



République Algérienne Démocratique et Populaire

Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique

Université de Blida -1-



Faculté des Sciences

Département de Biologie des Populations et Organismes

Mémoire de fin d'étude

En vue de l'obtention du Master II en Science de la Nature et de la Vie

Option: Génomique et Biotechnologie Végétale.

Thème

**Recherche d'une méthode fiable de culture de protoplastes et d'hybridation somatique chez le palmier dattier (*Phoenix dactylifera* L.)**

Présenté par:

M<sup>lle</sup> Ezzouaoui Sana et M<sup>lle</sup> Benkiar Imane Maya

Soutenu le 16 / 09 / 2015, devant le jury:

- M <sup>me</sup> Takarli S.	Maitres assistante classe A	BD1	Présidente
- M <sup>me</sup> Faidi H.	Maitre assistante classe B	BD1	Examinatrice
- M <sup>me</sup> Yatta D.	Chargée de recherche	INRAA	Promotrice
- M <sup>me</sup> Ayadi R.	Maitre de conférences	BD1	Co-promotrice

Promotion: 2014-2015



# *Remerciements*



Le mémoire fut une expérience très spéciale. C'est un long chemin qu'on a commencé avec une multitude de question et avec des périodes de haut et de bas. Quand les travaux sont achevés, nous nous sommes rendu compte que durant cette période nous avons réalisé beaucoup de progrès au niveau du savoir et surtout du savoir faire grâce à des personnes qui ont contribué à la réalisation de ce travail et à qui on voudrait exprimer notre gratitude et nos remerciements.

Au terme de ce travail, nous tenons vivement à exprimer nos remerciements les plus sincères à notre promotrice, Mme Yatta Djamila, chargée de recherche et chef de projet. Qu'elle puisse trouver ici, notre reconnaissance pour les efforts qu'elle déploie pour la bonne marche du projet, pour ses qualités humaine, pour ses bons conseils et ses orientations, ainsi que pour sa patience et sa bonne humeur tout au long de ce travail. C'est grâce à elle que nous avons pu surmonter les moments difficiles.

Nous exprimons également, nos remerciements à notre co-promotrice, Mme Ayadi Radia, pour ses orientations. L'ampleur de ses connaissances et ses conseils resteront pour nous un exemple. Nous tenons à l'assurer de notre grande admiration.

Nous sommes très reconnaissantes à Mr Oukil Salah, Directeur de la division de recherche en protection des végétaux, Mr Himrane Hocine et Mr Degaïchia Housseem pour leur précieuse aide tout au long de ce travail.

Nous adressons nos sincères remerciements à tout le personnel de la division de recherche en biotechnologie et amélioration des plantes de l'INRAA, en particulier Mr Yakhou Med. Said, Mr Amara Belkacem et Mme Djemmaili Lamia, qui nous ont bien accueilli et grâce à qui nous avons beaucoup appris. Nous avons vraiment passé d'agréables moments en leur compagnie.

Nos vifs remerciements vont également à Mme Takarli Souad pour l'honneur qu'elle nous a fait de présider notre jury. Il nous est aussi agréable de témoigner notre grande gratitude à notre examinatrice, Mme Faidi Houria, et la remercier d'avoir accepté de juger ce travail.

Nous tenons à exprimer toute notre gratitude et nos remerciements les plus sincères à Mr Benstaali Abdelaziz, Mr Ezzouaoui Mustapha et Mr Benkiar Sophiane pour tous leurs sacrifices.

Et par la même occasion, nous remercions toute personne qui a contribué de près ou de loin pour le bon déroulement de ce travail, merci à vous tous.

Ce mémoire reste une belle aventure humaine et scientifique dans laquelle la curiosité et l'envie d'acquérir le savoir nous incite à avancer toujours plus loin.



*Dédicaces*



*À ma mère: Tu es la plus belle créature que Dieu à créer sur terre, tu représentes pour moi le symbole de la bonté par excellence. Pour ton amour, ton soutien, ton dévouement, tes précieux conseils, ta tendresse et tous tes sacrifices consentis, reçois à travers ce modeste travail, l'expression de mon profond amour et de mon éternelle gratitude.*

*Je voudrais, suite à ce travail, te rendre un hommage mérité et t'exprimer à quel point je suis fière de t'avoir comme mère. Que Dieu, le tout puissant, te préserve et t'accorde santé et bonheur, pour qu'on puisse t'avoir encore longtemps auprès de nous  
Inchaallah.*

*À mon père: Aucune dédicace ne saurait exprimer l'admiration, l'amour et le respect que j'ai toujours eu pour toi. Ce modeste travail est le fruit de ton affection et de tout tes efforts fournis jour et nuit pour mon bien être. Je te remercie pour tes valeurs nobles, ton éducation et surtout pour ton soutien permanent. Puisse Dieu te procurer bonne santé et longue vie.*

*À ma sœur **Lamia** et son mari **Nabil**: Merci pour votre soutien, vos encouragements et surtout pour vos conseils. Trouvez à travers ce mémoire l'expression de ma profonde reconnaissance et le témoignage de mon respect.*

*À mon frère **Hamza**: Je t'exprime à toi aussi mes sentiments d'amour et de fraternité. Je te souhaite un avenir plein de bonheur, de joie et de réussite.*

*À **Mohamed**: Tu as su trouver les mots pour m'encourager, me faire avancer et ne pas baisser les bras dans les moments difficiles. Je te remercie pour ta patience, ton aide, ta gentillesse, ta compréhension et ton soutien permanent tout au long de ce travail.*

*À mon binôme, et avant tout, meilleure amie que je considère comme ma sœur, **Maya** ainsi qu'à son mari **Abdelaziz** et toute la famille **Benkjar**.*

*Et à toute la promotion de Génomique et Biotechnologie Végétale 2014-2015.*

*Aux personnes dont j'ai aimé la présence dans ce jour et à tous ceux qui, par un mot, m'ont donné la force de continuer...*

*Aimablement, Sana.*

*A l'homme de ma vie,*

*Abdelaziz, ta compréhension et ton amour sont pour moi le soutien indispensable que tu as toujours su m'apporter. Ton encouragement était la bouffée d'oxygène qui me ressourçait dans les moments pénibles de souffrance. En témoignage de mon amour, de mon admiration et de ma grande affection, je te prie de trouver dans ce travail l'expression de mon estime et mon sincère attachement. Que dieu nous aide à atteindre nos objectifs dans la vie*

*A Mon **papa** chéri*

*Autant de phrases et d'expressions aussi éloquentes soit-elles ne sauraient exprimer ma gratitude et ma reconnaissance. Tu as su m'inculquer le sens de la responsabilité, de l'optimisme face aux difficultés de la vie. Tes conseils ont toujours guidé mes pas vers la réussite. Je te dois ce que je suis aujourd'hui et ce que je serai demain et je ferai toujours de mon mieux pour rester ta fierté et ne jamais te décevoir.*

*A **Maman** chérie*

*Autant de phrases aussi expressives soient-elles ne sauraient montrer le degré d'amour et d'affection que j'éprouve pour toi. Tu m'as comblé avec ta tendresse et affection tout au long de mon parcours. Tu n'as cessé de me soutenir et de m'encourager durant toutes les années de mes études, tu as toujours été présente à mes côtés pour me consoler quand il fallait.*

*Papa, maman Trouvez en ce travail le fruit de votre dévouement, de votre patience et l'expression de ma gratitude et mon profond amour. J'espère avoir réalisé une partie de vos rêves*

*A mes **beaux-parents***

*Je ne pourrais jamais exprimer le respect que j'ai pour vous. Vos prières, vos encouragements et votre soutien m'ont toujours été d'un grand secours. Puisse Dieu, le tout puissant vous préserver du mal, vous combler de santé, de bonheur et vous procurer une longue vie.*

*A mon frère **Mohamed Yacine** et a mes sœurs **Asma, Sara** et **Yasmine** pour leur soutien, je leurs souhaite tout le succès et tout le bonheur du monde.*

*A la personne qui a partagé tous le travail, qui a supporté mon humeur au moment de stress, a mon binôme **Sana** pour la sœur agréable qu'elle était et qu'elle restera toujours, et a toute la famille **Ezzouaoui**.*

*A ma chère sœur **Ines** à qui je souhaite tout le bonheur du monde.*

*A toute la promo génomique et biotechnologie végétale 2014-2015*

*A toute personne qui m'a aidé à franchir un horizon dans ma vie.*

***Aimablement, Imane Maya.***



Les suspensions cellulaires sont à l'origine du développement de l'embryogenèse somatique, des transformations génétiques et constituent le matériel idéal pour l'obtention et la fusion des protoplastes. La maîtrise de ces techniques présente un grand intérêt tant sur le plan agronomique, peut être intégrée dans le schéma d'amélioration et de la résistance au bayoud, que sur le plan fondamental pour une meilleure connaissance de l'espèce. Le but de ce travail est l'isolement et la fusion des protoplastes afin d'obtenir des hybrides somatiques résistants au bayoud.

Deux milieux de cultures sont utilisés lors de la prolifération des cals, qui sont le M<sub>100</sub> et le P<sub>12.5</sub>. La présence des auxines (le 2,4-D et le Picloram) est indispensable à la multiplication des cals. Le taux de cette multiplication varie de 1.03 à 2.26 dans le milieu P<sub>12.5</sub> et de 1.02 à 3.1 dans le milieu M<sub>100</sub>.

Des suspensions cellulaires ont été établies à partir de cals embryogènes sur le milieu liquide P<sub>5</sub>. La suspension cellulaire a été obtenue après 9 semaines de culture sous agitation continue. Le suivi des subcultures montre que les cals se dissocient et libèrent des cellules de différentes formes (arrondies, ovales et allongées).

L'utilisation des suspensions cellulaires comme source de protoplastes a permis d'obtenir un rendement élevé en protoplastes viables après leur évaluation par le FDA. En effet le rendement le plus élevé a été obtenu après traitement en utilisant la solution enzymatique SE5 (Cellulase RS 2% et Hémicellulase 6%). Ces protoplastes ont été transférés sur la couche nourricière qui a permis la régénération de la paroi pectocellulosique.

La fusion des protoplastes réalisée par l'utilisation du PEG 50% s'est révélée la plus efficace. Les protoplastes fusionnés sont transférés sur la couche nourricière afin de générer des cals embryogènes et d'aboutir par la suite à un hybride somatique résistant à la maladie du bayoud.

**Mots clés:** Palmier dattier, embryogenèse somatique, suspension cellulaire, culture des protoplastes, Polyéthylène-glycol (PEG).



The cell suspensions are at the origin from development of somatic embryogenesis, genetic transformations and constitute the best material for obtaining somatic hybrid by protoplast fusion. Mastering protoplast culture techniques and somatic hybridization in the date palm breeding program is an important ways to fight against the bayoud and preserve our phœnicicole heritage. The aim of this work is isolation and protoplast fusion in order to obtain somatic hybrids resistant to bayoud disease.

Two culture media are used in calli proliferation, which are the M<sub>100</sub> and the P<sub>12.5</sub>. The presence of auxin (2,4-D and Picloram) is indispensable for callus emergent. The propagation rate varies from 1.03 to 2.26 in the P<sub>12.5</sub> medium and from 1.02 to 3.1 in the M<sub>100</sub> medium.

Cell suspensions were established from calluses on the P<sub>5</sub> embryogenic liquid medium. The cell suspension was obtained after 9 weeks of continuous stirring culture. Monitoring subcultures shows callus dissociate and liberate cells of various shapes (round, oval and elongated).

The use of cell suspensions as a source of protoplasts was obtained a high yield of viable protoplasts after their evaluation by the FDA. In fact the best yield was obtained after treatment using the enzyme solution SE5 (Cellulase RS Hemicellulase 2% and 6%). These protoplasts were transferred on the feeder layer which permits the regeneration of the pectocellulose wall.

Protoplast fusion achieved by PEG 50% using, proved the most successful. The fused protoplasts are transferred to the nutrient medium to generate embryogenic callus and afterward to a somatic hybrid resistant to bayoud disease.

**Keywords:** Date palm, somatic embryogenesis, cell suspension, cultur of protoplast, Polyethylene-glycol (PEG).





إن تطور الجنيني الجسدي، التحويل الوراثي و الحصول على البروتوبلاست يحدث نتيجة التحليل الخلوي. التحكم في طريقة الحصول على البروتوبلاست و الاندماج الخلوي للبروتوبلاست يلعب دورا هام في القطاع الزراعي و التحسين الوراثي للنخيل حتى يتمكن من مقاومة البيوض.

الهدف من هذا الانجاز هو فصل و إدماج البروتوبلاست للحصول على هجائن مقاومة لبيوض. لمضاعفة الكالس نستعمل وسطين للزرع:  $M_{100}$  و  $P_{12.5}$ . معدل مضاعفة الكالس يتراوح ما بين 1.30 إلى 2.26 في الوسط  $P_{12.5}$  و من 1.02 إلى 3.1 في الوسط  $M_{100}$ .

تم انشاء التحليل الخلوي من الكالس في الوسط السائل  $P_5$ . تم الحصول عليه بعد 9 أسابيع تحت خضا مستمرا. الدراسة المجهرية مكنتنا من الكشف على وجود خلايا مختلفة الأشكال (دائرية و بيضوية).

استعمال التحليل الخلوي كمصدر للبروتوبلاست، مكنا من الحصول على مردود هائل من البروتوبلاست الحية بعد اختبارها عن طريق ال FDA. أعلى مردود تم الحصول عليه بعد استعمال المحلول الانزيمي الخامس (2 بالمئة سيلولاز و 6 بالمئة ايمي سيلولاز) تنقل البروتوبلاست على الطبقة المغذية كي تمكنها من تجديد جدارها الخلوي.

يحدث الادمج الخلوي للبروتوبلاست تحت تأثير 50% PEG بعدها يتم نقل الخلايا المندمجة على الطبقة المغذية لتحويلها الى كالس وبالتالي الحصول على هجائن مقاومة لمرض البيوض.

الكلمات الرئيسية: النخيل، كالس، التحليل الخلوي، بروتوبلاست، PEG

## Liste des abréviations

**DN:** Deglet Nour.

**FDA:** Fluorescéine DiAcétate.

**F.o.a:** *Fusarium oxysporum* f.sp. *albedinis*.

**IPA:** Isopentényl-adénine.

**M<sub>100</sub>:** Milieu solide avec 100 mg/l de 2,4-D.

**MS:** Murashig et Skoog (1962).

**P<sub>12.5</sub>:** Milieu solide avec 12,5 mg/l de picloram.

**P<sub>5</sub>:** Milieu liquide de suspension cellulaire avec 5mg/l de picloram.

**PEG:** Polyéthylène glycol.

**pH:** Potentiel d'hydrogène.

**Picloram:** Acide 4-amino-3,5,6 trichloropicolinique.

**TGZ:** Tegaza.

**TKB:** Takerboucht.

**SE:** Solution enzymatique.

**SCE:** Suspension cellulaire embryogène.

x g: L'accélération due à la force centrifuge.

**2,4-D:** Acide 2,4-dichlorophénoxyacétique.

## Liste des figures

<b>Figure 1:</b> Production mondiale des dattes (Anonyme, FAOSTAT, 2013)	8
<b>Figure 2:</b> Top 5 des pays producteurs (Anonyme, FAOSTAT, 2013).	9
<b>Figure 3:</b> Repiquage des cals A+B: Repiquage des cals sous la hotte à flux laminaire. C: Cal sous la loupe Leica EZ4 D.	21
<b>Figure 4:</b> Préparation et stérilisation des milieux solides (A: préparation du milieu de culture, B: ajustement du pH, C: distribution du milieu de culture, D: stérilisation de milieu de culture).	23
<b>Figure 5:</b> Cal sous la loupe Leica EZ4 D.	24
<b>Figure 6:</b> Préparation du milieu liquide (P <sub>5</sub> ). A: préparation du milieu. B: distribution du milieu dans des erlenmeyers	25
<b>Figure 7 :</b> Obtention de la suspension cellulaire. A: broyage des cals. B: mise en culture sur milieu liquide. C: incubation.	26
<b>Figure 8 :</b> Stérilisation des solutions enzymatiques sous la hotte à l'aide de la pompe sous vide.	27
<b>Figure 9 :</b> Les différentes étapes de la macération enzymatique à partir de micro cals en utilisant des erlenmeyers. A: filtration des cals avec un tamis de 380µm. B: addition de la solution enzymatique. D: incubation.	28
<b>Figure 10 :</b> Les différentes étapes de la macération enzymatique à partir de suspensions cellulaires en utilisant des boite de pétris. A: élimination du surnageant. B: récupération du culot. C: addition de la solution enzymatique. C: incubation	29
<b>Figure 11 :</b> Les différentes étapes de la purification des protoplastes.	30
<b>Figure 12:</b> Préparation du milieu PcM <sub>2</sub> .	32
<b>Figure 13:</b> Les différentes étapes de la fusion des protoplastes. A+B: dépôt de la solution de protoplastes sur boite de pétri. C+D: ajout de la solution	33

du PEG. E: transfert dans des eppendorfs. F: rinçage avec la solution de rinçage de fusion. G: centrifugation. H: mise en culture.

- Figure 14:** Induction et multiplication des cals. 35  
A: Induction de la callogenèse. B: Multiplication de cals.
- Figure 15:** Effet de la concentration et de la nature des régulateurs 37  
de croissance sur le nombre de souche obtenu chez les trois cultivars.
- Figure 16:** Multiplication de cals des trois cultivars en milieu M<sub>100</sub> (A) 38  
et en milieu P<sub>12.5</sub> (B).
- Figure 17:** Types de cals choisis pour l'établissement des suspensions cellulaires 42  
A: cal friable, B: cal compact.
- Figure 18:** Initiation de la suspension cellulaire. A: mise en culture cals 45  
embryogènes en milieu liquide agité. B: microcals après la deuxième semaine.
- Figure 19:** Obtention d'une suspension cellulaire embryogène. 45
- Figure 20:** Evolution d'une suspension cellulaire, 46  
A: microcals après la 1<sup>ère</sup> subculture, B: microcals après la 1<sup>ère</sup> filtration avec un tamis de 380 µm, C: suspension après la 2<sup>ème</sup> filtration avec un tamis 150 µm, D: suspension après 3<sup>ème</sup> filtration avec un tamis 80 µm), E: suspension cellulaire.
- Figure 21:** Evaluation de la viabilité de la suspension cellulaire 47  
par le FDA sous microscope inversé (GX40).
- Figure 22:** Observation de protoplastes, à l'aide d'un microscope inversé, après agitation. 52
- Figure 23:** Protoplastes issus de microcals, sous microscope inversé. 53  
A+B+C: après traitement à la SE1. D+E+F: après traitement à la SE4.
- Figure 24:** Observation de protoplastes issus de microcals, sous 54  
microscope inversé, après traitement à la SE2.
- Figure 25:** Observation de protoplastes issus de microcals, 54  
sous microscope inversé, après traitement à la SE5.
- Figure 26:** Protoplastes issus de microcals, sous microscope inversé, après traitement 55

à la SE3.

<b>Figure 27:</b> Protoplastes issus de SCE, sous microscope inversé, A: après traitement à la SE1. B+C: après traitement à la SE4.	55
<b>Figure 28:</b> Observation de protoplastes issus de SCE, sous microscope inversé, après traitement à la SE5.	56
<b>Figure 29:</b> Protoplastes issus de SCE, sous microscope inversé, après traitement à la SE2.	56
<b>Figure 30:</b> Protoplastes issus de SCE, sous microscope inversé, après traitement à la SE3.	57
<b>Figure 31:</b> Les différents types de protoplastes observés sou microscope inversé.	59
<b>Figure 32:</b> Régénération des protoplastes en cals.	60
<b>Figure 33:</b> Les étapes de la fusion TKBxDN.	62
<b>Figure 34:</b> Protoplaste en division sur couche nourricière.	63
<b>Figure 35:</b> Régénération des hybrides en cals.	63

## Liste des tableaux

<b>Tableau 1:</b> Différentes utilisations des fruits et sous-produits du palmier dattier.	9
<b>Tableau 2 :</b> Composition des solutions enzymatiques testées (pour 100 ml de solution).	27
<b>Tableau 3:</b> Préparation des solutions de PEG pour 100 ml d'eau.	32
<b>Tableau 4:</b> Etude de la callogenèse et de la prolifération des souches embryogènes sur les deux milieux de culture M <sub>100</sub> et P <sub>12.5</sub> .	36
<b>Tableau 5:</b> Différentes étapes appliquées tout au long de la période de culture jusqu'à l'obtention d'une suspension cellulaire embryogène.	43
<b>Tableau 6:</b> Influence du génotype, du matériel de base et de la solution enzymatique sur le rendement en protoplastes (x10 <sup>6</sup> /g) chez DN, TKB et TGZ.	57
<b>Tableau 7:</b> Effet des différents traitements de PEG sur le phénomène de fusion	61



# *Sommaire*



Résumé  
Abstract  
المخلص

**Introduction** ..... 1

### **Première partie: Synthèse bibliographique**

1.	Taxonomie et classification	3
2.	Caractères morphologiques	4
3.	Cycle de développement	6
4.	Origine et répartition géographique	6
5.	Ecologie du palmier dattier	7
6.	Production	8
7.	Intérêt et importance du palmier dattier	9
8.	Génétique du palmier dattier	10
9.	Notion de cultivar	10
10.	Pathologie du palmier dattier	10
11.	Mode de multiplication chez le palmier dattier	11
12.	Culture de cellules et de protoplastes	14

### **Deuxième partie: Matériel et méthodes**

1.	Multiplication de la callogenèse (entretien de la callogenèse)	21
2.	Etablissement des suspensions cellulaires	24
3.	Isolement des protoplastes	26
4.	Culture des protoplastes	31
5.	Fusion des protoplastes	32
6.	Analyses des données	34

### **Troisième partie: Résultats et discussion**

1.	Entretien et multiplication des cals	35
2.	Initiation de la suspension cellulaire	42
3.	Isolement des protoplastes	51
4.	Culture des protoplastes	59
5.	Hybridation somatique	60

**Conclusion** ..... 68

Références bibliographiques ..... 70

Annexes





# *Introduction*





Le palmier dattier (*Phoenix dactylifera* L., famille des *Arecaceae*) constitue l'une des cultures les plus importantes dans les zones arides et semi-arides de l'Afrique du Nord. Dénommé par Linné depuis 1734 (*Phoenix dactylifera* L.), le palmier dattier est une plante pérenne dioïque, diploïde ( $2n=36$ ) et polyploïde pour certaines variétés. C'est une angiosperme, monocotylédone, tropicale à reproduction sexuée allogame, aboutissant à la formation de populations composées d'individus mâles (*dokkar*) et femelles (*nakhla*) difficiles à caractériser précocement (Buelguedj, 2007). Cultivé depuis plus de 4000 ans, le palmier demeure une source vitale pour ses fruits: les dattes dans les zones arides et semi-arides du globe (Meraneh, 2010).

La production mondiale de dattes varie selon les années mais occupe aujourd'hui une grande place dans l'économie (Aberlenc-Bertossi, 2012). L'Égypte contribue à 18.5% de cette production et se classe en 1<sup>ère</sup> position (Anonyme, FAOSTAT, 2013).

En Algérie, la production de datte occupe une place importante dans le domaine de l'agriculture. Elle représente le pilier de l'économie agricole nationale avec un effectif de plus de 18 millions de palmiers et plus de 900 variétés, dont les plus couramment rencontrés sont: Deglet Nour, Ghars, Takerboucht, Tegaza, Mech Degla...etc. (Anonyme, Ministère de l'Agriculture, 2012).

Le palmier dattier joue un important rôle, dû non seulement à son importance économique, mais aussi à son adaptation écologique permettant, d'une part, d'assurer une protection nécessaire à des cultures sous jacentes (arbres fruitiers, cultures maraichères et fourragères) contre les vents chauds et secs, et d'autre part, de contribuer à la lutte contre l'ensablement (Sedra, 2003).

Il constitue l'ossature de l'écosystème saharien, sa destruction entrainerait inévitablement l'exode des populations et accentuerait le phénomène de désertification or, l'existence du dattier est réellement menacée, l'espèce est sujette à de nombreuses maladies dont la plus redoutable est la fusariose vasculaire causée par *Fusarium oxysporum* f.sp. *albidinis* (F.o.a). Cette maladie a détruit plus de 3 millions d'arbres dans la région de Sud-ouest incluant surtout les cultivars productifs et de hautes valeurs commerciales. Actuellement, il menace les oasis de Sud-est algérien.

Depuis que cette maladie fut connue, toutes les recherches ont été axées sur la lutte contre la fusariose afin de contrecarrer ses effets néfastes. La lutte chimique, par stérilisation des sols



avec du bromure de méthyle, s'est révélée onéreuse et dangereuse pour des résultats incertains; la lutte biologique, par la recherche de micro-organisme antagoniste du *Fusarium* (Sabaou et *al.*, 1980), elle nécessite une étude profonde des rapports hôte-pathogène (Amir et Amir, 1988).

Actuellement, les seuls moyens envisagés, pour prévenir la maladie, est la sélection de cultivars résistants au bayoud et de bonne qualité dattière, de leur multiplication rapide par culture *in vitro* ainsi que la création de cultivars améliorés (Bouguédoura, 1991).

Nos travaux entrent dans le cadre d'un programme de recherche, lancé par l'équipe Palmier, pour l'amélioration et la conservation du palmier dattier par les techniques de culture *in vitro*. Nous avons entrepris d'étudier la culture de protoplastes qui vise l'amélioration génétique du palmier dattier par traitement biologique.

Ainsi notre présent travail est divisé en trois parties

- Multiplication de cals de trois cultivars de palmier dattier (Deglet Nour, Takerboucht et Tegaza) par repiquage périodique sur les milieux de cultures: M<sub>100</sub> et P<sub>12.5</sub>.
- Etablissement de la suspension cellulaire à partir des cals embryogènes de ces trois cultivars, afin d'obtenir du matériel pour l'isolement des protoplastes.
- Obtention d'hybrides somatiques par fusion des protoplastes.



*Synthèse*

*bibliographique*





## 1. Taxonomie et classification

Le palmier dattier a été dénommé par Linné en 1734 «*Phœnix dactylifera* L.», cette appellation botanique est vraisemblablement dérivée du mot «*Phoinix*» ou «*Phoinikes*», nom donnée par les Grecs de l'antiquité à cet arbre qu'ils considéraient comme l'arbre des Phéniciens. Quant à «*dactylifera*» dérive de «*daktylus*» qui fait référence au doigt en raison de la forme des fruits et à «*fero*» qui signifie «qui porte» en latin. (Linné, 1753; Munier, 1973; Dransfield, 2008; Gros-Balthazard et *al.*, 2013; Littardi, 2015).

Le palmier dattier appartient à l'une des plus grandes familles d'angiospermes monocotylédones, celle des *Palmaceae* ou *Arecaceae*, représentée par 200 genres et 2700 espèces, répartie en six sous-familles, qui permet de la placer au 14<sup>ème</sup> rang après les graminées, les liliacées et les orchidées. Le genre *Phœnix* comprend 14 espèces réparties dans les régions tropicales et subtropicales de l'Ancien Monde (Barrow, 1998; Govaert & Daransfield, 2005; Henderson, 2009). Le dattier est la seule espèce de ce genre à être cultivée pour ses fruits (Chowdhury et *al.*, 2008; Newton et *al.*, 2013; Littardi, 2015).

Sa classification est d'abord basée sur l'analyse des caractères morphologiques et des données anatomiques. En 2006, Mark attribue au palmier dattier la classification suivante

Règne: Plantae

Sous-règne: Tracheobionta = Plantes vasculaires

Embranchement (division): Magnoliophyta = Angiospermes

Classe: Liliopsida = Monocotylédones

Sous-classe: Arelidae

Ordre: Arecales ou Palmales

Famille: Arecaceae ou Palmaceae

Sous-famille: Coryphoideae

Tribu: Phœniceae

Genre: *Phœnix*

Espèce: *Phœnix dactylifera* L.



La classification phylogénétique APG II (2003) et APG III (2009), rattache *Phœnix dactylifera* L. à l'ordre des Arécales inclus dans le clade des Commélinidées. Cet ensemble comporte environ 21000 espèces caractérisées par un marqueur chimique l'acide férulique, présent au niveau de la paroi pectocellulosique, des vaisseaux parfaits (Dupont, 2007).

## 2. Caractères morphologiques

Le palmier dattier est une plante monocotylédone à croissance apicale dominante. On distingue trois parties: un système racinaire, un organe végétatif composé du stipe et de feuilles et un organe reproductif composé d'inflorescences mâles ou femelles (annexe 1) (Sedra, 2003).

### 2.1. Le système racinaire

La partie souterraine du palmier dattier est formée d'un bulbe volumineux, qui émerge en partie au dessus du niveau du sol, et à partir duquel, partent des racines. On distingue trois types de racines répartis en quatre zones d'enracinement: les racines respiratoires (zone I), les racines de nutrition (zone II) et les racines d'absorption (zone III et IV).

Zone I: les racines respiratoires, localisées au pied du palmier, elles comprennent les racines aériennes adventives (0 à 150 cm) et les racines de la couche superficielle du sol (0 à -20 cm). Ces racines servent aux échanges gazeux avec le sol.

Zone II: les racines de nutrition, se développent de façon plus profonde et horizontale, entre 20 à 100 cm. Elles constituent la plus forte proportion du système racinaire.

Zone III: les racines d'absorption d'une profondeur allant de 1 à 2 mètre. Elles assurent l'apport en eau.

Zone IV: les racines d'absorption en profondeur, caractérisées par un géotropisme positif très accentué pouvant atteindre une longueur de 17 mètres si le niveau de la nappe phréatique est profond (Munier, 1973; Peyron, 2000; Meraneh, 2010).

### 2.2. Le système végétatif

#### 2.2.1. Le stipe

Le stipe est un axe orthotrope monopodial et cylindrique issu du méristème apical de l'embryon zygotique, dont l'activité végétative est indéfinie durant toute la vie de la plante.



Ce bourgeon terminal assure la croissance de la plante. Sa hauteur augmente avec l'âge et peut atteindre plus de 30 mètres. Le stipe demeure droit et élancé, avec une couronne de feuilles à son sommet. Les ramifications de base sont appelées rejets et celles en hauteur gourmands. Les gourmands ont un développement limité et une floraison très difficile, alors que les rejets présentent une croissance indéfinie et peuvent fleurir et produire à leur tour de nouvelles ramifications basales (Zaïd, 2002; Munier, 1973).

### **2.2.2. La couronne ou frondaison**

La couronne est l'ensemble des palmes vertes, qui peut contenir jusqu'à 200 palmes chez un palmier adulte. On distingue trois types de couronne: la couronne basale, la couronne centrale et les palmes du cœur formées des palmes non ouvertes et des palmes n'ayant pas encore atteint leur taille définitive (Peyron, 2000).

### **2.2.3. Les palmes**

Les palmes du palmier dattier sont composées, pennées et longues de 4 à 7 mètres, dont les folioles sont régulièrement disposées en position oblique le long du rachis. Au cours de sa vie, le palmier dattier produit trois types de feuilles: les feuilles juvéniles, les feuilles semi-juvéniles et les feuilles adultes. Les palmes adultes demeurent actives durant trois à sept ans selon la variété et le mode de culture (Bouguédoura, 1991; Peyron, 2000).

## **2.3. Le système reproducteur**

### **2.3.1. Les inflorescences**

Le palmier dattier est une plante dioïque. Les organes de reproduction sont composés d'inflorescences mâles ou femelles portées par des pieds différents. Les fleurs sont portées par des pédicelles, qui à leur tour sont portées par un axe charnu, la hampe, l'ensemble est enveloppée dans une grande bractée membraneuse close, la spathe (Peyron, 2000; Guillot, 2010). Les fleurs femelles comprennent trois carpelles indépendants dont un seul se développe pour former la datte (Guillot, 2010). Tandis que les fleurs mâles comprennent une carole formée de trois pétales et de six étamines (Peyron, 2000; Guillot, 2010).

### **2.3.2. Le fruit**

Les dattes, sont des bais oblongues, ovoïdes ou sphériques, de couleur jaune clair à brun plus au moins foncé, leur poids varie de quelques grammes à plus de 50 g, contenant une



pulpe sucrée et une seule graine, lisse, de consistance ligneuse, avec un sillon ventral et un embryon dorsal (Peyron, 2000).

### 3. Cycle de développement

Le palmier dattier en Algérie comporte généralement quatre phases de développement

- Phase jeune: Depuis la plantation jusqu'aux premières productions. Cette phase dure entre 5 à 7 années, selon le milieu et les soins apportés à la culture.
- Phase juvénile: C'est la production. Elle se situe autour de 30 ans d'âge du palmier.
- Phase adulte: Autour de 60 ans d'âge, début de décroissance de la production surtout si le palmier est dans des conditions de culture médiocres.
- Phase de sénescence: 80 ans et plus. Chute de la production (Belguedj, 2002).

### 4. Origine et répartition géographique

#### 4.1. Origine

Le palmier dattier est considéré comme le plus vieil arbre de tous les arbres fruitiers cultivés (Bhansali, 2010). Cependant son origine géographique précise paraît très controversée, des travaux récents ont montré que le palmier dattier proviendrait de la domestication d'une population sauvage de la même espèce (Pintaud et *al.*, 2010; Littardi, 2015). Sur la base d'étude archéobotanique, la domestication du palmier dattier remontait vers 6000 ans avant J.C dans la région du Golf persique, comme témoignent des fossiles de graines découvertes grâce au carbone 14 dans la région de Dalma aux Emirats (Newton et *al.*, 2008). Cette domestication serait associée à la naissance des premières civilisations agricoles du croissant fertile, entre la Mésopotamie et l'Égypte, vers 4000 ans avant J.C (El Hadrami, 2009).

#### 4.2. Répartition géographique

##### 4.2.1. Dans le monde

Le palmier dattier est localisé dans l'hémisphère nord, là où les conditions climatiques le permettent. Un adage arabe évoque ces conditions climatiques et écologiques que la culture du dattier requiert: «le palmier dattier vit les pieds dans l'eau et la tête au soleil». Il nécessite en effet des températures élevées, une faible hygrométrie mais une humidité édaphique constante (Zohary et *al.*, 2012).





L'aire de répartition du palmier dans le monde, couvre les cinq continents. La culture du palmier dattier s'étend depuis le sud de l'Iran à l'Est, jusqu'à la côte Atlantique de l'Afrique du Nord à l'Ouest. Cette culture est concentrée dans les régions arides et semi arides du continent Africain, où le palmier dattier forme la végétation caractéristique des oasis.

Les limites extrêmes de la distribution géographique sont entre les altitudes 10° Sud (Somalie) et 39° Nord (Espagne ou Turkménistan). Les secteurs les plus favorables pour cette culture sont situés entre 24° et 34° Nord (Maroc, Algérie, Tunisie, Libye, Egypte, Irak, Iran, Arabie Saoudite, Soudan,... etc.). Le palmier dattier se trouve aussi aux Etats-Unis entre 33° et 35° Nord, d'autres surfaces négligeables pour la culture du palmier dattier sont à l'hémisphère sud (Australie, Mexique, Argentine, ... etc.) (Zaïd, 2002; Zohary et *al.*, 2012).

#### 4.2.2. En Algérie

La culture du palmier dattier s'étend sur 170 000 ha (Anonyme, Ministère de l'Agriculture, 2012) en plusieurs oasis réparties sur le Sud du pays où le climat est chaud et sec (zone saharienne). Sa culture s'étend depuis la frontière Marocaine à l'ouest jusqu'à la frontière tunisio-lybienne à l'est et depuis l'Atlas Saharien au nord jusqu'à Reggane (sud-ouest), Tamanrasset (centre) et Djanet (sud-est).

Les principales régions phœnicicoles sont

- A l'Est les Zibans (Biskra), l'Oued Rhir (entre Ouargla et Touggourt), l'Oued souf, la cuvette de Ouargla et le M'zab (Ghardaïa). Ces palmeraies sont constituées principalement de Deglet Nour, cultivar à très haute valeur commerciale.
- A l'Ouest, la Saoura (Beni Abbes), le Touat (Adrar), le Gourara (Timimoune), le Tidikelt (Reggane) et El Goléa. Ces palmeraies comportent un verger très diversifié. Ces cultivars produisent des dattes, de qualité commerciale très faible (Anonyme, Ministère de l'Agriculture, 2012).

### 5. Ecologie du palmier dattier

Le palmier dattier est cultivé dans les régions arides et semi-arides à des altitudes ne dépassant pas quelques centaines de mètre. Il peut s'adapter à de nombreuses conditions, grâce à sa grande variabilité. Différents facteurs climatiques et même édaphiques, sont très importants pour pouvoir déterminer la convenance d'un emplacement spécifique pour la culture d'un palmier dattier. En effet, le palmier dattier est une espèce thermophile qui



nécessite pour sa croissance et la production dattière des températures supérieures à 30°, héliophile, cultivée dans les régions à forte luminosité et exige un taux d'humidité inférieur à 40%. Il nécessite également une alimentation suffisante en eau (16.000 à 20.000 m<sup>3</sup>/ha/an) et un sol neutre, profond, légers et assez riche ou susceptible d'être fertilisé (Zaïd, 2002; CIRAD et GRET, 2002)

## 6. Production

La production mondiale est estimée à 7 627 624 de tonnes pour l'année 2013, dont 43,8% soit 3 343 322 tonnes, proviennent de l'Afrique. L'Egypte est classée au premier rang avec une production d'environ 1 501 799 tonnes, suivi de l'Iran au 2<sup>ème</sup> rang et l'Arabie saoudite au 3<sup>ème</sup> avec une production avoisinant les 1 000 000 de tonnes.

L'Algérie prend la 4<sup>ème</sup> position avec une production de 848 199 tonnes (Anonyme, FAOSTAT, 2013), dont près de 50% de la production totale est assurée par la variété noble Deglet Nour, néanmoins, le rendement moyen toutes variétés confondues est estimé 57.2Kg/arbre (Anonyme, Ministère de l'Agriculture, 2012).

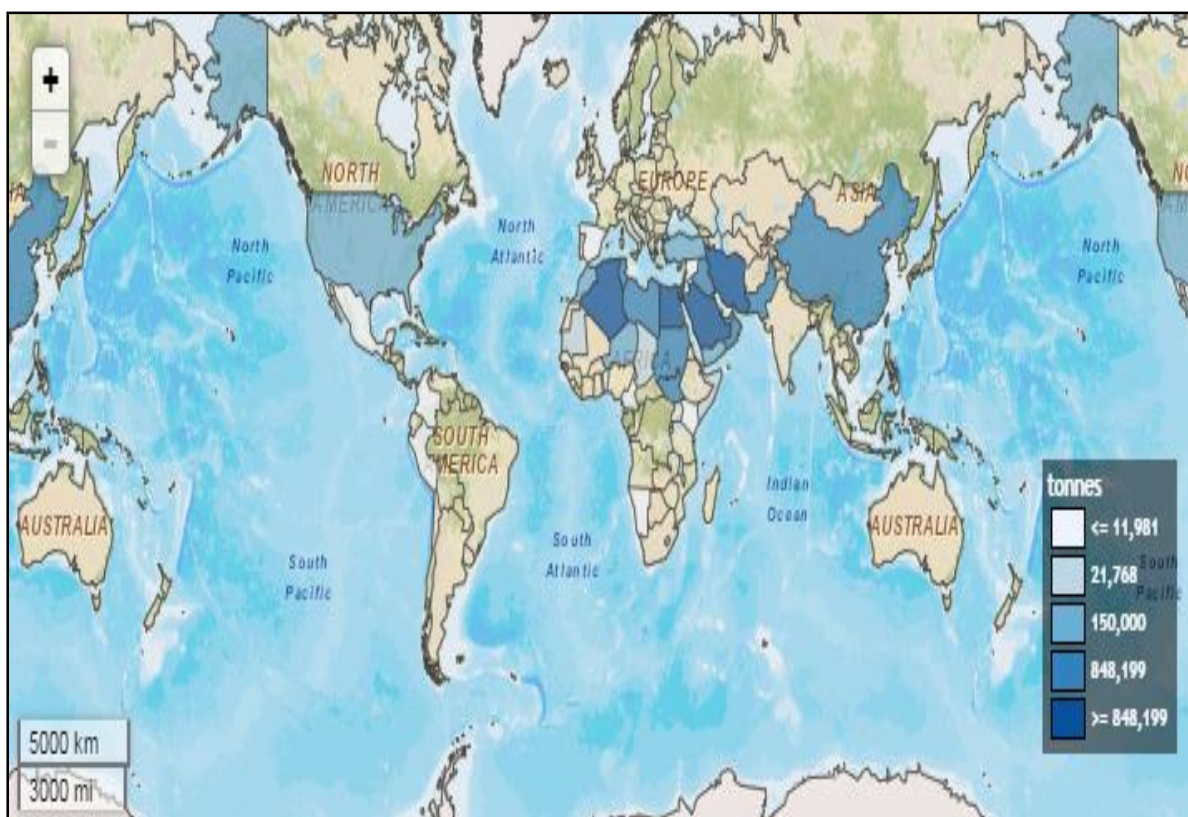
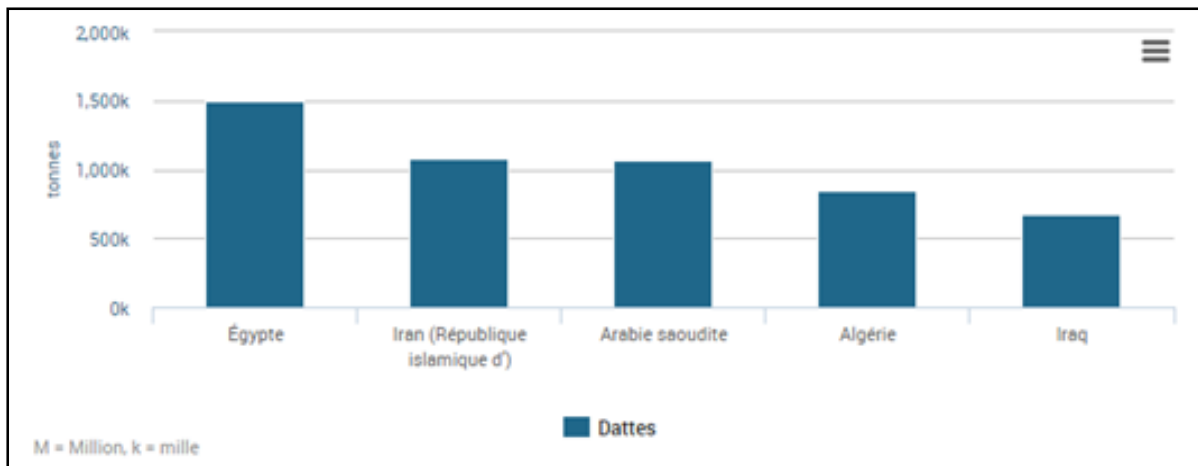


Figure 1: Production mondiale des dattes (Anonyme, FAOSTAT, 2013).



**Figure 2:** Top 5 des pays producteurs (Anonyme, FAOSTAT, 2013).

## 7. Intérêt et importance du palmier dattier

L'utilité du palmier dattier ne s'arrête pas à la production des dattes. Cette espèce est la plus importante dans les régions arides du monde tant sur le plan écologique, économique et social. Ainsi, le palmier constitue l'ossature de l'écosystème oasien de régions arides.

Sur le plan économique, la date constitue la base de l'alimentation des populations oasiennes vue sa haute valeur énergétique (300 Kcal, 5 fois l'orange et 4 fois le raisin), sa richesse en fibre, en minéraux (A, B). Le palmier dattier fournit aux oasiens en complément de cheptel, une gamme très large de produits vitaux. En effet, toutes les parties de la plante sont valorisées (tableau 1).

**Tableau 1:** Différentes utilisations des fruits et sous-produits du palmier dattier.

Partie de l'arbre	Son utilisation
Dattes	Consommation humaine (dattes nature, sous forme transformée), aliment pour le bétail (déchets des dattes et les noyaux), biocarburant.
Palmes	Bois de chauffage, ombrage, clôture.
Folioles	Vannerie, cordes, aliment pour le bétail, cure-dents (épines).
Rachis	Bois de chauffage, fibres.
Spadices	Cordes et bois de chauffage.
Lif	Cordes, couffins, filets
Stipe	Bois de chauffage et d'œuvre (menuiserie, canaux d'irrigation).
Cœur du palmier	Nourriture
Sève	Boisson
Pollen	Médicaments



Sur le plan pharmaceutique, les dattes pourraient être utilisées comme calmants contre les insomnies et les ballonnements, comme compresses pour le rétablissement des fractures des os (Ghars et Azerza), comme fortifiant pour les femmes après accouchement (Feggouss). Des suspensions de pollen de palmier dattier sont traditionnellement utilisées contre l'infertilité dans l'ancienne Egypte dans les contrées du Golfe persique (Guerradi et *al.*, 2005).

## 8. Génétique du palmier dattier

Le genre *Phoenix* est constitué d'espèces dioïques, hétérozygotes à reproduction allogame. Ces espèces sont diploïdes, le nombre chromosomique est de  $2n=36$  ( $n=18$ ). Selon Munier en 1973 le *Phoenix dactylifera* L. est un hybride probable de plusieurs phœnix, qui provoquent une forte hétérogénéité de la descendance.

Cependant, d'après les travaux de Al Salih en 1987, il existerait une variation dans le nombre chromosomique entre les cultivars et à l'intérieur d'un même cultivar. A ce jour la génétique du palmier dattier est donc loin d'être bien connue car son caryotype n'a pas été déterminé. La dioécie du palmier dattier entraîne une allogamie obligatoire qui permet un brassage génétique mais aussi une hétérozygotie (Dellaporta et Calderon-Urrea, 1993).

## 9. Notion de cultivar

Elle repose sur la description morphologique du fruit, mais de façon moins évidente, sur la description de l'arbre. L'appellation de variété ne peut être appliquée qu'aux palmiers femelles, car ils sont les seules à produire les fruits. Il est difficile de distinguer des variétés pour les palmiers mâles. D'une manière générale et pour éviter toutes confusions, il est préférable de retenir la notion de cultivar pour dénommer l'arbre, et la notion de variété pour dénommer le fruit. Ils existent un grand nombre de cultivars de dattiers. C'est ainsi qu'en Algérie plus de 1000 cultivars ont été recensés par Benkhalifa en 2006.

## 10. Pathologie du palmier dattier

Le palmier dattier, comme toute espèce végétale, se trouve sous la menace de diverses pathologies dues à des ravageurs (insectes ou acariens) ou à des parasites (champignons, bactérie, ou mycoplasmes). Parmi ces pathologies, on peut citer: la maladie de «Boufaroua», la maladie du «Djreb» et la pourriture de l'inflorescence mais la maladie la plus dévastatrice reste celle de la fusariose vasculaire appelée «Bayoud». Elle est causée par le champignon imparfait appartenant à l'espèce *Fusarium oxysporum* f.sp. *albedinis* (Djerbi, 1990).



Le bayoud est apparu dans la vallée du Drâa au Maroc vers 1870 et s'est propagé dans tout le territoire en détruisant 10 à 12 millions d'arbres en un siècle. Cette maladie a continué de progresser jusqu'en Algérie où elle a atteint les palmeraies des régions Metlili en 1950, Ghardaïa, en 1965 et El Goléa en 1978 en suivant un axe nord-sud où elle aurait décimé 3 millions d'arbres (Djerbi, 1988; El Hadrami et *al.*, 2005). Actuellement les palmerais de l'est de l'Algérie et de Tunisie sont menacées, d'autant plus que ce sont le centre de production de la variété Deglet Nour (très sensible au bayoud). Cependant certains cultivars présentent une résistance au F.o.a tel que le cultivar Takerboucht (Saadi, 1979).

Le bayoud présente des symptômes externes et internes très particuliers. En général, les premiers signes de la maladie se manifestent par un dépérissement et un dessèchement progressif, de la base vers l'extrémité, d'une ou de plusieurs palmes au niveau de la couronne moyenne, c'est l'attaque hémiplegique typique de la fusariose (Bulletin OEPP/EPPO, 2003). En se desséchant, la palme fini par mourir et prend l'aspect d'une plume mouillée, avec une couleur blanchâtre (annexe 1) (Djerbi, 1990; Ouinten, 1996).

Le palmier dattier atteint, meurt 6 mois à 2 ans, après l'attaque par le *Fusarium oxysporum* f.sp. *albedinis*. Après la mort de l'arbre, le F.o.a persiste sous forme de chlamydospores dans les tissus de certains organes (racines, rachis,...etc.) (Louvét, 1977).

Différentes méthodes ont été préconisées, en vue de lutter contre le bayoud, tel que la lutte culturale (Tirichine, 2007) et la lutte chimique (Roger, 1990), mais elles n'ont pas abouti à des résultats. Les mesures prophylactiques ont permis de ralentir la progression de la maladie sans l'arrêter définitivement. Enfin la lutte génétique (sélection des cultivars résistants) semble être la plus prometteuse (Mahdi, 2011).

## **11. Mode de multiplication chez le palmier dattier**

Trois méthodes de multiplication peuvent être utilisées, pour mettre en place de nouvelles surfaces de phœniciculture ou pour l'extension des palmeraies (CIRAD, GRET, 2002).

### **11.1. Multiplication par semis (par graine)**

Cette technique de propagation, est utilisée comme méthode traditionnelle dans les programmes d'amélioration génétique, à partir d'hybridation contrôlée orientée dans le sens d'une amplification du brassage génétique, et qui permet d'étudier les descendants des croisements et d'évaluer l'hérédité des caractères agronomiques et morphologiques (Sedra,



2003). Elle est longue, pas rentable et généralement utilisée lorsque les rejets sont absents (CIRAD et GRET, 2002; Kriaa *et al.*, 2012).

La multiplication du palmier par graine ne garantit pas le maintien de la variété cultivée et est infidèle puisqu'il y a disjonction des caractères des parents (qualité, sexe, résistance...) (Sedra, 2003).

Ce mode de multiplication donne une population hétérogène (50% pieds mâles et 50% pieds femelles); la différence entre les deux sexes n'est apparentes qu'après le développement des premières inflorescences soit 10 ans de culture après le premier semis.

Cette technique est non satisfaisante, car la moitié de la nouvelle génération est mâle alors qu'un seul pied mâle (*dokkar*) suffit pour la fécondation d'au moins 50 pieds femelles (Nixon et Fur, 1965; Tisserat, 1979; Barton *et al.*, 1989; Zaïd *et al.*, 2002).

### 11.2. Multiplication par rejets

Ce mode de multiplication permet une reproduction pratiquement conforme et une transmission génétique fidèle des caractères des parents. Il permet donc de conserver intégralement les aptitudes du pied mère ainsi que les caractéristiques de ses fruits.

Les rejets appelés «*djebbars*», sont prélevés de la base du tronc et doivent avoir un diamètre d'au moins 30 cm avec un poids de 12 à 25 Kg (Mezouane, 2012). La séparation du rejet de son pied mère est une opération qui conditionne la reprise. Le nombre de rejets varie selon les cultivars. Certains cultivars algériens tel que la Takerboucht ne donne que 1 à 3 rejets; d'autre produisent jusqu'à 30 rejets, c'est le cas de la Deglet Nour.

Cette technique de multiplication est donc considérée comme la plus stable et la plus efficace par les phœniciculteurs (CIRAD et GRET, 2002).

### 11.3. Multiplication *in vitro*

La multiplication végétative *in vitro*, ou micropropagation, permet de cultiver isolément sur un milieu nutritif synthétique, un organe, un fragment d'organe, un tissu ou de cellules isolées prélevé d'une plante, dans un environnement contrôlé et dans des conditions d'asepsie totale afin que ce dernier ne soit pas gêné par la présence de bactéries ou de champignons. Ces explants, peuvent soit proliférés de façon anarchique et constitué des amas cellulaires indifférencier qu'on appelle cals (qui sont conservés indéfiniment par repiquage ou utilisés



pour régénérer des plantes entières), soit développer des bourgeons et/ou des racines, donnant ainsi naissance par voie directe à des plantules viables identiques à la plante de départ (Zryd, 1988).

Cette technique a été énoncée par Haberlandt en 1902, qui suite à ses travaux à permis d'ouvrir la voie de la micropropagation. Il a réussi à faire survivre *in vitro*, quelques mois, mais sans multiplication, de petits amas cellulaires.

Ce n'est qu'en 1934 que White réussit la culture de racines de tomate sur un milieu contenant de l'eau, des sels minéraux, un extrait de levure et du sucre et une hormone végétale, la seule connue à l'époque: l'auxine. En 1939, Gautheret et Nobécourt (In Haïcour, 2002) ont obtenu à partir de tissus de carotte, un amas cellulaire dédifférencié: un cal. Grâce à ces travaux, démarre vraiment la culture *in vitro*.

En 1962, Murashige et Skoog étudient la multiplication végétative du tabac et mettent au point le premier milieu de base pour la culture *in vitro*. Ce milieu contient des sels minéraux, des sucres, des vitamines B, des auxines et des cytokinines. Ce milieu rend possible la culture et la prolifération de méristèmes de tiges jusqu'alors réfractaires à la multiplication végétative *in vitro*. La preuve irréfutable de la possibilité de régénération à partir de cellules végétales somatiques fut, sans aucun doute, l'obtention en 1965 d'une plante entière à partir d'une cellule isolée de culture de tissus par Vasil et Hildebrandt.

En 1971, Takebe, Labib et Melchers obtiennent une plante entière à partir d'un protoplaste isolé de mésophile de feuilles.

Dès lors, toutes les données de base sont connues ou du moins maîtrisées, pour multiplier à l'infini n'importe quelle plante herbacée (Ammirato, 1983). Par contre peu d'espèces ligneuses sont multipliées par les techniques de culture de tissus.

Depuis le premier succès de démonstration de micropropagation du palmier dattier, il y a eu des progrès signifiant pour améliorer la régénération des plantes (Al-Khayri, 2012).

### 11.3.1. L'organogenèse

Elle consiste à induire la formation et le développement des bourgeons et pousses adventives sur les tissus de plusieurs types d'explants. Elle peut être directe ou indirecte. C'est une voie qui permet la production des bourgeons à partir de cals légers suite à la mise en culture de fragments de cœur de rejets.



### 11.3.2. L'embryogenèse somatique

Cette technique est considérée comme le processus de régénération le plus efficace pour la micropropagation du palmier dattier (AL-Khayri, 2011). Un apport important de la technique des cultures *in vitro* à la biologie a montré que des cellules somatiques (à 2n chromosomes) pouvaient produire des structures comparables à des embryons, méritant l'appellation d'embryons somatiques (Margara, 1989; John et Smith, 2004). Les explants, provenant de la base de jeunes feuilles de cœurs de rejets ainsi que les inflorescences, sont cependant les plus utilisés (El Hadrami et al., 1997).

Il existe deux voies d'embryogenèse somatique

- L'embryogenèse somatique directe: elle s'opère à partir de cellules embryogènes individualisées au sein de l'explant primaire sans passage par le stade cal.
- L'embryogenèse somatique indirecte: elle est induite après une étape de multiplication cellulaire sous forme de cals embryogènes.

La multiplication végétative du palmier dattier par embryogenèse somatique a été mise au point à la fin des années 1970 avec les travaux de Ait chitt et Beauchesne (1975), Reuveni (1979), Reynolds et Murashig (1979), Tisserat (1979), Bouguedoura (1979), De Mason (1980), Chabane (1995), Yatta et Fergani (2007) à partir d'embryons zygotiques, de bourgeons axillaires issues de rejets et de feuilles immatures. Les tissus embryogènes peuvent être maintenus *in vitro* en milieu solide ou liquide et peuvent générer des embryons en grande quantité.

## 12. Culture de cellules et de protoplastes

### 12.1. Suspension cellulaire

Les cellules et/ou les amas de cellules, en état actif de division, se développent et se multiplient de façon homogène dans un milieu liquide. Le terme de suspension cellulaire est souvent utilisé pour décrire les cultures en suspension de cellules individuelles et d'agrégats cellulaires (Auge et al., 1989; Yatta et al., 2014; Yatta et Bouguedoura, 2015)

Classiquement, les suspensions cellulaires sont établies en milieu liquide maintenu en agitation à partir d'un cal friable afin d'assurer l'aération et la dispersion des cellules (El Hamdouni et al., 1999; Yatta et al., 2012). Il est ensuite absolument nécessaire d'entretenir la suspension cellulaire par des repiquages réguliers. A partir d'agrégats cellulaires se





développent des embryons somatiques individualisés (Margara, 1989) présentant un développement relativement synchrone (Rival et *al.*, 1997; Yatta et Fergani, 2007; Yatta et Bouguedoura, 2013).

L'année 1958, a été marquée par la mise en évidence du phénomène d'embryogenèse somatique à partir d'une suspension cellulaire de carotte, grâce aux travaux de Steward et *al.*, et Reinert. Ceci a permis de régénérer de nombreuses espèces d'angiospermes et de gymnospermes en milieu liquide et/ou gélosé (Thorpe, 1988).

La régénération à partir de suspensions a été réalisée avec succès chez plusieurs monocotylédones, on peut citer *Asparagus ossicimalis* (asperge) (Steward et Mapes, 1971) et *Lilium arboricola* (Lys) (Krikorian et Kann, 1981); chez les graminées *Fennistum americanum* (millet) (Vasil et Vasil, 1981), *Zea mays* (maïs) (Vasil et Vasil, 1986) et *Triticum aestivum* (blé) (Vasil et *al.*, 1999) et chez les monocotylédones pérennes *Musa sinensis* (bananier) (Novak et *al.*, 1989), *Elaeis guineensis* (palmier à huile) (Touchet et *al.*, 1990; Sondahl, 1991) et *Phoenix dactylifera* L. (palmier dattier) (Sané et *al.*, 2006).

Les techniques de génie génétique ont été améliorées grâce à de nombreuses suspensions, notamment de monocotylédones. En effet, les suspensions sont utilisées lors d'une régénération de plantes transgéniques pour obtenir une culture importante de cellules transformées (Tiecoura et *al.*, 2014). Elles constituent aussi une sources de protoplastes du fait qu'elles possèdent une grande quantité de cellules en culture, facilement accessible à la digestion enzymatique et capable de régénérer des plantes entières (Assani et *al.*, 2002).

Selon Vasil et Vasil les suspensions embryogènes fournissent les seules cellules dont les protoplastes sont totipotentes chez les graminées, et que les plantes régénérées à partir des protoplastes proviennent des espèces pour lesquelles une suspension embryogène a été préalablement établie.

Les suspensions cellulaires possèdent une capacité à produire des métabolites secondaires (alcaloïdes...) caractéristique de la plante d'origine (Assani et *al.*, 2002).

Pour maintenir une suspension cellulaire, il faut vérifier régulièrement la présence de contamination et le potentiel de régénération ainsi que le taux de croissance (Auge et *al.*, 1989). Cependant la qualité d'une suspension cellulaire diminue avec le nombre de repiquages. Ceci se traduit par un risque plus élevé de contamination. Pour réduire les problèmes liés aux repiquages, un protocole de cryoconservation qui consiste à transformer



tout ou partie de l'eau cellulaire en glace, sans léser les cellules. L'utilisation de la culture de suspension embryogène à améliorer le rendement de processus de régénération et a permis la propagation de plusieurs cultivars de palmier dattier à grande échelle (Sané et *al.*, 2012).

## 12.2. Les protoplastes

Un protoplaste est une cellule végétale ou bactérienne dont on a artificiellement retiré sa paroi squelettique qui adopte une forme sphérique et qui est capable, dans certaines conditions de croître et de se diviser (Auge et Boccon-Gibod, 1989; Tourte et *al.*, 2002).

Les protoplastes isolés constituent un matériel végétal unique et original pour les manipulations génétiques des plantes. Ils offrent un système cellulaire particulièrement approprié pour l'application des techniques nouvelles, telles que la fusion somatique, la transformation génétique ou l'exploitation de la variation somaclonale chez les végétaux (Sihachakr, 2002).

Le terme de protoplaste a été utilisé la première fois par Hansteinen 1880, pour décrire la matière vivante contractée par la plasmolyse et limitée par le plasmalemme. Dès 1913, Giaja obtient des protoplastes végétaux par dégradation des parois cellulaires de levures au moyen de suc digestif d'escargot; les protoplastes obtenus possédaient encore un mécanisme respiratoire et fermentaient les sucres. En 1969, Takebe obtient, pour la première fois en grande quantité et de façon aseptique des protoplastes de Tabac, il réussit à les maintenir en culture.

Les premiers travaux sur les protoplastes portent bien évidemment sur la régénération d'une plante entière à partir d'une cellule isolée. Pour surmonter cette difficulté des méthodes d'isolement et de culture ont été élaborées par de nombreuses équipes. Des études structurales ont montré que la membrane des protoplastes est une membrane biologique typique (Burgess et *al.*, 1973 ; Schnabl et *al.*, 1978). Sa surface est caractérisée par la présence d'évaginations (Williamson et *al.*, 1977 ; Burgess et Linstead, 1977).

Sur des protoplastes de Carotte, Asamizu et *al.*, (1977) notent que la synthèse de la cellulose est réalisée 24 heures après la mise en culture. Les premiers composés néoformés diffèrent d'ailleurs de ceux de la paroi cellulaire d'origine (Asamizu et *al.*, 1980).

Quant à la fusion ne s'est avérée réellement intéressante que lorsque Kao et *al.*, (1974) puis Wallin et *al.*, (1974) qui ont préconisé l'emploi de  $Ca^{2+}$  couplé à l'action fusionnante du



polyéthylène-glycol (PEG), ce qui permet l'agglutination des protoplastes par modification des charges du plasmalemme.

En ce qui concerne la famille des *Arecaceae*, les premiers travaux sur les protoplastes sont réalisés par Eeuwens (1978) qui a isolé pour la première fois des protoplastes de cocotier, Haibon et Kovoov (1982) qui ont réussi à isoler des protoplastes et à obtenir des microcals.

Quant au palmier dattier, Gabr et Tisserat (1985) ont réussi à isolés des protoplastes à partir d'apex de tiges, de méristèmes apicaux ainsi que de cals embryogènes, les protoplastes issus de ces cals ont formé des colonies sur milieu gélosé.

En 2006, Chabane et Bouguedoura ont isolé des protoplastes à partir des suspensions cellulaires et de cals nodulaires. Leur étude a permis la production de protoplastes viables en quantité significative.

Aida. Rizkalla et *al.*, (2007) ont isolé des protoplastes à partir des jeunes feuilles issues de ramifications des génotypes des cultivars Barhee et Zagloul, c'est ainsi qu'ils ont réussi a induire les premières divisions cellulaires.

Yatta et *al.*, (2013, 2014 et 2015) ont isolé et cultivé des protoplastes de deux cultivars du palmier dattier.

### **12.2.1. Isolement de protoplastes**

#### **12.2.1.1. Plasmolyse**

La cellule végétale est fortement turgescente, ceci est dû à la présence de solutés et de sels minéraux à l'intérieur de la cellule qui sont à l'origine de l'existence d'un potentiel hydrique (potentiel osmotique) provoquant alors l'entrée d'eau dans la cellule. Ce potentiel osmotique est équilibré par la pression exercé par la paroi.

En conséquence la suppression de la paroi doit être compensée par une certaine hypertonie du milieu extérieur. La plasmolyse a pour effet de détacher le protoplaste de la paroi cellulaire, le protoplaste se trouve alors dans la cavité pariétale puis il est libéré par digestion de la paroi. La plasmolyse a également un rôle de diminuer la tension de surface des protoplastes à la suite d'une régression vacuolaire et d'une déshydratation du cytoplasme, évitant ainsi leur éclatement. Les agents plasmolysants les plus couramment utilisés sont des oses-alcools (le mannitol, le sorbitol) ou des sels minéraux (Nacl, Kcl) (Zrÿd, 1988; Sihachakr, 2002)



### 12.2.1.2. Dégradation de la paroi

Dans la cellule végétale, le plasmalemmes est doublé par une paroi cellulaire constituée de fibres de cellulose et de pectine. Cette dernière contient également des protéines (des enzymes comme les phosphatases). Lors de la différenciation cellulaire, la composition chimique de la paroi évolue (paroi primaire, secondaire, tertiaire...etc.). La structure de la paroi est très complexe. Elle contient:

- 20 à 30% de cellulose: polyglucane constitué de chaînes de glucose liées en  $\beta$ -(1,4) associées en fibrilles et organisées à leur tour en fibres.
- 70 à 80% de polysides amorphe (hémicellulose et pectine): l'hémicellulose sont des polymères associant les oses rencontrés dans la paroi cellulaire (galactose, rhamose, gsylose, arabinose), tandis que les pectines contiennent des acides poly-glucuronique et poly-galactoronique.
- et parfois jusqu'à 10% de protéines.

La dégradation de la paroi est obtenue grâce à la digestion enzymatique. Pour obtenir des activités cellulases et pectinases, on fait appel à des champignons tels que *Morythecium verrucatia*, *Trichoderma aviride* et *Aspergillus niger* (Zrýd, 1988; Sihachakr, 2002).

### 12.2.2. Culture des protoplastes

La culture des protoplastes est influencée par plusieurs facteurs

- Le matériel végétal: les protoplastes de différentes espèces et de différents tissus de la même espèce peuvent avoir des besoins nutritionnels différents.
- La densité de la culture: l'ajustement des protoplastes à une densité élevée est nécessaire pour induire une première division cellulaire. Généralement une densité de 50 000 protoplastes/ml est utilisée, mais certaines espèces exigent une densité beaucoup plus élevée (100000 – 500 000 protoplastes pour le bananier et le manioc) pour obtenir un taux de division correcte.
- La méthode de culture: la culture des protoplastes reste l'étape la plus difficile de toutes les approches *in vitro* visant la régénération de plantes, particulièrement chez les plantes ligneuses pérennes. Les milieux de mise en culture des protoplastes ne diffèrent pas essentiellement des milieux de cultures des cellules isolées. La différence majeure est la nécessité de maintenir un potentiel osmotique assez bas par l'usage du mannitol ou du sorbitol, on peut citer: MS (Murashige et Sckoog 1962), B5 (Gamborg



et *al.*, 1968), KM (Kao et Michayluk, 1975) et la couche nourricière (Panis et *al.*, 1993; Megia et *al.*, 1993).

### 12.2.3. Fusion des protoplastes

L'hybridation somatique permet de surmonter les barrières d'incompatibilité sexuelle, qui constituent une limite majeure dans l'amélioration des plantes et le croisement des variétés cultivées avec des espèces sauvages pour introduire de nouveaux caractères, tels que la résistance aux maladies et ravageurs ou tout simplement pour augmenter la variabilité génétique. Cependant, la fusion de protoplastes nécessite la connaissance des gènes d'intérêts, particulièrement ceux liés aux mécanismes de résistances aux maladies.

Afin d'obtenir un hybride somatique, les cellules végétales doivent d'abord être débarrassées de leur paroi pectocellulosique pour être induites à fusionner. De plus, l'avantage des cellules végétales est leur totipotence, qui leur procure ainsi la potentialité de régénérer une plante entière à partir d'une cellule isolée. La maîtrise de plusieurs facteurs influence le succès de la fusion des protoplastes (Sihachakr et *al.*, 1994) et qui sont:

- Isolement des protoplastes en grande quantité et régénération des plantes.
- Technique de fusion des protoplastes.
- Sélection de structure hybride.
- Régénération à partir de cals hybrides.
- Confirmation de la nature hybride des structures régénérées.

Les protoplastes se repoussent mutuellement en vue des charges électrostatiques négatives présentes à la surface de la membrane plasmique qui sont causées en majeure partie aux groupes phosphates, et pour une part plus faible, à des protéines. Afin d'induire une fusion cellulaire, on fait appel à deux stratégies: les méthodes chimiques et électriques (Sihachakr et Haïcour, 1996).

#### 12.2.3.1. Méthode de fusion chimique

Cette méthode utilise des agents chimiques, tels que le calcium et le polyéthylène-glycol «PEG». L'utilisation du PEG a été simultanément découverte par deux groupes de chercheurs en 1974: Kao et Michayluk au Canada, et Erickson et *al.*, en Suède. Cette méthode reste simple, très utilisée, efficace et ne nécessite pas l'utilisation de matériel sophistiqué. Le PEG est une substance non ionisante à «surface-actives» provoquant l'accolement des protoplastes



par la neutralisation des charges négatives présentes à la surface de la membrane conduisant alors à un contact membranaire intime, suivie de fusion de protoplastes, qui se produit au cours du rinçage. Le taux de fusion est relativement élevé en utilisant des solutions de rinçage contenant une forte concentration d'ions  $\text{Ca}^{2+}$  et un pH élevé. Cette substance, induit des fusions cellulaires d'une manière non spécifique en plus de la formation de cellules multi-nuclées par fusion de plusieurs protoplastes. D'autres produits peuvent être utilisés pour provoquer la fusion des protoplastes, comme les nitrates de sodium ( $\text{NaNO}_3$ ); cependant ils présentent des taux de fusion très faibles qui sont de l'ordre de 0 à 5% (Power et *al.*, 1970; Rene, 1984; Auge et *al.*, 1989; Sihachakr, 2002).

### 12.2.3.2. Méthode de fusion électrique ou électrofusion

Cette méthode a commencé durant les années 1980, elle est très efficace pouvant induire la fusion cellulaire avec une fréquence élevée jusqu'à 100%. Elle consiste à soumettre les protoplastes à un champ électrique de haute fréquence, qui a la propriété de les aligner en chapelets entre les deux électrodes, puis de produire la fusion par une décharge électrique (200 V) pendant un très court instant (une microseconde) ce qui provoque des ruptures de membranes et la fusion au niveau des points de contact entre protoplastes (Sihachakr 2002; Zrýd, 2002). Cette technique est préférée en terme de maintenance de la viabilité des protoplastes et de la réduction des dommages membranaires, déformation et rupture générale des protoplastes ainsi que la fusion d'organites (Davey et *al.*, 2005).



*Matériel*

*et*

*Méthodes*





Notre expérimentation s'est déroulée au niveau de la Division Biotechnologie et Amélioration des plantes de l'Institut National de la Recherche Agronomique dans le cadre des activités de recherche de l'équipe Palmier Dattier. La durée du stage est de 6 mois (Janvier-Juin 2015).

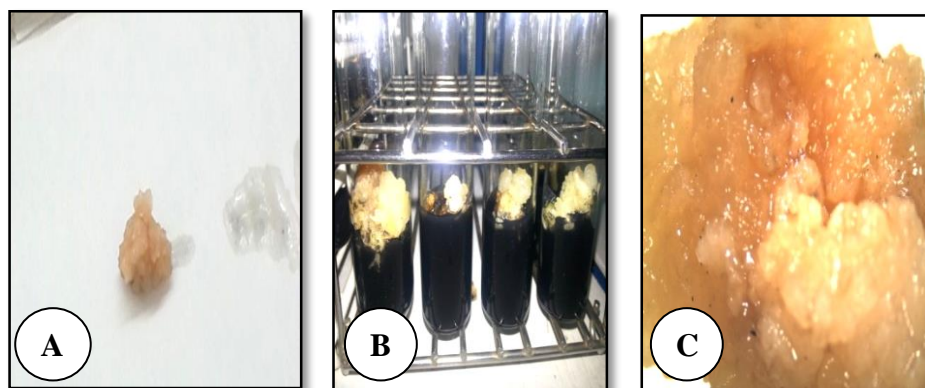
## 1. Multiplication de la callogenèse (entretien de la callogenèse)

### 1.1. Matériel biologique

Notre travail a été mené sur un matériel végétal constitué de cals de trois cultivars du palmier dattier issus de rejets prélevés dans les palmeraies d'Adrar et de Touggourt

- ✓ Le cultivar «Deglet Nour»: sensible au bayoud et d'une excellente qualité de dattes.
- ✓ Le cultivar «Takerboucht»: résistant au bayoud et d'une qualité dattière moyenne.
- ✓ Le cultivar «Tegaza»: sensible au bayoud et d'une bonne qualité de dattes.

Dans la première étape de ce travail, nous avons entretenu des cals embryogènes déjà mis en culture dans deux milieux: P<sub>12.5</sub> et M<sub>100</sub> pour éviter l'accumulation des polyphénols et permettre ainsi, une bonne prolifération cellulaire et une amélioration de la capacité de production (figure 3). Les cals qui prolifèrent sont subdivisés au cours de subcultures, en deux parties ou plus, selon leur taille. Ces derniers sont ensuite placés dans l'obscurité à une température de 24°C ±2.



**Figure 3:** Repiquage des cals.

**A+B:** Repiquage des cals sous la hotte à flux laminaire, **C:** Cal sous la loupe Leica EZ4 D.





## 1.2. Protocole expérimental

### 1.2.1. Stérilisation du matériel de culture

Lavage de la verrerie (tubes à essai, erlenmeyers, éprouvettes) avec des détergents et rinçage avec de l'eau distillée. Ce matériel est stérilisé à l'autoclave à 120° C pendant 20 minutes. Les pinces, bistouris, scalpels et spatules, utilisés lors du repiquage sont stérilisés à l'étuve à 180°C pendant 24 heures puis dans le stérilisateur à billes avant chaque utilisation (annexe 2).

### 1.2.2. Préparation des milieux de cultures solides

Les milieux de cultures utilisés pour ce travail ont été mis au point par l'équipe du laboratoire de physiologie végétale de l'INRAA. Ils contiennent des éléments essentiels au développement des tissus végétaux: les éléments minéraux, les substances organiques, les régulateurs de croissance et le charbon actif. (annexe 4).

#### ▪ Les éléments minéraux

Ils correspondent à ceux de Muraschig et Skoog (1962), ils sont absorbés sous forme ionique.

**-Les macroéléments:** comme l'azote (N), et le phosphore (P) entrent dans la composition des protéines et des acides nucléiques. Le potassium (K), le magnésium (Mg), et le calcium (Ca) interviennent dans le maintien de l'équilibre ionique. L'ion  $K^+$  règle la pression osmotique. Le  $Mg^{2+}$  entre dans la composition de la chlorophylle. Le  $Ca^{2+}$  est un antagoniste des ions  $K^+$  et  $Fe^{2+}$  (annexe 3).

**-Les microéléments:** appelés aussi oligo-éléments, jouent un rôle important dans les mécanismes enzymatiques. Les principaux d'entre eux sont le fer (Fe), le cuivre (Cu), le zinc (Zn), le cobalt (Co), le nickel (Ni), le bore (B). (annexe 3).

#### ▪ Les éléments organiques

**-Source de carbone:** le saccharose est ajouté à tous les milieux à des concentrations allant de 45 à 60 g/l. Ces sucres utilisés à des concentrations élevées, ont une forte action sur l'embryogenèse somatique de même que sur la rhizogenèse.



**-Acides aminés et autres additifs:** la glutamine et l'adénine sont ajoutés au milieu. Ils ont un effet sur la prolifération des cals et la germination des embryons somatiques.

**-Les vitamines:** Il s'agit de la thiamine fournie à 1 mg/l et du myoinositol à 100 mg/l dont l'effet est très nette sur la prolifération tissulaire.

**-Le charbon actif:** il permet d'absorber les composés phénoliques excrétés par l'explant et diffusés dans le milieu et qui provoquent le brunissement et l'inhibition de la croissance.

- **Les régulateurs de croissance (hormones végétales)**

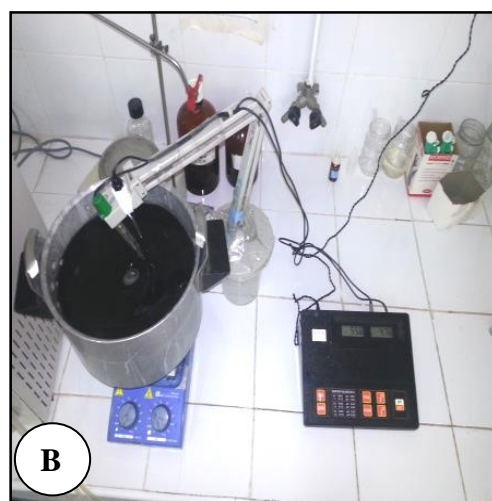
Ils ont une influence très sensible sur le développement des tissus. La réussite de la culture *in vitro* est basée essentiellement sur un bon équilibre entre les auxines et les cytokinines dans le milieu. Deux auxines (2,4-D et Picloram) et une cytokinine (IPA) ont été utilisées pour l'induction et la prolifération des cals embryogènes (annexe 2).

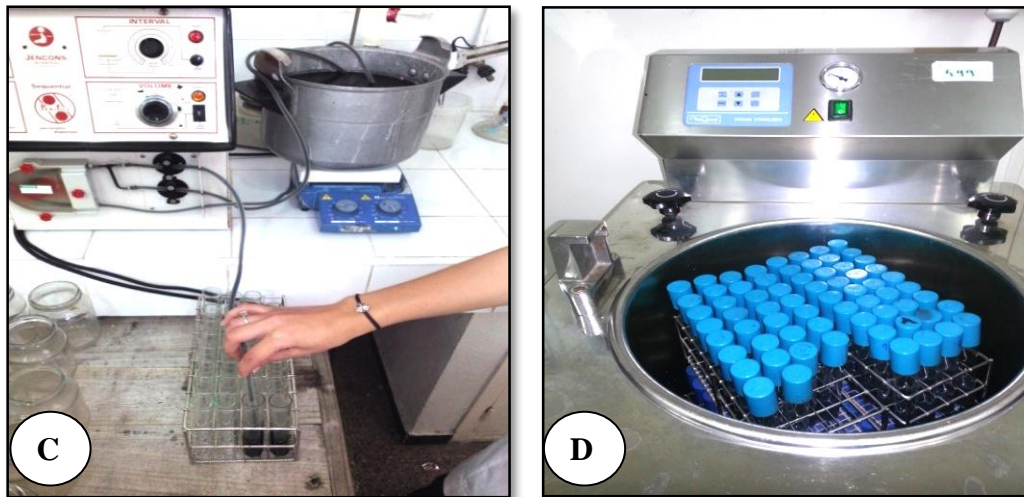
- **Agents gélifiants**

Ils permettent la solidification des milieux de cultures. La quantité de l'agent gélifiant tel que l'agar ou le phytigel, ajouté dans le milieu, joue un rôle dans l'évolution de culture.

### 1.2.3. Stérilisation des milieux de cultures

Les milieux de culture sont distribués dans des tubes pyrex (15 ml par tube) à l'aide d'un distributeur automatique. Le pH des milieux est régulé à 5.8 avant d'être stérilisés à l'autoclave à 120°C pendant 20 minutes (figure 4).





**Figure 4:** Préparation et stérilisation des milieux solides.

**A:** préparation du milieu de culture, **B:** ajustement du pH, **C:** distribution du milieu de culture, **D:** stérilisation de milieu de culture.

## 2. Etablissement des suspensions cellulaires

### 2.1. Matériel biologique

Pour l'obtention de la suspension cellulaire nous avons utilisé des souches de cals embryogènes des trois cultivars: Deglet Nour (DN), Takerboucht (TKB) et Tegaza (TGZ) prélevés des milieux d'inductions ( $P_{12.5}$  et  $M_{100}$ ) (figure 5).



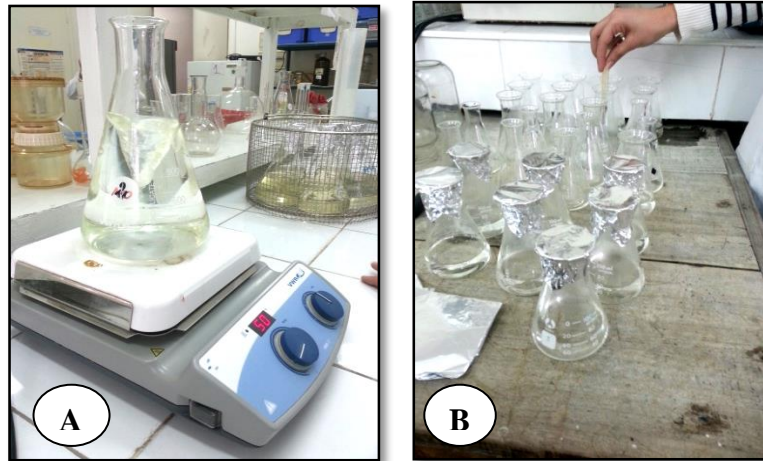
**Figure 5:** Cal sous la loupe Leica EZ4 D.



## 2.2. Protocole expérimental

### 2.2.1. Préparation et stérilisation du milieu de culture liquide

Le milieu adéquat pour l'établissement des suspensions cellulaires est le milieu liquide P<sub>5</sub>, qui contient 5 mg/l de Picloram (annexe 4). Le milieu est distribué dans des erlenmeyers de 100 ml à raison de 50 ml de milieu par erlenmeyer. Le pH du milieu est ajusté à 5.8 avant sa stérilisation à l'autoclave à 120°C pendant 20 minutes (figure 6).

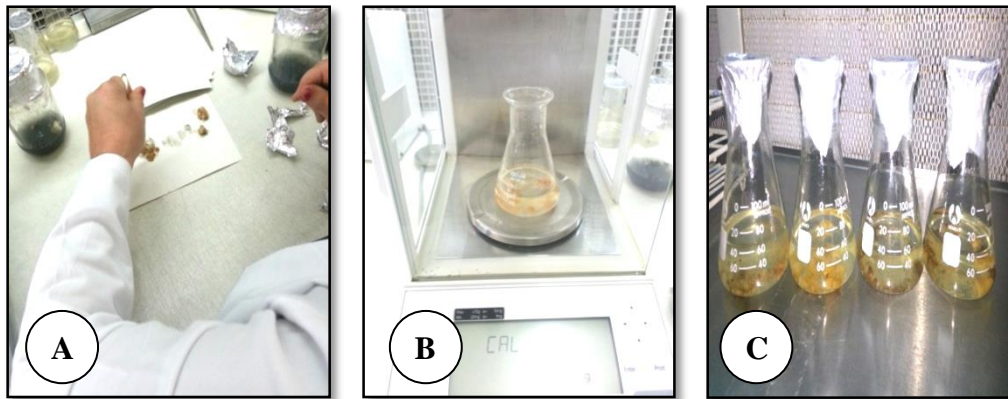


**Figure 6:** Préparation du milieu liquide (P<sub>5</sub>).

**A:** Préparation du milieu. **B:** distribution du milieu dans des erlenmeyers.

### 2.2.2. Conditions de cultures

Les cals sélectionnés, grâce à leur texture (friable), sont écrasés à l'aide d'un pilon stérile puis repiqués dans le milieu liquide à raison de 2 g par erlenmeyer. Cette étape est réalisée sous la hotte à flux laminaire. Les erlenmeyers sont placés à l'obscurité à une température de 24°C ±2 sur un agitateur rotatif horizontal à une vitesse de 100 tours/min (annexe 2). Les cultures sont repiquées tous les 7 à 10 jours sur un milieu liquide frais jusqu'à l'obtention des suspensions cellulaires (figure 7).



**Figure 7:** Obtention de la suspension cellulaire.

**A:** broyage des cals. **B:** mise en culture sur milieu liquide. **C:** Incubation.

### 2.2.3. Test de viabilité

Nous avons ajouté une goutte de la solution FDA (Fluorescéine DiAcétate) à 1 ml de suspension cellulaire. Nous avons laissé agir 10 min, puis observé une goutte au microscope inversé: les cellules viables sont fluorescentes avec une coloration verte (estérases actives).

## 3. Isolement des protoplastes

Le protocole suivi pour l'isolement des protoplastes est celui du bananier modifié (Assani et *al.*, 2002). Après macération enzymatique du matériel végétal utilisé, les protoplastes libérés sont purifiés, fusionnés puis cultivés pour leur régénération en plantes.

### 3.1. Matériel végétal

Le matériel végétal utilisé pour l'isolement des protoplastes est la suspension cellulaire ainsi que les microcals des trois cultivars (Deglet Nour, Takerboucht et Tegaza).

### 3.2. Protocole expérimental

#### 3.2.1. Préparation des solutions enzymatiques

Dans le but d'une digestion de la paroi pectocellulosique, nous avons défini un complexe enzymatique adéquat à la suspension cellulaire. Afin de tester l'influence des différentes enzymes (Cellulase RS, Pectolyase Y-23, Pectinase et Hémicellulase), nous avons modifié les différents constituants ainsi que les différentes concentrations dans cinq solutions enzymatiques (SE1, SE2, SE3, SE4, SE5) (tableau 2).

**Tableau 2** : Composition des solutions enzymatiques testées (pour 100 ml de solution).

Produits	SE1	SE2	SE3	SE4	SE5
Cellulase RS	0.5%	0.5%	/	1%	2%
Pectinase	/	0.5%	4%	/	/
Hémicellulase	2%	2%	6%	2%	6%
Pectolyase Y-23	0.5%	/	/	0.5%	/
CaCl <sub>2</sub>	0.5%	0.5%	0.5%	0.5%	0.5%
Kcl	3%	3%	3%	3%	3%
MES	0.05%	0.05%	0.005%	0.05%	0.005%
<b>pH = 5.6</b>					

Après préparation des différentes solutions enzymatiques, elles sont ensuite stérilisées sous la hotte à l'aide d'une pompe sous vide munie d'un filtre millipore (0.22 µm) (figure 8).

**Figure 8**: Stérilisation des solutions enzymatiques sous la hotte à l'aide de la pompe sous vide.

### 3.2.2. Macération enzymatique

Durant notre expérimentation, nous avons suivi deux protocoles de macération, en utilisant des suspensions cellulaires des trois cultivars (DN, TKB, TGZ) pour l'isolement des protoplastes afin de les utiliser ultérieurement comme parents de fusion. Cependant comme l'obtention de suspension cellulaire est longue et difficile, nous avons également essayé de

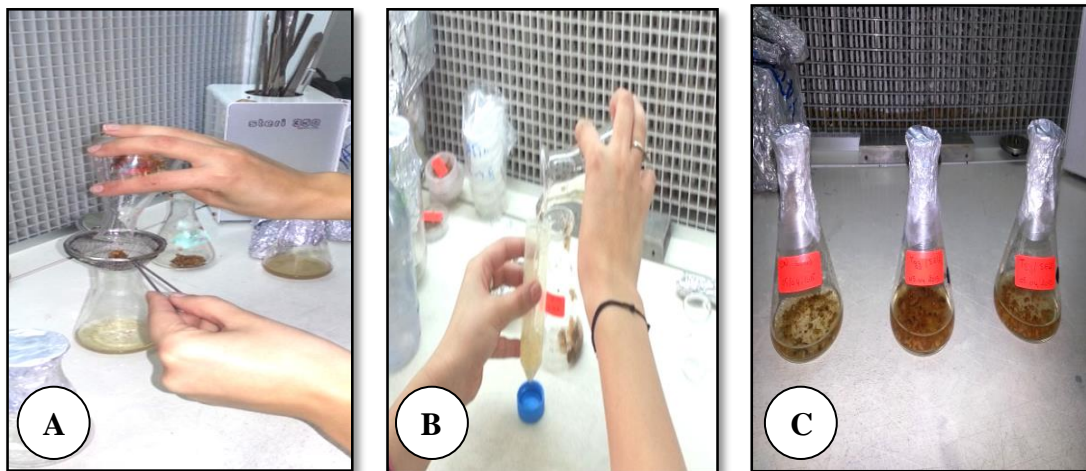


produire directement des protoplastes à partir de microcals friables obtenus après la 1<sup>ère</sup> subculture.

Dans un 1<sup>er</sup> temps, nous avons filtré les microcals sélectionnés à l'aide d'un tamis de 380 µm de diamètre, à qui on a ajouté 15 ml (à l'aide d'un petit bécher) de solution enzymatique dans des erlenmeyers qui sont ensuite fermés avec de l'aluminium stérile et scellés au parafilm (annexe 2) (figure 9).

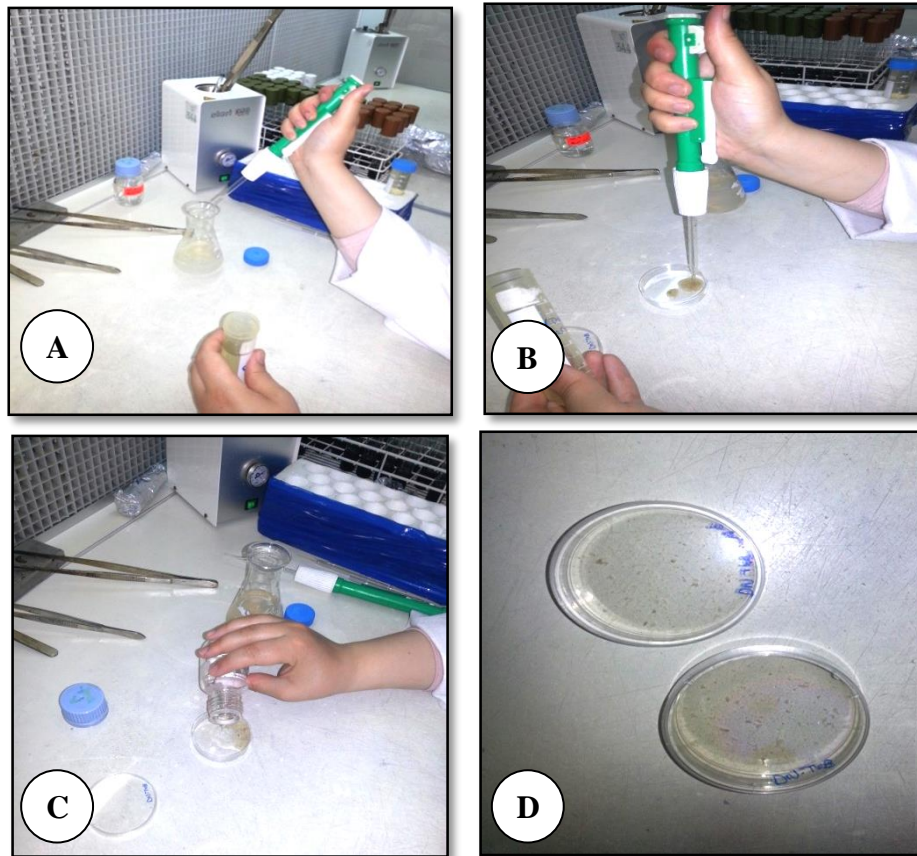
Dans un 2<sup>ème</sup> temps, nous avons optimisé la technique, en utilisant les suspensions cellulaires issues après 9 semaines de cultures, que nous avons centrifugé à 50xg pendant 5 min puis disposer dans des boites de pétris. Après nous avons ajouté 8 à 12 ml de solutions enzymatique (figure 10). L'étape de macération est réalisée dans des conditions stériles sous la hotte à flux laminaire.

Certains erlenmeyers et boites de pétris obtenus sont ensuite incubés à l'obscurité à 24°C ±2 à différents temps (24 h et 72 h) sans agitations, tandis que d'autres sont agités pendant 45 min avant d'être incubés pendant 10 h dans les mêmes conditions cités.



**Figure 9** : Les différentes étapes de la macération enzymatique à partir de microcals dans des erlenmeyers.

**A:** filtration des cals avec un tamis de 380µm. **B:** addition de la solution enzymatique. **C:** Incubation.



**Figure 10:** Les différentes étapes de la macération enzymatique à partir de suspensions cellulaires dans des boîtes de pétris.

**A:** élimination du surnageant. **B:** récupération du culot. **C:** addition de la solution enzymatique. **D:** incubation.

### 3.2.3. Purification des protoplastes

Après macération enzymatique, nous avons purifié les protoplastes à l'aide du protocole suivant

- Filtration du contenu d'un erlenmeyer à l'aide d'une passoire stérile à travers un tamis métallique (80  $\mu\text{m}$ ) afin d'éliminer les gros débris et ne laisser passer que les protoplastes.
- Rinçage du filtrat obtenu contenant les protoplastes avec 15 ml de solution CPW Man-NaCl (annexe 5).
- Récupération de la suspension de protoplastes dans des tubes, puis centrifugation à 50xg pendant 5 min.





- Elimination du surnageant et récupération du culot dans 10 ml de solution de rinçage, puis centrifugation à 50xg pendant 5 min, ce qui permet d'éliminer la solution enzymatique.
- Elimination du surnageant et récupération du culot dans 12 ml de solution de rinçage de saccharose à 21% (annexe 5) dans le but d'éliminer les débris qui sont plus dense que le saccharose et qui sédimentent au fond du tube. Puis centrifugation à 100xg pendant 10 min. Cette étape est nécessaire pour la formation du ménisque de protoplastes purifiés à la surface du tube.
- Récupération du ménisque en l'aspirant à l'aide d'une micropipette et du culot dans des eppendorfs différents, les rincer ensuite dans 5 ml de solution de rinçage et les centrifugés à 50xg pendant 2 min.



**Figure 11:** Les différentes étapes de la purification des protoplastes.



### 3.2.4. Dénombrement des protoplastes

Les protoplastes sont prélevés à partir du culot de la deuxième centrifugation dans 1 ml de milieu de culture. A l'aide d'une micropipette, environ 100  $\mu$ l d'homogénat est prélevé et dilué 10 fois (ajout de 900  $\mu$ l d'eau distillée).

Les protoplastes sont dénombrés par l'observation microscopique sur un hématocytomètre, en raison, 3 à 5 dénombrement sont effectués afin d'obtenir la concentration moyenne en protoplastes. Le nombre est multiplié par 800, par 10 et par X.

<b>Concentration moyenne en protoplastes</b> = nombre moyen de protoplastes obtenus x800 x 10 x X
---

800: surface de la cellule malasses.

10: coefficient de dilution.

X: volume de solution de rinçage ajouté.

Trois dénombrement sont effectués pour chaque type d'explant (microcals ou suspension cellulaire) dans trois rectangles différents de la cellule de malasses *Büker türk*, afin d'obtenir le nombre moyen de protoplastes en ml et le rendement de protoplastes par poids de matière végétale utilisé.

## 4. Culture des protoplastes

Les protoplastes isolés sont mis en culture dans un milieu nutritif solide PcM<sub>2</sub> (couche nourricière) à raison de 3 à 7x10<sup>6</sup> protoplastes/g avec apport de milieu frais (P<sub>5</sub>) tous les 10 jours.

La préparation du milieu PcM<sub>2</sub> se fait en deux étapes: la première consiste à préparer un milieu liquide MS modifié (annexe 4), avec un pH ajusté à 5.7 puis stériliser par filtration à l'aide d'une pompe sous vide sous la hotte à flux laminaire. La deuxième consiste à préparer de l'agarose qui est ensuite stérilisé à l'autoclave à 120°C pendant 20 minutes.

Les deux préparations sont ensuite mélangées et agitées manuellement sous la hotte jusqu'à homogénéisation. Le mélange est coulé dans des boîtes de pétris (5.5 cm de diamètre) à raison de 15 ml par boîte (figure 11).

La couche nourricière se prépare 1 à 2 jours avant la mise en culture des protoplastes. Elle est conservée à 24°C  $\pm$ 2 à l'obscurité.



**Figure 12:** Préparation du milieu PcM<sub>2</sub>.

## 5. Fusion des protoplastes

Dans notre expérimentation nous avons utilisé la méthode chimique au polyéthylène glycol (PEG) de haut poids moléculaire (8000) à deux pourcentages: 30% et 50% avec différents protocoles de préparations (tableau 3).

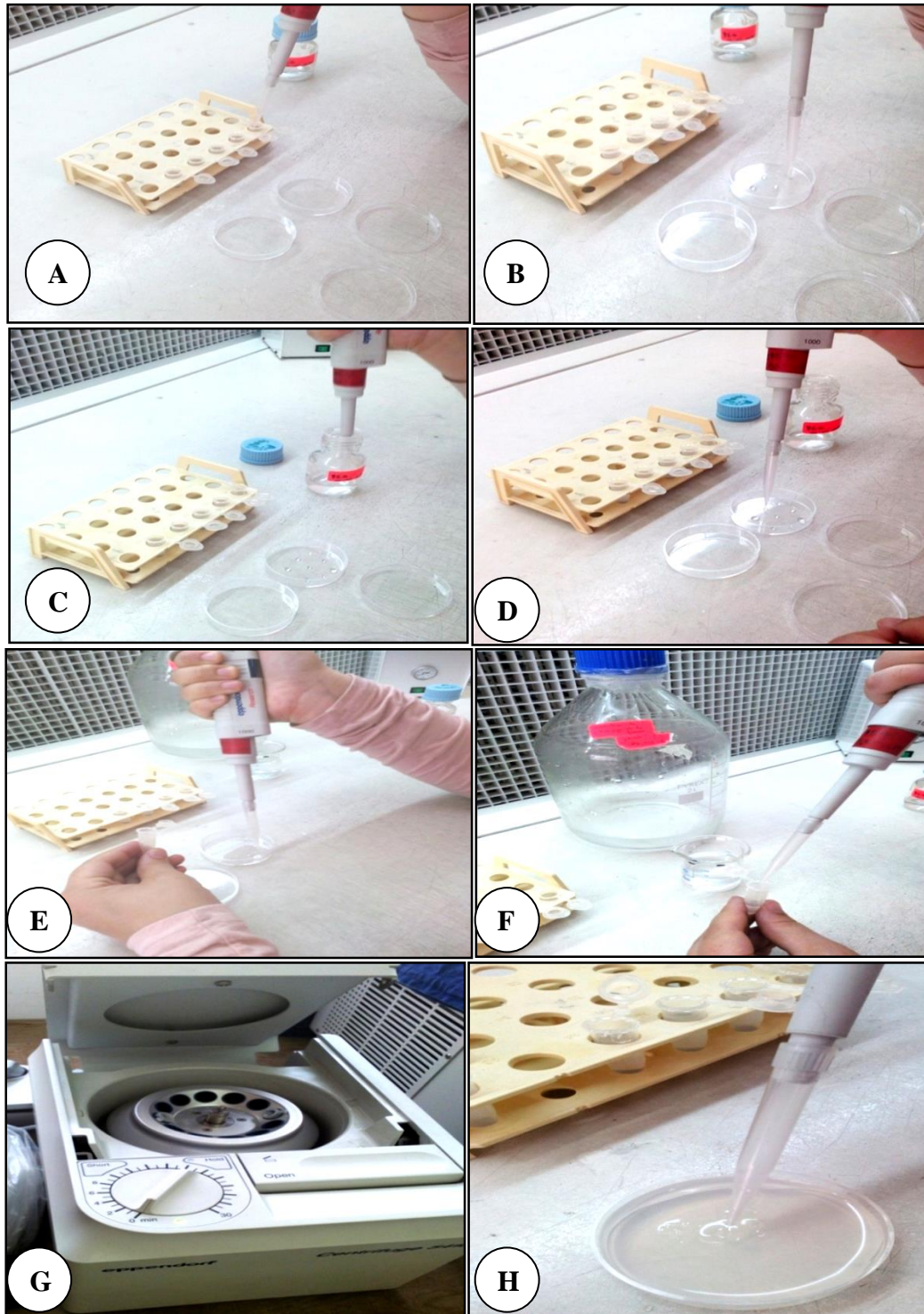
**Tableau 3:** Préparation des solutions de PEG pour 100 ml d'eau.

<b>PEG (8000)</b>	30%	30%	50%
<b>Poids du PEG</b>	30 g	30g	50g
<b>CaCl<sub>2</sub></b>	14.8 g	14.8 g	198 mg
<b>Eau</b>	Normal	Tiède	Tiède
<b>pH</b>	/	5.9	7
<b>Stérilisation</b>	Par filtration	A l'autoclave	A l'autoclave

Nous avons déposé dans une boîte de Pétri (50 x15 mm) 600-800  $\mu$ l d'une suspension de protoplastes. Nous avons laissé décanter pendant 15-20 min. Nous avons déposé tout autour de la goutte 4-6 fois 50  $\mu$ l de solution de PEG. Nous avons laissé incuber pendant 15-20 min à température ambiante. Les protoplastes adhèrent au fond de la boîte de Pétri. Nous avons suivi l'évolution de fusion des protoplastes directement au microscope optique.



Après le temps d'incubation, nous avons rajouté 50  $\mu\text{l}$  de solution de rinçage de fusion mannitol  $\text{Ca}^{2+}$  (annexe 5), puis centrifugé à 50xg pendant 2 minutes. Et ensuite nous avons disposé le contenu des eppendorfs sur couche nourricière.



**Figure 13:** Etapes de la fusion des protoplastes. **A+B:** dépôt de la solution de protoplastes sur boîte de pétri. **C+D:** ajout de la solution du PEG. **E:** transfert dans des eppendorfs. **F:** rinçage avec la solution de rinçage de fusion. **G:** centrifugation. **H:** mise en culture.



## 6. Analyse des données

Nous avons effectué une analyse statistique avec le logiciel SPSS version 20.0. Le test ANOVA (ANalysis Of VAriance), le test post hoc (test de Tukey) à  $\alpha = 0.05$  (risque d'erreur) et le test de T de student ont été réalisés dans le but de voir s'il existe des effets significatifs entre les deux milieux de culture  $M_{100}$  et  $P_{12.5}$  sur les trois cultivars DN, TKB et TGZ pour la multiplication de cals embryogènes et aussi de voir s'il existe un effet cultivar, milieu de culture et l'interaction milieu-cultivar pour l'établissement de la suspension cellulaire.



*Résultats*

*et*

*Discussion*





## 1. Entretien et multiplication des cals

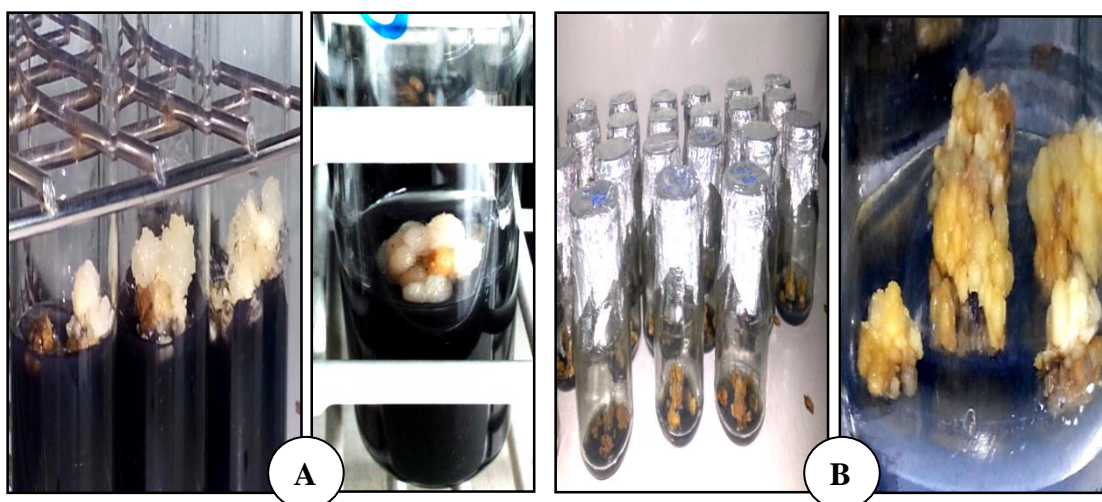
L'entretien des cals embryogènes reste une étape importante pour leur multiplication afin d'enrichir la vitrothèque et d'améliorer la capacité de production d'embryons somatiques.

Cette étape consiste à repiquer les cals embryogènes sous la hotte à flux laminaire tous les 40 à 45 jours sur des milieux neufs qui sont le  $M_{100}$  et le  $P_{12.5}$  (les mêmes milieux utilisés pour l'induction). La différence entre ces deux milieux réside en l'utilisation de deux auxines différentes: le 2,4 diclorophénoxyacétique (2,4-D) pour le milieu  $M_{100}$  et l'acide 4-amino-3,5,6 trichloropicolinique (le Picloram) pour le milieu  $P_{12.5}$ .

L'association auxine/cytokinine (2,4-D/IPA pour le milieu  $M_{100}$  et Picloram/IPA pour le milieu  $P_{12.5}$ ) conduit non seulement à la production des cals mais aussi à la multiplication intense de la callogenèse.

Au cours des subcultures, le transfert des cals se fait soit directement, soit en les subdivisant en deux parties ou plus, selon leur taille qui varie de 0.5 cm à 4.5 cm (figure 14). Ces derniers présentent des textures friables, granuleuses ou mixtes de couleur blanche à beige.

Cependant, les cals présentant un aspect friable, se développent rapidement et peuvent produire secondairement des cals nodulaires, tandis que les cals compacts, ont une croissance plus lente.



**Figure 14:** Induction et multiplication des cals.

**A:** Induction de la callogenèse. **B:** Multiplication de cals.



Au cours de notre expérimentation, nous avons suivi l'évolution et la multiplication de différents cals mis à notre disposition (tableau 4).

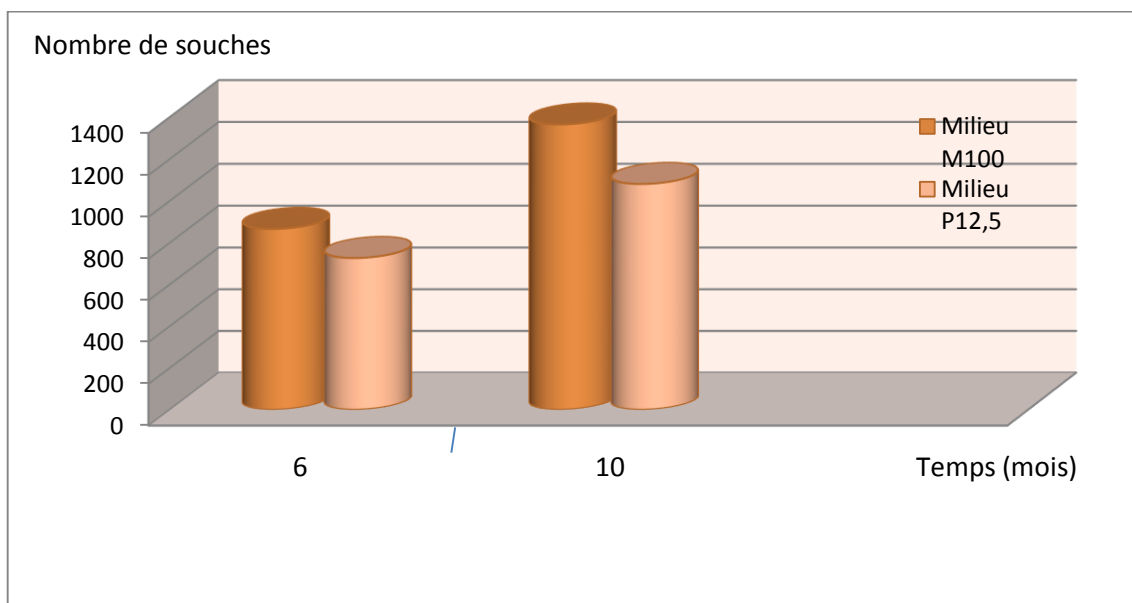
**Tableau 4:** Etude de la callogenèse et de la prolifération des souches embryogènes sur les deux milieux de culture M<sub>100</sub> et P<sub>12.5</sub>.

Phase d'induction et phase de multiplication					
Code du cultivar	Milieu	Nombre initial d'explants	Nombre de souches (6 mois)	Nombre de souches finales (10 mois)	Taux de multiplication des souches (Les 4 derniers mois)
DN1	P <sub>12.5</sub>	13	57	92	1,61
DN4	P <sub>12.5</sub>	15	78	83	1,06
DN8	P <sub>12.5</sub>	13	46	63	1,36
DN7	P <sub>12.5</sub>	13	46	102	2,22
DN13	M <sub>100</sub>	12	21 Beaucoup de souches infectées par une bactérie endogène	64	3,04
DN10	M <sub>100</sub>	10	52	161	3,1
DN12	M <sub>100</sub>	15	97	108	1,11
DN9	M <sub>100</sub>	12	50	121	2,42
<b>Total</b>		103	447	794	1,99
TKB1	P <sub>12.5</sub>	12	70	80	1,14
TKB2	P <sub>12.5</sub>	11	83	182	2,19
TKB3	P <sub>12.5</sub>	10	76	172	2,26
TKB4	P <sub>12.5</sub>	12	32	35	1,09
TKB6	M <sub>100</sub>	13	62	180	2,9
TKB9	M <sub>100</sub>	15	138	164	1,19
TKB7	M <sub>100</sub>	13	70	95	1,35
TKB8	M <sub>100</sub>	11	110	190	1,72
<b>Total</b>		97	641	1098	1,73
TGZ1	P <sub>12.5</sub>	13	44	49	1,11
TGZ3a	P <sub>12.5</sub>	14	40	59	1,34
TGZ3b	P <sub>12.5</sub>	12	54	60	1,18
TGZ3c	P <sub>12.5</sub>	19	101	104	1,03
TGZ7	M <sub>100</sub>	20	102	104	1,02
TGZ9	M <sub>100</sub>	11	55	56	1,02
TGZ10	M <sub>100</sub>	13	48	58	1,21
TGZ11	M <sub>100</sub>	15	61	64	1,05
<b>Total</b>		117	505	554	1,12





Les résultats obtenus après quatre mois de cultures sont exposés dans la figure 15. Les résultats ont permis de comparer les deux milieux d'inductions. En effet, le nombre de souches après 6 mois d'induction dans le milieu  $M_{100}$  est de 866 ce nombre atteint 1365 calcs après 10 mois de culture, on déduit que le nombre de calcs s'est multiplié 1.54 fois durant les 4 derniers mois. Par contre, le nombre de souches après 6 mois d'induction dans le milieu  $P_{12,5}$  est de 727, puis 1081 calcs après 10 mois de culture, le nombre de calcs s'est donc multiplié 1.48 fois. A partir de ces résultats, nous avons pu constater que les trois cultivars montrent une légère variabilité de réponse par rapport aux deux milieux.



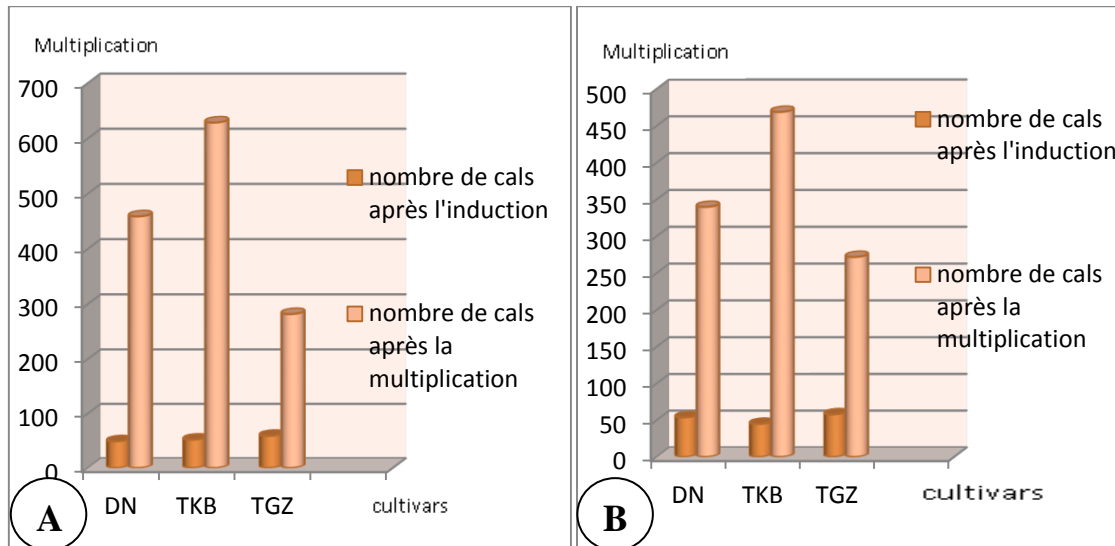
**Figure 15:** Effet de la concentration et de la nature des régulateurs de croissance après 4 mois sur le nombre de souche obtenu chez les trois cultivars.

L'analyse de la figure 16 montre que

- ✓ Le nombre de calcs du cultivar Deglet Nour en culture sur le milieu  $M_{100}$  est multiplié 9.36 fois (de 49 à 459 calcs), tandis que le nombre de calcs en culture sur le milieu  $P_{12,5}$  est multiplié 6.29 fois (de 54 à 340).
- ✓ Le nombre de calcs du cultivar Takerboucht en culture sur le milieu  $M_{100}$  est multiplié 12.09 fois (de 52 à 629), tandis que le nombre de calcs en culture sur le milieu  $P_{12,5}$  est multiplié 10.42 fois (de 45 à 469).



- ✓ Le nombre de cals du cultivar Tegaza en culture sur le milieu M<sub>100</sub> est passé de 59 à 282 soit une multiplication de 4.77, tandis que le nombre de cals en culture sur le milieu P<sub>12.5</sub> est multiplié 4.68 fois (de 58 à 272).



**Figure 16:** Multiplication de cals des trois cultivars (DN, TKB et TGZ) en milieu M<sub>100</sub> (A) et en milieu P<sub>12.5</sub> (B).

Nous constatons que les cals de cultivars Deglet Nour et Takerboucht prolifèrent mieux dans le milieu M<sub>100</sub> où les masses callogènes sont intensifiées et amplifiées par rapport au milieu P<sub>12.5</sub>, par contre les cals du cultivar Tegaza donnent des résultats similaires dans les deux milieux.

Lors de l'entretien des cals, nous avons pu rencontrer plusieurs contraintes. La contrainte majeure, à laquelle nous avons fait face, est la contamination, qui peut être difficilement détectable lorsqu'elle est due à des agents chimiques (invisibles) ou facilement détectable lorsqu'elle est due à des levures, des champignons ou des bactéries où l'explant prend une couleur blanchâtre et adopte une texture velouté. Pour éviter ce genre de problème, il est nécessaire de respecter les conditions d'asepsie et avoir une bonne maîtrise de manipulation.

### 1.1. Analyse statistique

En présence des résultats obtenus sur la multiplication des cals, nous avons cherché à évaluer le sens de l'information obtenue. Pour cela, nous avons établi une analyse statistique avec le logiciel SPSS version 20.0 qui s'avère être le mieux adapté à nos données et grâce à lequel nous avons étudié l'influence des cultivars et des milieux de culture sur les paramètres (nombre de souches après 6 mois et nombre de souches finales après 10 mois).



### 1.1.1. Etude de l'influence des cultivars

Nous avons utilisé le test ANOVA (ANalysis Of VAriance) avec un test post hoc (test de Tukey) à  $\alpha = 0.05$  (risque d'erreur), car notre variable est qualitative –le cultivar- à trois niveaux- trois cultivars-) (annexe 6).

Il ressort de l'analyse de la variance que

- Le cultivar n'a pas un effet significatif sur le nombre de souches après 6 mois de culture ( $p = 0.2 > 0.05$ )
- Le cultivar a un effet significatif sur le nombre de souches finales après 10 mois de culture ( $p = 0.01 < 0.05$ )

### 1.1.2. Etude de l'influence des milieux de culture

Pour cela nous avons utilisé le test **T de student**, car notre variable est qualitative-le milieu- à deux niveaux- deux milieux de culture-) (annexe 6).

Nous avons comparé les valeurs de «Sig. (Bilatérale)» et nous avons noté que toutes les valeurs sont supérieures à 0.05 donc, nous avons conclu que le milieu de culture n'a pas une influence significative sur le nombre de souches après 6 mois de cultures mais le cultivar a un effet significatif sur le nombre de souches finales après 10 mois.

Il ressort de cette analyse que les conditions utilisées sont homogènes sur la multiplication des cals embryogènes.

### • Discussion

La multiplication des cals est une étape importante qui demeure le problème fondamental dans le programme d'embryogenèse somatique du palmier dattier. Ce résultat concorde avec celui de nombreux auteurs (Schroeder 1970; Bouguedoura 1979) qui ont rencontré une grande difficulté à maintenir les cals en survie.

Nos résultats montrent que les cals de différentes textures (friable, compacte) répondent efficacement et se multiplient activement dans les deux milieux cultures  $M_{100}$  et  $P_{12.5}$ . C'est résultats confirment ceux obtenus par Yatta et Fergani 2007, Abed 2012, Yatta et *al.*, 2014,



Abed et *al.*, 2014, qui ont parvenu à sélectionner ces deux milieux de cultures parmi 80 milieux pré-tester.

Les auxines: 2,4-D, utilisée pour la première fois par Tisserat en 1979 et le Picloram, sont considérées comme des inducteurs de la callogenèse du palmier dattier. Dans notre travail ces régulateurs de croissance, en association avec la cytokinine IPA, ont permis d'obtenir d'excellents résultats concernant la prolifération des cals embryogènes; ces résultats concordent avec ceux de Mater 1986; Daguin et Letouze 1988; Zaïd 1989; Bhaskaran et Roberta 1995; Yatta et Fergani 2007; Vanneste et Friml 2009. Ces auteurs confirment la performance et la rapidité de ces deux hormones dans l'induction et la multiplication des cals embryogènes, ceci est confirmé aussi par Tisserat (1979) sur les embryons zygotiques.

Nos résultats montrent que la multiplication des cals a eu lieu sur des milieux de culture ayant des compositions hormonales identiques à celles des milieux d'initiation. D'après certains auteurs (Mater 1986, Daguin et Letouze 1988, Bhaskaran et Roberta 1995) la multiplication du cal a également donné de bons résultats sur le milieu d'induction. Ceci est contradictoire, avec les travaux de Drira (1983). Cet auteur a remarqué que le maintien des cals et nodules sur un milieu identique à celui de l'ensemencement, aboutit à leur nécrose après trois à six mois de culture.

La présence du charbon actif à des quantités différentes 3 g/l pour le M<sub>100</sub> et 200 mg/l pour le P<sub>12.5</sub>, permet d'éliminer la toxicité des composés phénoliques, qui empêchent la croissance des cals et provoquent leurs brunissements. Ceci est en accord avec Valverde et *al.*, 1987; Hocher et *al.*, 1997; Steinmacher et *al.*, 2007, qui ont rapporté que les meilleurs résultats de l'induction de la callogenèse chez le palmier de pêche sont obtenus en présence du charbon actif combiné à une forte concentration d'auxines (2,4-D).

L'ajout de l'acide aminé Glutamine contribue à la multiplication en améliorant leur pourcentage et nature callogènes sans modifier l'aspect et la taille des cals néoformés, ces résultats affirment les travaux de Reuveni 1979; Reynold et Murashige 1979; Sharma et *al.*, 1998; Daguin et Letouze 1988; Zaid 1989; Chabane 1995; Yatta et Fergani 2007; Vanneste et Friml 2009 et Yatta et Bouguedoura, 2013.

Le taux de multiplication des cals varie de 1.03 à 2.26 dans le milieu P<sub>12.5</sub> et de 1.02 à 3.1 dans le milieu M<sub>100</sub> après 4mois de subcultures. Il ressort de ces résultats que le taux de multiplication le plus élevé est observé sur le milieu M<sub>100</sub>. Nos résultats montrent aussi l'effet



variétal sur la multiplication des cals embryogènes. En effet les trois cultivars du palmier dattier que nous avons utilisé (DN, TKB et TGZ) répondent différemment aux deux milieux de cultures. En effet, nous avons constaté que les cultivars DN et TKB donnent de meilleurs taux de prolifération dans le milieu  $M_{100}$  par rapport au  $P_{12.5}$ , tandis que le cultivar TGZ répond de façon similaire aux deux milieux. Ceci confirme les travaux de Yatta et Fergani 2007; Abed 2012; Yatta et *al.*, 2014; Abed et *al.*, 2014, ainsi que ceux de Ben abdallah (1990) qui a montré l'effet génotypique chez les cultivars tunisiens Allig, Kentichi et Deglet Nour.



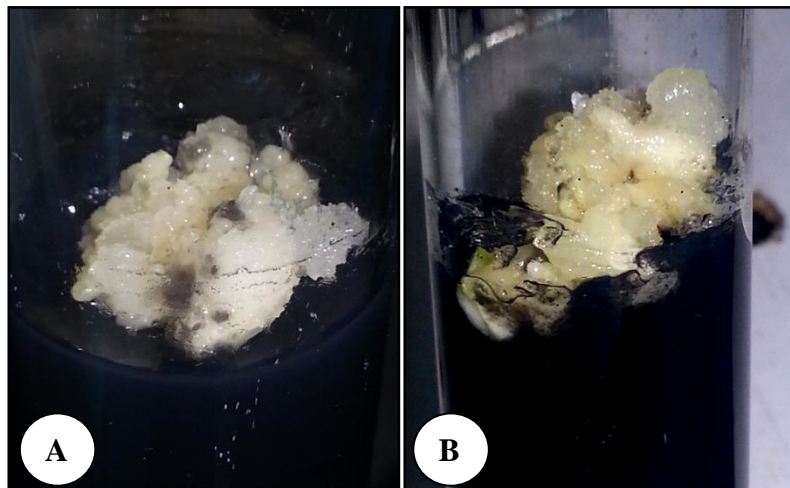
## 2. Initiation de la suspension cellulaire

### 2.1. Sélection et maintenance de cals embryogènes et de suspension cellulaire

#### 2.1.1. Choix des cals

L'initiation d'une suspension cellulaire embryogène (SCE), de bonne qualité, dépend de la qualité et du volume des cals embryogènes sélectionnés (Panis et Thineh, 2001).

Nous avons recherché parmi les cals embryogènes, ceux qui présentaient une texture granulaire friable et compacts des trois cultivars (DN, TKB, et TGZ) suite à une observation attentive et régulière du cal idéal. Ces cals présentent un équilibre entre la bonne taille et la bonne phase de développement (figure 17).



**Figure 17:** Types de cals choisis pour l'établissement des suspensions cellulaires.

**A:** cal friable, **B:** cal compact.

#### 2.1.2. Mise en culture

Le milieu liquide modifie l'aspect des cals et leur état de différenciation. Les divergences portent sur la couleur des cals, plus clair en milieu liquide, et sur leur fragmentation plus importante. En raison de l'agitation, de nombreux éléments de petite taille sont observés.

Un essai préliminaire sur l'obtention de suspension a été testé sur le cultivar Deglet Nour. Parmi les 8 cals sélectionnés appartenant à ce dernier, deux ont été choisis (DN1 et DN4) pour l'établissement de la suspension. Ces cals ont été suivis sur 7 cycles de culture de 10 jours chacun.



Afin de vérifier que l'établissement de la suspension cellulaire était un phénomène reproductible, nous avons répété la même opération avec d'autres cals issus du même cultivar (DN).

Après optimisation de la suspension cellulaire chez le cultivar DN, nous avons procédé à l'extension de l'établissement de celle-ci à partir d'autres cals avec les cultivars (TKB et TGZ). Les résultats obtenus sont organisés dans le tableau 5.

Le tableau 5 montre que durant notre expérimentation la croissance des cals est différente pour les différentes souches utilisées.

Dans le but d'établir des suspensions cellulaires, nous avons opté d'utiliser toutes les souches mis à notre disposition mis à part TGZ7 et TGZ9 qui présentent le plus faible taux de prolifération.

**Tableau 5:** l'évolution des suspensions cellulaires embryogènes.

Code du cultivar	SUSPENSION CELLULAIRE DANS LE MILIEU P5										Poids au départ	Poids après 9 semaines
	Nombre de semaines "											
	W1	W2	W3	W4	W5	W6	W7	W8	W9	W10		
DN1		+				X	-	-		S	2g	15g
DN4			+			X		-		S	2g	14,3g
DN8			+			X		-		S	2g	12, 25g
DN7		+				X	-			S	2g	15g
DN13		+				X	-	-		S	2g	15.6g
DN10		+				X	-	-		S	2g	12,5g
DN12			+			X	-	-		S	2g	13g
DN9		+				X	-			S	2g	14,09g
TKB1		+				X		-		S	2g	11g
TKB2		+				X	-			S	2g	13g
TKB3		+				X	-	-		S	2g	15g
TKB4		+				X	-			S	2g	13g
TKB6		+				X	-	-		S	2g	13,41g
TKB9		+				X	-			S	2g	12g
TKB7		+				X	-			S	2g	13g
TKB8		+				X	-			S	2g	12g
TGZ1		+				X	-	-		S	2g	14,27g



<b>TGZ3a</b>		+				X	-			S	2g	11g
<b>TGZ3b</b>		+				X	-			S	2g	13,24g
<b>TGZ3c</b>		+				X	-			S	2g	10,33g
<b>TGZ7</b>			+			X	-			S	2g	3,2g
<b>TGZ9</b>			+			X	-			S	2g	3,8g
<b>TGZ10</b>			+			X	-			S	2g	11,45g
<b>TGZ11</b>			+			X	-			S	2g	10.20g

+: apparition de calcs secondaire

X: répartition des calcs I et II

-: première filtration sur tamis de 380µm de diamètre (établissement de la classe III)

S: obtention de suspension cellulaire de taille comprise entre 50 et 100 µm.

W: semaine.

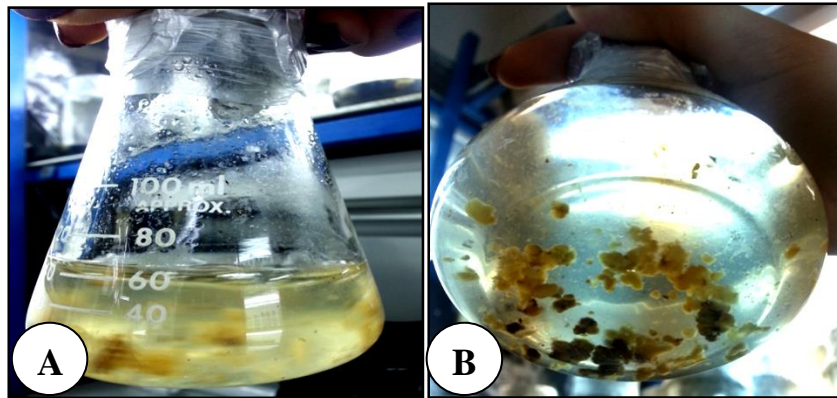
Nous avons remarqué qu'il y'a eu l'apparition de calcs secondaires à partir de la 2<sup>ème</sup> semaine pour toutes les souches du cultivar TKB ainsi que pour certaines souches du cultivar DN (DN1, DN7, DN13, DN10, DN9) et du cultivar TGZ (TGZ1, TGZ3, TGZ3, TGZ3). Tandis que l'apparition des calcs secondaires pour le reste des souches des cultivars DN (DN4, DN8 et DN12) et TGZ (TGZ7, TGZ9, TGZ10, TGZ11) a débuté à partir de la 3<sup>ème</sup> semaine.

A partir de la 6<sup>ème</sup> semaine, nous avons procédé à la répartition des classes de calcs I et II en séparant les calcs de taille supérieure à 5 mm des autres (figure 18).

Une première filtration est réalisée à la 7<sup>ème</sup> semaine, en utilisant un tamis de 380µm de diamètre, pour toutes les souches. Ceci a permis d'établir la classe III des calcs. Ces calcs ont été utilisés pour continuer la culture, par contre les autres calcs, des souches DN1, DN13, DN10, DN12, TKB3, TKB6 et TGZ1, ont nécessité une 2<sup>ème</sup> filtration à la 8<sup>ème</sup> semaine vue que leur taille était supérieure à 380 µm.

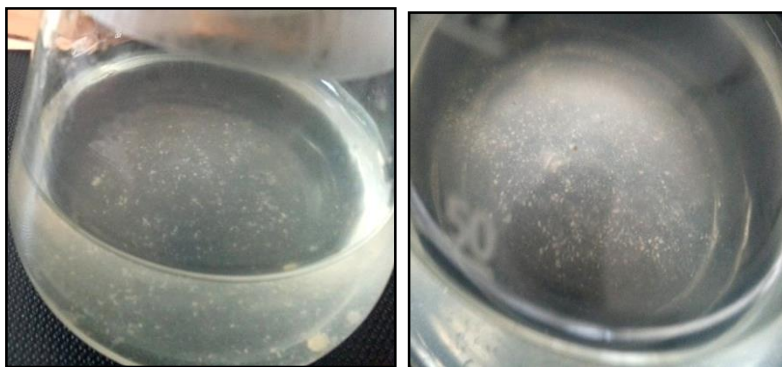
La prolifération des souches était différente, néanmoins la plupart d'entre eux présentaient une bonne prolifération, en effet la meilleure prolifération était pour la souche DN13 qui est passée de 2 g à 15.6 g à la 9<sup>ème</sup> semaine de culture, tandis que la plus faible était celle des souches TGZ7 et TGZ9 qui sont passées de 2 g à 3.2 g et 3.8 g respectivement. Cependant pour le reste des souches le poids variait entre 10 g et 15 g.





**Figure 18:** Initiation de la suspension cellulaire. **A:** mise en culture cals embryogènes en milieu liquide agité. **B:** microcals après la deuxième semaine.

Nous avons pu obtenir une suspension cellulaire embryogène à la 10<sup>ème</sup> semaine (figure 19).



**Figure 19:** Obtention d'une suspension cellulaire embryogène.

La qualité d'une SCE diminue avec le nombre de repiquages. Ceci se traduit par un risque plus élevé de contamination et une diminution du taux de croissance et du potentiel de régénération.

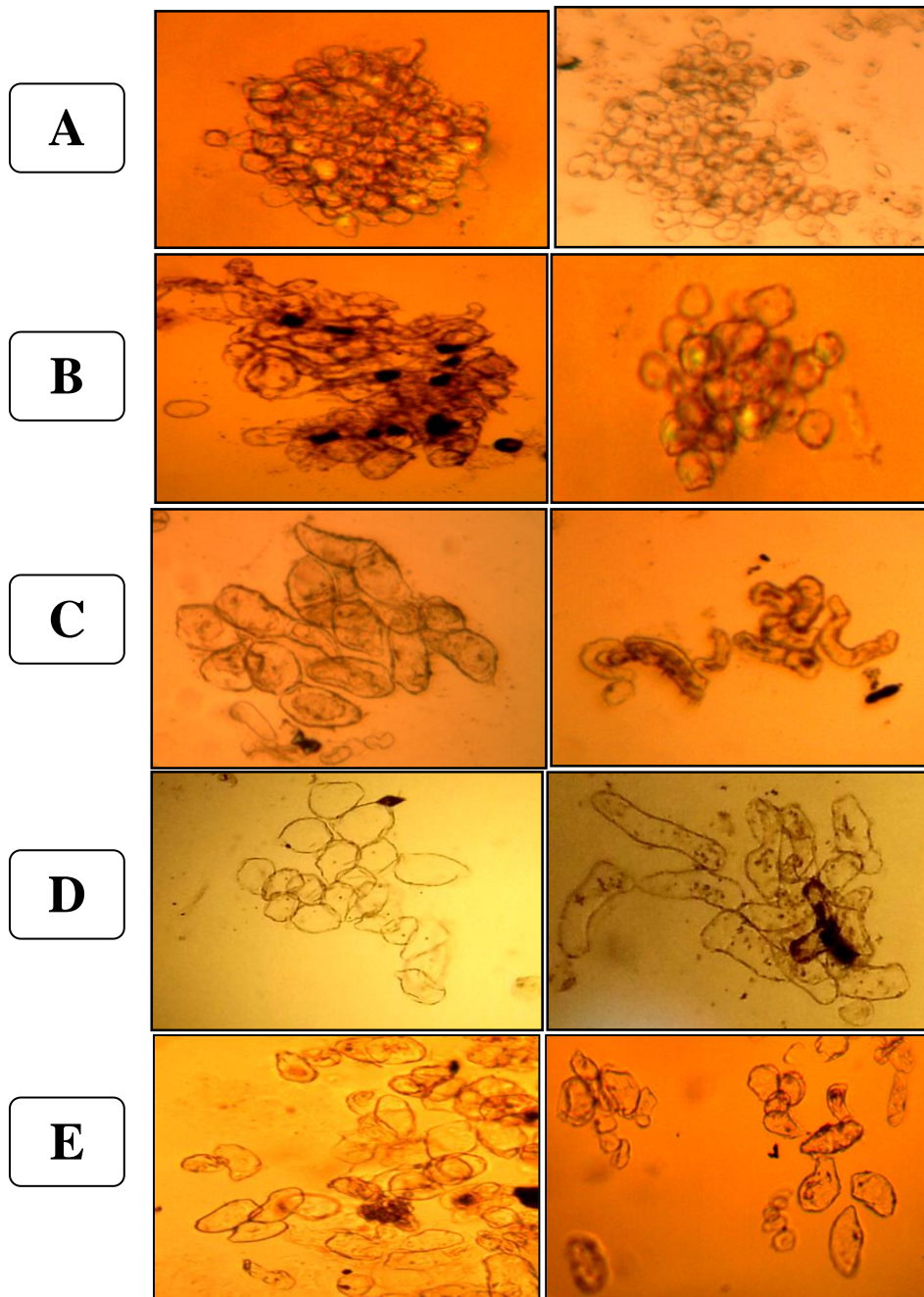
## 2.2. Etude microscopique

Après avoir établi les suspensions, nous avons effectué des observations microscopiques pour distinguer les différents types de cellules libérées par les cals (figure 20).

L'observation des échantillons de suspension cellulaire directement sous microscope inversé a permis de distinguer les différents types de cellules:



- ✓ Des amas de cellules de tailles variables formés de cellules arrondies de petite taille avec un noyau volumineux qui occupe la majeure partie du cytoplasme et de cellules ovales plus ou moins grandes avec un petit noyau, ces cellules ont des caractères typiquement embryogènes.
- ✓ Des cellules isolées vacuolisées avec une forme allongée (en forme de banane), de grande taille et avec un petit noyau.



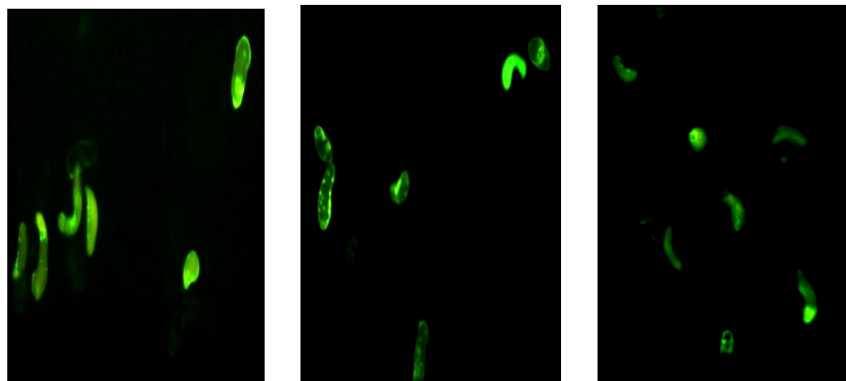
**Figure 20:** Evolution d'une suspension cellulaire. **A:** microcals après la 1<sup>ère</sup> subculture, **B:** microcals après la 1<sup>ère</sup> filtration avec un tamis de 380µm, **C:** suspension



après la 2<sup>ème</sup> filtration avec un tamis 150 $\mu$ m, **D**: suspension après 3<sup>ème</sup> filtration avec un tamis 80 $\mu$ m), **E**: suspension cellulaire.

### 2.3. Evaluation de la viabilité des suspensions cellulaire

L'observation des suspensions cellulaires après l'ajout de la Fluorescénine DiAcétate (FDA), sous microscope inversé, montre des amas cellulaires de différentes tailles avec des cellules colorées en vert ce qui indique la viabilité des cellules (figure 21). Le FDA confère aux cellules vivantes une coloration verte sous excitation bleue.



**Figure 21:** Evaluation de la viabilité de la suspension cellulaire par le FDA sous microscope inversé (GX40)

### 2.4. Analyse statistique

Nous avons également cherché à évaluer les résultats obtenus sur la suspension cellulaire. Pour cela, nous avons établi une étude statistique basée sur l'analyse de la variance (ANOVA) grâce à laquelle nous avons étudié l'effet cultivar, milieu de culture et l'interaction milieu-cultivar sur l'établissement de la suspension cellulaire (annexe 6).

Les résultats de l'analyse de la variance ont montré que

- Le cultivar a un effet significatif sur le poids après 9 semaines ( $p = 0.002 < 0.05$ )
- Le milieu a une influence significative sur le poids après 9 semaines de subculture ( $p = 0.04 < 0.05$ )
- L'interaction milieu-cultivar n'a pas un effet significatif sur le poids après 9 semaine de subculture ( $p = 0.07 > 0.05$ )



## • Discussion

Une suspension cellulaire embryogène de bonne qualité dépend des cals choisis. Dans notre étude nous avons sélectionné des cals embryogènes friables et compacts. Selon Panis et *al.*, 1993, les cals idéaux sont des cals embryogènes de texture granulaire friable, la sélection de ces derniers est réalisée suite à des observations minutieuses. Par contre les cals nodulaires ne sont pas recommandés pour l'établissement des suspensions. Ceci a été rapporté par Escalant et *al.*, 1994; Grapin 1995; Escalant et *al.*, 1996.

Dans notre étude, les cals embryogènes sélectionnés ont nécessité un broyage avant leur mise en culture dans le milieu liquide P<sub>5</sub>, cette étape permet de relâcher rapidement une importante quantité de microcals pour un établissement rapide de la suspension cellulaire embryogène. Ceci concorde avec les travaux de Tiecoura et *al.*, 2014.

Une fois les cals transférés dans le milieu liquide agité, ils sont submergés totalement et mis en contact avec les constituants de ce dernier qui sont responsable de la désagrégation et l'augmentation de la masse des cals. L'utilisation du milieu liquide augmente considérablement la productivité de l'embryogenèse somatique. Ces résultats confirment ceux de Fki et *al.*, 2003; Fki 2005; Yatta et *al.*, 2009.

Durant notre expérience, nous avons remarqué que la suspension cellulaire qui résulte des cals friables est plus stable par rapport à celle obtenue du cal compact. Les cals friables facilitent l'obtention de cellules isolées plus ou moins rapidement. Leur multiplication est plus rapide par rapport aux cals compacts hachés. Ceci concorde avec les résultats de Chabane et Bouguedoura 2006; Yatta et *al.*, 2015. Ces auteurs confirment que l'obtention de ces cellules est le point de départ de suspension cellulaire viable. Ces suspensions sont composées essentiellement de cellules isolées, d'agrégats cellulaires à bord irréguliers et de nodules. L'aspect des cellules de ces agrégats permet d'avancer l'hypothèse qu'il s'agit de cellules embryogènes (Georget et *al.*, 2000).

L'entretien des suspensions cellulaires embryogènes est crucial, car il nécessite un repiquage régulier (tous les 10 jours) des cultures sur un milieu frais, pour éviter l'accumulation des polyphénols, leur brunissement et pour permettre une croissance plus rapide. Dans nos conditions de travail, nous avons remarqué donc la formation de nouveaux massifs cellulaires qui semblent se produire par multiplication de massifs préexistants. Nos premières observations après l'initiation de la suspension cellulaire ont montré que le volume



cellulaire évolue et augmente rapidement après chaque repiquage. Ce résultat est en accord avec celui de Guédira 2006 sur le bananier et Yatta et Bouguedoura 2015 sur le palmier dattier.

En effet des observations de cultures conservées dans un même milieu pendant plus de 20 jours montrent des agrégats de cellules très bruns et une latence de croissance. Un protocole de cryoconservation a été élaboré par Panis et Thinh en 2001 pour parvenir aux problèmes liés au repiquage et au stockage des suspensions durant une période indéfinie.

Après une phase de latence il y'a apparition des cals secondaires généralement observés à partir de la 2<sup>ème</sup> semaine, cependant pour certaines souches, la croissance ne débute qu'à partir de la 3<sup>ème</sup> semaine. Ceci montre que les souches embryogènes répondent différemment au milieu de culture liquide (Monnier 1990;Yatta et *al.*, 2014).

Après une phase de multiplication exponentielle observée durant les premières semaines, une phase stationnaire est remarquée à la 6<sup>ème</sup> semaine. A partir de ce stade nous avons remarqué la diminution de la multiplication des cals. Ce résultat a été rapporté en 1991 par Abe et Futsuhara et Assani et *al.*, 2002.

A la 7<sup>ème</sup> semaine, la filtration nous a permis de récupérer les cals de la classe III, qui sont de taille inférieure à 380µm, et d'éliminer les composés de gros agrégats, ceci conduit à l'établissement des suspensions cellulaires embryogènes au bout de la 10<sup>ème</sup> semaines. Ceci valide les travaux de Fki et *al.*, 2003 ;Yatta et *al.*, 2012 et Al-khayri 2012 ainsi que les travaux de Chong Pérez et *al.*, 2005 sur le bananier. Il faut par contre beaucoup plus de temps de culture lorsque la suspension cellulaire n'est pas filtrée. Tout se passe comme si, en absence de filtration, les gros cals ayant servi à l'initiation de la suspension cellulaire relâcheraient difficilement les microcals embryogènes. Ces résultats concordent avec ceux de Tiecoura et *al.*, 2014. L'établissement de la suspension cellulaire embryogène en deux mois représente un temps de culture très court par rapport aux 9 mois rapporté chez le riz (Dayuan Wang et *al.*, 1989 in Tiecoura et *al.*, 2014).

L'étude microscopique des suspensions cellulaires à l'aide d'un microscope inversé, révèle l'existence de cellules isolées vacuolisées de différentes formes: arrondies de petites tailles, ovales plus au moins grande et allongées en forme de banane, ainsi d'un grand nombre de massifs cellulaires de tailles variables. Ceci est en accord avec Chabane et Bouguedoura 2006, Yatta et *al.*, 2013 qui ont affirmé que l'obtention de ce type de cellules est à l'origine



d'une suspension cellulaire embryogène viable. Les cellules de forme arrondie ou ovale sont amylières, tandis que les cellules de forme allongée sont non amylières. Ces observations valident celles de Fki et *al.*, 2003; Sané et *al.*, 2006; Chabane et *al.*, 2007 et Yatta et Bouguedoura, 2013. Les cellules amylières ont tendances à se diviser et à se régénérer rapidement et peuvent donc conserver leurs propriétés embryogènes (Panis et *al.*, 1993).

Une suspension cellulaire est dite embryogène, selon Vasil et Vasil en 1981 et 1982, lorsqu'elle est formée à près de 80 % de petits groupes de cellules à cytoplasme dense très riche en grains d'amidon avec de nombreuses petites vacuoles. Cette suspension est composée de peu de grandes cellules, de formes diverses, avec de larges vacuoles et pauvres en grains d'amidon selon El Mtili en 1990.

Le test de viabilité par coloration au FDA repose sur la détection de l'activité estérase spécifiquement présente dans les cellules vivantes. Si la cellule est vivante, ses estérases coupent le FDA (les résidus acétates) et libèrent dans la cellule la fluorescéine acide fluorescente. Celle-ci, non lipophile, ne peut sortir de la cellule qui devient fluorescente.

Une bonne température favorise le maintien d'une suspension cellulaire. La densité d'inoculum semble influencer de façon décisive sur le taux de croissance des suspensions.

La suspension cellulaire est le matériel nécessaire pour l'amélioration de la plupart des monocotylédones, elle est considérée comme une source de choix pour l'isolement des protoplastes. De nombreux travaux sur le bananier (Megia et *al.*, 1992; Haïcour 2002; Assani et *al.*, 2005) et sur le palmier dattier (Chabane et *al.*, 2007; Yatta et *al.*, 2012; Yatta et Bouguedoura, 2013), ont mentionnés que la suspension cellulaire pourrait être le point initial pour l'hybridation somatique.



### 3. Isolement des protoplastes

La maîtrise de la culture et de la régénération des plantes à partir de protoplastes ouvre de multiples voies de recherche telle que l'hybridation somatique. Ainsi les protoplastes constituent un bon matériel pour l'amélioration des plantes.

Dans le but de déterminer la meilleure composition enzymatique ainsi que les conditions d'incubation appropriées pour l'isolement des protoplastes avec un taux élevé, nous nous sommes inspirés des travaux réalisés sur différentes espèces de monocotylédones tels que le bananier et le palmier à huile.

Plusieurs paramètres interviennent dans le processus d'isolement, dans le rendement et la viabilité des protoplastes dont la source du matériel végétal utilisée, les compositions de la solution enzymatique et les conditions d'incubation (température, agitations)

#### 3.1. Effet de la solution enzymatique

La libération des protoplastes dépend de la nature et de la concentration des enzymes employées. Pour atteindre cet objectif, nous avons optimisé les choix des enzymes et leurs concentrations.

La dégradation de la paroi nécessite principalement l'action de quatre enzymes: Cellulase RS, Pectolyase Y-23, Hémicellulase et Pectinase qui permettent de rompre les liaisons covalentes. Dans le but de libérer des protoplastes issus de suspension cellulaire ou de microcals friables, nous avons testé cinq combinaisons de ces dernières enzymes à différentes concentrations.

#### 3.2. Effet des conditions d'incubation

L'agitation et le temps d'incubation sont des facteurs à considérer de près lors du traitement enzymatique car les conditions optimales nécessaires à l'isolement des protoplastes et celles pour obtenir le maximum de viabilité ne sont pas toujours les mêmes. Donc dans notre travail, nous avons entrepris d'étudier l'effet et l'influence de ces deux facteurs.

##### 3.2.1. Effet de l'agitation

Afin d'étudier l'importance de cet effet, nous avons testé deux incubations, l'une à l'état stable et l'autre agitée à 60-80 tours/min pendant 45 min. En effet, nous avons remarqué, qu'après 45 min d'agitation à une vitesse de 60 à 80 tours/min, il y a libération d'un nombre



très élevé de protoplastes viables. Cependant nous avons constaté, qu'en allant au delà des 80 tours/min et qu'en dépassant les 45 min d'agitation, il y'a éclatement des protoplastes libérés et nous n'avons pratiquement plus de protoplastes intacts. Ceci est peut être dû à une forte pression de l'agitation sur les protoplastes.

Quelque soit la nature et la concentration de la solution enzymatique et le temps d'incubation, ce facteur permet de détacher les protoplastes du tissu et donc d'influencer fortement sur leur rendement (figure 22).



**Figure 22:** Observation de protoplastes, à l'aide d'un microscope inversé, après agitation.

### 3.2.2. Effet du temps d'incubation

Ce facteur conditionne également le rendement en protoplastes. En effet dans notre expérimentation, nous avons essayé de conjuguer l'action du temps d'incubation avec le complexe enzymatique sur la libération des protoplastes. Il ressort du tableau 6 que pour la 1<sup>ère</sup> solution enzymatique (Cellulase RS 0.5%, Pectolyase Y-23 0.5% et Hémicellulase 2%), la réponse optimal est obtenue après un temps d'incubation de 24 h. Pour la 2<sup>ème</sup> solution enzymatique (Cellulase RS 0.5%, Pectinase 0.5% et Hémicellulase 2%), la meilleure réponse est également obtenue après 24 h d'incubation. Pour la 3<sup>ème</sup> solution enzymatique (Pectinase 4% et Hémicellulase 6%), la réponse la plus élevée est notée après 72 h d'incubation. Pour la 4<sup>ème</sup> solution enzymatique (Cellulase RS 1%, Pectolyase Y-23 0.5% et Hémicellulase 2%), la réponse la plus favorable est remarqué après agitation de 45 min à un temps d'incubation de 10 h. Tandis que pour la 5<sup>ème</sup> et dernière solution enzymatique (Cellulase RS 2% et Hémicellulase 6%), la réponse optimale est apparue après 24 h d'incubation et sans agitations.

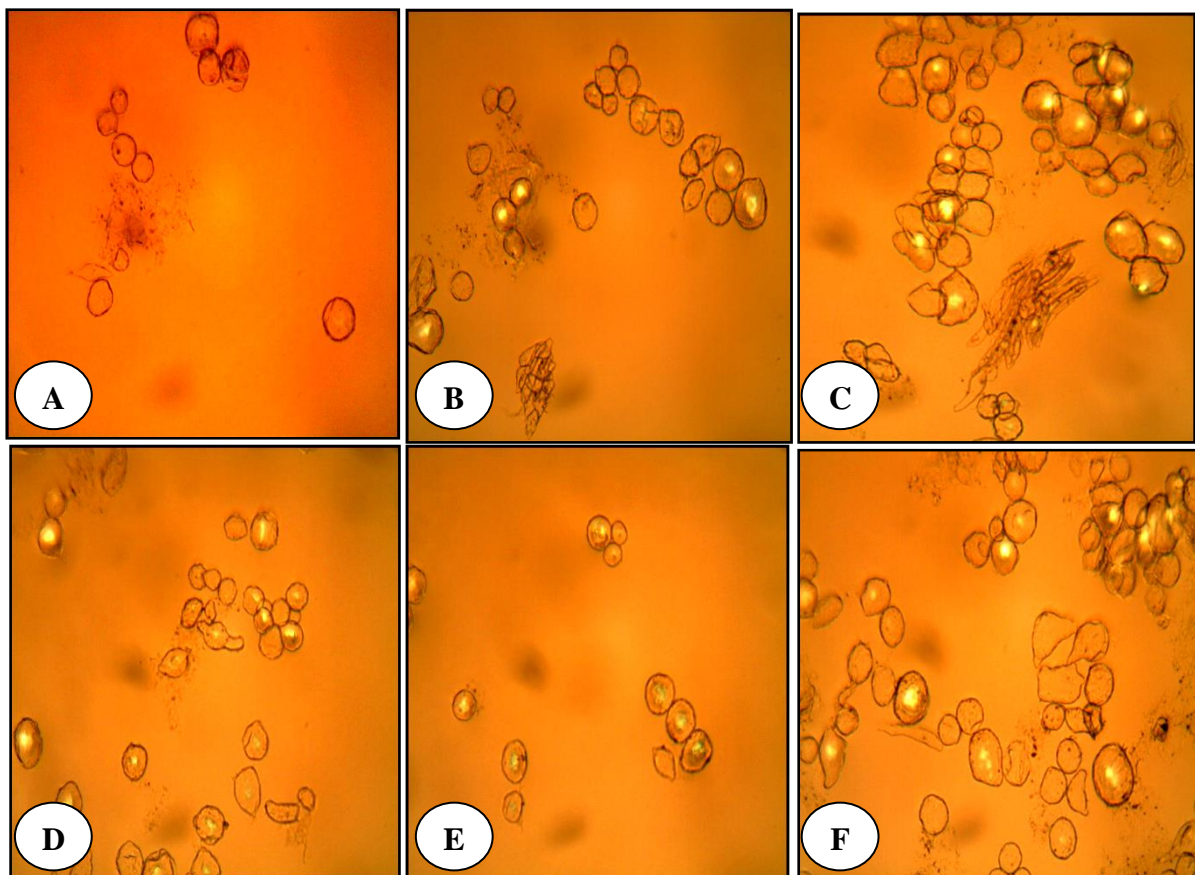




### 3.3. Rendement en protoplastes

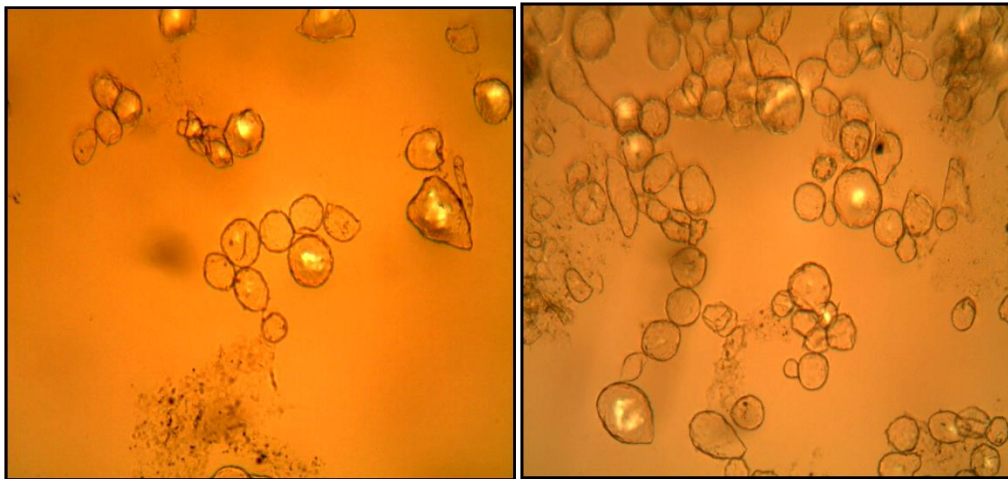
#### 3.3.1. A partir de microcals

L'effet de la SE1 contenant la Cellulase RS, la Pectolyase et l'Hémicellulase (incubée pendant 24 h et sans agitation) pour l'isolement des protoplastes est faible chez les trois cultivars, par rapport à la SE4, contenant le même complexe enzymatique avec une augmentation de la concentration de Cellulase RS et en agitant 45 min, qui présentent des rendements de  $1 \times 10^6$  protoplastes/g,  $1.03 \times 10^6$  protoplastes/g et  $1.59 \times 10^6$  protoplastes/g et des taux de viabilité de 23% pour les cultivar DN, 25% pour TKB et 40% pour TGZ (figure 23)



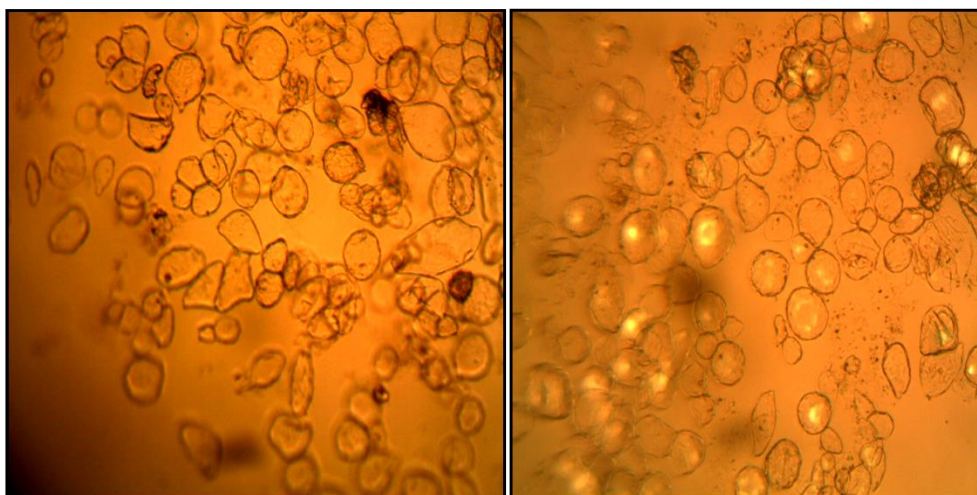
**Figure 23:** Protoplastes issus de microcals, sous microscope inversé. **A+B+C:** après traitement à la SE1. **D+E+F:** après traitement à la SE4.

L'action de la 2<sup>ème</sup> solution enzymatique, contenant la Cellulase RS, la Pectinase et l'Hémicellulase, pour l'isolement des protoplastes est faible, variant de  $0.25 \times 10^6$  protoplastes/g à  $0.55 \times 10^6$  protoplastes/g avec des taux de viabilité d'environ 20% chez les trois cultivars (figure 24).



**Figure 24:** Observation de protoplastes issus de microcals, sous microscope inversé, après traitement à la SE2.

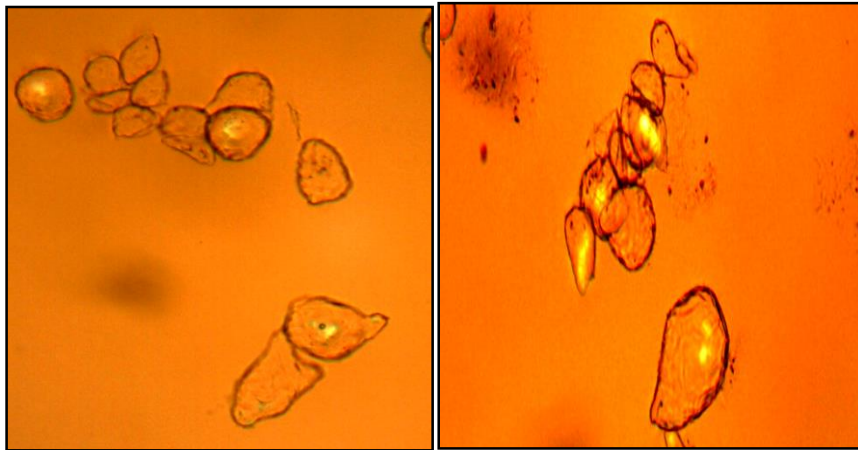
L'effet de la SE5, contenant la Cellulase RS et l'Hémicellulase et testée d'abord sans agitation pendant 24 h, a pratiquement le même rendement chez les trois cultivars qui est approximative de  $3 \times 10^6$  protoplastes/g, mais un taux de viabilité différent avec 43% chez TGZ, 54% chez TKB et 59% chez DN. Cette même solution est testée avec une agitation de 45min avant l'incubation de 10 h. Les rendements obtenus sont de  $2.99 \times 10^6$  protoplastes/g chez DN,  $3.5 \times 10^6$  protoplastes/g chez TKB et  $3.63 \times 10^6$  protoplastes/g chez TGZ et une viabilité de 60%, 56% et 50% respectivement (figure 25).



**Figure 25:** Observation de protoplastes issus de microcals, sous microscope inversé, après traitement à la SE5.



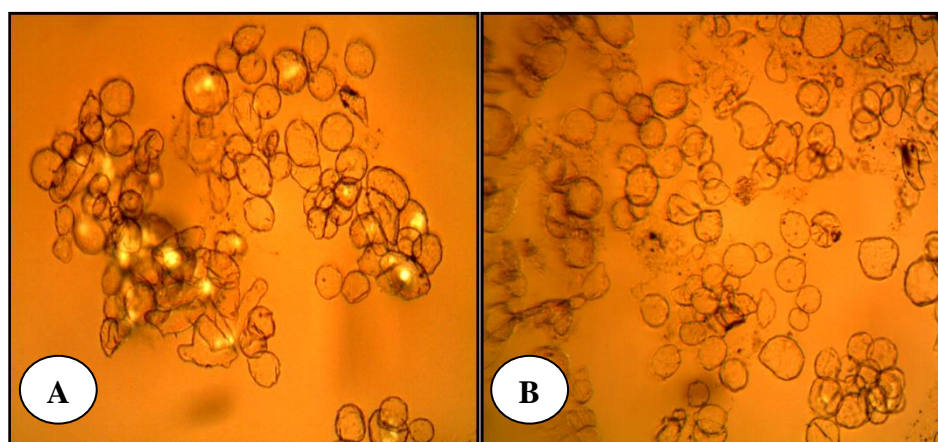
La SE3, contenant la Pectinase et l'Hémicellulase, incubée pendant 72 h et sans agitation, n'a aucun effet sur l'isolement des protoplastes chez les trois cultivars avec observation d'éclatement des cellules chez le cultivar DN (figure 26).



**Figure 26:** Protoplastes issus de microcals, sous microscope inversé, après traitement à la SE3.

### 3.3.2. A partir de suspension cellulaire

L'effet de la SE1 est faible pour la libération des protoplastes avec un rendement de  $1.33 \times 10^6$  protoplastes/g chez TKB,  $0.83 \times 10^6$  protoplastes/g chez TGZ et  $1.28 \times 10^6$  protoplastes/g chez DN, et des taux de viabilité ne dépassant pas les 25%, par rapport à l'effet de la SE4 qui est pratiquement similaire chez TKB et TGZ ( $2.40 \times 10^6$  protoplastes/g et  $2.61 \times 10^6$  protoplastes/g) avec un taux de viabilité de 30%, et qui atteint les  $3.40 \times 10^6$  protoplastes/g chez DN avec un taux de viabilité de 40% (figure 27).

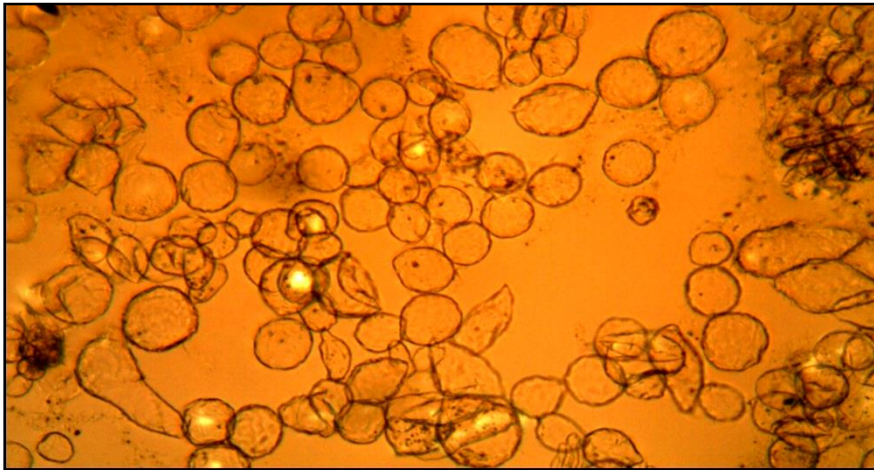


**Figure 27:** Protoplastes issus de SCE, sous microscope inversé.

**A:** après traitement à la SE1. **B:** après traitement à la SE4.

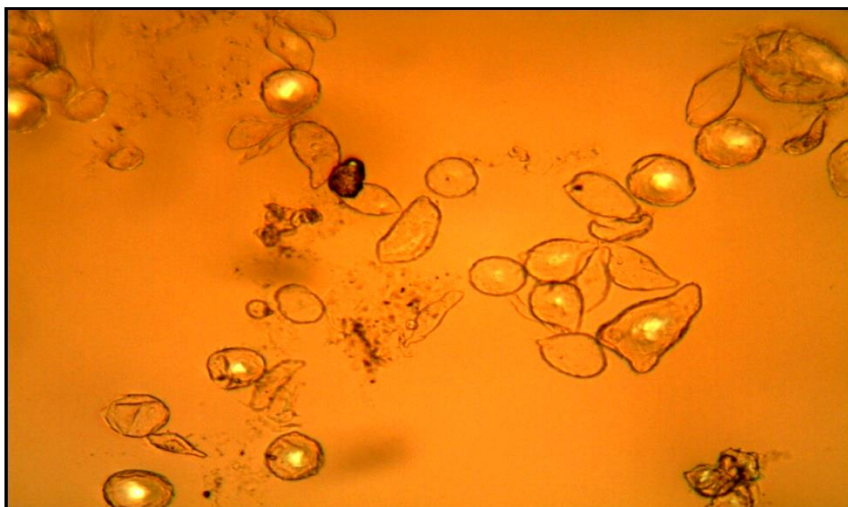


L'action de la 5<sup>ème</sup> solution enzymatique dans la première condition (24 h d'incubation sans agitation) permet d'obtenir le meilleur rendement qui est de  $5.87 \times 10^6$  protoplastes/g chez TGZ,  $6.68 \times 10^6$  protoplastes/g chez TKB et  $7 \times 10^6$  protoplastes/g chez DN, avec une bonne viabilité allant de 63% à 70%. Tandis que l'effet de cette même solution dans la deuxième condition soit 45 min d'agitation suivie de 10h d'incubation est aussi très élevé avec des taux similaires pour DN et TKB ( $6.80 \times 10^6$  protoplastes/g et  $6.83 \times 10^6$  protoplastes/g) et un taux de  $6 \times 10^6$  protoplastes/g chez TGZ et une viabilité allant de 67% à 69% (figure 28).



**Figure 28:** Observation de protoplastes issus de SCE, sous microscope inversé, après traitement à la SE5.

En ce qui concerne l'effet de la SE2 (Cellulase RS, Pectinase et l'Hémicellulase), sur le rendement des protoplastes, il varie entre  $0.96$  et  $1.40 \times 10^6$  protoplastes/g. avec des taux de viabilité entre 23% et 28% (figure 29).



**Figure 29:** Protoplastes issus de SCE, sous microscope inversé, après traitement à la SE2.



La SE3 donnent un très faible rendement en protoplastes. Le rendement vari de  $0.06 \times 10^6$  protoplastes/g à  $0.09 \times 10^6$  protoplastes/g chez les trois cultivars (figure 30).



**Figure 30:** Protoplastes issus de SCE, sous microscope inversé, après traitement à la SE3.

**Tableau 6:** Influence du génotype, du matériel de base et de la solution enzymatique sur le rendement en protoplastes ( $\times 10^6/g$ ) chez DN, TKB et TGZ.

Génotype	Deglet Nour (DN)											
	Micro cals						Suspension cellulaire					
Source du matériel végétal												
Solution enzymatique	SE1	SE2	SE3	SE4	SE5		SE1	SE2	SE3	SE4	SE5	
Temps d'incubation (heure)	24	24	72	10	24	10	24	24	72	10	24	10
Agitation (60 tours/min)	/	/	/	45 min	/	45 min	/	/	/	45 min	/	45 min
Rendement $\times 10^6$ (protoplastes/g)	0.4	0.55	0 + Eclatement des cellules	1	3	2.99	1.28	1.36	0.09	3.40	7	6.83
Viabilité (%)	19	20	/	23	59	60	25	23	/	40	70	69



Génotype	Takerboucht (TKB)											
Source du matériel végétal	Micro cals						Suspension cellulaire					
Solution enzymatique	SE1	SE2	SE3	SE4	SE5		SE1	SE2	SE3	SE4	SE5	
Temps d'incubation (heure)	24	24	72	10	24	10	24	24	72	10	24	10
Agitation (60 tours/min)	/	/	/	45 min	/	45 min	/	/	/	45 min	/	45 min
Rendement x10 <sup>6</sup> (protoplastes/g)	0.20	0.25	0	1.03	3	3.5	1.33	1.40	0.07	2.61	6.68	6.80
Viabilité (%)	12	15	/	25	54	56	21	28	/	30	63	67

Génotype	Tegaza (TGZ)											
Source du matériel végétal	Micro cals						Suspension cellulaire					
Solution enzymatique	SE1	SE2	SE3	SE4	SE5		SE1	SE2	SE3	SE4	SE5	
Temps d'incubation (heure)	24	24	72	10	24	10	24	24	72	10	24	10
Agitation (60 tours/min)	/	/	/	45 min	/	45 min	/	/	/	45	/	45 min
Rendement x10 <sup>6</sup> (protoplastes/g)	0.28	0.30	0	1.59	3.20	3.63	0.83	0.96	0.06	2.40	5.87	6
Viabilité (%)	21	22	/	40	43	50	20	25	/	31	67.5	68

### 3.4. Observation des protoplastes

Dans notre expérimentation, nous avons observé à l'aide d'un microscope inversé, les protoplastes issus de microcals et de suspensions cellulaires. Nous avons remarqué que les protoplastes présentent des tailles et des rendements différents selon l'origine du matériel végétal et aussi de la qualité de la suspension cellulaire (figure 31). En effet, nous avons



constaté que chez le cultivar Deglet Nour, les protoplastes issus de la suspension cellulaire sont homogènes, beaucoup plus volumineux avec un cytoplasme très vacuolisé et plus abondants. Par contre, chez les cultivars Takerboucht et Tegaza, nous avons observé des protoplastes de taille moyenne avec un cytoplasme relativement moins vacuolisé avec un rendement moins abondant.



**Figure 31:** Les différents types de protoplastes observés sous microscope inversé.

Par contre, l'observation des protoplastes issus de microcals, montrent qu'ils ont une petite taille et qu'ils sont beaucoup moins abondants pour les trois cultivars.

#### 4. Culture des protoplastes

Afin de régénérer leur paroi pectocellulosique et d'entamer les divisions cellulaires, les protoplastes viables sont mis en culture sur couche nourricière (milieu PcM<sub>2</sub>).

Les besoins nutritifs des protoplastes sont très semblables à ceux des cellules et de tissus en culture. L'absence de paroi cellulaire facilite l'efficacité des protoplastes pour assimiler les substances nutritives du milieu.

Les protoplastes commencent à régénérer leurs parois cellulaires quelque heure après leur mise en culture et la complètent en quelques jours. La perte de la forme sphérique indique donc la régénération de la paroi.

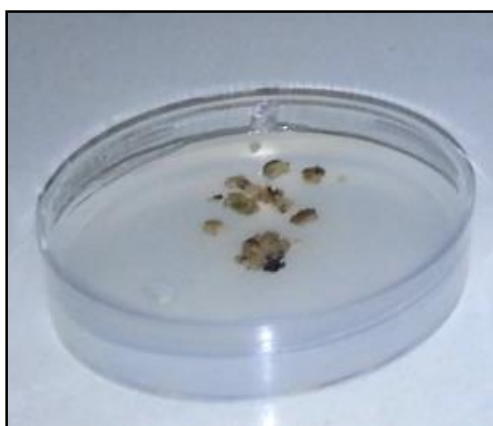
Il existe une relation directe entre la formation de la paroi et la division cellulaire. En effet, nous avons observé que les premières divisions n'apparaissent qu'à partir du 4<sup>ème</sup> jour mais se poursuivent régulièrement à raison d'une division tous les deux jours environ, des



colonies cellulaires de couleur blanchâtre se forment ainsi. Après un mois de culture environ, des microcals se sont développés sur la couche nourricière (figure 32), ces microcals sont jaunâtres à croissance très active. Ces derniers évolueront pour donner des cals.

Nous avons remarqué que généralement les protoplastes obtenus à partir d'une culture en suspension se divisent plus rapidement que ceux provenant d'une culture de microcals.

Néanmoins, nous avons constaté que certaines boites ne présentent aucune évolution, ceci est peut être dû soit à des erreurs de manipulation ou bien à l'éclatement des protoplastes. Nous avons également eu quelques pertes qui sont dû à des contaminations.



**Figure 32:** Régénération des protoplastes en cals.

## 5. Hybridation somatique

Durant notre expérimentation, nous avons effectué des hétéro-fusions entre Deglet Nour et Takerboucht, et entre Tegaza et Takerboucht issues de suspension cellulaire. Cette hybridation a été réalisée avec la méthode chimique au PEG 8000.

Les expériences menées en utilisant le traitement au Polyéthylène Glycol (PEG) ont été visualisés sous le microscope inversé.

Durant notre travail, nous avons testé trois protocoles de fusion au PEG 8000 sur les protoplastes issus des trois cultivars (DN, TKB et TGZ). Les résultats obtenus sont résumés dans le tableau 7.



**Tableau 7:** Effet des différents traitements de PEG sur le phénomène de fusion.

<b>Concentration du PEG</b> <b>8000</b>	<b>30%</b>	<b>30%</b>	<b>50%</b>
<b>Temps d'incubation</b>			
<b>15 min</b>	Aucun effet	Rapprochement de protoplastes	Rapprochement de protoplastes
<b>20 min</b>	Aucun effet	Pas d'accolement	Accolement des protoplastes
<b>25 min</b>	Aucun effet	Pas de fusion	Fusion des protoplastes
<b>30 min au plus</b>	Morts des protoplastes		

Il ressort du tableau, que le 1<sup>er</sup> test de fusion, en utilisant le PEG à 30% ajustée avec de l'eau distillée à température normal et stérilisée par filtration et sans ajustement du pH (préparé 24h avant), n'a eu aucune influence sur les protoplastes. Cependant, nous avons remarqué la mort des cellules en dépassant les 30 min de traitement.

L'observation des protoplastes sous effet du 2<sup>ème</sup> traitement contenant 30% de PEG ajustée avec de l'eau distillée tiède et stérilisée à l'autoclave avec un pH ajusté à 5.9 (Préparer 30-45 min avant), montre qu'après 15 min, les protoplastes se sont rapprochés et reste à cet état (pas d'accolement ni de fusion) durant les minutes qui ont suivies et qu'en dépassant les 30 min ces derniers se sont éclatés.

Afin d'optimiser l'accolement et la fusion des protoplastes nous avons opté d'utiliser un 3<sup>ème</sup> traitement, semblable à celui du bananier, contenant du PEG 50% ajustée avec de l'eau tiède et stérilisée à l'autoclave avec un pH régulé à 7 (Préparer 30-45min avant). Le suivi des protoplastes sous microscope inversé, dans ce cas, a montré qu'après 15 min d'incubation, les protoplastes se sont attirés et se sont déplacé les uns vers les autres avec leur accolement après 20 min, puis ils se sont fusionnés après 25 min d'incubation (figure 33).



Les protoplastes fusionnés sont ensuite ensemencés sur la couche nourricière. Les cultures des deux hétéro-fusion ont une évolution similaire, avec la formation de cals jaunâtre à croissance très active. Ces cals couvrent toute la surface ensemencée de la couche nourricière (figure 34 et figure 35).

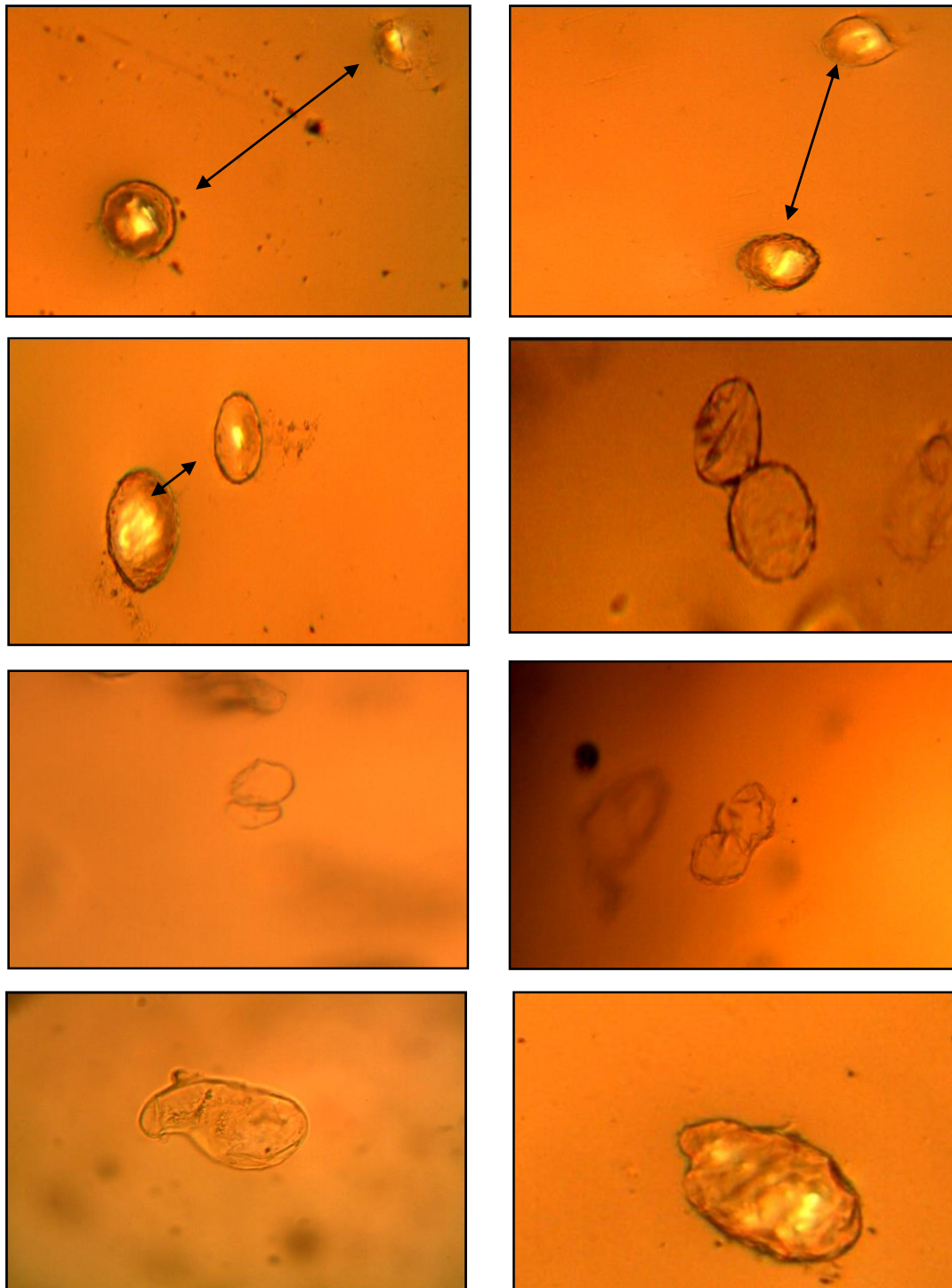
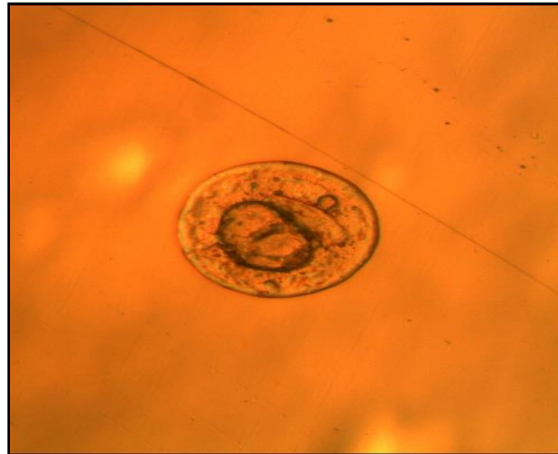


Figure 33: Les étapes de la fusion TKBxDN.



**Figure 34:** Protoplaste fusionné en division sur couche nourricière.



**Figure 35:** Régénération des hybrides en cals.

## • Discussion

Dans le but d'isoler des protoplastes à partir de suspensions cellulaires et de microcals friables, nous avons essayé de déterminer les combinaisons optimales d'enzymes (Cellulase, Pectolyase Y-23, Hémicellulase et Pectinase) et les conditions expérimentales optimales (temps, agitation), afin d'obtenir un meilleur rendement et un plus grand pourcentage de viabilité en protoplastes.

Les résultats obtenus dans notre expérimentation, révèlent que le matériel végétal utilisé influence fortement le rendement en protoplastes. En effet nous avons constaté un excellent rendement en protoplastes lorsque les suspensions cellulaires embryogènes sont utilisées. Par contre ce rendement est beaucoup plus faible quand les protoplastes sont issus de microcals ou de cals compacts. Ce résultat est en accord avec les travaux réalisés chez le bananier, par



plusieurs auteurs cités par Haïcour et *al.*, 2004. Dans le cas de matériel végétal récalcitrant (arbres, monocotylédones), les suspensions cellulaires constituent le matériel idéal pour l'obtention de protoplastes (Brent et Mc Cown, 1988; Haïcour et *al.*, 2002). Ceci a été démontré chez plusieurs espèces comme le riz (Datta et *al.*, 1992; Jain et *al.*, 1995), le maïs (Prioli et Söndahl, 1989), le blé (Vasil et *al.*, 1990) et l'orge (Funatsuki et *al.*, 1992).

Le rendement en protoplastes, ayant origine les microcals, n'a pas été amélioré ni par l'application des différentes solutions enzymatiques ni par les changements des conditions d'incubations. L'hypothèse avancée pour expliquer ces résultats faible est que les tissus de microcals contiennent moins d'agrégats de cellules par rapport aux suspensions cellulaires (Assani et *al.*, 2006)

Dans notre expérimentation, nous avons montré que ce sont les suspensions cellulaires les plus fines qui fournissent le plus de protoplastes. Ces résultats valident les travaux de Megia en 1993 et de Bui Trang en 1994. On déduit qu'il ya un rapport positif entre la présence des cellules embryogènes et le rendement en protoplastes.

Cependant, l'obtention d'une production importante de protoplastes pourrait être envisagée par la recherche d'une solution enzymatique particulière adaptée à la suspension cellulaire et aux microcals embryogènes ainsi qu'un nouveau milieu de culture d'initiation de suspensions cellulaires qui favoriserait l'obtention de cellules embryogènes.

Dans notre essai, nous avons utilisé cinq solutions enzymatiques et nous avons sélectionné la meilleure combinaison d'enzymes (SE5) qui est composée de (2% de Cellulase RS et 6% d'Hémicellulase). Cette solution a donné pratiquement les mêmes résultats chez les trois cultivars après une incubation de 24 heures (sans agitation) et aussi avec agitation 45 min suivie d'une incubation pendant 10 heures quelques soit la source du matériel végétal (microcals ou suspensions). Dans notre cas, nous avons déduit que l'addition de l'effet agitation de 45 minutes avant l'incubation influence positivement sur la libération d'un grand nombre de protoplastes. Ce résultat est en accord avec les travaux de Yatta et *al.*, 2014 et Yatta et *al.*, 2015 et en désaccord avec les travaux de Aida et *al.*, 2007 qui ont obtenus les meilleurs rendements dans les solutions enzymatiques non agité.

L'optimisation de la solution SE1 en solution SE4 nous a permis de confirmer l'effet de l'agitation sur le rendement en protoplastes et nous a informé d'avantage sur l'action de la



Cellulase RS. En effet une double concentration de cette dernière dans la SE4 par rapport à SE1 nous a permis d'obtenir un meilleur rendement.

Le remplacement de la Pectolyase Y-23 de la SE1 par la Pectinase de la SE2 avec la même concentration ne semble avoir aucun effet sur le rendement. Cependant une légère augmentation du rendement de la SE2 est probablement due à la durée d'incubation.

Un taux très faible voir nul est observé après utilisation de la 3<sup>ème</sup> solution enzymatique qui contient 4% de Pectinase et 6% d'Hémicellulase. Ces résultats sont en concordance avec les travaux réalisés sur l'isolement des protoplastes du palmier dattier (Rizkalla et *al.*, 2007; Chabane et *al.*, 2007 et Yatta et Bouguedoura, 2013) ainsi que les travaux réalisés par Assani et *al.*, 2001 sur la régénération des protoplastes du bananier.

Selon Haïcour et *al.*, 2004; et Zhu et *al.*, 2005, le faible rendement est due à l'absence ou la faible concentration (moins de 1%) de Cellulase RS. Ceci confirme également nos résultats obtenus avec la SE3 qui combine entre l'Hémicellulase et la Pectinase.

Par contre, en dépassant les 2% de Cellulase, elle semble provoquer la digestion du matériel végétal du départ. Cette affirmation a été rapportée par Monteiro et *al.*, 2003; Haïcour et *al.*, 2004 et Guedira 2006.

L'utilisation d'une cellulase RS est donc indispensable pour obtenir un meilleur rendement en protoplastes.

L'Hémicellulase nécessite un temps d'incubation plus lent (72 heures) par rapport aux trois autres enzymes (Cellulase, Pectinase et Pectolyase). En effet plus le temps d'incubation est lent plus le rendement est élevé avec l'Hémicellulase. Ceci dit qu'en dépassant les 72 heures d'incubation on observe l'éclatement des cellules.

Par ailleurs, il faut respecter le temps d'agitation qui est de 45 minutes à 80 tours/min, car au-delà, on remarque l'éclatement des protoplastes sous l'effet de la pression et ceci quelques soit la nature et la concentration de la solution enzymatique ainsi que le temps d'incubation. Ceci est en accord avec Haïcour et *al.*, 2004.

D'après nos résultats nous avons déduit que le rendement en protoplastes est également influencé par le génotype. En effet, nous avons remarqué que le cultivar Deglet Nour présente le meilleur rendement quelques soit la source du matériel végétale (microcals ou suspension



cellulaire embryogène), la solution enzymatique ainsi que les différentes conditions d'incubations (le temps et l'agitation). Ces résultats confirment ceux obtenus par Si-Dehbi et *al.*, 2013.

On a pu produire, grâce à notre travail, des protoplastes viables de formes parfaitement arrondie de différentes tailles. La viabilité est détectée grâce au FDA, ce produit lipophile pénètre rapidement dans les cellules grâce à la perméabilité de la membrane plasmique et lui confère une coloration verte. Ceci est en accord avec les travaux de Chabane et *al.*, 2006; Chabane, 2007 et Yatta et Bouguedoura, 2013.

Les protoplastes du palmier dattier comme ceux de la plupart des monocotylédones sont considérés comme récalcitrants. La mise en culture des protoplastes n'est envisageable que s'ils sont isolés en quantité suffisante. Ce résultat est en accord avec Assani et *al.*, 2002. Leur culture pose de nombreux problèmes. C'est pour cela que l'utilisation des couches nourricières reste pour l'instant le milieu favorable pour stimuler les divisions cellulaires de protoplastes du palmier dattier. L'apport d'un milieu frais (le milieu P<sub>5</sub>), tous les 10 jours est nécessaire afin de diminuer la pression osmotique et donc empêcher leur éclatement.

La mise en culture des protoplastes issus de microcals des trois cultivars n'a pas permis la constitution de colonies cellulaires. Il semble que ces protoplastes n'ont pas de pouvoir de division.

Dans notre étude, nous avons remarqué une régénération des protoplastes issus de suspensions cellulaires qui sont capable d'évoluer en embryons. Cette évolution dépend de la qualité de la suspension cellulaire utilisée. Il paraît donc que l'évolution des protoplastes dépend de la source du matériel végétal utilisée, et leur division nécessite la régénération de leur paroi. En effet les protoplastes qui ne peuvent pas régénérer leur paroi ne se divisent pas. Ces résultats concordent avec les travaux de Bohnke et Kohlenbach, 1978, Assani et *al.*, 2005.

L'utilisation de la méthode chimique au PEG reste une méthode de choix pour la fusion des protoplastes néanmoins cette technique nécessite des précautions d'utilisation car le PEG devient toxiques et causent la mort des cellules en dépassant les 30 minutes de traitement.

Dans notre étude, l'utilisation de la solution du PEG 8000 à une concentration de 50% a permis l'accolement des protoplastes, ce dernier constitue un film d'enrobage à la périphérie du protoplaste et masque ainsi les charges électriques. Tandis que la fusion, ne se produit



qu'au moment du rinçage, ceci est dû à la forte concentration d'ions  $\text{Ca}^{2+}$  de la solution de rinçage. Ces résultats confirment ceux trouvés par Sihashkr 2002; Assani et *al.*, 2005; Yatta et *al.*, 2014; Yatta et *al.*, 2015.

Les résultats de l'hybridation sont un peu aléatoires car ils dépendent de l'isolement des protoplastes et de la densité des suspensions. Durant notre expérimentation nous avons pu constater que lorsque les protoplastes sont viables et la suspension est très dense, il ya eu de très nombreuses fusions. Ceci nous a permis d'augmenter les chances d'obtention des hétéro-fusions.

La mise en culture des protoplastes après fusion, nous a permis leur régénération en embryons, ce résultat, semble être lié à l'utilisation du PEG qui réduit l'activité mitotique des cellules issues de la culture des protoplastes (Assani et *al.*, 2005). Cet embryon a évolué par la suite en microcals puis en cals pour aboutir à la suite à la régénération de plantes entières résistantes au bayoud.



*Conclusion*







Le patrimoine phœnicicole algérien est exposé à de nombreux problèmes tels que le vieillissement, culture monovariétal ainsi que d'autres maladies dont la plus redoutable est le bayoud causées par un champignon du sol *Fusarium oxysporum* f.sp. *albedinis*.

Pour pallier à ce problème et préserver nos ressources phœnicicoles, le moyen le plus prometteur pour la reconstitution des palmerais via une multiplication massif du palmier dattier est l'introduction de l'outil biotechnologique dans l'amélioration génétique du palmier dattier. D'après Michaux-Ferriere et *al.*, (1987), l'utilisation de cet outil, est fondée sur les techniques de culture *in vitro* par embryogenèse somatique.

Au cours de ce travail nous nous sommes fixés, comme objectif principal, la création d'hybride somatique résistant au bayoud par le biais de la fusion de protoplastes de trois cultivars du palmier dattier (Deglet Nour, Takerboucht et Tegaza).

Dans la première partie de ce travail, nous avons entretenu des cals embryogène des trois cultivars dans deux milieux de cultures M<sub>100</sub> et P<sub>12.5</sub>. La présence d'hormone de croissance dans ces deux milieux a conduit à un fort développement et à une multiplication intense des cals. Ces cals ont servi par la suite à l'initiation des suspensions cellulaires.

Nous avons établi, par la suite, des suspensions cellulaires embryogènes à partir de cals granulaires, friables des cultivars DN, qui est d'une excellente qualité dattière, et TGZ de bonne qualité dattière mais tous les deux sensibles au bayoud et du cultivar TKB, qui est une qualité dattière moyenne et résistant à la fusariose. Ces suspensions sont utilisées comme source potentiel de protoplastes viables ayant une bonne aptitude à la division et à la régénération de nombreuses plantes.

Les cals embryogènes choisis pour l'établissement des suspensions ont proliféré sur le milieu P<sub>5</sub>. La croissance et l'initiation de la suspension cellulaire ont été estimées par la pesée de poids frais des cals embryogènes en fonction du nombre de subcultures.

L'analyse statistique nous a permis de constater que les conditions, utilisées lors de la multiplication des cals, sont homogènes.

Les résultats obtenus chez les trois cultivars ont permis de définir les paramètres essentiels de la croissance de ces suspensions (le temps de dédoublement et le rendement maximal) et de leur maintenance en culture.



L'observation microscopique, des suspensions cellulaires, a permis de distinguer différents types de cellules composant les suspensions obtenues: amas de cellules et cellules isolées. La présence dans les suspensions cellulaires de cellules à cytoplasme dense et non vacuolisées a permis d'avancer l'hypothèse qu'il s'agissait de cellules embryogènes.

Les microcals et les suspensions cellulaires, des trois cultivars, nous ont servis dans la 2<sup>ème</sup> partie de notre travail à isoler les protoplastes. L'utilisation des suspensions cellulaires comme source de protoplastes nous a permis d'obtenir un meilleur rendement en protoplaste. Cependant, à partir de microcals, de faibles rendements ont été obtenus. En revanche, le cultivar DN libère plus de protoplastes, qui sont plus volumineux, par rapport aux cultivars TKB et TGZ. En effet il paraît que le rendement en protoplastes est conditionné par la source du matériel végétale utilisé (SCE ou microcals), d'une part, et par la composition de la solution enzymatique utilisé, d'une autre part. Le meilleur rendement a été noté pour les protoplastes isolés par l'utilisation de la solution enzymatique contenant 2% de Cellulase RS et 6% d'Hémicellulase.

L'utilisation de la couche nourricière pour la mise en cultures des protoplastes, s'est révélé d'être le milieu idéal pour l'initiation de l'activité mitotique des cellules. Cette dernière a permis la régénération de la paroi des protoplastes. Seuls les protoplastes issus de suspensions cellulaires peuvent se régénérer en microcals.

L'utilisation du traitement chimique au polyéthylène glycol (PEG 50%) a permis la fusion des protoplastes. La culture des protoplastes fusionnés a permis leur régénération en cals.

Quant aux perspectives de recherche, l'étude laisse apparaître les orientations suivantes:

- ✓ Etude cytofluométrique pour déterminer le niveau de ploïdie.
- ✓ Utilisation des marqueurs moléculaires pour déterminer le succès de l'hybridation somatique.



*Références  
bibliographiques*





## -A-

**Abe T., Futsuhara Y.** 1991 – Regeneration of rice plants from suspension cultures, in *Biotechnology in Forestry and Agriculture*, vol 14, Rice (Bajaj, Y. P. S., ed), Springer-Verlag, Heidelberg, pp. 38-469.

**Abed F.** 2012 – embryogenèse somatique chez quelques cultivars de palmier dattier (*Phoenix dactylifera* L.) de trois régions du sud et évaluation de la conformité par les systèmes enzymatique (peroxydases). Mémoire de Magister en sciences agronomiques.

**Abed F., Yatta D., Amara B., Yakhou M.S., et Benhafsfi F.** 2014 – Somatic embryogenesis from offshoot of different cultivars of date palm (*Phoenix dactylifera* L.) of three region of southern Algerian, e-Book *Biotechnology and conservation of species from arid regions*.

**Aberlenc-Bertossi F.** 2012 – La détermination du sexe du palmier dattier. *Diadenews letters* 3: 1-8.

**Aida A., Rizkalla A., Badr-elden M., Ahmed A., Nower A.** 2007 – Protoplast Isolation, Salt stress and callus formation of two Date Palm Genotypes. *Journal of Applied Sciences Research*, 3(10):1186-1194.

**Al-Khayri Jameel M.** 2011 – Basal salt differ according to culture stage and cultivar in date palm somatic embryogenesis. *American Journal of Biochemistry and Biotechnology* 7(1): 32-42.

**Al-Khayri Jameel M.** 2012 – Determination of the date palm cell suspension growth curve, optimum plating efficiency, and influence of liquid medium on somatic embryogenesis. *Emirate Journal of Food Agriculture*, Vol. 24(5): 444-455.

**Al Salih A. et Al Rawi A.** 1987 – A study of the cytology of two female cultivars of date palm. *Date Palm Journal* 5: 123-142.

**Amir H. et Amir A.** 1988 – Le palmier dattier et la fusariose. XXXXIV. Antagonisme dans le sol de souches de *Fusarium solani* vis-à-vis du *Fusarium oxysporum* f.sp *albedinis*. *Rev. Ecol. Biol. Sol*, 25: 161-174.

**Ammirato P.V.** 1983 – The regulation of somatic embryo development in plant cell cultures: suspension culture techniques and hormone requirements - *Bio/Technology* 1: 68-74.

**Asamizu T., Tanaka K., Takebe I. et Nishi A.** 1977 – Change in molecular size of cellulose during regeneration of cell wall on Carrot protoplasts. *Physiol. Plant.*, 40: 215-218.

**Asamizu T. et Nishi A.** 1980 – Regenerated cell wall of Carrot protoplasts isolated from suspension-cultured cells. *Physiol. Plant.*, 48: 207-212.

**Assani A., Chabane D., Haïcour R., Bakry F., Wenzel G. et Foroughi-Wehr B.** 2005 – Protoplast fusion in banana (*Musa* spp.): Comparison of chemical (PEG: polyethylene glycol) and electrical procedure. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, pp. 145-151.



**Assani A., Haïcour R., Wenzel G., Côte F.X., Bakry F., Foroughi-Wehr B., Ducreux G. et Aguillar M.E.** 2001 – Plant regeneration from protoplasts of dessert Banana cv. Grande Naine (*Musa* spp., Cavendish sub-group AAA) via somatic embryogenesis. *Plant Cell Reports*, 20: 482-488.

**Assani A., Haïcour R., Wenzel G., Foroughi-Wehr B., Bakry F. et Cote F.X.** 2002 – Influence of donor material and genotype on protoplast regeneration in banana and plantain cultivars (*Musa* spp). *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, pp. 145-151.

**Auge R., Beauchesne G.J., Boccon-Gibod L., Decourty L., Get. B., Jalouzout R., Minier R., Moran J., Reynord J.P., Strully D.G et Vidalie H.** 1989 – La culture in vitro et ses applications horticoles. 3<sup>ème</sup> Ed., TEC. Et DOC., Lavoisier, 207 p.

**Auge R. et Boccon-Gibod J.** 1989 – La culture in vitro et ses applications horticoles. Ed. J.B BAILLIERE. Paris, 225 p.

**-B-**

**Ball E.** 1946 – Development in sterile culture of stem tips and subjacent regions of *Tropaeolum majus* L. and *Lupinus albus* L. *Am.J. Bot.* 33: 301-18.

**Barrow S.** 1998 – Amonograph of *Phœnix* L. (Palmae: Coryphoideae). *Kew bulletin* 53: 513-575.

**Barton R.L. et Blake J.** 1989 – Date palm (*Phœnix dactylifera* L.). In biotechnology in agriculture and forestry. BADJJA AJ, Y.P.S, ed. Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, vol.5, pp. 161-175.

**Belguedj M.** 2002 – Les ressources génétiques du palmier dattier, caractéristiques des cultivars de dattiers dans les palmeraies du Sud-Est Algérien. Institut national de la recherche agronomique d'Algérie, 289 p.

**Belguedj M.** 2007 – Evaluation du sous-secteur des dattes en Algérie, INRAA El-Harrach.

**Ben abdellah A.** 1990 – La Phœniciculture. Option Méditerranéennes. -Les systèmes agricoles oasiens- Série A/n°11.

**Benkhalifa A.** 2006 – Un système d'information au service des ressources génétiques du palmier dattier et de la lutte contre la fusariose. Journées internationales sur la désertification et le développement durable. Biskra 10 et 12 juin.

**Bhansali R. Raj.** 2010 – Date palm cultivation in the changing scenario of India Arid zones: challenges prospects, in desert plants, K.G. Ramawat (ed), Springer, pp. 423-459.

**Bhaskaran S. et Roberta H.S.** 1995 – Somatic embryogenesis in date palm (*Phœnix dactylifera* L.) In: Jain S., Gupta P. et Newton R. (eds) Somatic Embryogenesis in Woody Plants. Vol.2: 461-470.



**Bohnke E. et Kohlenbach H.W.** 1978 – Cultivation of protoplasts of hyscyamus. EN : A.W. Alferman y E.Reinhard, Eds. Production of natural compounds by cell culture methods. Gesellschaft fur strahlen und umwltforschung mbh, Munchen, pp. 266-273.

**Bouguedoura N.** 1979 – Contribution à la connaissance du palmier dattier (*Phœnix dactylifera* L.). Etude des productions axillaires. Thèse 3<sup>ème</sup> cycle, Université des Sciences et de la Technologie d'Alger, 64 p.

**Bouguedoura N.** 1991 – Connaissance de la morphogenèse du Palmier dattier *Phœnix dactylifera* L. Etude in situ et *in vitro* du développement morphogénétique des appareils végétatif et reproducteur. Thèse Doctorat d'Etat, U.S.T.H.B Alger.

**Brent H. et Mc Cown B.H.** 1988 – Recent advances in protoplast culture of horticultural crops ornamental trees and shrubs. ScientiaHort., 37: 257-265.

**Bui-Trang V.** 1994 – Utilisation de systèmes cellulaires en vue de l'introgession de gènes d'intérêt agronomique pour l'amélioration des bananiers. Thèse de Doctorat, Université de Paris XI Orsay, 259 p.

**Burgess J., Watts J.W., Flemming E.N. et King J.M.** 1973 – Plasmalemma fine structure in isolated Tobacco mesophyll protoplasts. Planta, 110: 291-301 p.

**Burgess J. et Linstead P.J.** 1977 – Membrane mobility and concanavalin. A binding system of the plasmalemma of higher plants. Planta, 136: 253-259.

**-C, D-**

**Chabane D.** 1995 – Etude des aptitudes morphogénétiques de divers explants de rejets de palmier dattier (*Phœnix dactylifera* L.) chez deux variétés Takerboucht et Deglet Nour pour induire une embryogenèse somatique. Thèse de magister, U.S.T.H.B, Alger, 103 p.

**Chabane D., Assani A., Bouguedoura N., Haïcour R. et Ducreux G.** 2007 – Induction of callus formation from difficile date palm protoplasts by means of nurse culture. CR Biology's 330: 329-401.

**Chabane, D. et Bouguedoura, N.** 2006 – Contribution à la lutte contre le bayoud par les biotechnologies: production de protoplastes de le variété Deglet Nour (sensible) et de la variété Takerboucht (résistante) en vue de leur fusion et la production d'hybrides somatiques, pp. 45-48.



**Chong Pérez B., Gomez K.R., Reyes V.M., Bermudez C.I., Gallardo C.J., Freire S.M., Posada P.L., Herrera O.I. et Swennen R.** 2005 – Nouvelle méthodologie pour l'établissement de suspensions cellulaires de 'Grande naine' (AAA). Infomusa, 14: 13-18.

**Chowdhury M. S. H., Halim M. A., Haque F. & Koike M.** 2008 – Traditionnal utilisation of wild date palm (*Phoenix sylvestris*) in rural bangladesh: an approach to sustainable biodiversity management. Journal of forestry research 19 (3): 245-251.

**CIRAD et GRET,** 2002 –Mémento de l'agronome. Edit. Quae, 2002. ISBN 2876145227. 1691 p. CIRAD/ Centre de coopération International en Recherche Agronomique pour le Développement France, GRET/ Groupe de Recherche d'Echanges Technologiques.

**Daguin F. et Letouze R.** 1988 – Regeneration of date palm (*Phoenix dactylifera* L.) by somatic embryogenesis: improved efficiency by shaking in liquid medium. Fruits 43: 191-19.

**Datta K., Potrikus I. et Datta S.K.** 1992 – Efficient fertile plant regeneration from protoplasts of the Indica rice breeding line (*Oryza sativa* L.). Plant Cell Reports, 11: 229-233.

**Davey M. R., Anthony P., Power J.B. et Lowe K.C.** 2005 – Plant protoplast technology: current status. Acta Phys. Plant. 27:117-129.

**Dellaporta S. L et Calderon-urrea A.** 1993 – Sex Determination in Flowering Plants. The Plant Cell, 5: 1241-1251.

**De Mason DA.** 1980 – A histological study of development of adventive embryos in organ cultures of *Phoenix dactylifera* L. Ann Bot (London) 46: 465-472.

**Djerbi M.** 1988 – Les maladies du palmier dattier. Ed. El Watan Printing Press Co. Beyrouth, 125 p.

**Djerbi M.** 1990 – Méthodes de diagnostic du Bayoud. In: Compte rendu de l'atelier sur le diagnostic et l'éradication du Bayoud. Ghardaïa 3-7 Juin 1989.

**Dransfield J.** 2008 – Genera Palmarum: The Evolution and Classification of Palms 131 p.

**Dupont F. et Guinard J L.** 2007 – Botanique: Systématique moléculaire. Ed. Elsevier Masson, 285 p.

#### -E, F, G-

**Euwens C.J.** 1978 – Effects of organic nutrients and hormones on growth and development of tissue explants from coconut (*Cocos nucifera*) and date (*Phoenix dactylifera* L.) palms cultured *in vitro*. Physiologia Plantarum 42: 173-178.

**El Hadrami I., et El Hadrami A.** 2009 – Breeding date palm. S.M. Jain, P.M. priyadarshan (ed), Breeding Plantation Tree Crops: Tropical Species.



**El Hadrami A., El Idrissi-Tourane A., El Hassni M., Daayf F., et El Hadrami I.** 2005 – Toxin-based *in vitro* selection and its potential application to date palm for resistance to the bayoud *Fusarium* wilt. *Plant Biology and Pathology, C. R. Biologies*, 328 : 732-744.

**El Hadrami I., El Jaafari S. et Daayf F.** 1997 – Les biotechnologies végétales : intégration chez le palmier dattier (*Phoenix dactylifera L.*), pivot de l'agriculture oasienne. Cas du Maroc., In *Biotechnologies, Amélioration des plantes et sécurité alimentaires, Actes des 6<sup>èmes</sup> Journées Scientifiques du Réseau Biotechnologies Végétales AUPELF.UREF. Centre universitaire d'Orsay*, 571: 23-27.

**El Hamdouni E., Lamarti A. et Badoc A.** 1999 – La régénération *in vitro* du fraisier (*Fragaria X Ananassaduch*): Les possibilités offertes par la culture *in vitro*. *Bull. Soc. Pharm., Bordeaux*, 138: 49-74.

**El Mtili N.** 1990 – Embryogenèse somatique, cultures de cellules et de protoplastes chez le mil (*Pennisetum Americanum L.*). Thèse d'Université, Paris XI.

**Escalant J.V., Dufour M. et Rabot B.** 1996 – Plant genetic engineering in Catie. *Unidad de biotecnologia, Informe bianual 1994-1995*, 2 p.

**Escalant J.V., Teisson C. et Côte F.** 1994–Amplified somatic embryogenesis from male flowers of triploid banana and plantain cultivars (*Musa spp.*). *In Vitro Cell. Dev. Biol.*, 30: 181-186.

**FAOSTAT.** 2013 – United Nations Food and Agriculture Organisation FAO Stat, 2013-<http://faostat.Fao.org/>.

**Fki L.** 2005 – Application des suspensions cellulaires embryogènes au clonage et à l'amélioration *in vitro* du palmier dattier. Thèse d'Université, Faculté des sciences de Sfax, SfaxTunisia .

**Fki L., Masoudi R., Drira N. et Rival A.** 2003 – An optimized protocol for plant regeneration from embryogenic suspension cultures of dates palm (*Phoenix dactylifera L.*), cv. Deglet Nour. Thèse de Magistère en Biologie, U.S.T.H.B, Alger, 131 p.

**Frearson E.M., Power J.B. et Cocking E. C.** 1973 – The isolation, culture and regeneration petunia leaf protoplasts. *Dev. Biol.*, 33, 130-137.

**Funatsuki H., Lörz H. et Lazzeri P.A.** 1992 – Use of feeder cells to improve barley protoplast culture and regeneration. *Plant Sci.*, 85:179-187.

**Gabr F. et Tisserat B.** 1985 – Propagating palms *in vitro* with special emphasis on the date palm (*Phoenix dactylifera L.*). *Scientia Horticulturae* 25: 255-262.

**Gamborg O.I., Miller R.A. et Ojima K.** 1968 – Nurient requirements of suspension cultures of soybean root cells. *Exp. Cell Res.* 50: 148-51.

**Gamborg L. et Everleigh, D. E.** 1968 – Culture methods and detection of glucanases in suspension cultures of wheat and barley. *Can. J. Biochem.* 46: 417-21.





**Gautheret, R.** 1939 – Sur la possibilité de réaliser la culture indéfinie des tissus de tubercules de carotte. C. R. Soc. Biol. Paris 208: 118–120 p.

**Giaja J.** 1913 – Rev. Soc. Biol., 1913, 77, p. 719. Cité par : SCHIIDE-RENTSCHLER L, in "Les protoplastes". La Recherche, 1975, 56: 430-436.

**Goerget R., Domergue K., Ferrière N. et Cote F.X.** 2000 – Morpho-histological study of the différent constituents of a banana (Mussa AAB, cv. Grande naine) embryogenic cell suspension. Plant cell Report, 19: 748-754.

**Govaerts R. & Dransfield J.** 2005 – World checklist of palms. Kew, Royal Botanic Gardens, 240 p.

**Grapin A.** 1995 – Régénération par embryogenèse somatique en milieu liquide et transformation génétique par biolistique de bananiers di et triploïdes. Thèse de Doctorat, Montpellier, 90 p.

**Gros-Baltazard M.** 2013 – Hybridization in the genus Phœnix: Areview. Emirates Journal of Food and Agriculture 25: 831-842.

**Guedira A.** 2006 – Mise en œuvre des biotechnologies : suspensions cellulaires, protoplastes, en vue de l'amélioration des bananiers à la résistance aux nématodes au Maroc. Thèse d'état, Université Mohamed V, Faculté des Sciences de Rabat, 203 p.

**Guerradi M., Outlioua K. et Hamdouni N.,** 2005 – Projet RAB98/G31. In <http://www.maghrebdatepalm.org/>.

**Guillot G.** 2010 – La planète fleur. Ed. Quae. France, 208 p.

#### -H, J, K-

**Haberlandt G.** 1902 – Culturversuche mit isoliertenPflanzenzellen. Sitz-Ber. Mat. Nat. Kl. Kais. Akad. Wiss. Wien 111: 69–92.

**Hahne G., Herth W. et Hoffmann F.** 1983 – Wall formation and cell division in fluorescence -Labelled plant protoplasts. Protoplasma, 115:217-221.

**Haibon TK. et Kovoov A.** 1982 – Regeneration of callus from coconnutprotoplsts. In symposium on "Tissue culture of economic cally important plants" UNESCO, Singapore, 149 p.

**Haïcour R.** 2002 – Biotechnologies végétales. Techniques de laboratoire, pp. 177-199.

**Haïcour R., Assani A., Matsumoto K. et Guédira A.** 2004 – Banana protoplasts. In: Banana improvement: cellular, molecular biology and induced mutations. Mohan Jain S. et Swennen R. eds, INIBAP, pp. 111-125.

**Hanstein J. v.** 1880 – Das Protoplasmaals Träger der pflanzlichen und thierischenLebensverrichtungen. FürLaien und Sachgenossendargestellt. From Sammlung von Vorträgenfür das deutsche Volk, edited by W. Frommel and F. Pfaff, p. 125.

**Henderson A.** 2009 – Palms of Southern Asia. Princeton, Princeton University Press.



**Hocher V., Lyakurwa R., Grosdemange F., Huet C. et Verdeil J.L.** 1998 – Changes in levels of cytokinins during the early development of coconut somatic embryos. In: L'Usine Cellulaire Végétale *In Vitro*. Congrès IAPTC France, Amiens, 45 p.

**Hoffmann F.** 1981 – Formation of cytoplasts from giant protoplasts in culture. *Protoplasma*, 107: 387-391.

**Jain R.K., Khehra G.S., Lee S.H., Blackall N.W., Marchant R., Davey M.R., Power J.B., Cocking E.C. et Gosal S.S.** 1995 – An improvement procedure for plant regeneration from indica and japonica rice protoplasts. *Plant Cell Reports*, 4: 515-419.

**John E. et Smith.** 2004 – Biotechnology, Cambridge University press 37-38 p.

**Kao K.N. et Michayluk M.R.,** 1974 – A method for high frequency intergeneric fusion of plant protoplasts. *Planta*, 115:355-367.

**Kao K. N., et Michayluk M. R.** 1975 – Nutrient requirements for growth of *Vicia hajastana* cells and protoplasts at very low population density in liquid media. *Planta* 126: 105-10.

**Kriaa W., Sghaier-Hammami B., Masmoudi-Allouch, Benjemaa-Masmoudi R., Drira N.** 2012 – The date palm (*Phoenix dactylifera* L.) micropropagation using completely mature female flowers. *Plant biology and pathology. C.R. Biologies*, 335: 194-204.

**Krikorian A.D et Kann R.P.** 1981 – Plantlet production from morphogenetically competent cell suspensions of daylily. *Ann Bot* 47: 679-686.

#### -L, M-

**Linné C. (von)** 1753 – Species Plantarum, tome 2. Stockholm, Impensis Laurentii Salvii, 776 p.

**Littardi C.** 2015 – Palm di Liguria. Economia, paesaggio e significato simboliconell'estrema Riviera di Ponente (secoli XIII-XX) 293 p.

**Louvet J.** 1977 – Observations sur la localisation des chlamydozspores de *Fusarium oxysporum* dans les tissus des plantes parasitées. Travaux Dédiés à G. Viennot Bourgin, pp. 193-197. INRA, Paris, France.

**Mahdi N.** 2011 – Essai de lutte biologique contre la fusariose vasculaire du palmier dattier (*Phoenix dactylifera* L.). Mémoire de Magister Université Mouloud Mammeri de Tizi-Ouzou.

**Margara J.** 1989 – Bases de la multiplication végétative. Les méristèmes et l'organogenèse. E. INRA. Paris.

**Mark R.** 2006 – Introduction to fruit corps.

**Mater A.A.** 1986 – *In vitro* propagation of *Phoenix dactylifera* L. *Date palm J.* 4: 137-152.

**Megia R., Haïcour R., Rossignol L. et Sihachakr D.** 1992 – Callus formation from cultivated protoplasts of banana (*Musa* sp). *Plant Science*, 85: 91-98.



**Megia, R., Haïcour, R., Tizroutine, S., Bui Trang, V., Rossignol, L., Sihachakr, D. et Schwendiman, J.** 1993– Plant regeneration from cultured protoplasts of the cooking banana cv. Bluggoe (*Musa* spp., ABB group). *Plant Cell Reports*, 13:41-44.

**Meraneh A.D.** 2010 – Détermination du sexe chez le palmier dattier : approches histocytologiques et moléculaires. Thèse de doctorat de l'Université Montpellier II.

**Mezouane L.** 2012 – Contribution à l'étude bibliographique du palmier dattier (*Phoenix dactylifera* L.) Physiologie et écologie. Mémoire de DES Tizi-Ouzou.

**Ministère de l'Agriculture.** 2012 – Statistiques agricoles. Ministère de l'Agriculture, série B, 2012.

**Monnier M.** 1990 – Induction of embryogenesis in suspension culture. In POLLAND J. *Methods of Molecular Biology*. Humana Press, USA, pp. 149-156.

**Monteiro A., Pijs J., Bax M., Hakkaart T. et Beakefield P.M.** 2003 – Mutants highlight the modular control of butterfly eyespot patterns. *Evolution & Development*, 5: 180-187.

**Morel, G., et Martin, G.** 1952 – Guérison de dahlias atteintes d'une maladie à virus. *C. R. Acad. Sci. (Paris)* 235: 1324-5 p.

**Munier P.** 1973 – Le palmier-dattier. Paris, Maisonneuve et Larose, 221 p.

**Murashige T. et Skoog F.** 1962 – A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. *Physiol Plant* 15: 473-497.

#### -N, O, P-

**Newton C., Gros-Baltazard M., Ivorra S., Paradis L., Pintaud J.-C. et Terral J.-F.** 2013 – *Phoenix dactylifera* L. and *P. sylvestris* in Northwestern India: A glimpse into their complex relationship. *Palms* 57: 37-50.

**Nixon R.W. et Fur J.R.** 1965 – Problems and progress in the date breeding. *Grower's Institute Reports*, pp. 2-5.

**Noat G., Nari J., Moustacas A.M. et Borel M.** 1996 – Propriétés des parois cellulaires végétales et interaction matrice-enzymes. *Bull. Soc. Bot. Fr. Actual. Bot.* 138, (3/4): 263-277.

**Nobécourt P.** 1939 – Sur la pérennité et l'augmentation de volume des cultures de tissus végétaux. *Compt. Rendus Soc. Biol. Lyon* 130: 1270-1271.

**Novak F.J, Afza R, Van Duren M, Perea-Dallos M. Conger B.V et Tang X.L.,** 1989 – Somatic embryogenesis and plant regeneration in suspension cultures of dessert (AA and AAA) and cooking (ABB) bananas (*Musa* spp.). *Biotechnology* 7: 154-159.

**OEPP.** 1994 – Fiche informative sur les organismes de quarantaine. *Fusarium oxysporum* f.sp. *albedinis*. N° 70 II/ A1. Organisation Européenne et Méditerranéenne pour la protection des plantes, pp. 1-6.

**OEPP/EPPO.** 2003 – *Fusarium oxysporum* f.sp. *albedinis*. *Bulletin*, 33: 265-269.



**Ouinten M.**, 1996 – Diversité et structure génétique des populations algériennes de *Fusarium oxysporum* f.sp. *albedinis*, agent de la fusariose vasculaire (bayoud) du palmier dattier. Thèse de Doctorat. Sciences et Technique du Languedoc. Université de Montpellier II.

**Panis B. et Thinh N.T.** 2001 – Cryoconservation de matériel génétique de bananier. Guide Technique INIBAP 5. Ed. J.V. Escalant et S. Sharrock. Réseau international pour l'amélioration de la banane et de la banane plantain. Montpellier. France, 44 p.

**Panis B., Wauwe Aw. et Swenen R.** 1993 – Plant regeneration through direct somatic embryogenesis from protoplasts of banana. (*Musa* spp). Plant cell rep. 12: 403-407.

**Peyron G.** 2000 – Cultiver le palmier dattier. Groupe de Recherche et d'Information pour le Développement de l'Agriculture d'Oasis (GRIDAO), 109 p.

**Pintaud J.C, Zehdi S., Couvreur T., Barrow S., Henderson S., Aberlenc-Bertossi F., Tregear J. et Billote N.** 2010 – Species delimitation in the Genus *Phoenix* (Arecaceae) based on SSR markers, with emphasis on the identity of the date palm. Diversity, phylogeny, and evolution in the monocotyledon. Edited by seberg, Peterson, barfodans dais. Aarhus university press, dannark, 2010.

**Popenoe W.** 1938 – Manual of tropical and subtropical fruits. New-York, The Macmillan Company, 544 p.

**Poulain C., Rhiss A. et Beauchesne G.,** 1979 – Essai de multiplication «*in vitro*» de palmier dattier. GRET.

**Poulain C., Rhiss A. et Beauchesne G.,** 1979 – Multiplication végétative en culture *in vitro* de palmier dattier (*Phoenix dactylifera* L.). C. R. Acad. Sc., pp. 1151-1154.

**Power J.B et Cocking E.C.** 1970 – Isolation of leaf protoplasts: macromolecular uptake and growth substance response. J. Exp. Bot. n°21, pp. 64-70.

**Prioli L.M. et Söndahl M.L.** 1989 – Plant regeneration and recovery of fertile plants from protoplasts of maize (*Zea mays* L.). Bio/Technology, 7: 589-594.

#### -R, S-

**Rene S.** 1984 – Biotechnologie. Ed. Technique et documentation (Lavoisier), 2<sup>ème</sup> édition, Paris (France), 662 p.

**Reinert J.** 1958 – Untersuchungen über die Morphogenese an Gewebekulturen. BerDtsch Bot Ges 71, 15 p.

**Reuveni O.** 1979 – Embryogenesis and plantlets growth of date palm (*Phoenix dactylifera* L.) derived from callus tissues - Plant Physiol. 63, 138 p.

**Reuveni O. et Lilien-kipnis H.,** 1974 – Studies of the *in vitro* culture of date palm tissues and organs. The Volcani Center, pp. 1-39.



- Reynolds J.F. et Murashige T.** 1979 – Asexual embryogenesis in callus cultures of palms. *In vitro* 15: 383-387.
- Rival A., Beulé T., Barre P., Hamon S., Duval Y. et Noirot M.** 1997 – Comparative flow cytometric estimation of nuclear DNA content in oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.) tissue cultures and seed-derived plants. *Plant Cell. Rep.*, 16: 884-887.
- Rizkalla A., Badr-Eldem A. et Nower A.** 2007 – Protoplast isolation, salt stress and callus formation of two date palm genotypes. *Journal of Applied Sciences Research*, 3(10): 1186-1194.
- Roger C.**, 1990 – Principe de phytopathologie et de lutte contre les maladies des plantes. Ed. Presses Polytechniques et Universitaires Romandes, 285 p.
- Saadi M.**, 1979 – Contribution à la lutte contre le Bayoud, Fusariose vasculaire du palmier dattier. Thèse Université de Dijon.
- Sabaou N., Amir H. et Bounaga A.N.** 1980 – Le palmier dattier et la fusariose. X: Dénombrement des actinomycètes de la rhizosphère, leur antagonisme vis-à-vis du *Fusarium oxysporum* f.sp. *albedinis*. *Ann. Phytopathol*, 12: 253-257.
- Sané D., Aberlenc-Bertossi F., Djitiningo Diatta L.I., Guèye B., Daher B., Sagna M., Duval Y., et Borgel A.** 2012 – Influence of Growth Regulators on Callogenesis and Somatic Embryo Development in Date Palm (*Phoenix dactylifera* L.) Sahelian Cultivars. *The Scientific World Journal*, pp. 1-8.
- Sané D., Aberlenc- Bertossi F., Gassama-Dia Y.K., Sagna M., Trouslot M.F., Duval Y. et Borgel A.** 2006 – Histocytological analysis of callogenesis and somatic embryogenesis from cell suspensions of Date Palm (*Phoenix dactylifera*). *Ann Bot.* 98: 301–308.
- Schnabl H., Bornman C.H. et Ziegler H.**, 1978– Studies on isolated starch-containing (*Vicia faba*) and starch - deficient (*Allium cepa*) guard cell protoplasts. *Planta*, 143: 33-39.
- Schroeder C.A.** 1970 – Tissue culture of date shoots and seedlings. *Date Grower's Institute Report* 447: 25-27.
- Sedra M.H.** 2003 – Le palmier dattier base de la mise en valeur des oasis au Maroc. *Techniques phœnicicoles et Création d'oasis*, 25 p.
- Si-Dehbi F., Chabane D. et Bouguedoura N.** 2013 – Improvement of Date Palm (*Phoenix dactylifera* L.) by using Cell Suspension. In *Proc. First Is on Date Palm* eds. Bougudoura et al., *Acta Hort.* 1994. 303p.
- Sihachakr D.** 2002 – Protoplastes: isolement, culture, régénération et fusion au polyéthylène glycole. In: *Biotechnologies végétales, techniques de laboratoire*. Tec et Doc Ed., pp.177-199.
- Sondahl M.** 1991 – Tissue culture of cacao, coffee and oil palm - Proceedings of the fourth conference Int. Plant Biotechnology Network San Jose, Costa Rica, 14-18 Janvier 1991, pp. 98-99.



**Steinmacher D., Cangahuala-Inocente G., Clement C. et Guerra M.** 2007– Somatic embryogenesis from peach palm zygotic embryos. In *Vitro Cellular and Development Biology – Plant.*; 43:124–132.

**Steward F.C., Mapes M.O. et Mears K.** 1958 – Growth and organized development of cultured cells. II. Organization in cultures grown from freely suspended cells. *Am J Bot* 45: 705–708.

**Steward F.C. et M.O. Mapes.** 1971 – Morphogenesis and plant propagation in aseptic cultures of asparagus. *Bot. Gaz.* 133: 70-79.

**-T-**

**Takebe I.** 1969 – Isolation of tobacco mesophyll cells in intact and active state *Plant cell Physiol.*, pp. 115-124.

**Takebe I., Iabib G. et Melchers G.** 1971– Regeneration of whole plants from isolated mesophyll protoplasts of tobacco. *Naturwissenschaften*, 58: 318-320.

**Thorpe T.A.** 1988 – In vitro somatic embryogenesis. *ISI. Atlas science*, 1: 81-88.

**Tirichine H.S.** 2007 – Essai de mise en évidence de la conformité génétique des vitro-plants du palmier dattier (*Phoenix dactylifera L.*) par l'utilisation des marqueurs enzymatiques. Mémoire de DES. Université d'Oran Es-Sénia, 52 p.

**Tiecoura K., Kouassi A.B., N'nan-Alla O. Dinant M. et Ledou L.** 2014 – Optimisation des conditions d'établissement de suspensions cellulaires embryogènes à partir de cals d'apex caulinaire de Mil (*Pennisetum glaucum L.*).

**Tisserat B.** 1979 – Propagation of date palm (*Phoenix dactylifera L.*) *in vitro*. *Journal of Experimental Botany*, 30(119): 1275-1283.

**Touchet B., Y. Duval et Pannetier C.** 1998 – Oil Palm (*Elaeis guineensis Jacq.*) regeneration from embryogenic suspension culture - VII IAPTC Congress of Plant tissue and Cell Culture, Amsterdam, Abstracts, 249 p.

**Tourte Y., Tourte C. et Moreau-Vauzelle C.** 2002 – Génie génétique et biotechnologies: concepts, méthodes et applications agronomiques. Ed. DUNOD, 2<sup>ème</sup> édition, Paris, France, 241 p.

**-V, W-**

**Valverde R., Arias O. et Thorpe TA.** 1987 – Picloram-induced somatic embryogenesis in peji-baye palm (*Bactris gasipaes HBK*) *Plant Cell Tissue and Organ Culture.*;10:149–156.

**Vanneste S. et Friml J.** 2009 –Auxin: a trigger for change in plant development. *Cell* 136: 1005–1016.

**Vasil V., et Hildebrandt A.C.** 1965a – Growth and tissue formation from single, isolated tobacco cells in microculture. *Science* 147: 1454–1455.



**Vasil V., et Hildebrandt A.C.** 1965b – Differentiation of tobacco plants from single, isolated cells in microcultures. *Science* 150: 889–892.

**Vasil V. et Vasil I.K.** 1986 – Plant regeneration from friable embryogenic callus and cell suspensions cultures of *Zea mays* L. - *J. Plant Physiol.* 127: 399 – 408.

**Vasil V. et Vasil I.K.** 1981 – Somatic embryogenesis and plant regeneration from suspension cultures of Pearl millet (*Pennisetum americanum*) - *Ann. Bot.* 47: 669 – 678.

**Vasil V. et Vasil I.K.** 1982–Characterization of an embryogenic cell suspension culture derived from cultured inflorescences of *Pennisetum americanum* (Pearl Millet, Gramineae). *Amer. J. Bot.*, 69: 1441-1449.

**Vasil I.K., Vasil V. et Redway F.** 1990 – Plant regeneration from embryogenic callus, cell cereals, Eucarpia symposium on genetic manipulation in plant breeding molecular biology breeding interface. Rens/Salori (Tarragone), 26-30 Mai.

**Vasil I.K., Vasil V. et Redway F.** 1999 – Plant regeneration from embryogenic calli, cell suspension cultures and protoplasts of *Triticum aestivum* L. (wheat). VII International Congress of Plant Tissue and Cell Culture, Amsterdam. Abstracts, pp. 33-37.

**Wallin A., Glimelius K. et Eriksson T.** 1974 – The induction of aggregation and fusion of *Daucus carota* protoplasts by polyethylene glycol. *Z. Pflanzenphysiol.*, 74:64-80.

**White P.R.** 1934 – Potentially unlimited growth of excised tomato root tips in a liquid medium. *Plant Physiol.* 9: 585–600.

**Williamson F.A., Fowke L.C., Weber G., Costabel F. et Gamborg O.L.** 1977 – Microfibril deposition on cultured protoplasts of *Vicia hajastana*. *Protoplasma*, 91: 213-219.

**-Y, Z-**

**Yatta D., Abed F., Amara B., Yakhou M.S et Benhafs F.** 2012 –Participation à la manifestation sur la recherche scientifique et le développement technologique. Célébration du 50<sup>ème</sup> anniversaire de l'indépendance nationale.

**Yatta D., Abed F., Amara B., Yakhou M.S., Beloued D., Beule T., Bennaceur M. et Bouguedoura N.** 2014 – Somatic embryogenesis and molecular analysis for conformity test of date palm vitroplants (*Phoenix dactylifera* L.) and their relationship to bayoud disease. *Journal of agricultural science and technology*, pp. 144-150.

**Yatta D., Abed F., Amara B. et Yakhou M.S.** 2009 –Isolment et culture de protoplaste de palmier dattier *Phoenix dactylifera* L. Séminaire International sur «la protection et la préservation des écosystèmes sahariens».

**Yatta D., Abed F., Belouad D., Amara B., Yakhou M.S. et Benhafsi F.** 2015 – «Propagation tests of date palm by protoplast culture».International Symposium on Production and Establishment of Micropropagated Plants, San Remo (Italy).

**Yatta D. et Bouguedoura N.** 2013– «The Date palm in Algeria», San Remo (Italy).



- Yatta D., et Bouguedoura N.** 2015 – Micropropagation of date palm (*Phoenix dactylifera* L.) using cell suspensions established from vegetative and floral explants.
- Yatta D. et Fergani.** 2007 – Multiplication et amélioration du palmier dattier (*Phoenix dactylifera* L.) par les biotechnologies. Atelier National de recherche sur le palmier dattier et le bayoud: préservation et valorisation. INRAA.
- Zaïd A.** 2002 – Date palm cultivation. Food and agricultural organization of the United Nations, Rome, (en ligne) URL: <http://www.fao.org/docrep/006/y4360e/y4360e00.htm>.
- Zohary D., Hopf M. & Weiss E.** 2012 – Domestication of plants in the Old World. 3<sup>ème</sup> édition. New York, Oxford University Press, 264 p.
- Zrÿd J.P.** 1988 – Cultures de cellules, tissus et organes végétaux. Fondement théorique et utilisations pratiques. Ed Press. Polytechnique Romandes Suisse.
- Sharma D.R., Chowdhori J.B et Yadan N.** 1998 – Somatic embryogenesis and plantlet regeneration from shoot tipecalli of wild date *Phoenix sylvestris* Roxb. *Indian Journal of Experimental Biology*, 26: 854-857.
- Zaïd A.** 1989 – Etude histologique de l'embryogenèse somatique chez le palmier dattier (*Phoenix dactylifera* L.). Compte rendu du 2eme séminaire magrébin sur la multiplication rapide du palmier dattier par les techniques de culture *in vitro*. FAO/PNUD/RAB/88/024, pp. 81-95.
- Zhu L.G., Wang B.C., Zhu J., Chen L.X., Dai C.Y. et Duan C.R.** 2005 – Prtoplast isolation of callus in *Echinacea augustifolia*. *Colloids Surfaces B-Bio interfaces*, 44: 4-5





# *Annexes*



Annexe 1

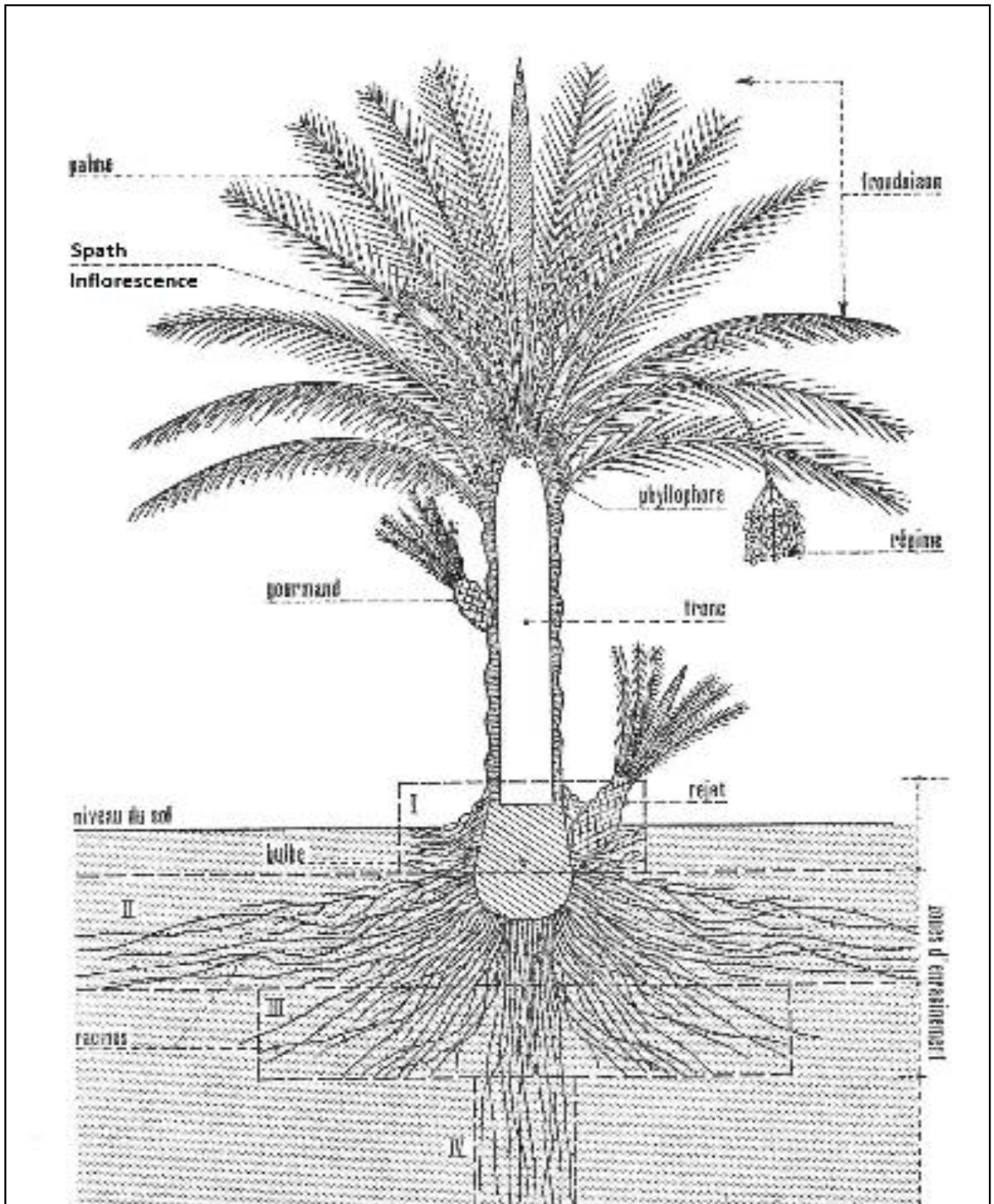


Figure 1: Représentation schématique du palmier dattier (*Phoenix dactylifera* L.) d'après Munier (1973).



**Figure 2:** Palmes présentant les symptômes typique de la maladie du bayoud. (Béchar)  
(photo Benzohra CRSTRA 01-2014).

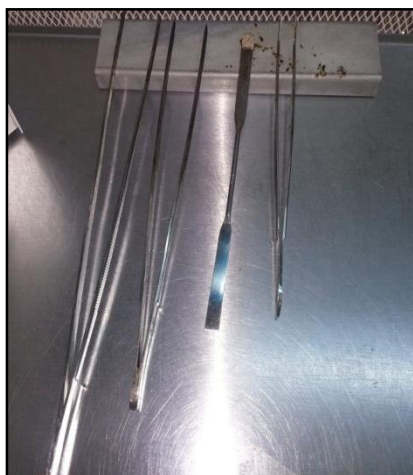


**Figure 3:** Palmier présentant le stade final de la maladie.

## Annexe 2



**Figure 4:** Hotte à flux laminaire.



**Figure 5:** Matériel de repiquage.



**Figure 6:** Stérilisateur a billes.



**Figure 7:** Etuve.



**Figure 8:** Verrerie.



**Figure 9 :** Micropipettes.



**Figure 10:** Tamis.



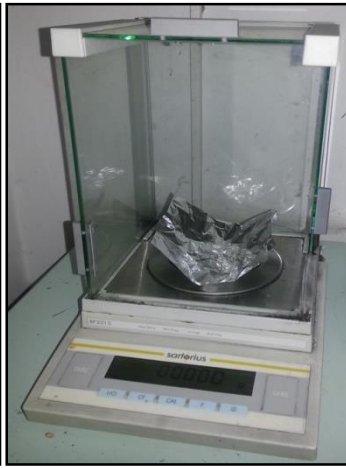
**Figure 11:** Fer MS, Micro MS et les Macro MS.



**Figure 12 :** IPA, Thiamine, Picloram.



**Figure 13:** Balance.



**Figure 14:** Balance de précision.



**Figure 15:** Agitateur.



**Figure 16:** Chambre de culture.

### Annexe 3

**Tableau 1:** Les composants de la solution mère des Macro MS.

Produits	Concentration du milieu	(n) fois concentration	Concentration de la solution mère
<b>KNO<sub>3</sub></b>	1.9g/l	X25	45.5g
<b>NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub></b>	1.65g/l	X25	41.25g
<b>CaCl<sub>2</sub> ,2H<sub>2</sub>O</b>	0.44g/l	X25	11g
<b>MgSO<sub>4</sub>, 7H<sub>2</sub>O</b>	0.37g/l	X25	9.25g
<b>KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub></b>	0.17g/l	X25	4.25g

**Tableau 2:** Les composants de la solution mère des Micro MS.

Produits	Concentration du milieu	(n) fois concentration	Concentration de la solution mère
<b>H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub></b>	6.2mg/l	X100	620mg
<b>MnSO<sub>4</sub>, 7H<sub>2</sub>O</b>	16.9mg/l	X100	1690mg
<b>ZnSO<sub>4</sub>, 7H<sub>2</sub>O</b>	8.6mg/l	X100	860mg
<b>CuSO<sub>4</sub>, 5H<sub>2</sub>O</b>	0.025mg/l	X100	2.5mg
<b>CaCl<sub>2</sub>, 6H<sub>2</sub>O</b>	0.025mg/l	X100	2.5mg
<b>NaMoO<sub>4</sub>, 2H<sub>2</sub>O</b>	0.25mg/l	X100	25mg
<b>KI</b>	0.83mg/L	X100	83mg

**Tableau 3:** Les composants de la solution mère Fer MS.

Produits	Concentration du milieu	(n) fois concentration	Concentration de la solution mère
<b>Na<sub>2</sub> EDTA</b>	0.03735g/l	X100	3.73g
<b>FeSO<sub>4</sub>, 7H<sub>2</sub>O</b>	0.02785g/l	X100	2.78g

#### Annexe 4

**Tableau 4:** Milieux solides pour l'induction et la multiplication des cals.

Eléments	Milieu P12.5	Milieu M100
<b>Solutions mères Murashig et Skoog</b>		
Macro éléments	40 ml	40 ml
Micro éléments	10 ml	10 ml
Fer MS	10 ml	10 ml
<b>Vitamines</b>		
Thiamine	1 mg/l	1 mg/l
Myo-inositol	100 mg/l	100 mg/l
<b>Hormones de croissances</b>		
IPA	1 mg/l	3 mg/l
Piclorame	12.5 mg/l	/
2-4D	/	100 mg/l
<b>Source de carbone</b>		
Saccharose	45 g/l	45 g/l
<b>Autres constituants</b>		
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	100 mg/l	100 mg/l
Na <sub>2</sub> H <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	170 mg/l	170 mg/l
Adenine	40 mg/l	40 mg/l
Citrate d'ammonium	200 mg/l	200 mg/l
L-Glutamine	100 mg/l	100 mg/l
Charbon actif	200 mg/l	3 g/l
<b>Agent de solidification</b>		
Agar	7 g/l	7 g/l
<b>pH= 5.85</b>		

**Tableau 5:** Milieu liquide pour la suspension cellulaire (P5).

Eléments	Quantité
<b>Solutions mères de Murashig et Skoog</b>	
Macro éléments	40 ml
Micro éléments	10 ml
Fer	10 ml
<b>Vitamines</b>	
Thiamine	1 mg/l
Inositol	100mg/l
<b>Hormones de croissances</b>	
Piclorame	5 mg/l
IPA	1 mg/l
<b>Source de carbone</b>	
Saccharose	45 g/l
<b>Autres additifs</b>	
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	100 mg/l
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	170 mg/l
L-Glutamine	100 mg/l
Adenine	40 mg/l
PVP	2 g/l
Citrate d'ammonium	200 mg/l
MnSO <sub>4</sub>	40 mg/l
<b>pH=5.85</b>	

**Tableau 6:** Milieu PcM<sub>2</sub> (couche nourricière).

Produits	Concentrations
<b>Solutions mères de Murashig et Skoog</b>	
Macro éléments	40 ml
Micro éléments	10 ml
Fer	10 ml
<b>Source de carbone</b>	
Glucose	0.5g
Maltose	0.1g
Saccharose	45g
Mannitol	45g
<b>Hormones de croissances</b>	
2-4D	2.5ml
<b>Vitamine</b>	
Vitamine morel	1ml
<b>Agent de solidification</b>	
Agarose	20g
<b>pH=5.7</b>	



## Annexe 5

**Tableau 7:** Solution de rinçage de saccharose 21%

Produits	Concentrations
Saccharose	210g
Eau distillée	1000ml

**Tableau 8:** CPW (Frearson et *al.*, 1973)

Produits	Concentrations
Stock A :	
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1360 mg
KNO <sub>3</sub>	5050 mg
MgSO <sub>4</sub>	12300 mg
KI	8 mg
CuSO <sub>4</sub>	2.5 mg
Stock B :	
CaCl <sub>2</sub>	148 g

**Tableau 9:** Solution de rinçage CPW Mannitol NaCl pour 1l.

Produits	Concentrations
Stock A	10ml
Stock B	10ml
Mannitol	45.5g
NaCl	7.3g
<b>pH = 5.7-5.8</b>	

**Tableau 10:** Solution de rinçage et de fusion mannitol-CaCl<sub>2</sub> dans 500 ml d'eau distillé.

Produits	Concentrations
Mannitol	45.5g
CaCl <sub>2</sub>	37mg

## Annexe 6

1/ Etude de l'influence des cultivars sur les paramètres (Nombre de souches 6mois et nombre de souches finales 10mois)

### Test ANOVA

ANOVA à 1 facteur

		Somme des carrés	DDL	Moyenne des carrés	F	Signification
Nombre de souches (6mois)	Inter-groupes	2479,000	2	1239,500	1,737	0,200
	Intra-groupes	14988,625	21	713,744		
	Total	17467,625	23			
Nombre de souches finales (10mois)	Inter-groupes	18581,333	2	9290,667	5,632	0,011
	Intra-groupes	34642,500	21	1649,643		
	Total	53223,833	23			

En jaune, représente les valeurs d'une variance significative ( $p < 0,05$ )

### Test de Tukey (post hoc)

Comparaisons multiples							
Test de Tukey							
Variable dépendante	(I) Cultivar	(J) Cultivar	Différence de moyennes (I-J)	Erreur standard	Signification	Intervalle de confiance à 95%	
						Borne inférieure	Borne supérieure
Nombre de souches (6mois)	DN	TKB	-24,250	13,358	0,189	-57,92	9,42
		TGZ	-7,250	13,358	0,851	-40,92	26,42
	TKB	DN	24,250	13,358	0,189	-9,42	57,92
		Teg	17,000	13,358	0,426	-16,67	50,67
	Teg	DN	7,250	13,358	0,851	-26,42	40,92
		TKB	-17,000	13,358	0,426	-50,67	16,67
Nombre de souches finales (10mois)	DN	TKB	-38,000	20,308	0,172	-89,19	13,19
		TGZ	30,000	20,308	0,322	-21,19	81,19
	TKB	DN	38,000	20,308	0,172	-13,19	89,19
		TGZ	68,000*	20,308	0,008	16,81	119,19
	TGZ	DN	-30,000	20,308	0,322	-81,19	21,19
		TKB	-68,000*	20,308	0,008	-119,19	-16,81

\*. La différence moyenne est significative au niveau 0.05.

## 1.1. Nombre de souches finales (10 mois)

Nombre de souches finales (10mois)

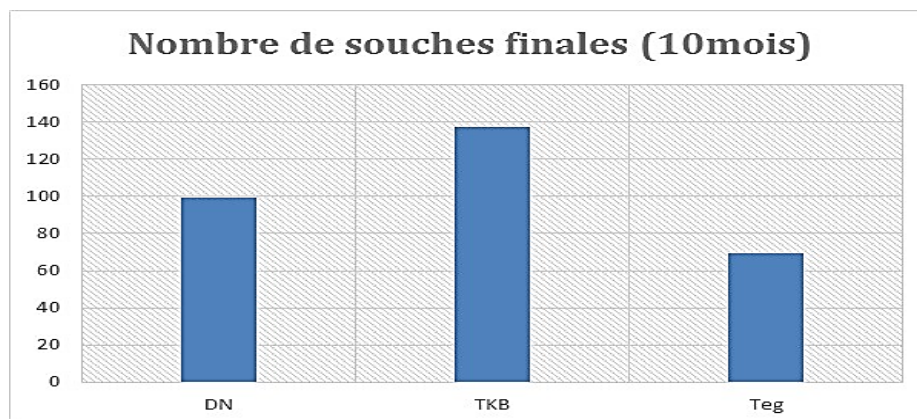
Test de Tukey

Cultivar	N	Sous-ensemble pour alpha = 0.05	
		1	2
Teg	8	69,25	
DN	8	99,25	99,25
TKB	8		137,25
Signification		,322	,172

Les moyennes des groupes des sous-ensembles homogènes sont affichées.

a. Utilise la taille d'échantillon de la moyenne harmonique = 8,000.

- Ici on note que le cultivar Teg et DN appartiennent au même sous-ensemble (le sous-ensemble 1).
- Le cultivar DN et TKB appartiennent au même sous-ensemble (le sous-ensemble 2)

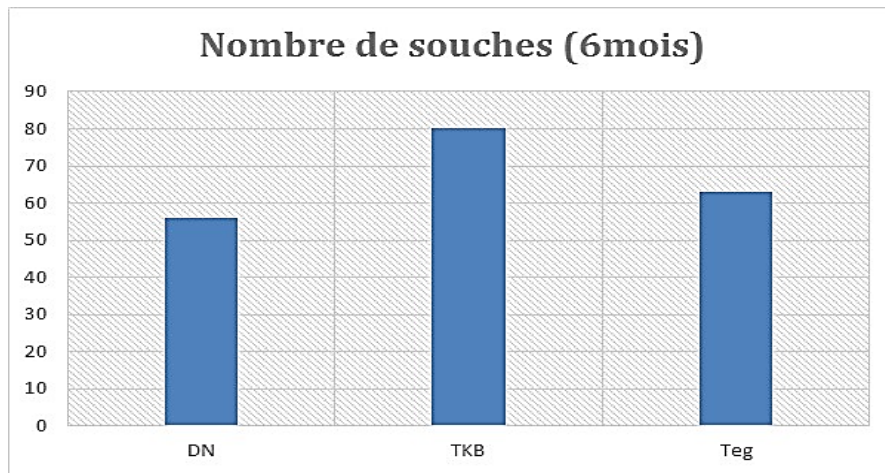


\* : Sous-ensemble 1

\*\* : Sous-ensemble 2

## 1.2. Nombre de souches après 6 mois

Comme dit plus haut, le cultivar n'a pas un effet significatif sur le nombre de souches (6mois)  $p = 0,2$  ( $> 0,05$ ) donc, on obtient un seul groupe homogène (statistiquement parlant).



2/ Etude de l'influence des milieux de cultures sur les paramètres (nombre de souches après 6 mois de culture et nombre de souches finales après 10 mois de culture)

Test d'échantillons indépendants

		Test de Levene sur l'égalité des variances		Test-t pour égalité des moyennes						
		F	Sig.	T	DDL	Sig. (bilatérale)	Différence moyenne	Différence écart-type	Intervalle de confiance 95% de la différence	
									Inférieure	Supérieure
Nombre de souches (6mois)	Hypothèse de variances égales	,526	,480	-1,749	14	<b>0,102</b>	-24,250	13,861	-53,980	5,480
	Hypothèse de variances inégales			-1,749	12,678	<b>0,104</b>	-24,250	13,861	-54,273	5,773
Nombre de souches finales (10mois)	Hypothèse de variances égales	6,200	,026	-1,607	14	<b>0,130</b>	-38,000	23,641	-88,704	12,704
	Hypothèse de variances inégales			-1,607	10,865	<b>0,137</b>	-38,000	23,641	-90,111	14,111
Poids après 9 semaines	Hypothèse de variances égales	,307	,589	1,913	14	<b>0,076</b>	1,1662500	,6096579	-,1413362	2,4738362
	Hypothèse de variances inégales			1,913	13,960	<b>0,076</b>	1,1662500	,6096579	-,1416853	2,4741853