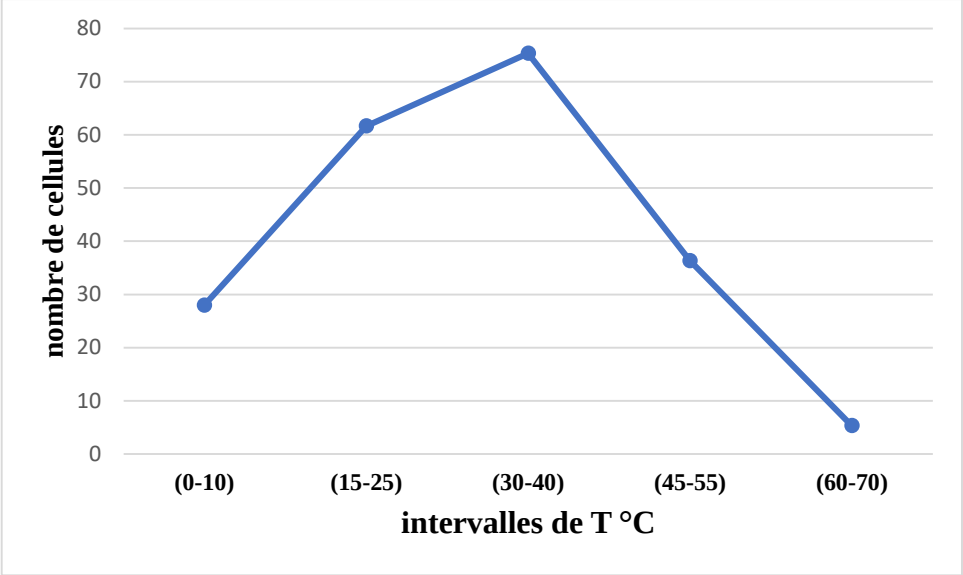

Figure19 : Graphe représentatif de l'effet de la variation de la température de l'hydrolyse sur le nombre de cellules en division présentées dans une lame.

Le graphe montre l'effet des variations de température de l'hydrolyse sur le nombre des cellules en division, la moyenne des nombres de cellules en état mitotique qui ont été enregistrées dans l'intervalle de (0-10) °C égale à 28 **(Fig19)**, Ce changement de température cause un changement du nombre de cellules jusqu'à ce qu'un nombre maximum soient enregistré à l'intervalle de (30-40) °C, la moyenne des cellules dans cet intervalle est égale à 75,33. Au-dessus de cet intervalle de température, nous avons constaté que le nombre de cellules en division diminuait avec l'augmentation de la température jusqu'à ce que le nombre de cellules atteigne 0 à 70 °C (**Fig20),(Fig21)**

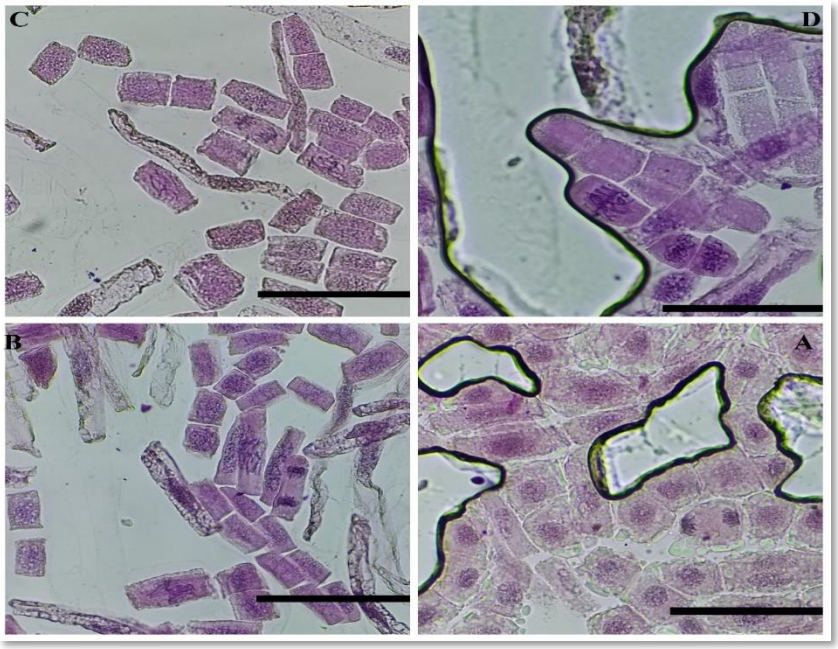

Figure20 : L'effet des variations de température sur le nombre et la visibilité des cellules en divisions. A : (0_10) °C, B(15-25) : , C : (30-40) °C , D (45-55) °C. (Grossissement X40 Echelle : 10µm.

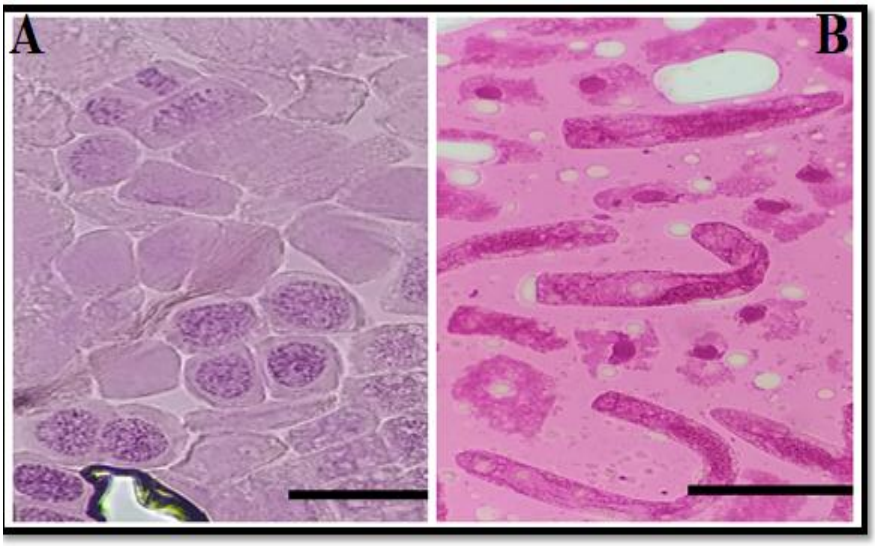

Figure 21: L'effet des variations de température sur le nombre et la visibilité des cellules en divisions. A :60 °C et B :70 °C Grossissement X40, Echelle : 10µm

2. Détermination de l'intervalle de temps de l'hydrolyse

Les résultats obtenus de l'étude de l'effet des variations de temps de l'hydrolyse sur la clarté des lames et le nombre de cellules en division sont représentés dans le tableau 04et la figure **22.**

TableauIII : représente l'effet des variations de temps de l'hydrolyse sur le nombre des cellules en division.

Temps en min	(0-4)	(6-10)	(12-16)	(18-22)
Moyenne des cellules	16,66	31,33	18,66	4,66

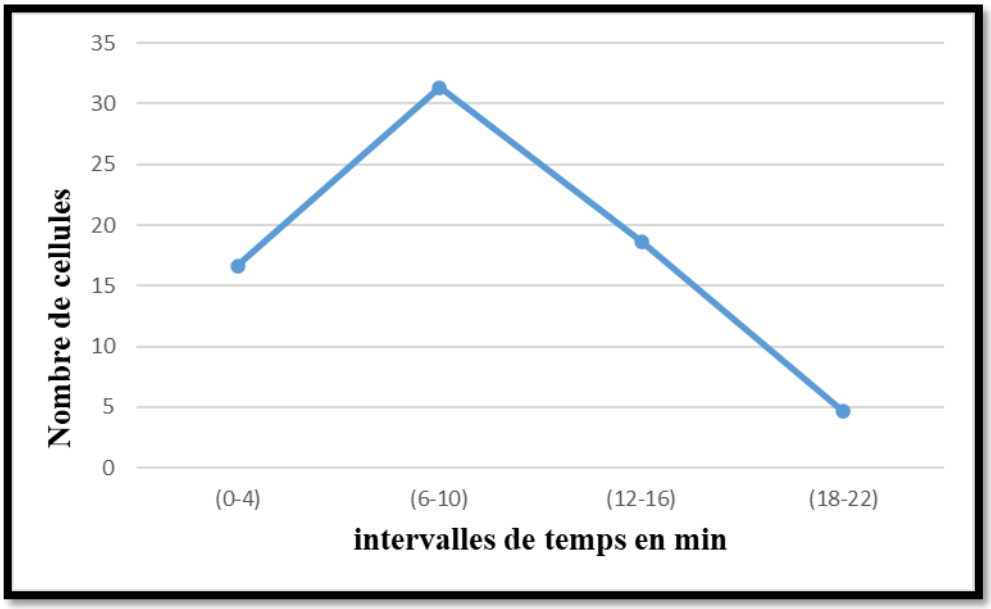

Figure 22: Graphe représente l'effet de la variation de temps de l'hydrolyse sur le nombre de cellules en division.

L'étude de l'effet de variation de temps de l'hydrolyse sur le nombre calculé des cellules qui sont dans l'état de division montre que les cellules à l'état mitotique n'ont pas été visualisées lorsque temps égal à 0 min**.** A l'intervalle de (0-4) min la moyenne de cellules en division est égale à 16,66 **(Fig 22**). La clarté des lames et le nombre des cellules en division augmente avec l'allongement de temps de l'hydrolyse **(Fig 23)**, atteignant un nombre maximal dans l'intervalle de (6-10) min avec une moyenne égale à 31,33 . Au-dessus de 10 min et dans l'intervalle (12-16) et (18-22) min la moyenne des cellules en division est égale à 18,66 et 4,66 respectivement.

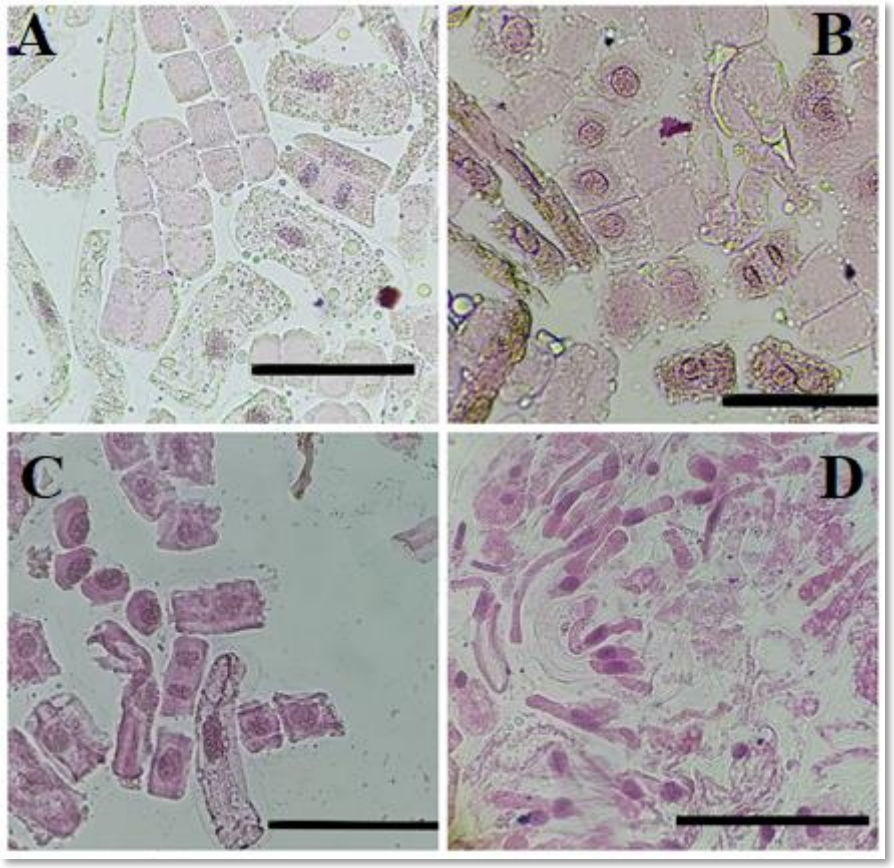

Figure23: L'effet des variations de temps de l'hydrolyse sur le nombre et la visibilité des cellules en division :A(0-4)min ,B((6-10)min,C(12-16)min,D (18-22)min Grossissement X40, Echelle : 10µm

3 .Détermination de l'intervalle de temps de la coloration

Les résultats obtenus dans l'étude de l'effet des variations de temps de la coloration sur le nombre de cellules en division et la netteté des lames colorées sont présentés dans le tableau suivant :

Tableau IV : l'effet de la variation de temps de coloration sur le nombre de cellules en division

t en min	0	2	4	6	8	10	12	14	16	18	20	22
N de cellules	0	10	43	38	25	15	10	3	4	5	2	0

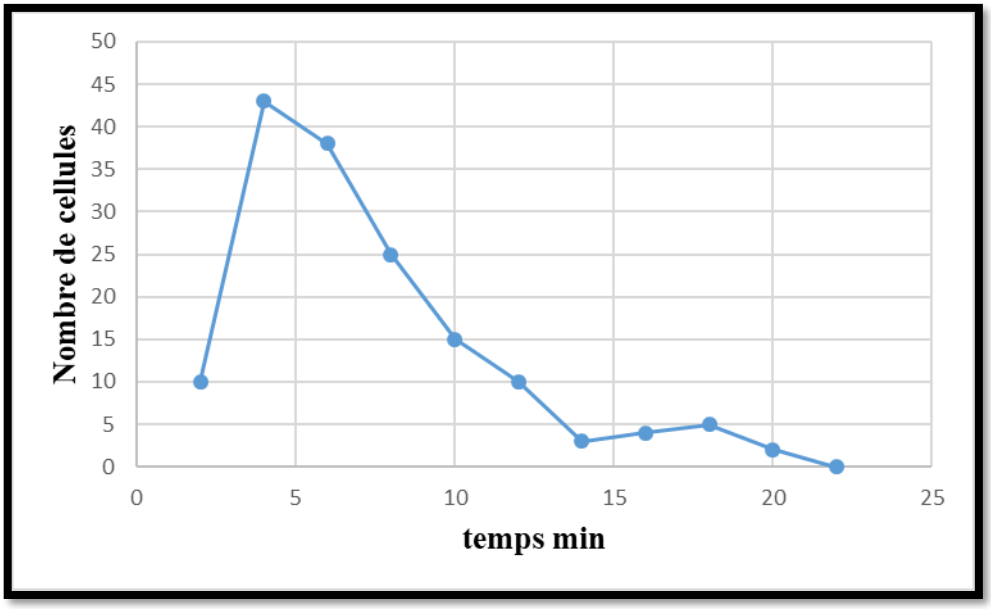

Figure 24: Graphe représente l'effet de la variation de temps de coloration sur le nombre de cellules en division.

L'analyse des résultats obtenus montre que les cellules en division ont été observés lorsque t est égal à 2 min avec un nombre de 10 cellules **(Fig 24)** atteignant un nombre maximal de 43 cellules à t égale 4min. avec l'allongement de temps de la coloration on a enregistré une difficultés d'observation et de comptage des cellules en état mitotique atteignant un nombre minimal de 2 cellules à t égale 20 min **(Fig 25).**

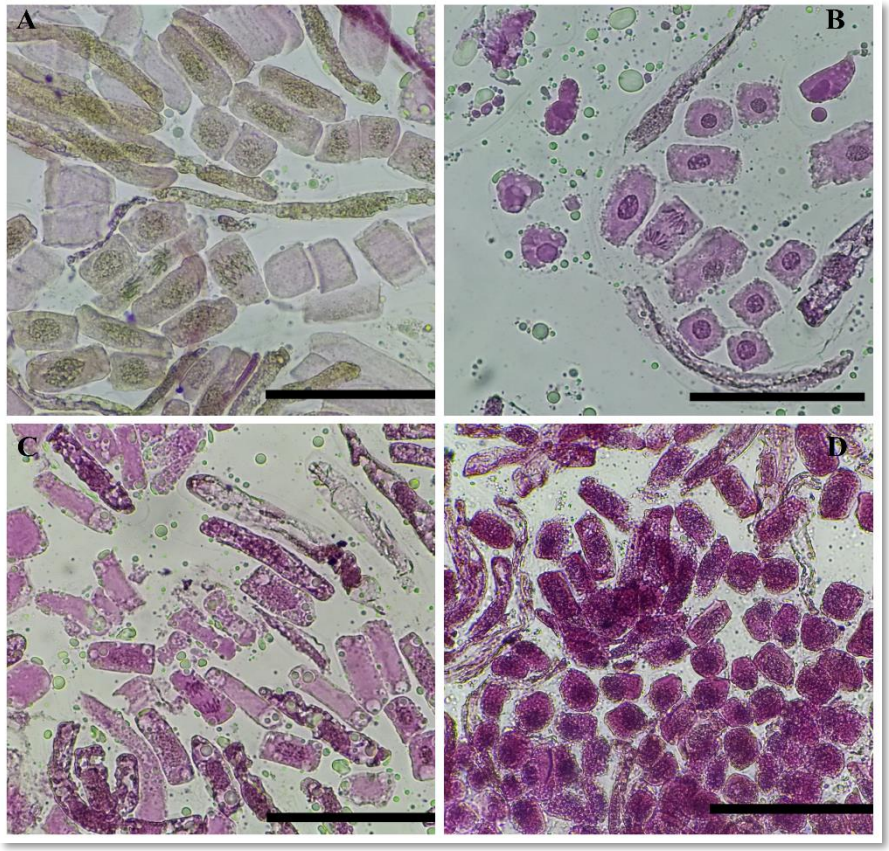

Figure 25 : L'effet des variations de temps de la coloration sur le nombre et la visibilité des cellules en division :A :4 min ,B :8 min, C : 14 min ,D : 22)min Grossissement X40,Echelle : 10µm.

B) Analyse de la mitose

L'analyse de la mitose portée sur les méristèmes racinaires de graines germées du Pin d'Alep a montré une séparation insuffisante des chromosomes, ce qui a rendu le comptage des chromosomes difficile.

Les différents stades de la mitose **(Fig 26) :**

A) Prophase, B) Metaphase, C) Anaphase ,D)Telophase.

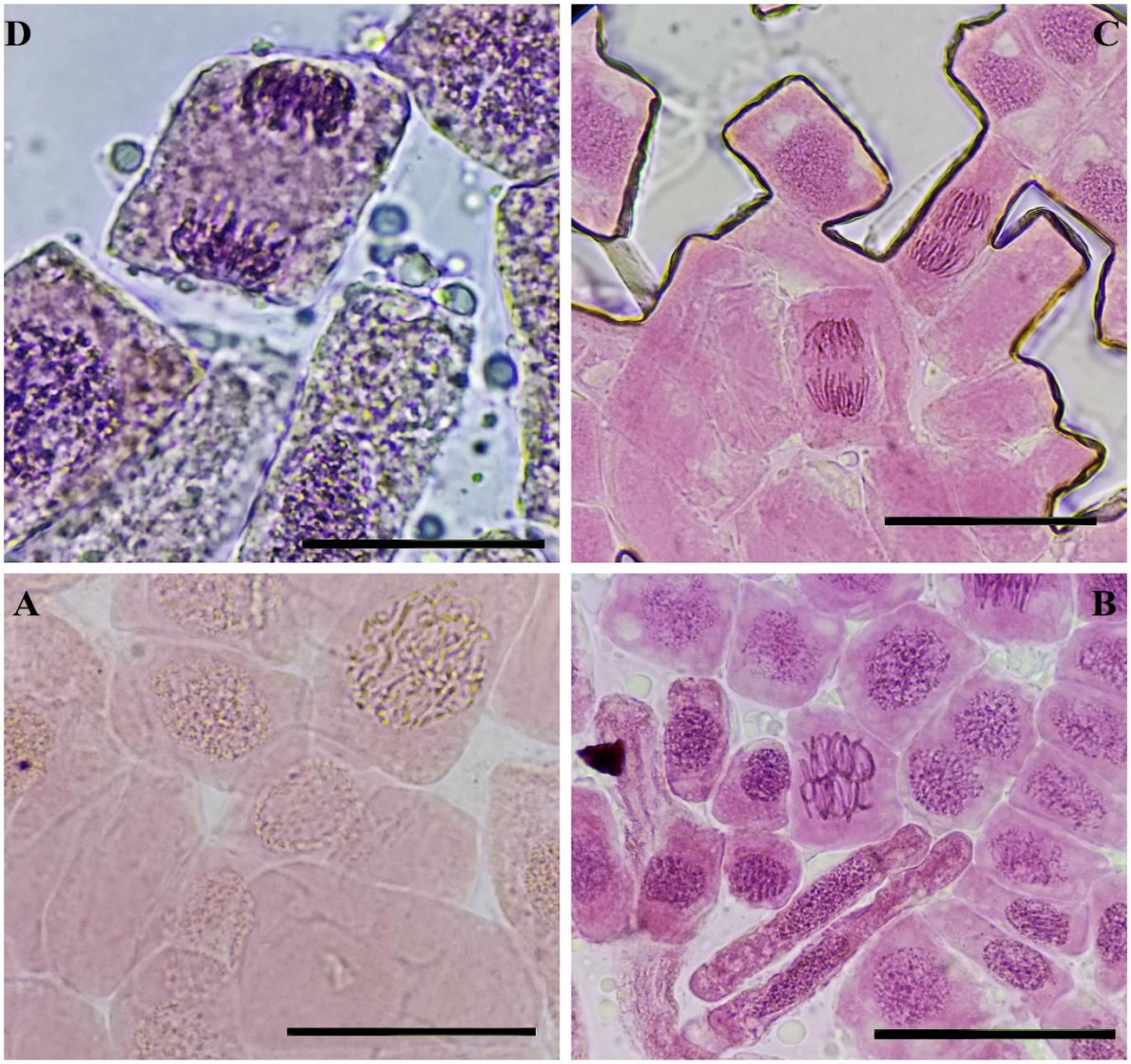

Figure26: Les différentes phases des divisions cellulaires chez le pin d'Alep. A : Prophase, B : Métaphase, C : Anaphase, D : Télophase. (Grossissement X100) Echelle : 10µm.

IV.2 Discussions

IV.2.1Germination

Les principaux résultats obtenus dans le présent travail sur la germination des graines de pin d'Alep, montrent que le trempage des graines dans l'eau pendant 72h a permis d'obtenir le taux de germination le plus élevé par rapport aux autres prétraitements. En effet, ces derniers ont germé avec un taux de 59 %. En revanche les graines qui ont subi une scarification avec trempage dans l'eau pdt 24 h et les graines trempés dans l'eau pendant 24h et 48h ont donné un taux de germination de 35% ,39%et 49% respectivement. Cependant, une différence significative a été observée entre le taux de germination des graines prétraitées dans l'eau et celui des graines non traitées. Le séjour des graines dans l'eau a probablement ramolli les enveloppes des graines et a ainsi permis l'entrée d'eau et d'air et la libération de réserves, induisant la germination.

Ces résultats sont en accord avec Dantani et *al.*, 2019 qui ont noté que l'eau ambiante ramollit le tégument, l'un des traitements qui permettent à l'eau de pénétrer et d'induire la germination. Nos résultats sont aussi étayés par ceux de Falemara et *al.* 2013 qui ont rapporté que le trempage dans l'eau à température ambiante améliore la germination des graines d'arbres tropicaux. D'autre part Nedjmi . M. et Haddioui .,2014 ont enregistré un effet non négligeable pour le traitement des graines par l'eau chaude sur la germination de graines de pin d'Alep

L'effet de la scarification des graines a été nettement remarqué aussi sur la germination des graines par rapport aux graines témoin, ce qui confirme que la scarification manuelle joue un rôle important dans la levée des graines et la germination, notre résultat est en accord avec Toumi *et al.,* 2017 qui ont trouvé que la scarification des graines de *Robinia pseudoacacia* L. est nécessaire pour permettre l'absorption de l'eau par les semences et cela implique l'obtention un meilleur taux de germination .

L'obtention de 59% de germination est probablement dû aux conditions de stockage ou la période de la récolte des graines (graines jeune ou non).

IV.2.2 Etude cytogénétique

- **Détermination des intervalles des températures, de temps de l'hydrolyse et le temps de coloration**

Les essais préliminaires qui ont été effectué consistent à déterminer les meilleures conditions (température, temps de l'hydrolyse et la coloration) qui offre des plaques largement plus visibles et permettent de faire le comptage des cellules en phase mitotique en variant un paramètre et fixant les autres.

Grâce à notre étude, nous avons pu déterminer le champ de changement de température qui nous a permis d'obtenir des plaques et de cellules mère bien visibles Cet intervalle est défini entre 0 °C et 65 °C. Nous sommes arrivés à compter le maximum de cellules dans l'état de division à (30-40) °C.

Par rapport au temps d`hydrolyse par HCl les plaques claires obtenues sont comprises entre 2 et 22 min, l'HCL hydrolyse le ciment pectique qui relie les parois cellulaires : cela va faciliter la dissociation des cellules.

Ces résultats sont en même lignes avec les travaux de OUAFI, (2009) sur trois espèces de Medicago où elle a enregistré que la coloration à l'orceine combinée à une durée d'hydrolyse de 7 minutes offre des plaques largement plus visibles avec un très bon contraste par rapport au réactif de schiff combiné à trois durées d'hydrolyse (7, 10 et 15 minutes).

Les résultats de l'étude des modifications du temps et la durée de la coloration, montrent que dans l'intervalle de 2min à 14 min les plaques sont claires et visibles. Au-dessus de 14 min on a trouvé des difficultés de faire le comptage des cellules en état mitotique, les plaques sont compactes et les cellules ne sont pas visibles.

Selon Bollen, (1949) la durée de la coloration par la solution de l'orciene pouvait être allongée sans inconvénient jusqu'à 10 minutes, mais qu'à partir de 15 minutes, les colorations nucléaires étaient plus pâles et plus irrégulières pour finir par disparaître complètement.

Bollen, (1949) montre qu'il existe une relation entre l'hydrolyse et la coloration et elle a conclu que l'action de l'acide chlorhydrique n'affecte pas seulement la dissociation des méristèmes radiculaires mais aussi il intervient, à chaud, dans la coloration, en affinant les images de noyaux et surtout de chromosomes, mais il ne faut

pas trop prolonger cette action chlorhydrique à chaud, pour ne pas perdre toute image nucléaire.

- **Analyse des mitoses**

Les études sur les cellules du pin d'Alep en phases mitotiques ont montré que le comptage était difficile car les chromosomes étaient mal séparés. Selon Pederick (1966)., Mergen, Burley, (1964) le chromosome métacentrique était probablement la raison principale de ces difficultés.

Selon Masahiro, (1988) la morphologie des chromosomes a été examinée de façon déficiente, car les chromosomes des Pinacées sont relativement grands et nombreux, et difficile de comparer les caryotypes obtenus avec différentes techniques par différents auteurs. Par conséquent, il pourrait être nécessaire de révéler les relations phylogénétiques entre les genres et les espèces dans les Pinacées par rapport à la morphologie chromosomique observée par la même technique cytologique.

Les résultats de ce travail ont été obtenu en utilisant une technique classique de la cytogénétique, cette technique était modifiée au cours du travail, l'imprécision et la modification des techniques au cours des manipulations peuvent être la cause de l'obtention des chromosomes déformés et longs et à de faibles indices mitotiques, ce qu'il est noté par Nkongolo et Klimaszewska1994 ; Nkongolo et Klimaszewska 1995 ; Nkongolo 1996 ; Nkongolo1999 ; Islam-Faridi et *al* 2007 ; Nkongolo, 2012) que le manque de précision du caryotypage des conifères dans les études précédentes a été attribué principalement à l'utilisation de techniques inappropriée entraînant des chromosomes déformés et longs et à de faibles indices mitotiques .

Sax (1933), et Khoshoo (1961**)** sont les premiers qui ont décrit les caryotypes de diverses espèces de conifères. Ils ont découvert que les espèces de genre Pinus étaient diploïdes avec 24 chromosomes (2n = 2x = 24). Les compléments chromosomiques sont généralement composés de 10 ou 11 paires de grands chromosomes métacentriques et une ou deux paires de plus petits chromosomes submétacentriques **Saylor , (1983).**

Conclusion

Conclusion

L’objectif principal de ce travail était de réaliser des études préliminaires pour déterminer les conditions optimales dont le but est la création d’un protocole cytogénétique spécifique au pin d’Alep.

L’étude de la germination montre que le trempage des graines dans l’eau distillée pendant 72 h augmente le taux et la vitesse de germination, ce prétraitement aide à ramollir le tégument de la graine ce qui favorise la levée des graines et induire la germination.

L’analyse des résultats de la phase mitotique portée sur les méristèmes racinaires des graines germées de *Pinus halepensis* Mill. a donné dans la plupart des cas une séparation insuffisante des chromosomes à la métaphase, ce qui a rendu le comptage des chromosomes presque impossible. Toutes les phases de la mitose ont été observées.

Grâce à notre étude, nous avons pu déterminer le champ de variation de température, de temps de l’hydrolyse et le temps de la coloration qui nous a permis d'obtenir des plaques et de cellules mère bien visible, ces intervalles sont (0 -65 °C), (2-20min),(2-20min) respectivement .

Conclusion

Perspectives

Il serait fort intéressant que cette étude sera poursuivie car la continuité de ce travail peut ouvrir plusieurs axes de recherche :

- Utiliser d'autres prétraitements pour augmenter le taux et la vitesse de germination de cette espèce.
- Réaliser d'autres essais et répétitions pour confirmer ces résultats.
- Utiliser des logiciels pour déterminer les conditions optimales pour faire une optimisation du protocole cytogénétique de cette espèce.
- Des études moléculaires sont fortement recommandées afin de connaitre le devenir de cette espèce dans notre région.

Références bibiographiques

A

Abi – Ayad, M., Abi – Ayad, F.Z., Lazzouni, H.A., Rebiahi ,S.A., Ziani Cherif,C., Bessierre ,J.M. (2011). Chemical composition and antifungal activity of Aleppo pine essential oil. Journal of Medicinal Plants Research 5, pp. 5433 – 5436.

Abbas, H., Barbero, M., Loisel R., Quézel P. (1985)**.** Les forêts de pin d'Alep dans le sud-est méditerranéen français. Analyses écodendrométriques, première partie. Forêt Méditerranéenne, 7 (1) : 35-42.

Alice Bollen. (1949). Essais de coloration de préparations par l'orcéine acétique, Bulletin de la Société Botanique de France, 96:4-6, 105-106, DOI:10.1080/00378941.1949.10837585

Alice Bollen .(1949). Rôle de l'acide chlorhydrique dans les colorations par l'orcéine acétique, Bulletin de la Société Botanique de France, 96:4-6, 110-111, DOI:

10.1080/00378941.1949.10837588

Anthony Griffiths, J. F., David Suzuki, T., Chrystelle, S. (2002). Introduction à l'analyse génétique. De Boeck Université. Paris. 87p.

B

Bariteau, M., (1992). Variabilité géographique et adaptation aux contraintes du milieu Méditerranéen des pins de la section Halepensis : résultats (provisoires) d'un essai en plantation comparative en France. Ann. Sci. Forest, 49: 261-276.

Barcia, J.J. (2007). The Giemsa stain: its history and applications. Int J Surg Pathol 15:292–296p.

Bedel, J. (1986). Aménagement et gestion des peuplements de Pinus halepensis dans la zone méditerranéenne française. Options méditerranéennes. Série d'étude CIHEAM 86/1. 127-156.

Benblkacem, S. (2011). Contribution à l'étude cytogénétique de l'espèce Bellevalia Mauritanica Pomel (*Hyacinthaceae*) endémique de l'Afrique du nord. Mémoire Magister en génétique et amélioration des plantes option: génomique et techniques avancées des végétaux. Université Mentouri, Constantine, Algérie, 47p.

Bentouati, A. (2006). Croissance, productivité et aménagement des forêts de Pin d'Alep (Pinus halepensis Mill) du massif de Ouled Yagoub (Khenchela- Aurès). Thèse de doctorat. Université de Batna. 9-116 p.

Bernard Swynghedauw., Jean-Sébastien Silvestre. (2008). Biologie et génétique moléculaires. 174 pages.

Brochiero, F., Chandioux, O., Ripert ,C., Vennetier, M. (1999). Autécologie et croissance du pin d'Alep en Provence calcaire. Forêt méditerranéenne, XX (2) : 215-224.

Boullard (2001). Plantes médicinales du monde Croyances et réalités. Ed. Stem, 638 p.

Boudy P. (1950). Economie forestière Nord-Africaine, tome 2 (Monographie et traitement des essences forestières). Edit. Larose, Paris, France.

Bouzena, H., Noura, S., Etaya, A., Sakhria, M., Zied, T, Ilhem ,R., Abdelfattah, E., Héléne, T., Najla, H. (2016), protective effects of *Pinus halpensis* L. essential oil on aspirin- induced Acute Liver and Kidney damage in Female Wistar Albino Rats, journal of oleo science .12, pp.1171-3000.

C

Cavalier-Smith.(1978). Nuclear volume control by nucleoskeletal DNA, selection for cell volume and cell growth rate, and the solution of the DNA C-value paradox, doi: 10.1242/jcs.34.1.247.

Camus, A., (1914) Les Cyprès (genre Cupressus) : Monographie, systématique, biologie, culture et principaux usages. Ed. Paul Le chevalier. Paris, 106p

Calamassi, R., Falusi, M., Tocci, A. (1984). Effet de la température et de la stratification sur la germination des semences de *Pinus halepensis* Mill. Silvaegenetica 33 (4-5): 133-139.

Cai ,Q., Zhang ,D., Liu Zhan-lin, Wang Xiao-ru.(2006). Chromosomal localization of 5S and 18S rDNA in five species of subgenus Strobus and their implications for genome evolution of *Pinus* ; Annals of Botany. 97(5): 715-722; 10.1093/aob/mcl030.

Cheikh- Rouhou, S., Hentati, B., Besbes, S., Blecke, C., Deroanne, C., Attia, H. (2006). Chemical composition and lipid fraction characteristics of Aleppo pine (*Pinus halepensis* Mill.) seeds cultivated in Tunisia. Food Science and Technology International, 15 (5): 407-415. https://doi.org/10.1177/1082013206069910.

Cordier-Courel, K. (2010). Techniques de cytogénétique moléculaire : de la FISH aux puces à ADN. Ed. Laboratoire CERBA. France. 44p.

Crèvecoeur, M. (2022). Mise en évidence de l'ADN sur coupe paraffine par la réaction de Feulgen.Disponiblesurhttps://www.unige.ch/sciences/biologie/bioveg/crevecoeur/competences/coloration-de-feulgen/ Cosulter le 30/05/2023.

D

Dantani, A., Mukhtar, R., Musa, A., Gupa, M., Wali B.(2019). Assessment of pre-sowing treatments on germination and early growth of tamarind (*Tamarindus indica* L.) in Kano State Nigeria. *South Asian Journal of Biological Research,* 3 : 18-27.

Dimaki, A., Kyriazi, M., Leonis, G., Sfiniadakis, I., Papaioannou, G.T.,Ioannou, E.,Roussis, V.,Rallis, M. (2019). Diabetic skin and UV light: Protection by antioxidants. Eur. J. Pharm. Sci. 127, pp.1–8.

De Robertis EDP et De Robertis EMF.(1983)., BIOLOGIA CELULAR Y MOLECULAR, Published by El Ateneo, Barcelona.

Dahham, S,S., Tabana ,Y.M., Iqbal, M.A ., Ahmed, M.B ., Ezzat, M.O ., Majid, A.S ., ***et al.*** (2015). The anticancer, antioxidant and antimicrobial properties of the sesquiterpene β-caryophyllene from the essential oil of Aquilaria crassna. Molecules ; 20, pp.11808-11829.

Djerrad, Z. (2016). Etude 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 pinèdes du semi-arides est algérien. Thèse doctorat en sciences de la nature. USTHB, Fac. Sc. Biol., Alger. 182p.

Dobignard et Chatelain ,(2012) ;Etat des lieux et perspectives de recherche sur la flore méditerranéenne d'Algérie et de Tunisie. DOI: 10.13140/RG.2.1.3954.6325

Dorkeld, F. (1994). Un modèle objet dédié à la cartographie comparée des génomes de mammifères. Thèse de Doctorat. Université Claude Bernard, Lyon.

F

Fekih, N. (2015). Propriétés chimiques et biologiques des huiles essentielles de trois espèces

du genre Pinus poussant en Algérie, Chimie. Université Abou-Bekr-Belkaid Tlemcen,

131p.

Falemara, B.C.,Nwadjike,C.,Obashola, E.O.,(2013).Germination response of baobab seeds (*Adansonia digitata* L.) as influenced by three pre-treatment techniques. Forest industry in a dynamic global environment ». *In* Fan (eds) : *Proceedings of the 35*th *Annual Conference of Forestry Association of Nigeria, Sokoto* : 44-55.

Francelet, A., (1970). Stimulation de l'ouverture des cônes de pins. Institut National de Recherches forestières Tunisien, Note technique, 13 : 2-3.

G

Gaussen, H., (1960). L**es** Gymnospermes actuelles et fossiles (Généralités, Genre Films). Fasc. VI, chap. XI, pp. 1-272.

Gerar Karp , (1998). Biologie cellulaire et moléculaire/concepts et exercices.

Gernandt D.S., Lopez G.G., Garcia S.O., Liston A., (2005**).** Phylogeny and classification of Pinus. Taxon. 54. 29-42.

Ghanmi ,M., A. El Abid, A. Chaouch, A. Aafi, M. Aberchane, A. El Alami & A. Farah, (2007). Étude du rendement et la composition de l'essence de térébenthine du Maroc : cas du pin maritime (*Pinus pinaster)* et du pin d'Alep (*Pinus halepensis*). Acta Bot. Gallica, 152, pp.3-10.

Ghazghazi ,H., Rigane ,G., El Aloui ,M., Taghouti ,I.(2020), Phytochemical Characterization of the Seed Oil of *Pinus Halepensis*, incredible/Innovation Network for Cork, Resin & Edibles, Tunisia, Kasserine, 3p.

Ghorbal, M. (2011). Biologie cellulaire histologie et embryologie. Ellipses, Paris.

G**iovanni,Caudulloa.,Erik,Welkb,c.,Jesús.,San-Miguel-Ayanz.**(2017).Data Article Chorological maps for the main European woody species; 2352-3409/&2017 Published by Elsevier Inc.

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, Ecole nationale supérieure d'agronomie, Alger. 156-167 p.

H

Harry, M. (2001). Génétique moléculaire et évolutive. Maloine. Paris. 15p.

Hizume, M. (1988) **.** Karyomorphological Studies in the Family *Pinaceae.*

Horobin, R.W., et Walter, K.J. (1987). Understanding Romanow skystaining. I: The Romanowsky-Giemsa effect in bloodsmears. Histochemistry 86:331–336p.

Horobin, R.W. (2011). How Romanowsky stains work and why valuable– including a proposed universal Romanowsky staining mechanism and a rational troubleshooting scheme. Biotech Histochem 86:36–51p.

I

Islam-Faridi, M.N., Nelson, C.D and Kubisiak, T.L. (2007). Reference karyotype and cytomolecular map for loblolly pine (*Pinustaeda* L.). Genome, **50**(2): 241–251. doi:10.1139/G06-153. PMID: 17546089.

J

Jahier, J., Chever, A.M., Eber, F., Delourne, R et Tanguy A.M. (1992) - Techniques de la cytogénétique végétale. Ed. INRA, Paris,183p.

Jacues brosse, (2003). Larousse des arbres dictionnaire des arbres et des arbustes, Edition Rustica/ FLER, N°de l'editeur ; 48396N1 (F12062). Paris, 325p.

Jahier, J., Chever, A.M., Eber, F., Delourne, R et Tanguy A.M. (1992) Techniques de la cytogénétique végétale. Ed. INRA, Paris,183p.

Jorde , L.,Cary ., Bomshad, M., Witer, R. (2004). Génétique médicale, Elsevier,

Paris.

Judd W.S., Campbell C.S., Kellog E.A., Stevens P. (2002). Relation phylogenetique entre les principaux groups de trachéophytes à l'exclusion des angiospermes « Spermatophytes non

angyospermes ». In : « Botanique système ». Ed. De Boeck. ISBN, Paris. ,152, pp.2-7445-0123-9.

K

Kadik, B. (1983). Contribution à l'étude du Pin d'Alep (*Pinus haiepensis* Mill.) en Algérie. Ecologie, dendrométrie, morphologie. O.P.U. Alger. 581 p.

Kadik, B. (1987). Contribution à l'étude du pin d'Alep (*Pinus halepensis* Mill) en Algérie :Ecologie, Dendrométrie, Morphologie. Office des publications universitaires (Alger). 585p.

Kadik, L. (2005). Etude phytosociologique et phytoécologique des formations à pin d'Alep (Pinus halepensis mill) de l'étage bioclimatique semi-aride algérien. Thèse doctorat en sciences de la nature. USTHB. Alger. 350p

Kadri, N., Khettal, B., Yahiaoui-Zaidi, R., Barragan-Montero, V., Montero, J.-L. (2013). Analysis of polar lipid fraction of *Pinus halepensis* Mill. seeds from North Algeria. Industrial Crops and Products 51: 116-122. https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2013.08.0.

Kato, A., Vega, J.M., Han, F., Lamb, J.C et Bricher, J.A. (2005). Advances in plant Chromosome identification and cytogenetic techniques, Current Opinion in Plant Biology. 8:148-154p.

Kızılarslan C, Sevgi E (2013). Ethnobotanical uses of genus Pinus L. (Pinaceae) in Turkey. Indian J Tradit Knowle. 12, pp.209-220.

Khoshoo, T.N. (1961). Chromosome numbers in gymnosperms. SilvaeGenet. 10: 1–9

Klorane Botanical Foundation. (2007). Guide des conifères et espèces apparentées.Fondation d'Entreprise pour la Protection et la Bonne Utilisation du Patrimoine Végéta .Europe, 68p.

L

Lahouati, R. (2000). Expérience des Plantations en Climat Aride. Cas de la Ceinture Verte en Algérie. Direction Générale des forêts, Ministère de l'Agriculture, Alger.

Letreuch_Belarouci , N., (1991) Les reboisements en Algérie et leurs perspectives d'avenir. 2 Tomes. Ed. OPU, Alger. 641 p.

Levitzky, G.A. (1931). The karyotype in systematics. Bulletin Of Applied Botany, Of Genetics And Plant-breeding, 27: 220–240.

Lieutaghi, P. (2004). Le Livre Des Arbres Arbustes & Arbrisseaux. Ed. ACTES. 1328 p.

Loisel, R. (1976). Place et rôle des espèces du genre *Pinus* dans la végétation du sud-est méditerranéen français. Ecologia Mediterranea, 10, 131-152.

Lopez G.G., Kamiya, K., Harada K., (2002). Phylogenetic relationships of Diploxylon pines (Subgenus Pinus) based on plastid sequence data. International Journal of Plant Sciences. 163. 737-747.

M

Mabuchi Issei,.(1986); Biochemical Aspects of Cytokinesis Volume 101, 1986, Pages 175-213.

Masahiro,H., Kazuo,T., Akio,T.(1988). Fluorescent chromosome banding in*Larix leptolepis* (Pinaceae) .

Maestre F., Cortina, J., Bautista, S., Bellot,J., (2003). Does Pinus halepensis facilitate the establishment of shrubs in Mediterranean semi-arid afforestations? Forest Ecology and Management. 176. 147-160.

Maestre ,F. T . , Cortina J . , (2004**).** Insights intro ecosystem composition and function in a sequence of degraded semiarid steppes. Restoration Ecology ,12, pp.494 -502 ;

Maire R., (1952). Flor de l'Afrique de Nord. Ed. Encyclopédie Biologique. Paris. 129-150p

Maillet, M., (2006). Biologie cellulaire. 10ème Ed., Masson, Paris

Maillet, M., (2008). Abrégé de cytologie. Masson, Paris.

Marion J., Poupon J., (1974). "Manuel pratique de reboisement" - Institut de Reboisement, Tunis, FAO/PNUD FO : SF/TUN 11, Rapport technique N° 2, 1974.

Mathieu, A., (1897). Flore forestière, 4° Ed., 705 p., Paris.

Meziti Hicham, Hamama Bouriche, Seoussen Kada, Ibrahim Demirtas, Murat Kizil, Abderrahmane Senator., (2019).Phytochemical analysis, and antioxidant, anti-hemolytic and Geno protective effects of Quercus ilex L. and *Pinus halepensis* Mill. methanolic extracts, Journal of Pharmacy & Pharmacognosy Research, 7 (4), pp.260-272.

Mergen, F and Burley, J. (1964) .*Abies* karyotype analysis. Silvae Genet. **13**, 63–68.
Mill) dans le massif forestier de Senalba (Région de Djelfa). Ecole Nationale Supérieur d'AgronomieEl-harache, Alger, p. 108.

Mohamed Toumi ,, Selma Barris, Mohamed Seghiri, Houmam Cheriguene, Fatiha Aid., (2017) **.**Effet de plusieurs méthodes de scarification et du stress osmotique sur la germination des graines de *Robinia pseudoacacia* L. Doi : 10.1016/j.crvi.2017.02.002.

Montero, G., Canellas, I., et Ruis-Peinado, R. (2001). Growth and Yield models for Pinushalepensis Mill. Invest. Agr. Sist. Recur. For., 10 (1): 23p

Muratova, E.N., Kruklis, M.V. (1988). Chromosome numbers of gymnospermous plants. Nobosiberisk Science, Siberian Branch.

N

Nahal, I. (1962). Le Pin d'Alep (Pinus halepensis Mill.). Étude taxonomique, phytogéographique, écologique et sylvicole. Annales de l'Ecole Nationale des Eaux et Forêts et de la Station de Recherches et Expériences Forestières, 19 (4), 477-688.

Nasri ,N. Khaldi, A. . Hammami ,M . Triki S (2005), Biotechnol. Prog, 21, 998 p.

Nkongolo, K.K., and Klimaszewska, K. (1994). Karyotype analysis and optimization of mitotic index in *Picea mariana* (black spruce) preparations from seedling root tips and embryogenic cultures.Heredity, **73**(1): 11–17. doi:10.1038/hdy.1994.93

Nkongolo, K.K. (1996). Chromosome analysis and DNA homology in three *Picea* species, *P. mariana*, *P. rubens*, and *P. glauca* (Pinaceae). Plant Syst. Evol. 203(1–2): 27–40. doi:10.1007/ BF00985235

Nkongolo, K.K. (1999). RAPD and cytological analyses of *Picea* spp. from different provenances: genomic relationship among taxa.Hereditas, 130(2): 137–144. doi:10.1111/j.1601-5223.1999.00137.x.

Nkongolo, K.K., and Klimaszewska, K. (1995). Cytological and molecular relationships between *Larix decidua*, *L. leptolepis* and *Larix _ eurolepis*: identification of species specific chromosomes and enhancement of mitotic index. Theor. Appl. Genet. **90**(6): 827–834. doi:10.1007/BF00222018.

Nkongolo, KK ET Mehes-Smith, M. (2012). Karyotype evolution in the *Pinaceae*: implication with molecular phylogeny. Review, Department of Biology and Biomolecular Science Program, Laurentian University, Sudbury,ON P3E 2C6, Canada, Genome V (55): 1–19 p.

Nouha, B., Portnoï, M., Vialard, F., Amouri, A., Van den Akker , J et Taillemite, J.

(2000). Les techniques de cytogénétique moléculaire: principes et progrès. Med. Sci 16:

1405- 1411p.

O

OUAFI Leila, (2009). Caractérisation cytogénétique et comportement vis-à-vis d'un stress

hydrique de quelques populations de trois espèces de Medicago (M. ciliaris, M. intertexta, M.truncatula).

Orazio, J., Jarrett, S.; Amaro-Ortiz, A.; Scott, T. (2013). UV Radiation and the Skin. Int. J. Mol. Sci, 14, pp. 12222–12248.

P

Pardé, J., (1957). La productivité des forêts de Pin d'Alep en France. Annales de l'Ecole Nationale des Eaux et Forêts et de la Station de Recherches et Expériences Forestières, 15 (2), 365-415 p. hal-03483769.

Prat, D., Faivre Rampant, Pet Prado, E. (2006) - Analyse du génome et gestion des ressources génétiques forestières. Institut national de la recherche agronomique. Vol 1, Paris,341-432p.

Pederick, L.A. (1966). The Structure and Identification of the Chromosomes of Pinus radiate D. Don. School of Forestry, University of Melbourne, Victoria, Australial, 69-77.

Pederick, L.A. (1970). Chromosome relationship between Pinus species.Silvae Genet. 19:

171–180.

Petri, A.; Alexandratou, E.; Kyriazi, M.; Rallis, M.; Roussis, V.; Yova, D. (2012), Combination of Fospeg-IPDT and a natural antioxidant compound prevents photosensitivity in a murine prostate cancer tumor model. Photodiagnosis Photodyn. 9, pp.100–108.

Postua Paula Alexandra, Fatima Zahra Sadikib, Mostafa El Idrissib, Oana Cioancac, Adriana Trifanc, Monica Hancianuc, Lucian Hritcua, (2019). *Pinus halepensis* essential oil attenuates the toxic Alzheimer's amyloid beta (1-42)-induced memory impairment and oxidative stress in the rat hippocampus, Biomedicine & Pharmacotherapy,112, pp 8.

Price, R.A., Liston,A., Strauss,S.H., (1998). Phylogeny and systematic of Pinus. In Richardson D.M. (Ed.) Ecology and Biogeography of *Pinus*. Cambridge University Press. Cambrige (UK). 49-68.

Q

Qing Cai, Ing Cai Daming Zhang, Zhan-han-lin liu, Xiao-Ru wang, (2006). Chromosomal Localization of 5S and 18S rDNA in Five Species of Subgenus *Strobus* and their Implications for Genome Evolution of *Pinus.* Annals of Botany, volume 97, Issue 5, pages 715–722, https://doi.org/10.1093/aob/mcl030.

Quézel, P. (1980). Biogéographie et écologie des Conifères méditerranéens. Documents d'Ecologie.in: Pesson P. (ed), Forestière. Paris, Pp. 201-255.

Quézel ,P. (1986). Les pins du groupe « halepensis ». Ecologie, végétation, écophysiologie Options Méditerranéennes. Série Etude CIHEAM. 86 (1) : 11-24.

Quézel, P et Barbero, M. (1992). Le pin d'Alep et les espèces voisines : répartition et caractères écologiques généraux, sa dynamique récente en France méditerranéenne. Forêt méditerranée. XIII, n° 3, 158-169 p.

R

Rathgeber, C. (2002). Impact des changements climatiques et de l'augmentation du taux de CO2 atmosphérique sur la productivité des écosystèmes forestiers: exemple du pin d'Alep (*Pinus halepensis* Mill.) en Provence calcaire (France). Université de Droit, d'Economie et des Sciences d'AIX-Marseille (AIX-MARSEILLE III), 312p.

Rigane. G., Arfaoui M.O., Chira M, H., Ghazghazi, A., Yahyaoui, R., Ben Salem, S. M., Hamdi, Hannachi, H., Jouili and Y. Ammari. (2016). Chemical composition and biological activities of *pinus halepensis* Mill. oil Rev. Roum. Chim., 61, 807 p.

S

Saylor, L.C. (1983). Karyotype analysis of the genus *Pinus* subgenus *Strobus*. Silvae Genet. 32, 119–124.

Sax, K, Sax ,H.J. (1933). Chromosome number and morphology in the conifers. Journal of the Arnold Arboretum 14(4): 356-375.

Samouelian, F., Gaudin,V., Boccara ,M,. (2009). Génétique moléculaire des plantes, 6ème édition, Quae, Paris, P198.

Schwarzacher, T. and Heslop-Harrison, J.S,. (2000). Practical in Situ Hybridization. BIOS Scientific Publishers, Oxford, 203.

Seigue, A. (1985). La forêt circum méditerranéenne et ses problèmes. Maison neuve et Larose Edition. Paris. 502p

Serre, F., (1976) a. Les rapports de la croissance et du climat chez le pin d'Alep (Pinus halepensis Mill.). I- Méthodes utilisées. L'activité cambiale et le climat. Acta Oecologica / Oecologica plantarum 2 (2) : 143-171.

Serre, F.(1976) b. Les rapports de la croissance et du climat chez le pin d'Alep (*Pinus halepensis* Mill.). L'allongement des pousses et des aiguilles et le climat. Discussion générale. Acta Oecologica / Oecologica plantarum 2 (3) : 201-224.

Siljak-Yakovlev S , Pustahija F, Vicic V, Robin O. (2013). Molecular Cytogenetics (FISH and Fluorochrome Banding): Resolving Species Relationships and Genome Organization. Molecular Plant Taxonomy, 309–323p. doi:10.1007/978-1-62703-767- 9_15.

Souleres G. (1969). Le pin d'Alep en Tunisie. Ann. De l'I. N. R. F., Tunis, 2 (1) : 1-126.

Souleres, G. (1969)**.** Le pin d'Alep en tunisie. Ann. Ins. Hist. Nat. afr. Nord, Alger, 59 (4),23-36.

Sumner A.T. de la Torre J. Steppia L. (1993). The distribution of genes on: chromosomes; A cytological approach .

T

Talbi ,Sarra . (2019). Contribution à l'étude du dépérissement du pin d'Alep *Pinus halepensis* Mill. (Symptôme, cause et traitement) cas de la forêt de Draa El-Aoud à Mecheria (Wilaya de Naâma).

V

Venet, J. (1986). Identification des outils et méthodes utilisées à Dynafor concernant la Dendrochronologie

Vincent Rachel. **(2007).** Génétique moléculaire ; 1re Édition 122 pages**.**

Vennetier, M., Girard, F., Didier, C., Ouamim, S., Ripert, C., Misson, L., Estève, R. Martin, W., Ndiaye-Boubacar, A. (2011). Adaptation phrénologique du pin d'Alep au changement climatique. Forêt Méditerranéenne. 32(2): 151-167.

W

Wittekind, D.H. (1979). On the nature of Romanowskydyes and the Romanowsky-Giemsa effect. Clin LabHaematol 1:247–262p.

Wittekind, D.H. (1983). On the nature of Romanowsky-Giemsa staining and itssignificance for cytochemistry and histochemistry: an overallview. Histochem J 15:1029–1047p.

Wilkinson, D.G. (1994). In Situ Hybridization: A Practical Approach. Oxford, IRL Press.

Z

Zavala, M., Zea, E. (2004). Mechanisms maintaining biodiversity in Mediterranean pine-oakforests: insights from a spatial simulation model. Plant Ecol. 171: 197-207.https://doi.org/10.1023/B:VEGE.0000029387.15947.b7.

Zenzen, W., (2016). Utilisation du S.I.G pour l'analyse de la structure de la forêt de Ouennougha dans la Wilaya de Bordj BouArréridj, mémoire, master en foresterie . univ. Tlemcen 60p.

Zoumpliou, V. ; Stamatiadi, M. ; Vassiliadis, C. ; Rallis, M. ; Papaioannou, G.T. ; Liakos, S. ; Angelou, A. ; Daskalaki, S. ; Kyriazi, M. ; Roussis, V. ; *et al.* (2014), Effect of Cigarette Smoke on Diabetic Skin and Protection with Topical Administration of Pinus halepensis Extract. Am. J. Plant Sci, 5, pp.3964-3974.

Annexe

Annexe

Tableau: Représente le nombre de graines germées dans les boites témoins par jour pendant 20jours.

J / Boîtes	J1	J2	J3	J4	J5	J6	J7	J8	J9	J10	J11	J12	J13	J14	J15	J16	J17	J18	J19	J20
T1	0	0	0	0	0	1	3	3	4	5	5	6	7	7	9	8	8	10	10	10
T2	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	2	3	3	4	4	4	5	6	6
T3	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	2	2	2	2	2	2	6	6	9
T4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	2	2	3	4	4	5	6	7	7	7

Tableau : Représente le nombre de graines germées qui ont subi une scarification et trempage dans l'eau pdt 24h par jour pendant 20jours

J / Boîtes	J1	J2	J3	J4	J5	J6	J7	J8	J9	J10	J11	J12	J13	J14	J15	J16	J17	J18	J19	J20
S1	0	0	0	1	2	2	3	4	4	4	4	5	6	6	7	8	8	9	9	10
S2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	3	3	4	4	4	4	6
S3	0	0	2	2	3	3	3	3	4	4	4	4	6	8	8	8	8	8	8	9
S4	1	1	1	1	1	1	3	3	3	3	4	6	6	6	6	7	8	9	9	10

Tableau: Représente le nombre de graines germées qui ont subi un trempage dans l'eau pdt 24h par jour pendant 20jours.

J / Boîtes	J1	J2	J3	J4	J5	J6	J7	J8	J9	J10	J11	J12	J13	J14	J15	J16	J17	J18	J19	J20
b1	0	0	0	0	1	2	2	4	5	5	5	5	5	5	6	8	10	10	11	13
b2	0	0	0	0	0	0	1	3	3	4	4	6	6	6	6	6	8	8	10	11
b3	0	0	0	0	0	1	1	3	3	3	3	4	4	4	5	5	5	6	7	7
b4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	2	3	4	5	5	5	6	6	7	8

Annexe

Tableau : Représente le nombre de graines germées qui ont subi un trempage dans l'eau pdt 48h par jour pendant 20jours .

J / boite	J1	J2	J3	J4	J5	J6	J7	J8	J9	J10	J11	J12	J13	J14	J15	J16	J17	J18	J19	J20
b1	0	0	0	0	2	2	2	2	3	3	3	3	4	6	7	7	8	9	10	10
b2	0	0	0	0	0	2	3	3	4	6	6	7	7	9	3	9	9	11	11	13
b3	0	0	0	0	1	1	1	2	3	3	3	5	6	6	8	9	9	11	10	11
b4	0	0	0	0	0	3	3	4	8	8	10	10	10	11	6	13	13	14	15	15

Tableau : Représente le nombre de graines germées qui ont subi un trempage dans l'eau pdt 72h par jour pendant 20jour.

J / boite	J1	J2	J3	J4	J5	J6	J7	J8	J9	J10	J11	J12	J13	J14	J15	J16	J17	J18	J19	J20
b1	0	0	0	1	1	3	3	3	3	3	4	8	10	10	12	12	12	12	14	15
b2	0	0	0	0	0	0	4	5	5	5	6	7	8	8	9	9	11	12	12	14
b3	0	1	1	1	1	1	1	2	3	3	5	5	5	5	8	9	12	14	16	16
b4	0	1	1	1	1	3	3	3	4	4	6	7	8	9	10	10	11	12	13	14

Tableau : Analyse de la variance du pourcentage de germination des graines de Pin d'Alep en fonction des différents prétraitements

ANOVA						
Source de variation	***SS***	***df***	***MS***	***F***	***P-value***	***F crit***
Entre groupes	123,2	4	30,8	7,57377	0,001512	3,055568
Dans les groupes	61	15	4,066667			
Total	184,2	19				

Annexe

Tableau : Représente l'effet de la variation de la température de l'hydrolyse sur le nombre des cellules en division.

T °C	0	5	10	15	20	25	30	35	40	45	50	55	60	65	70
Nombre de cellules	21	52	11	63	83	39	87	36	103	45	49	15	13	3	0

Tableau : Représente l'effet de la variation de temps de l'hydrolyse sur le nombre des cellules en division

t min	0	2	4	6	8	10	12	14	16	18	20	22
Nombre de cellules	0	13	37	30	44	20	18	15	23	10	4	0

Tableau : Représente l'effet de la variation de temps de coloration sur le nombre des cellules en division

t min	2	4	6	8	10	12	14	16	18	20	22
Nombre de cellules	10	43	38	25	15	10	3	4	5	2	0

Résumé

Le pin d'Alep (*Pinus halepensis* Mill.) est une espèce très importante pour le reboisement des forêts algériennes, largement distribué dans toute la mer méditerranée. Vu l'importance économique et écologique de cette espèce, des études préliminaires ont été fait sur les méristèmes racinaires des graines germées pour déterminer les conditions optimales (germination, température, temps de l'hydrolyse, temps de coloration) utilisé dans le protocole cytogénétique. Les résultats de la germination ont monté que le plus grand taux de germination est enregistré avec les graines qui ont subi un trempage dans l'eau pendant 72 h avec un taux de 59% par rapport aux autres prétraitements. L'analyse de la mitose portée sur les méristèmes racinaires a montré une séparation insuffisante des chromosomes ce qui rend le comptage des chromosomes difficiles en même temps toutes les phases de la mitose ont été observées. L'étude de la variation des températures, le temps de l'hydrolyse et le temps de coloration a permis de déterminer les intervalles de températures et de temps qui offrent des observations visibles et claires de cellules en divisions et de cellules mère.

Mots clés : Cytogénétique, chromosome, *Pinus*, Mitose, *Pinus halepensis* Mill., Germination, Prétraitements .

Absract:

Pinus halepensis Mill. is a very important species for the reforestation of Algerian woods. widely distributed throughout the Mediterranean Sea. In view of the economic and ecological importance of this species, preliminary studies have been made on the root of germinated seeds to determine the optimal conditions (germination, temperature, time of hydrolysis, time of coloring) used in the cytogenetic protocol. The results of germination went up that the highest germination rate is recorded with seeds that have been soaked in water for 72 h with a rate of 59% compared to other treatments. The analysis of mitotic carried out on the root cells showed an insufficient separation of chromosomes, which makes the counting of chromosomes difficult at the same time all phases of mitosis were observed. The study of temperature variation, the time of hydrolysis and the time of staining made it possible to determine the temperature and time intervals that offer visible and clear observations of cells in divisions and mother cells.

Key words: Cytogenetics, chromosome, *Pinus*, Mitosis, Pollen fertility, *Pinus halepensis* Mill. Germination , treatments.

ملخص

الصنوبر حلب هو نوع من الاشجار مهم للغاية لإعادة تشجيرفي الغابات الجزائريةو يتوزع على نطاق واسع في جميع أنحاء البحر الأبيض المتوسط. وبالنظر إلى الأهمية الاقتصادية والإيكولوجية لهذه الأنواع، أجريت دراسات أولية على جذور البذور المنبتة لتحديد الظروف المثلى (الإنتاش, درجة الحرارة ووقت التحلل المائي ووقت التلوين) المستخدمة في بروتوكول الوراثة الخلوية. حسب نتائج الإنتاش تم تسجيل أعلى معدل للبذور التي خضعت لنقع في الماء لمدة 72 ساعة بمعدل 59٪ مقارنة بالمعالجات المسبقة الأخرى. أظهر تحليل الانقسام الخلوي الذي تم إجراؤه على الخلايا الميريستمية الجذرية انفصالا غير كافٍ للكروموسومات مما يجعل عد الكروموسومات صعبًا ,في نفس الوقت لوحظت فيه جميع مراحل الانقسام الخلوي. سمحت دراسة تباين درجات الحرارة ووقت التحلل المائي ووقت التلوين بتحديد درجات الحرارة والفترات الزمنية التي توفر ملاحظات مرئية وواضحة للخلايا المنقسمة والخلايا الأم.

الكلمات المفتاحية: علم الوراثة الخلوية، الكروموسوم، الصنوبر، الانقسام الخلوي,