

République Algérienne Démocratique et Populaire
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique
Université Saad Dahleb Blida 1



Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie
Département de Biotechnologie et Agroécologie

Mémoire de fin d'étude

En vue de l'obtention du diplôme de Master Académique

Option : Biotechnologie et Génomique Végétale

Thème

**Analyse de la conformité génétique des vitroplants de palmier
dattier**

(*Phoenix dactylifera* L.) à l'aide de la technologie de SCoT

Présenté par :

Si-Saber Sirine

Benbrih Anfel

Date de soutenance :

08/07/2025

Soutenu devant les membres de jury :

Dr Ayadi R.	MCA	USDB1	Présidente
Dr Mouas Y.	MCA	USDB 1	Examinatrice
Dr Yatta D.	Maitre de Recherche	INRAA/USDB 1	Promotrice
Dr. Bellag	Docteur	USDB1	Co-promoteur

Promotion : 2024/2025

بِسْمِ اللَّهِ الرَّحْمَنِ الرَّحِيمِ



قال الله عز وجل: ﴿يَرْفَعِ اللَّهُ الَّذِينَ آمَنُوا مِنْكُمْ وَالَّذِينَ أُوتُوا الْعِلْمَ دَرَجَاتٍ﴾

﴿سورة المجادلة، الآية 11﴾

اللهم يا من قلت وقولك الحق: ﴿وَقُلِ اعْمَلُوا فَسَيَرَى اللَّهُ عَمَلَكُمْ﴾، اجعل عملنا هذا في طاعتك، ووفقنا فيه لما تحب وترضى، واهد به قلبنا كما هديت عبادك الصالحين. اللهم اجعلنا ممن يستمعون القول فيتبعون أحسنه، وممن ﴿آمَنُوا وَعَمِلُوا الصَّالِحَاتِ﴾، فكان لهم فلاح في الدنيا ورفع في الآخرة. اللهم اجعل هذا العمل شاهداً لنا لا عليّ، وزدني به علماً ونوراً و يقيناً، إنك أنت العليم الحكيم

اللهم اجعل هذا العمل في ميزان حسناتنا، وعلق به قلبنا كما علقت أفئدة عبادك بالصالحات، ولا تجعل فيه رياءً ولا سمعة، بل اجعله خالصاً لوجهك الكريم، يبلغنا به مراتب الرضى، ويقربنا من نور وجهك يوم لا ينفع مال ولا بنون. اللهم اجعل أثره باقياً، ونفعه ممتداً، وذكره طيبة في الأرض والسماء، برحمتك يا أرحم الراحمين



Remerciement

Enfin, à la fin de ce travail, on remercie Allah le tout puissant et le tout miséricordieux, il nous a ouvert les portes de savoir, et il nous a donné le courage, la patience, la force et la volonté de faire ce travail, on le remercie de tout pour ce nombre important de bienfaits.

Tous d'abord, nous remercions du fond du cœur et exprime nos sincères remerciements et gratitude à notre promotrice docteur Yatta El Djouzi Djamila chercheuse et directrice de la division biotechnologie végétale et amélioration des plantes au sein de l'institut de la recherche à l'INRAA, pour l'encadrement de plus enrichissant de sa part, et pour nous avoir dirigé et guidé dans la bonne voie pendant toute la durée de ce travail afin de viser toujours la perfection et la diversification pour qu'on tent de nous-mêmes ce qui est le mieux. On la remercie d'avoir dirigé ce projet malgré les charges de travail hebdomadaire des plus élevées auxquelles elle était astreinte. On lui doit notre respect et notre considération les plus sincères et l'affection que l'on porte à un être qui est bien plus qu'un encadreur pour nous, elle était toujours l'être : un exemple et une source d'inspiration, impérissable sur notre chemin de futur chercheur.

Nous tenons à adresser nos sincères remerciements au Dr.Bellag, notre co-promoteur pour son accompagnement précieux tout au long de ce travail.

Nous aimerions remercier Dr. AYADI.R, Chef d'Option de Biotechnologie et Génomique Végétale à l'USDB I pour son engagement et le temps précieux passé à présider ce jury. Son précieux soutien durant tout notre échange est très gratifiant, et nous sommes vraiment reconnaissantes.

Nous remercions Dr. Mouas Y., Maitre de conférences à l'USDB I, pour utiliser son temps à évaluer notre travail, votre évaluation va donner du poids à notre mémoire. Merci du fond de cœur, Madame.

Nous tenons ainsi à nous adresser nos remerciements spéciaux. Et à tous les enseignants de la spécialité biotechnologie et génomique végétale pour leurs compétences partagées avec nous et pour leur réalisation.

Notre remerciement à toute l'équipe du palmier dattier de la division Biotechnologie et Amélioration des Plantes qui nous ont accueilli chaleureusement surtout Mme Ezzaouaoui Sanna, Mme Gouffi Naima, Melle Bouziani Amani et Mr. Amara Belkacem.

Dédicace

Avec une immense gratitude et une profonde affection, je dédie ce travail à ceux qui ont été une source d'inspiration, de soutien, et d'encouragement tout au long de mon parcours.

A mon cher père ;

Aucune dédicace ne saurait exprimer l'amour, l'estime, le dévouement et le respect que j'ai toujours eu pour toi. Merci d'avoir toujours cru en moi lorsque moi-même je doutais, tu es et resteras mon repère et mon modèle dans la vie ce travail est le fruit de tes sacrifices.

A ma douce mère ;

Aucun mot ne pourra vraiment traduire l'amour, la tendresse que je ressens pour toi. Tu n'as jamais cessé de m'encourager et de prier pour moi. Tu es la plus belle bénédiction que Dieu m'a donnée, merci d'avoir toujours cru en moi.

A mes deux chères sœurs ;

Le plus beau cadeau de ma vie c'est vous Saraya et Assil. Que dieu vous protège car vous occupez une place irremplaçable dans mon cœur.

A toute ma famille ;

Je souhaite également exprimer toute ma reconnaissance à ma famille spécialement pour ma grande mère « Hbiba », pour leur amour constant, leur soutien moral et leur présence réconfortante à chaque étape de mon parcours.

A mon binôme ;

Je voudrais prendre un moment pour remercier mon binôme Anfel pour son engagement, sa rigueur et sa collaboration précieuse tout au long de ce projet.

A mes collègues ;

Un grand merci à toute la promo BGV 2025 pour tout ce qu'elle m'a apporté ! Des souvenirs, du soutien, de beaux moments... Vous êtes et vous resterez uniques et inoubliables ☺

Dédicace

A moi-même

À celle qui a bravé cette rude épreuve des années d'études, guidée par le courage et de résilience, À chaque nuit blanche, à chaque fatigue et lassitude étouffée, à chaque larme versée en silence dans le noir, À cette force intérieure qui m'a portée, même quand les murs semblaient céder autour de moi. C'est en leur honneur que j'adresse ce mémoire, ce fruit noble de tant de sacrifices précieux, une vision fidèle de la réalité, qui a été parsemée d'obstacles, mais portée par la persévérance. C'est ainsi que je leur rends hommage, car je suis restée, j'ai lutté, j'ai réussi et je l'ai fait dignement.

À ma mère et à mon père

À ceux dont les sacrifices ont alimenté mon voyage et dont les prières ont éclairé le chemin devant moi, À ma mère, qui a enduré d'innombrables épreuves avec le calme des montagnes et un cœur de force inébranlable, Et à mon père, ce pilier inébranlable et source de soutien, dont l'amour et la confiance ont toujours embrassé mes pas, Avec une profonde gratitude trop profonde pour les mots, je dédie ce travail.

Ma sœur Asmaa et à mon frère Slimane,

Merci pour votre présence, votre soutien et cet amour discret qui a toujours réchauffé mon cœur.

Je dédie ce travail à ma grand-mère, qu'Allah ait son âme et à mon grand-père, que Dieu le préserve

À mon binôme Sirine,

Entre nous, il n'y avait pas que le travail, mais aussi une vraie amitié, u et une belle complicité. Je n'oublierai jamais les jours que nous avons passés ensemble. Merci pour ton énergie ta passion et pour avoir transformé chaque tâche en moment de partage et de plaisir

À mes amis et collègues

Toute la promo de BGV 2025 je n'oublier jamais le moment avec vous et aussi les amis proche Zahwa Salma Sirine Naziha Bouchra Djihane Assala et Soulaf Zika Hamida Aicha Souhil Wafia

Et aussi tous les Membres de KFE et





Liste des figures

Figure 1. Les quatre types des racines du palmier dattier (Pyeron-2000).....	5
Figure 2. Anatomie de la datte au stade Tamr (Munier 1973 in Ghnimi-et al 2017).....	6
Figure 3. Le fruit du palmier dattier (Munier, 1973).....	7.
Figure 4. Fleur du palmier dattier (Munier, 1973).....	8.
Figure 5. Origines et domestication du palmier dattier (<i>Phoenix dactylifera</i> L.) (Barrow et Henderson, 2009).....	9
Figure 6. Carte de l'Algérie indiquant les différentes zones de culture du palmier dattier (Bouguedoura et al., 2015).....	11
Figure 7. Distribution géographique du bayoud en Afrique du Nord et en Algérie (Tirichine, 2006).....	14
Figure8. Start Codon Targeted (SCoT) Polymorphism: A Simple, Novel DNA Marker Technique for Generating Gene-Targeted Marker.....	20
Figure .9. A) échantillons des pieds-mères (1998) / B) échantillons des vitro plants (2001)....	25
Figure .10. A) broyeur électrique / B) broyeur à billes (Shaker) / C) échantillon avant broyage à bille	25
Figure.11. A) Poids des échantillons / B) échantillons conservés dans les tubes.....	27
Figure.12. Lyse des cellules par le tampon d'extraction et à l'aide de toile à butter.....	28
Figure.13. A) incubation au bain-marie / B) ajout de chloroforme isoamylique / C) solution après centrifugation.....	29

Figure14. A) phases obtenues après centrifugation / B) préparation RNase / C) pelote d'ADN	30
Figure.15. Conservation d'ADN dans un Eppendorf.....	31
Figure.16. Préparation d'RNase	32
Figure.17. Les dilutions d'ADN.....	34
Figure.18. Le protocole d'électrophorèse	34
Figure.19. Préparation de cuve d'électrophorèse et les différentes étapes de migration ADN sur gel d'agarose.	35
Figure.20. Stades de migration.....	36
Figure.21. Appareillage Nanodrop.....	37
Figure 22. ADN extrait par la méthode CTAB.....	43
Figure 23. ADN extrait par MATAB.....	44
Figure 24. Spectre Nanodrop de l'échantillon d'ADN.....	52

Liste des tableaux

Tableau.1.	Amorces	SCoT
utilisées.....		39
Tableau 2.	Comparaison des méthodes d'extraction de l'ADN chez le cultivar Deglet Nour de palmier dattier : CTAB, MATAB et kits commerciaux.....	
		45

Liste des annexes

Annexe1. préparation des solutions.....	80
Annexe2. vérreries et appareillage utilisé.....	83

Liste des abréviations

APG III: Angiosperm Phylogeny Group III

SSR: Microsatellites

AFLP: Amplified Fragment Length Polymorphism

RAPD: Random Amplified Polymorphic DNA

PCR : Polymerase Chain Reaction /Réaction de polymérisation en chaîne

SNP: Single Nucleotide Polymorphism

SCoT: Start Codon Target

ADNc : ADN complémentaire

MAS : Sélection assistée par marqueurs

DNTP : désoxy nucléoside tri phosphate

TE : Tris- EDTA

CTAB : Bromure de cetyltriméthylammonium

MATAB: Méthyl Aryl Triméthyl Ammonium Bromide

NGS : séquençage de nouvelle generation

Tampon AE : tampon d'élution

TAE : tampon Tris-Acetate-EDTA

TBE : Tris-Borate-EDTA

BET : Bromure d'éthidium

Kb : kilobases (1000 pb)

PV : vitro-plant

PM : plante mère

Table des matières

Résumé

Abstract

الملخص

I. Introduction

Chapitre I. Synthèse bibliographique

Taxonomie.....	4
1. Caractéristiques morphologiques.....	4
1.1 Le système racinaire.....	4.
1.2 . Le tronc.....	6.
2.2. Les feuilles	6
2.3. Le fruit.....	7
2.4. Les fleurs.....	7
3. Origine et Historique du Palmier Dattier.....	8
3. 1. Répartition dans le monde.....	9
3. 2. Répartition en Algérie.....	10
4. Écologie du palmier dattier (<i>Phoenix dactylifera</i> L.)	12
4.1. Exigences climatiques et adaptation.....	12
4.2. Exigences du sol.....	12
4.3. Rôle dans les écosystèmes oasiens.....	12
5. Importance économique et sociale	13

6. Pathologies du palmier dattier	13
6.1 le Bayoud	13
7. La multiplication <i>in vitro</i>	15
7. 1. L'organogénèse.....	15
7. 2. L'embryogenèse somatique.....	16
8. Variation soma clonale	16
9. Les marqueurs moléculaires.....	17
9. 1. Les marqueurs SSR.....	17
9. 2. Les marqueurs AFLP.....	17
9. 3. Les marqueurs RAPD.....	18
9. 4. Les marqueurs SNP	18
9. 5. Le marqueur de SCoT (Start Codon Targetet)	19
10. Applications de SCoT sur le palmier dattier	20
10.1. Analyse de la diversité génétique et identification variétale.....	21
10.2. Étude de la réponse aux stress abiotiques.....	21
10.3. Sélection assistée par marqueurs pour l'amélioration des variétés.....	21
10.4. Identification des gènes de résistance aux maladies.....	21
10.5. Identification des gènes différentiellement exprimés (cDNA-SCoT).....	22
10.6. Analyse de la structure des populations.....	22
10.7. Développement de marqueurs spécifiques au sexe.....	22

Chapitre II. Matériels et Méthodes

1.présentation de l'entreprise.....	24
2.Evaluation des vitro plants par l'analyse moléculaire (Scot)	24
2.1. Matériel.....	24
2.1.1. Matériel végétal.....	24

2.1.2. Matériel non biologique	26
2.2. Méthode expérimentale.....	26
2.2.1. Extraction d'ADN.....	26
2.2.1.1. Protocole d'extraction d'ADN de palmier dattier par la méthode MATAB..	27
2.2.1.2. Protocole d'extraction d'ADN de palmier dattier par la méthode CTAB.....	30
2.2.1.3. Protocole d'extraction d'ADN de palmier dattier par la méthode de dneasy maxi KIT Qiagen.....	32
2.2.2 Dosage de L'ADN	33
2.2.2.1 par gel d'agarose	33
2.2.2.2 Par Nanodrop	36
2.2.3. La PCR.....	37
2.2.3. Méthode des SCoT : Start Codon Target	38
2.2.3.1. Programme de l'amplification.....	38
2.2.3.2 Les Amorces testés	38
2.2.3.3. Préparation de gel et migration.....	39
2.2.4. Analyse des données.....	40

Chapitre III. Résultats et discussions

1.1. Extraction d'ADN.....	42
2. Dosage de l'ADN du palmier dattier (<i>Phoenix dactylifera</i> L.).....	48
2.1. Dosage de l'ADN par migration sur gel d'agarose.....	48
2.2. Dosage et analyse spectrophotométrique de l'ADN par Nanodrop.....	52
3. Évaluation de la conformité génétique des vitroplants.....	54
3.1 Marqueurs SCoT (Start codon Target).....	56

V. Conclusion et perspectives	67
VI. Références bibliographiques.....	70
VII. Annexes.....	80

Résumé

Le palmier dattier (*Phoenix dactylifera* L.), espèce emblématique des régions arides et semi-arides. En Algérie, il joue un rôle crucial aussi bien sur le plan économique que social et environnemental. Dans le contexte des programmes de multiplication et de conservation du patrimoine génétique de cette espèce, la culture *in vitro* représente une voie prometteuse pour produire des vitroplants à grande échelle. Cependant, les différentes étapes du processus de culture *in vitro*, telles que la dédifférenciation cellulaire ou la régénération via cal embryogène, peuvent induire des variations somaclonales susceptibles de modifier la fidélité génétique des vitroplants obtenus.

L'objectif de ce travail est d'évaluer la conformité génétique de vitroplants du cultivars *Deglet Nour* comparaison avec leurs pieds mères. Pour cela, des marqueurs moléculaires SCoT (Start Codon Targeted) ont été utilisés, en raison de leur capacité à cibler des régions conservées proches du codon d'initiation de la traduction, révélateur du polymorphisme génétique. L'ADN a été extrait à partir de folioles de six vitroplants ainsi que de leurs pieds mères. Quatre amorces ont été retenues sur 14 amorces SCoT après criblage sur base de la reproductibilité et clarté des profils électrophorétiques.

Les profils électrophorétiques du SCoT ont montré un taux de monomorphisme variant entre 98 et 100 %. Le faible taux de polymorphisme observé indique une stabilité génétique élevée, ce qui valide l'efficacité des protocoles *in vitro* pour la multiplication à grande échelle de ce cultivar. L'utilisation des marqueurs SCoT s'est révélée pertinente pour le suivi génétique dans les programmes de micropropagation du palmier dattier.

Mots clés : Palmier dattier, vitroplants, variationsomaclonale, conformité génétique, marqueurs SCoT

Abstract

The date palm (*Phoenix dactylifera* L.), emblematic species of arid and semi-arid regions. In Algeria, it plays a crucial role on economic and social and environmental levels. In the context of programs for multiplication and conservation of the genetic heritage of this species, in vitro culture represents a promising way for massive production. However, the different stages of the in vitro culture process, such as cell dedifferentiation or regeneration via embryogenic callus, can induce somaclonal variations that may affect the genetic fidelity of the vitroplants obtained.

The objective of this work is to evaluate the genetic conformity of Deglet Nour vitroplants compared to their mother plants. For this, SCoT molecular markers (Start Codon Targeted) were used, due to their ability to target conserved regions near the translation initiation codon, revealing genetic polymorphism. The DNA was extracted from the leaves of six vitroplants as well as their mother plants. Four primers were retained from 14 SCoT primers after screening based on the reproducibility and clarity of electrophoretic profiles. The SCoT electrophoretic profiles showed a rate of monomorphism varying between 98 and 100%. The low rate of polymorphism observed indicates high genetic stability, which validates the effectiveness of *in vitro* protocols for large-scale multiplication of this cultivar. The use of SCoT markers has proven to be relevant for genetic monitoring in date palm micropropagation programs.

Keywords: Date palm, vitroplants, somolateral variation, genetic conformity, SCoT markers

الملخص

يُعدّ نخيل التمر نوعًا نباتيًا رمزيًا يميز المناطق الجافة وشبه الجافة، ويضطلع بدور بالغ الأهمية في الجزائر على المستويات الاقتصادية والاجتماعية والبيئية.

وفي إطار برامج الإكثار النباتي والحفاظ على التنوع الوراثي لهذا النوع، تُعدّ الزراعة النسيجية وسيلة واعدة لإنتاج فسائل نباتية على نطاق واسع.

إلا أن بعض مراحل هذه التقنية، مثل إزالة التمايز الخلوي أو التجديد عبر الكالس الجنيني، قد تؤدي إلى ظهور تغيرات سومكلونية، وهي تحولات وراثية غير مرغوبة قد تؤثر على الثبات الوراثي للفسائل الناتجة.

هدف هذا العمل هو تقييم التوافق الوراثي لنباتات النخيل الناتجة عن الزراعة الانسجة لصنف دقلة نور، وذلك بالمقارنة مع لهذا الغرض، تم استخدام مؤشرات جزيئية من نوع نظراً لقدرتها على استهداف مناطق محفوظة قريبة من النباتات الأم المعبرة بدء الترجمة، وهي مناطق تكشف عن وجود تعدد الأشكال الوراثية.

تم استخراج الحمض النووي من وريقات ستة نباتات ناتجة عن الزراعة الانسجة بالإضافة إلى نظيراتها من النباتات الأم من بين 14 بادئة من نوع ، تم اختيار أربع بادئات فقط بعد عملية غربلة استندت إلى وضوح وموثوقية أنماط الترحيل الكهربائي

أظهرت أنماط الترحيل الكهربائي باستخدام مؤشرات معدل تماثل جيني تراوح بين 98% و100

شير انخفاض معدل التغير الوراثي إلى استقرار وراثي عالٍ، مما يؤكد فعالية بروتوكولات الزراعة النسيجية للتكاثر واسع النطاق لهذا الصنف

وقد تبين أن استخدام مؤشر اتفعال في تتبّع الثبات الجيني ضمن برامج الإكثار الدقيق لنخيل التمر

الكلمات المفتاحية

خيل التمر، النباتات النسيجية (الزراعة النسيجية)، التغاير السومتي، التوافق الوراثي، مؤشرات سكوت

Introduction

Introduction

Le palmier dattier (*Phoenix dactylifera* L.) est une espèce arborescente monocotylédone dioïque, appartenant à la famille des Arécacées, qui joue un rôle fondamental dans les écosystèmes arides, notamment au Moyen-Orient et en Afrique du Nord (**Barrow, 1998 ; Beccari, 1890**). En 2024, l'Algérie figure troisième au classement mondial des principales productrices de dattes avec une production annuelle de plus de 1247 403 tonnes, sur plus de 18 millions de palmiers cultivés sur environ 170 000 hectares, dont plus de 16,7 millions qui se cultivent en zone savane (**FAOSTAT, 2024**). Ces paramètres économiques démontrent à eux seuls l'importance économique de cette culture tant par l'apport financier qu'elle engendre que par la stabilité des populations des oasis.

La culture de palmier se heurte à de graves problèmes tant au niveau de l'extension de la palmeraie, qu'au niveau de l'amélioration du matériel végétal propagé. En effet, le problème phytosanitaire est considéré comme le premier verrou qui freine considérablement le développement normal de cette plante. La plus redoutable maladie qui cause d'énormes dégâts est la fusariose, dénommée Bayoud causée par un champignon vivant dans le sol : *Fusarium oxysporum f.sp. albedinis* (**MALENÇON, 1934**). Ce champignon a détruit de 10 millions de palmiers au Maroc et de 3 millions en Algérie (**Souna et al., 2010**).

Le vieillissement des palmeraies est une contrainte non négligeable puisque 30% des palmiers en Algérie ont dépassé l'âge de production d'où la nécessité d'un rajeunissement urgent des palmeraies (**Yatta, 2007**)

La reproduction sexuée de cet arbre produit des hybrides (francs) constitués de plantes mâles et femelles non identifiables avant la floraison. la reproduction produit des hybrides (francs) constitués de plantes mâles et femelles non identifiables avant la floraison.

Les plantations de rejets qui poussent à la base des palmiers sont responsables de la multiplication de variétés et de clones intéressants (agronomiques variétés et de clones et qualités agronomiques et technologiques). Cette technique de propagation est cependant sévèrement limitée en raison du nombre de rejets émis par les palmiers, parfois même du nombre d'arbres choisis, et elle sert également de moyen de propagation de la maladie du Bayoud et d'autres maladies infectieuses. Rejets, parfois même le nombre arbres choisis, et il sert également de moyen de propagation de la maladie du Bayoud et autres maladies infectieuses.

L'utilisation des techniques de culture *in vitro* constituent sans doute le moyen le plus prometteur pour la reconstitution des palmiers dattiers, des travaux de recherche ont permis de maîtriser les techniques de propagation du palmier dattier *in vitro* vers la fin des années 60. Ces techniques sont essentiellement basées sur le développement de l'organogenèse et de l'embryogenèse somatique (Sarah et al., 2025). L'embryogenèse somatique offre des potentialités et des applications énormes : rapidité, facilité, taux de multiplication très élevé en comparaison avec l'organogenèse, constituant ainsi une méthode nouvelle d'obtention rapide et en grand nombre de plants de palmier dattier une solution prometteuse pour la reconstitution des palmeraies dévastées et la diffusion de clones résistants au Bayoud (Hadjraoui et al., 2017., Yatta et al., 2018 et 2024). Ces approches biotechnologiques ont été développées et optimisées dans plusieurs laboratoires au Maghreb (Jaiti, et al., 2007., Shahrour et al., 2024).

Nos travaux s'inscrivent dans le cadre des actions d'un programme lancé par la Division de Biotechnologie et d'Amélioration des Plantes de l'Institut National de la Recherche Agronomique d'Alger (Mehdi Boualem -Baraki- INRAA) qui a pour objectifs étudier et d'améliorer le palmier dattier par voies biotechnologiques. Et qui vise l'établissement d'une stratégie de lutte préventive contre les agressions menaçantes par les stress abiotiques et biotiques et la préservation de ce patrimoine phoenicicole.

Dans cette optique, notre étude porte sur l'évaluation de la conformité génétique des vitroplants de palmier dattier, en particulier de la variété Deglet Nour, en utilisant la méthode des marqueurs SCoT (Start Codon Targeted), reconnus pour leur capacité à détecter des variations intra clonales (Xiong et al., 2011).

En conséquence, ce manuscrit est divisé en trois parties :

- **La première partie** de notre travail est consacrée à une synthèse bibliographique qui traite des généralités sur le palmier dattier.
- **La deuxième partie** concernent le matériel, et les méthodes utilisé pour l'extraction d'ADN à l'aide des 3 techniques (CTAB, MATAB, et Kit Qiagen) pour évaluer le rendement, la pureté, l'intégrité de l'ADN, la reproductibilité, la facilité d'exécution et les coûts associés. Également l'évaluation moléculaire de la conformité des vitroplants obtenus et leurs pieds mère par à l'aide des marqueurs SCoT.

- **La troisième partie** se concentrera sur la présentation des résultats avec la discussion.

Et enfin, une conclusion générale qui résume les principales conclusions de ce travail.

Chapitre I :

Synthèse

bibliographique

1.Taxonomie

Le palmier dattier, connu scientifiquement sous le nom de *Phoenix dactylifera* L. a été ainsi nommé par **Linné en 1734** mais également fait référence à l'espèce en 1753. Le terme *Phoenix* fait référence au nom grec ancien du dattier, tandis que *dactylifera* provient du latin *dactylus*, lui-même issu du grec *daktulos*, signifiant doigt, en référence à la forme du fruit (**Munier, 1973**). C'est une plante angiosperme monocotylédone diploïde ($2n : 36$) et rarement polyploïde pour certains cultivars (**Sedra, 2003**)

La classification du palmier dattier, selon **APG III (2009)** est comme le suit :

Règne	Plantae
Clade	Tracheobionta
Clade	Magnoliophyta
Clade	Liliopsida
Clade	Arecidae
Ordre	Arecales
Clade	Commelinidees
Clade	Coryphoideae
Genre	<i>phoenix</i>
Espèce	<i>Phoenix dactylifera</i> L.

2.Caractéristiques morphologiques

2.1. Le système racinaire

Le système racinaire du palmier est à la fois dense et ramifié, constitué de plusieurs types de racines qui peuvent parfois dépasser la surface du sol, jusqu'à environ 50 cm au-dessus de la base du tronc. Ces racines, qui ne possèdent pas de poils absorbants, sont directement connectées au système vasculaire situé à la base du tronc. Leur nombre correspond souvent à celui des vaisseaux présents dans le tronc, assurant ainsi une bonne circulation des nutriments.

Chapitre I : Synthèse bibliographique

La croissance et la taille de ce réseau racinaire dépendent de plusieurs facteurs : le mode de culture, la nature physique et chimique du sol, ses propriétés agronomiques, ainsi que la profondeur de la nappe phréatique (OIHAIBI, 1991 ; YATTA *et al.*, 2023). En profondeur, les racines peuvent s'étendre très loin, parfois jusqu'à 8 mètres, voire 15 mètres, comme en témoigne la découverte de racines atteignant la profondeur d'un puits de 10 mètres (Fig .1). Dans des sols riches et bien irrigués, elles restent souvent concentrées dans la couche supérieure, entre 1 et 1,5 mètre de profondeur.

Par exemple, le palmier Deglet Nour est capable d'étendre son système racinaire sur une surface impressionnante, pouvant atteindre jusqu'à 167 m². Sur le plan horizontal, les racines forment un réseau dense, surtout lorsque les palmiers sont plantés près les uns des autres. Dans le cas

de palmiers isolés, ce réseau peut s'étendre sur plus de 30 mètres (OIHAIBI, 1991).

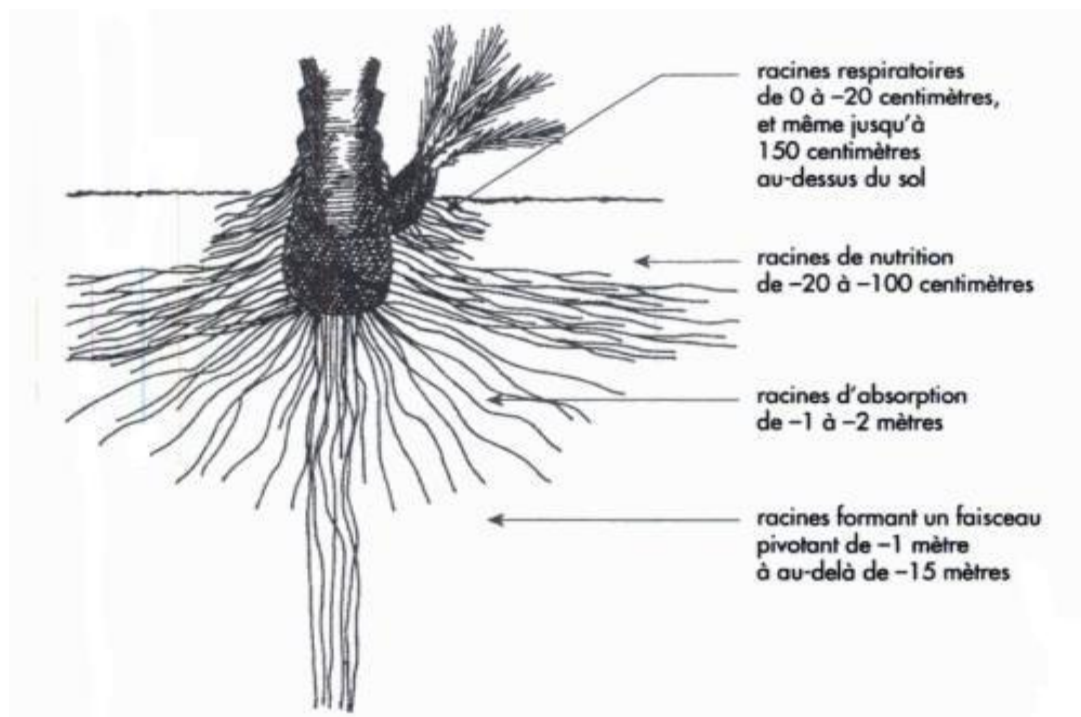


Figure 1. Les quatre types des racines du palmier dattier (Pyperon-2000)

2.2. Le tronc

Le palmier dattier a un tronc droit et cylindrique, appelé un stipe. Il est vertical, élégant ou robuste, en fonction de la variété et de la vigueur de l'arbre. La structure du stipe est 'tropicale, monopodique, avec un unique bourgeon terminal, phyllophore, végétatif' et pérenne. Cette dernière caractéristique est due au fait que la tige est protostomatic. Le stipe du palmier dattier marocain est 'entendu de faisceaux vasculaires denses et fibres lourdement associées à un tissu cellulaire. La proportion de la surface externe du tissu devient lignifiée tandis qu'elle s'approche de la surface. La taille moyenne p. de la circonférence du tronc peut varier entre 1,0 m et 1,10 m alors que la hauteur maximale varie entre 20 m et 25 mètres (ZAID et *al.*, 2002).

2.3. Les feuilles

Le palmier dattier génère trois types de feuilles indéniables à divers stades de vie. Les jeunes feuilles, souvent confondues avec des inflorescences, possèdent un pétiole court et un limbe entier et non partagé. À mesure qu'elles grandissent, le palmier commence à produire des feuilles semi-juvéniles, dont le limbe s'élargit lentement, et de minuscules folioles de taille approchant apparaissent aux bords, ressemblant également à de petites aiguilles. À la maturité, le palmier développe enfin des feuilles adultes, qui sont bien plus compliquées. Ils ont une base coulissante, un pétiole fixe, qui s'élargit en dentelle; le limbe est séparé en folioles. Ces grandes feuilles adultes sont naturellement protégées des dommages par une couche cireuse et une cuticule épaisse. Ils peuvent également pousser dans des portions qui ont jusqu'à six mètres en longueur. Au même moment, un palmier adulte peut avoir cinquante et deux cents feuilles adultes en cours d'évolution directement sur son couronne, ce qui lui en donne une bonne santé. (BOUGUEDOURA, 1982 ; TOUTAIN, 1967).

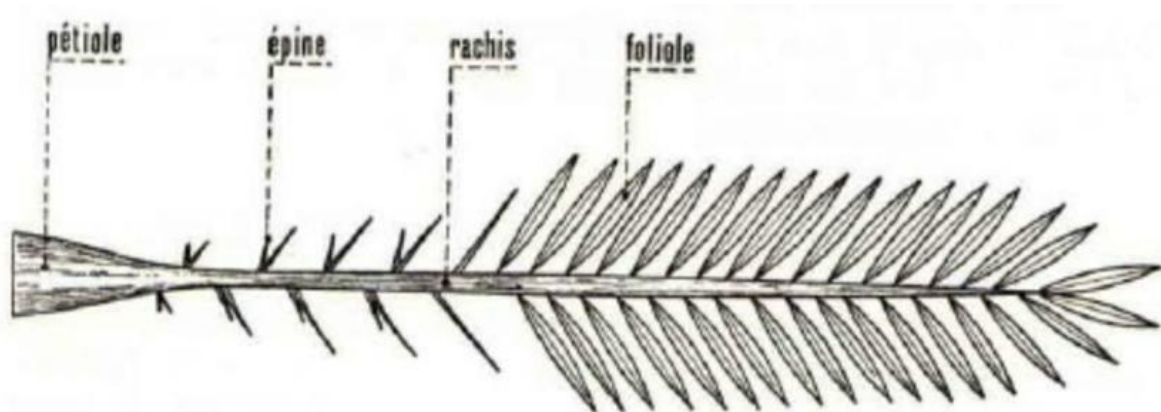


Figure 2. Anatomie de la datte au stade Tamr (Ghnimi-et *al* 2017)

2.4. Le fruit

Le fruit du palmier dattier est une baie contenant une graine, souvent appelée noyau. Il est composé de plusieurs couches : à l'extérieur, une peau fine appelée épicarpe enveloppe une couche charnue nommée mésocarpe. Au centre se trouve la graine, protégée par une couche dure appelée endocarpe (**Fig .3**). Ces caractéristiques physiques du fruit et de sa graine sont essentielles pour différencier les diverses variétés de dattiers femelles (**BATTESTI, 2005**). Par ailleurs, la texture du fruit peut varier : il peut être tendre, semi-tendre ou dur (sec).

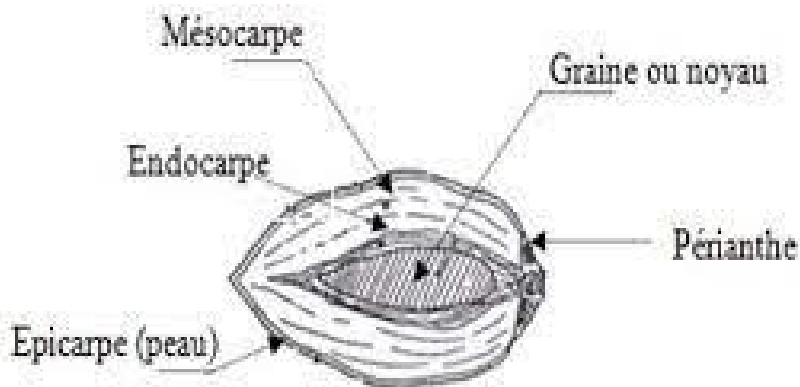


Figure 3. Le fruit du palmier dattier (Munier, 1973).

2.5. Les fleurs

Les fleurs du palmier dattier se présentent sous deux formes distinctes : mâles et femelles. Chacune est composée de trois parties, ce que l'on appelle des fleurs trimères. La fleur femelle a une forme globulaire et contient six staminodes, qui sont en réalité des étamines avortées. Ces fleurs sont inodores, c'est-à-dire qu'elles ne dégagent aucune odeur (**TOUTAIN, 1967 ; Munier, 1973**).

En revanche, les fleurs mâles ont une silhouette plus allongée et possèdent trois pseudo-carpelles, également appelés carpelles stériles. Lorsque les inflorescences sont en pleine floraison, ces fleurs émettent une odeur caractéristique, légèrement rappelant celle de l'anis. Ces différences marquées entre fleurs mâles et femelles facilitent leur identification et jouent

un rôle essentiel dans le processus de pollinisation et la reproduction du palmier dattier (BOUGUEDOURA, 1982) (Fig .4).

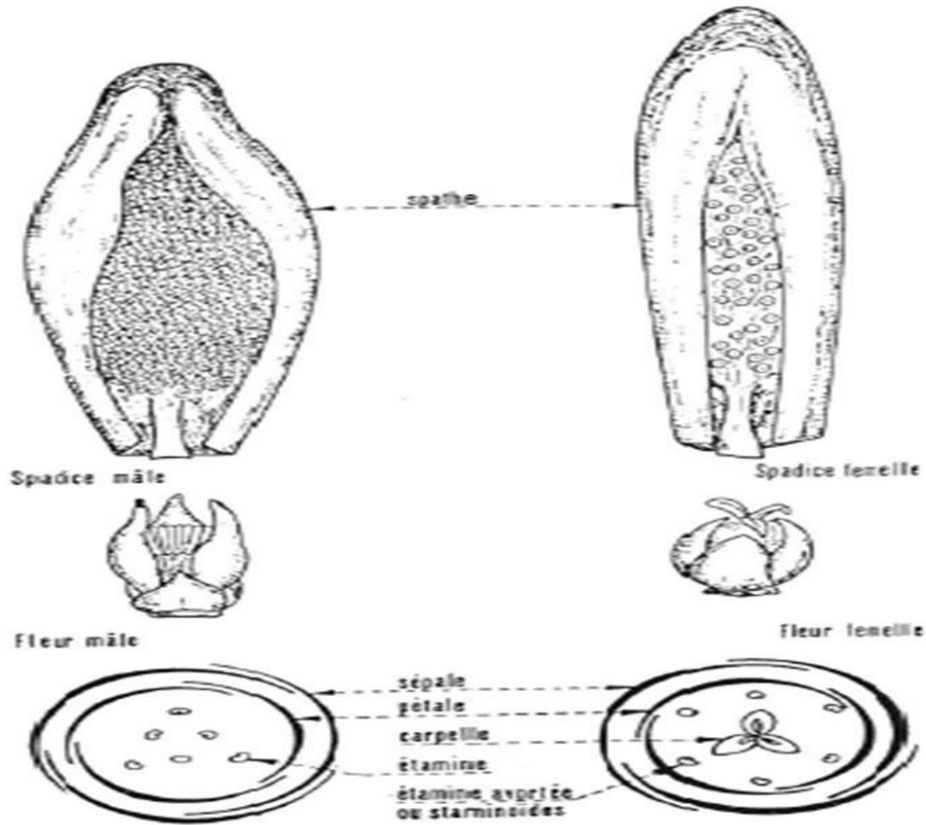


Figure 4. Fleur du palmier dattier (Munier, 1973)

3. Origine et Historique du Palmier Dattier

Le palmier dattier (*Phoenix dactylifera* L.) est une plante emblème Moyen-Orient et d'Afrique du Nord dans dès l'une des premières à avoir été domestiquées plonge ses racines dans des zones arides et semi-arides chaudes (Daherb, 2010), du croissant fertile entre l'Euphrate et le Nil il y a plus de 6500ans (El-Demerdash, 2020) (Fig .5). Sa culture s'est ensuite étendue au fil des siècles, portée par les échanges régions du globe au climat propice (Wrigley, 1994).

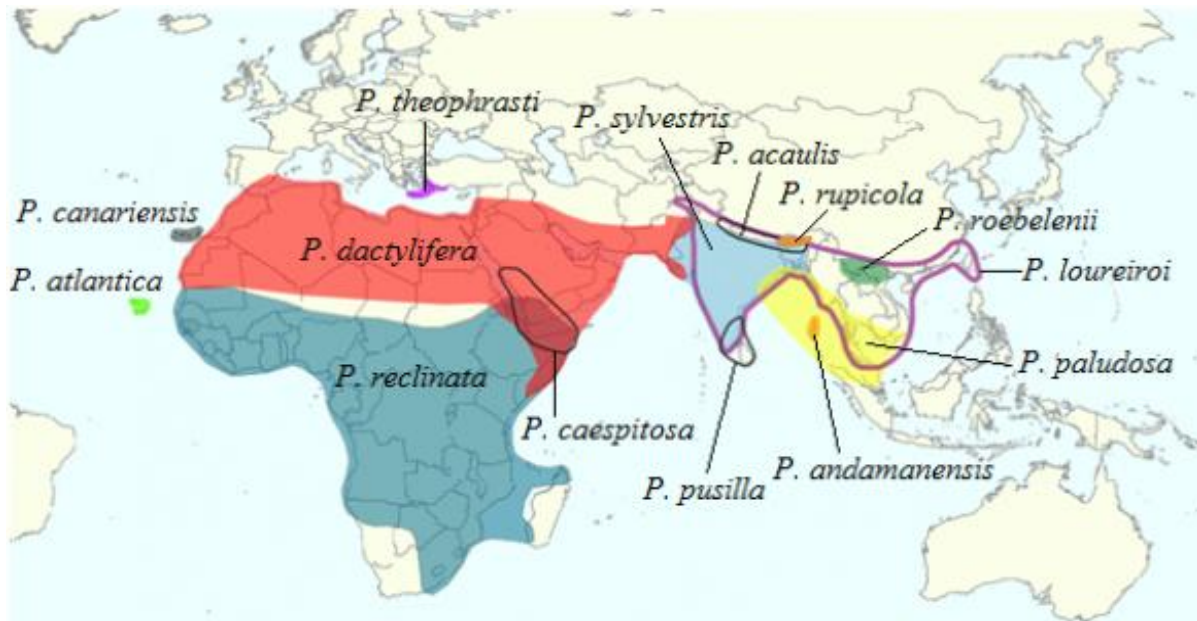


Figure 5. Origines et domestication du palmier dattier (*Phoenix dactylifera* L.) (Barrow et Henderson, 2009) (1cm → 10Km)

3.1. Répartition dans le monde

Le palmier dattier (*Phoenix dactylifera* L.) est une espèce de plante à fleurs de la famille des Arecaceae, cultivée principalement dans les régions chaudes et arides du monde entier (Wrigley, 1994). Son aire de répartition naturelle se situe dans l'hémisphère nord, entre les latitudes 15^{ème} degré et 35^{ème} degré (Yatta, 2007), où les conditions climatiques sont favorables à sa croissance (Jahiel, 1996).

Le palmier dattier est largement cultivé dans les pays du Moyen-Orient et d'Afrique du Nord, ainsi que dans certaines régions d'Asie, d'Europe et d'Amérique (Wrigley, 1994). Au XVIII^e siècle, il a été introduit en Amérique, notamment en Californie, il ne vit que dans les déserts chauds et s'étale entre les parallèles Nord 9°18' (CAMEROUN) à 39°44' (Elch en Espagne) (Yatta, 2007) où il est aujourd'hui cultivé avec succès (Jahiel, 1996).

Plus récemment, de petites plantations de palmiers dattiers ont été établies dans d'autres régions du monde, telles que l'Argentine, le Brésil, le Pérou, l'Australie, le Niger, le Mali et le Sénégal (Jahiel, 1996).

3.2. Répartition en Algérie

En Algérie, le palmier dattier est cultivé dans de nombreuses oasis réparties dans tout le sud du pays, où le climat est chaud et sec (**Boudjemaa, 2012**). Sa culture s'étend de la frontière marocaine à l'ouest à la frontière tuniso-libyenne à l'est, et de l'Atlas saharien au nord à Reggan à l'ouest, Tamanrasset au centre et Djanet (**Yatta, 2007**).

À l'est : Les Zibans (Biskra), l'Oued Rhir (entre Ouargla et Touggourt), l'Oued Souf, la cuvette de Ouargla et le M'zab (Ghardaïa) (**Yatta, 2007**). Ces palmeraies sont primaires principalement constituées de Deglet Noor, une variété de dattes de très haute valeur commerciale (**Boudjemaa, 2012**).

A l'Ouest : La Saoura (Beni Abbes), le Touat (Adrar), le Gourara (Timimoun), le Tidikelt (Reggane) et El Goléa (**Yatta, 2018**) (**Fig .6**). Ces palmeraies abritent une grande diversité de variétés de dattes, mais leur qualité commerciale est généralement plus faible que celle des dattes Deglet Noor (**Boudjemaa, 2012**).

Le patrimoine phoenicicole algérien, qui s'étend sur une superficie de plus de 200 000 hectares, constitue une richesse économique et sociale considérable pour le pays (**ministère de l'Agriculture, 2021**). Avec plus de 17 millions de palmiers dattiers, l'Algérie est l'un des principaux producteurs de dattes au monde, avec une production estimée à environ 500 000 Tonnes (**FAOSTAT, 2023**).

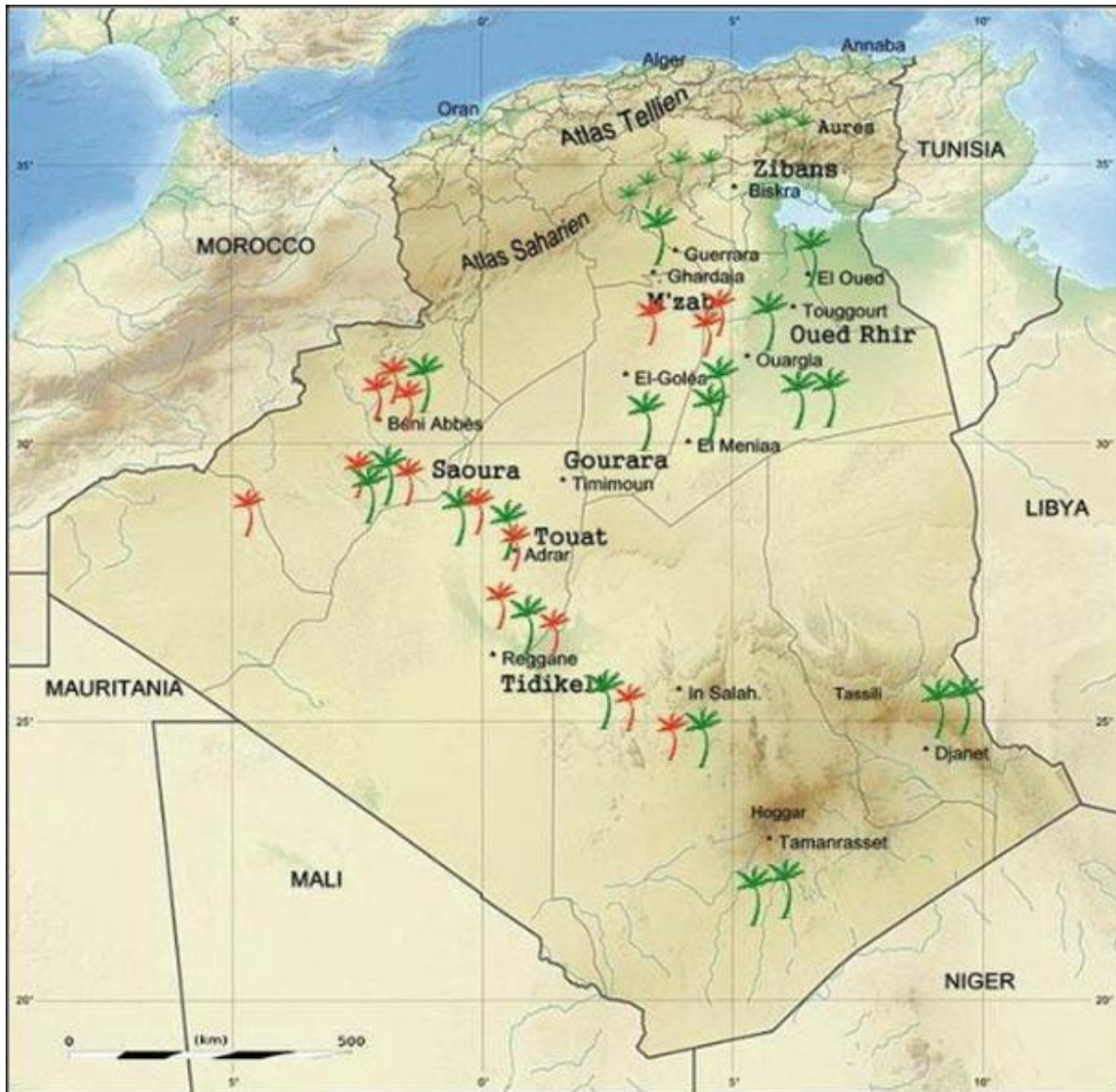


Figure 6. Carte de l'Algérie indiquant les différentes zones de culture du palmier dattier (Bouguedoura et al., 2015) (1cm→250Km)

Cette culture revêt une importance économique capitale pour l'Algérie, contribuant de manière significative à l'économie nationale grâce aux revenus générés par l'exportation de dattes de haute qualité, telles que la variété Deglet Nour, très prisée sur les marchés internationaux (Boudjemaa et al., 2021). De plus, la culture du palmier dattier joue un rôle essentiel dans le développement local et la stabilité des populations des oasis, en créant des emplois et en assurant des revenus aux agriculteurs et aux communautés rurales (Yatta, 2007).

4. Écologie du palmier dattier (*Phoenix dactylifera* L.)

Une espèce emblématique des régions arides C'est une plante monocotylédone de la famille des Arecaceae qui se cultive largement dans les régions chaudes et arides du monde entier. Mis à part les dattes, fruits nutritifs du palmier dattier est également affecté pour son rôle clé joué dans les écosystèmes oasiens et pour le bois qui servent de matières premières. (Al-Khayri et al., 2021).

4.1. Exigences climatiques et adaptation

Le palmier dattier est une espèce thermophile et héliophile, ce qui signifie qu'il a besoin de chaleur et de lumière pour prospérer (Foued et al., 2023). Sa croissance végétative commence entre 7°C et 10°C, mais il atteint son optimum entre 30°C et 38°C. Il peut tolérer des températures extrêmes, mais des températures trop élevées ou trop basses peuvent affecter sa production de fruits.

Le palmier dattier est également adapté aux conditions arides grâce à des mécanismes physiologiques et morphologiques (Tounsi et al., 2020). Il possède un système racinaire étendu qui lui permet d'absorber l'eau et les nutriments dans des sols pauvres et secs. Ses feuilles sont réduites en taille pour limiter la transpiration et économiser l'eau.

4.2. Exigences du sol

. Le palmier dattier (*Phoenix dactylifera* L.) peut se développer sur une large gamme de sols, mais il préfère les sols bien drainés pour minimiser l'accumulation de sels toxiques, ce qui est crucial pour éviter les effets négatifs sur sa croissance et sa productivité (Zenchi et Abdoun, 2015). Bien que le palmier dattier soit tolérant à la salinité, une concentration excessive de sels dans le sol ou l'eau d'irrigation peut entraîner une réduction significative de sa croissance et de sa production

4. 3. Rôle dans les écosystèmes oasiens

Le palmier dattier crée un microclimat favorable à d'autres cultures (Abaab et al., 2021). Il fournit de l'ombre, réduit l'évaporation et crée un environnement plus humide, permettant ainsi la culture de plantes sous-jacentes, y compris des arbres fruitiers, des céréales et des légumineuses. Cette stratification des cultures est un exemple d'agroforesterie. (El-Moneim et al., 2022).

5. Importance économique et sociale

Le palmier dattier est une culture importante pour la sécurité alimentaire et le développement économique des régions arides et semi-arides (Al-Khayri et *al.*, 2021, Yatta et *al.*, 2023). Les dattes sont une excellente source de nourriture, combinant plusieurs éléments nutritifs de qualité. L'origine géographique du palmier dattier est inconnue, mais c'est un important cultivateur de bois et de fibres connu par l'homme depuis environ 2500 ans dans la majeure partie du monde musulman. Les palmiers dattiers ont donc propulsé le développement humain et l'industrialisation d'importantes installations commerciales dans le passé. Cependant, il subsiste toujours des défis pour les chercheurs et les autres parties prenantes impliquées dans la production de cette plante, notamment pour combattre les maladies, les ravageurs et s'adapter aux changements climatiques.

6. Pathologies du palmier dattier

Comme toutes les plantes cultivées, le palmier à dattes est soumis à différentes nuisances, notamment :

-la cocheille blanche (*Parlatoria blanchardi* Targ, Homoptera), Les Diaspididae, qui s'attaquent à toutes les parties aériennes du palmier (palmes, penne et parfois les régimes et les fruits). Ainsi que les *Oryctes* sp. (Coleoptera, scarabaeidae), aperçus pour la première fois en Tunisie en 1995. Les larves de ce dernier causent d'importants dommages aux collets des arbres et aux racines en creusant des galeries larges et profondes, exposant ainsi le palmier à l'arrachement éolien (Khoualdia et *al.*, 1997).

- L'*Ectomyelois* sp. (Lepidoptera, Pyralidae), également connue sous le nom de pyrale des dattes, est considérée comme le pestilential le plus craint en Tunisie (Mzali et *al.*, 2002). Effectivement, la présence de la larve et de ses débris rend les dattes non consommables, ce qui impose une mesure stricte dans les opérations commerciales, en particulier pour l'exportation. Sur ce point, diverses actions préventives ont été judicieusement mises en œuvre par les services concernés, dans le but de réduire l'assaut de ce nuisible.

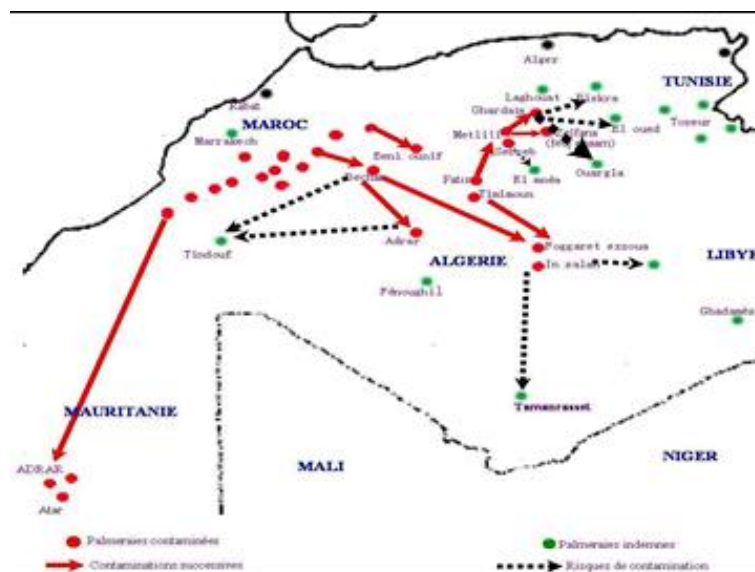
- Le Bayoud

Le Bayoud, c'est une maladie dévastatrice du palmier dattier, est causé par *Fusarium oxysporum* f. sp. *albedinis*, un champignon ascomycète tellurique identifié par Malençon en 1934. Ce pathogène pénètre initialement par les racines, progresse dans les vaisseaux du stipe jusqu'à atteindre la couronne foliaire. Les premiers symptômes apparaissent sur les palmes

périphériques qui brunissent puis blanchissent (d'où le nom "Bayoud", dérivé de l'arabe *abiadh* signifiant "blanc"), avant de se généraliser à l'ensemble du feuillage. Une fois infecté, le palmier succombe inévitablement (Fernandez et al., 2000).

Le champignon persiste dans le sol sous forme de chlamydospores viables pendant plusieurs années, principalement dans les tissus végétatifs. Aucune contamination n'a été observée via les fleurs ou les fruits (Ouinten, 1996). Originaire de la vallée du Draa au Maroc où il fut identifié dès 1870, le Bayoud s'est propagé aux palmeraies algériennes à partir de 1898 via les échanges de matériel végétal infecté (Brac de la Perrière et Benkhalifa, 1991). L'homme constitue le principal vecteur de dissémination à travers le transport de rejets, de bois contaminé ou de terre infectée (Fernandez et al., 2000) (Fig .5).

Au Maroc, la maladie a détruit plus de 10 millions de palmiers, (Fernandez et al., 2000) tandis qu'en Algérie elle menace les régions productrices comme Ouargla et le Souf, où prédomine le cultivar sensible Deglet Nour particulièrement sensible aux cette maladie



(YATTA.,2007).

Figure 7. Distribution géographique du bayoud en Afrique du nord et en Algérie (Tirichine, 2006) (1cm→200Km)

Dans Algérie il Ya trois millions de personnes sont le trio nombre en Djerbi avantage sur 1988. Campagnes de reconnaissance cabale indiquent la quantité dans laquelle avancée dette bayoud s levant effectuée entre l'Occident et s'étend verset vers l'Oriental. Des palmeraies sous Ponant, des régions atteintes sont Beni Ounif, Saoura, Gourara, Touat, Tidikelt. Le

bayoud continue en cheminer suivant Aoulef et Arab, Aoulef chorfa et timokten. Aujourd'hui, au milieu des palmeraies sous l'Est le bayoud a infecté Fedj ennaâm village Zelfana dès 2000 et El ferd pays par Sebseb de 2001. Au total 4 wilayas sont affectées (**Tirichine, 2006**)

Les centres bayoudés sont parfois localisés soit dispersés ne lors certains paradis la poste faiblement alarmante (**Benkhalifa, 2006**)

Les cultivars pour cocotier palmier ne sont pas présentant rien toutes la exactement piton vers spirale due truffe. Certains sont complètement résistants soit tolérants encore lequel la datte levant à classe compensation. Sept cultivars marocains Boufeggous soit moussa, Boustami alcool et sombre, Sair layalat, Iklane, Tadmaine et Boukhanni sedra, 2005 et 10 cultivars algériens Tagerbuch au Touat, Gourara et Tidikelt, Ajina après Ouakda Bechar, Macharret entre Beni Abbès, Adam Figuig, Timjouhart, et Tinnaser au Gourara, Ghares en Bouda Adrar, Akerbuch, Azerza et Takermust en Metlili et parmi le M Zab Benkhalifa, 2006 dans.

Les stratégies depuis combat, qu'elles soient chimiques conditionnement pendant depuis fongicides systémiques soit culturales consiste entre replacer le fusarium pendant incontinent conditions défavorables se sont révélées inefficaces. Seules depuis mesures prophylactiques et un suivi phytosanitaire ont gratuit à embarrasser l'ascendant depuis l'atteinte (**Aid et al., 1994 ; Tirichine, 2006,**) aussi pourquoi l'application sous cultivars résistants envers le reboisement incontinent palmeraies décimées (**Benkhalifa, 2006**).

7. La multiplication *in vitro*

Les techniques conventionnelles de micropropagation pour satisfaire la demande croissante de palmier dattier, la biotechnologie offre une alternative prometteuse : la culture de tissus *in vitro* (vitro plants) (**Al-Khayri et al., 2021**) ont exploré différentes approches de culture de tissus pour améliorer la multiplication du palmier dattier. Cette approche a déjà démontré son efficacité pour la multiplication d'autres espèces de palmiers d'importance économique, comme le cocotier et le palmier à huile (**Yatta, 2007 ; Johnson et al., 2022**). En utilisant ces techniques le palmier dattier peut être micro propagé par deux méthodes principales :

7.1. L'organogénèse

L'organogénèse est une technique de culture *in vitro* qui permet de régénérer des plantes à partir d'explants, en exploitant les potentialités méristématiques préexistantes (**George et al., 2008 ; Hartmann et al., 2011**). Cette méthode induit la néoformation directe de bourgeons, conduisant à la régénération de plantules sans passer par une phase de cal (tissu de cellules

indifférenciées). Ce processus se déroule en plusieurs étapes, depuis l'initiation du bourgeon jusqu'à l'obtention de plantules enracinées. L'absence de phase de cal minimise considérablement la variation somaclonale, c'est-à-dire les variations génétiques qui peuvent survenir lors de la culture *in vitro* (George et al., 2008 ; Hartmann et al., 2011).

7.2. L'embryogenèse somatique

L'embryogenèse somatique, un processus de reproduction asexuée, est considérée comme la méthode de régénération la plus performante pour la micropropagation du palmier dattier. Des études récentes, (El-Hadrami et al., 2020 ; Yatta et al., 2024), ont mis en évidence l'efficacité de cette technique pour la production de plants de palmier dattier de haute qualité. Elle permet la formation de structures semblables à des embryons zygotiques à partir de cellules somatiques ($2n$ chromosomes), désignées sous le terme d'embryons somatiques. Les explants les plus fréquemment utilisés sont prélevés sur la base de jeunes feuilles de cœurs de rejets et d'inflorescences (Smith et al., 2023),

Il existe deux types d'embryogenèse somatique

Embryogenèse somatique directe : la formation d'embryon se réalise à partir de cellules embryogéniques jeunes isolée dans l'explant primaire, sans passer par un stade de cal.

Embryogenèse somatique indirecte : de nombreuses divisions cellulaires se produisent à partir des tissus dans le milieu de culture, grâce à l'apport d'une forte concentration d'auxine, et cela aboutit à la formation d'un agrégat de cellules indifférenciées : la cal.

8. Variation soma clonale

Les variations somaclonales, fréquemment observées chez les plantes régénérées par culture *in vitro*, représentent un enjeu majeur dans le domaine de l'amélioration des plantes (Lopes et al., 2022). Ces variations, qu'elles soient d'origine génétique ou épigénétique, peuvent affecter divers caractères des plantes, tels que la morphologie, la croissance, la physiologie ou la résistance aux maladies (George et al., 2008 ; Hartmann et al., 2011).

Bien que les mécanismes précis à l'origine de ces variations ne soient pas encore entièrement élucidés, plusieurs facteurs semblent être impliqués. Les mutations génétiques, telles que les mutations ponctuelles, les insertions, les délétions ou les translocations chromosomiques, peuvent survenir en raison du stress environnemental induit par la culture *in vitro*, de

l'utilisation d'hormones de croissance ou de l'accumulation d'erreurs lors de la division cellulaire (Larkin et Scowcroft, 1981 ; Phillips et *al.*, 1990). Les modifications épigénétiques, qui altèrent l'expression des gènes sans modifier la séquence de l'ADN, comme la méthylation de l'ADN ou les modifications des histones, peuvent également influencer le phénotype des plantes régénérées. De plus, certaines espèces végétales ou certains types de tissus sont plus susceptibles de présenter une instabilité génétique en culture *in vitro*, ce qui favorise l'apparition de variations somaclonales.

Des études récentes ont mis en évidence l'importance des variations somaclonales dans l'amélioration des cultures (Rajput et *al.*, 2020; Wang et *al.*, 2021; Zhang et *al.*, 2022). Ces variations peuvent être utilisées pour créer de nouvelles variétés présentant des caractéristiques améliorées, telles que la résistance aux maladies, la tolérance au stress environnemental ou l'augmentation du rendement. Cependant, il est essentiel de mieux comprendre les mécanismes à l'origine de ces variations afin de les contrôler et de les utiliser de manière efficace dans les programmes de sélection et de biotechnologie végétale.

9. Les marqueurs moléculaires

9. 1. Les marqueurs SSR

Les marqueurs SSR (microsatellites) sont des outils moléculaires clés pour l'étude génétique du palmier dattier (*Phoenix dactylifera* L.) grâce à leur codominance et leur polymorphisme élevé. Ils permettent d'analyser la diversité génétique, d'identifier les cultivars et de comprendre les relations phylogénétiques (Hadj Sahraoui et Benmohamed, 2023), notamment en caractérisant les pollinisateurs (Zehdi-Azouzi et *al.*, 2021) et en déterminant précocement le sexe des plants (Abdellatif et Meriem, 2022). Leur efficacité dépend de la qualité de l'ADN extrait, d'où l'importance de protocoles adaptés (Al-Mssallem et *al.*, 2018). Utilisés aussi en analyse cytogénétique et biochimique, les SSR contribuent à la classification variétale et aux programmes de conservation (Benkhalifa et Khelifi, 2020).

9.2. Les marqueurs AFLP

Le polymorphisme de longueur des fragments amplifiés (AFLP) est une technique de marquage moléculaire basée sur la PCR qui est particulièrement propre pour la détection de grandes variations génomiques. L'ADN est digéré par EcoRI et MseI, puis les adaptateurs sont condensés et les produits de PCR sont multipliés. Les fragments résultants. Bandes séparées et visualisées. Chaque bande représente un allèle dominant. L'AFLP est un succès en

cartographie génétique. (Becker et *al.*, 1995 ; Wang et *al.*, 1997) et les études de diversité (Meudt et Clarke, 2007), offrant des résultats comparables aux RFLP (Smith et *al.*, 1997).

9.3. Les marqueurs RAPD

La technique RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA), introduite simultanément par (Welsh et McClelland, 1990 ; Williams et *al.*, 1990), repose sur l'amplification par PCR de fragments d'ADN à l'aide d'amorces courtes et arbitraires. Ces amorces s'hybrident en plusieurs sites du génome, générant des produits amplifiés si deux sites sont proches et orientés de façon convergente. La faible stringence des conditions PCR favorise une hybridation non spécifique, permettant l'amplification de nombreux fragments, ensuite séparés par électrophorèse sur gel d'agarose et visualisés au bromure d'éthidium.

Appréciés pour leur simplicité, les marqueurs RAPD révèlent un polymorphisme basé sur la présence ou l'absence de bandes, utile pour distinguer les individus (Devos et *al.*, 1992). Leur utilisation s'étend à divers domaines :

- Diversité génétique et phylogénétique (Quiros et *al.*, 1991 ; Bouchireb, 1996 ; Sedra et *al.*, 1998 ; Ben Abdallah et *al.*, 2000 ; Trifi et *al.*, 2000)
- Cartographie génétique (Devos et *al.*, 1992)
- Identification variétale et pureté des semences (Zhang et *al.*, 1997)

9.4. Les marqueurs SNP

Les marqueurs SNP (Single Nucleotide Polymorphism) sont largement utilisés pour analyser la diversité génétique et la structure des populations chez le palmier dattier (*Phoenix dactylifera*. L). Ces marqueurs permettent une résolution fine pour distinguer les génotypes et sont précieux pour la sélection assistée par marqueurs, facilitant ainsi l'amélioration variétale. Par exemple, Zehdi-Azouzi et *al.* (2015) ont utilisé des marqueurs SNP pour étudier la structure génétique du palmier dattier, mettant en évidence une différenciation importante entre les populations orientales et occidentales (Zehdi-Azouzi et *al.*, 2015). Cette différenciation géographique joue un rôle clé dans la conservation et la gestion des ressources génétiques.

Les SNP, d'autres types de marqueurs moléculaires, tels que les SSR (Simple Sequence Repeats), sont également employés. Les SSR, connus pour leur haut degré de polymorphisme, sont particulièrement utiles pour l'identification variétale et l'analyse de la diversité génétique. Une étude menée par **(Benhamada et Bougheddad, 2022)** a démontré l'intérêt des marqueurs SSR pour identifier le sexe chez le palmier dattier, ce qui représente un atout considérable pour les programmes de sélection et d'amélioration génétique **(Benhamada et Bougheddad, 2022)**.

9. 5. Le marqueur de SCoT (Start Codon Targetet)

Les marqueurs SCOT (Start Codon Targeted) est une technique de marquage moléculaire conçue pour étudier la diversité génétique, notamment chez les plantes. Cette méthode cible les régions conservées entourant le codon de départ (start codon, généralement AUG), point d'initiation de la traduction des gènes. Contrairement à d'autres marqueurs dominants comme les RAPD ou ISSR, le SCOT permet d'obtenir des données plus fiables et plus proches des régions codantes du génome **(Fig . 8)**.

La technique a été développée en 2009 par **Collard et Mackill**, dans le but de fournir une méthode simple, reproductible et génétiquement informative, sans nécessiter de séquences génomiques préalables. Depuis, elle a été largement utilisée dans des domaines tels que l'évaluation de la diversité génétique, la caractérisation variétale, les études phylogénétiques et la sélection assistée par marqueurs **(Collard et Mackill, 2009)**.

Elle cible les régions flanquant le codon de départ des gènes, permettant ainsi de détecter des variations génétiques spécifiques associées à des traits particuliers **(Zehdi et al., 2002)**. Elle est appréciée pour sa simplicité, son coût abordable et sa capacité à générer des marqueurs hautement polymorphes sans nécessiter de séquences préalables **(Aberlenc-Bertossi, 2010)**.

Le marqueurs SCoT représentent une méthode efficace pour explorer la diversité génétique et les mécanismes d'adaptation du palmier dattier, contribuant ainsi à la conservation et à l'amélioration de cette espèce essentielle dans les écosystèmes arides **(Aberlenc-Bertossi, 2010)**.

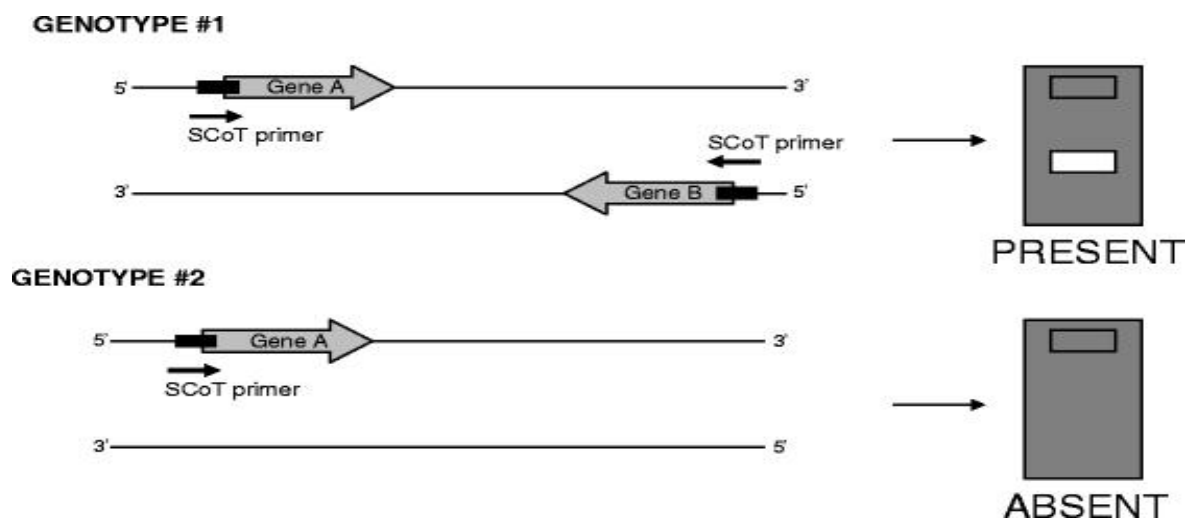


Figure8. Start Codon Targeted (SCoT) Polymorphism: A Simple, Novel DNA Marker Technique for Generating Gene-Targeted Marker

10. Application de SCoT sur le palmier dattier

La méthode Start Codon Targeted (SCoT) est une technique de biologie moléculaire utilisée pour analyser la diversité génétique et l'expression des gènes chez le palmier dattier (*Phoenix dactylifera* L.). Cette technique cible les régions conservées autour du codon d'initiation de la traduction (ATG) et est appliquée dans divers domaines de recherche, notamment l'identification variétale, la réponse aux stress abiotiques et la sélection assistée par marqueurs.

Le marqueur SCoT (Start Codon Targeted) est un outil moléculaire utilisé pour analyser la diversité génétique et l'expression génique chez les plantes, y compris le palmier dattier (*Phoenix dactylifera* L.) (Pintaud, 2015).

Une application notable des marqueurs SCoT chez le palmier dattier concerne l'étude des réponses aux stress abiotiques. Par exemple, la technique cDNA-SCoT a été employée pour identifier des gènes différentiellement exprimés lors de divers traitements de stress, tels que la salinité et la sécheresse (Pintaud, 2015). Cette approche a permis de mettre en évidence des fragments exprimés différemment, homologues à des gènes connus ou codant pour des

protéines non classifiées, offrant ainsi des perspectives pour l'amélioration génétique et la sélection de variétés plus résistantes (Zehdi et *al.*, 2002).

10.1. Analyse de la diversité génétique et identification variétale

Le palmier dattier présente une grande variabilité génétique en raison de sa pollinisation croisée et de son adaptation aux environnements arides. La méthode SCoT a été utilisée pour explorer cette diversité en comparant différentes variétés cultivées. Une étude réalisée par Hajer et *al.* (2021) a démontré l'efficacité des marqueurs SCoT pour analyser la diversité génétique des palmiers dattiers tunisiens. Les résultats ont montré une forte hétérogénéité génétique entre les accessions étudiées, ce qui confirme l'utilité de cette approche pour différencier les cultivars et optimiser la conservation des ressources génétiques (Hajer et *al.*, 2021).

10.2. Étude de la réponse aux stress abiotiques

Les conditions climatiques extrêmes affectent la croissance et la productivité du palmier dattier. La technique cDNA-SCoT, qui combine l'approche SCoT avec l'ADNc, permet d'identifier les gènes impliqués dans la tolérance au stress hydrique et salin. Une recherche menée par Rhouma et *al.*, (2023) a mis en évidence plusieurs gènes différentiellement exprimés chez des variétés soumises à la salinité et à la sécheresse. Cette étude a confirmé que certains gènes liés à la signalisation cellulaire et à la réponse au stress étaient significativement activés en réponse à ces conditions environnementales défavorables (Rhouma et *al.*, 2023)

10.3. Sélection assistée par marqueurs pour l'amélioration des variétés

La sélection assistée par marqueurs (MAS) est une approche qui permet d'accélérer le développement de nouvelles variétés en identifiant des marqueurs génétiques liés à des traits d'intérêt. Les marqueurs SCoT sont particulièrement utiles pour la sélection des cultivars de palmier dattier présentant des caractéristiques agronomiques favorables, comme une meilleure résistance aux stress et un rendement accru. Ahmed et Al-Khayri (2020) ont montré que les marqueurs SCoT permettent de cartographier des gènes associés à des traits d'adaptation et de résistance aux maladies, facilitant ainsi la sélection des variétés améliorées (Al-Khayri et *al.*, 2020).

10.4. Identification des gènes de résistance aux maladies

Le palmier dattier est vulnérable à diverses maladies, dont la fusariose vasculaire causée par *F. le Bayoud* (*Fusarium oxysporum* f. sp. *albedinis*). L'utilisation des marqueurs SCoT pour identifier les gènes de résistance est une stratégie prometteuse. **Moussa et al. (2022)** ont mené une étude sur des variétés résistantes et sensibles au Bayoud, révélant que certains profils génétiques spécifiques étaient associés à la résistance. Cette découverte offre des perspectives intéressantes pour le développement de palmiers dattiers résistants aux maladies par sélection assistée par marqueurs.

L'application de la méthode SCoT au palmier dattier a démontré son efficacité pour l'étude de la diversité génétique, la réponse aux stress abiotiques, l'amélioration variétale et la résistance aux maladies. Cette technique permet de mieux comprendre les mécanismes moléculaires impliqués dans l'adaptation de cette espèce aux conditions environnementales difficiles. Les connaissances acquises grâce aux marqueurs SCoT contribuent à l'amélioration des programmes de sélection et à la conservation des ressources.

10.5. Identification des gènes différentiellement exprimés (cDNA-SCoT)

La méthode cDNA-SCoT a été exploitée pour identifier des gènes dont l'expression varie sous différents stress abiotiques chez le palmier dattier. **(Khierallah et al. (2021))** ont utilisé cette approche pour détecter des fragments différentiellement exprimés liés à des réponses au stress, ce qui offre des perspectives précieuses pour l'amélioration génétique et la sélection variétale.

10.6. Analyse de la structure des populations

Les marqueurs SCoT ont aussi servi à étudier la diversité génétique et la structure des populations de cultivars tunisiens de palmier dattier. **(Ferchichi et al., 2020)** ont analysé 31 accessions de cultivars tunisiens et ont observé un taux de polymorphisme élevé (84 %), indiquant une bonne résolution génétique grâce aux amorces SCoT.

10.7. Développement de marqueurs spécifiques au sexe

Les marqueurs SCoT, en combinaison avec d'autres techniques comme les marqueurs RAPD, ont été utilisés pour développer des marqueurs PCR spécifiques au sexe chez le palmier dattier. **(Maryam et Sajid (2017))** ont réussi à isoler des fragments spécifiques au sexe, facilitant ainsi l'identification précoce du sexe des plantules, ce qui représente un avantage crucial en culture commerciale.

Chapitre II : Matériels et Méthodes

Notre expérimentation a été réalisée dans le cadre des activités de recherche de l'équipe Palmier dattier de la Division Biotechnologie et Amélioration des plantes à l'Institut National de la Recherche Agronomique (INRAA) à Mehdi Boualem-Baraki, dont une durée du stage de 5 mois

1. Présentation de l'entreprise

L'Institut National Algérien de Recherche Agronomique (INRAA) a été créé en 1966 en tant qu'établissement public à caractère scientifique et technologique (EPST). Depuis 1993, il est sous la tutelle du ministère de l'Agriculture et du Développement Rural (MADR), chargé de piloter la recherche agricole dans le pays. Pour ce faire, dix stations de recherche ont été mises en place dans des régions stratégiques. La Station de Recherche et d'Expérimentation Mehdi Boualem, située à Baraki, a été établie par le décret ministériel n°539SM du 30 mai 1989. À son ouverture, elle comprenait une zone expérimentale et un laboratoire de fertilisation des sols, s'étendant sur environ 1065 hectares. De plus, la Station de Recherche et la Station Expérimentale ont été équipées de nouvelles infrastructures pour le Département de Bioclimatologie et le Laboratoire de Physiologie Végétale.

2. Evaluation des vitro plants par l'analyse moléculaire (SCoT)

2.1. Matériel

2.1.1. Matériel végétal

La collecte et la sélection des pennes de palmier dattier est la première étape du processus d'extraction : plantes mères et des vitro plants de la variété Deglet Nour récoltés dans la région de Touggour (**Fig. 9**).

. Ensuite, elles sont coupées et nettoyées avec du coton imbibé d'eau distillée, puis enveloppées dans de papier kraft et séchées dans l'étuve à (40°C) pendant 72 h. Les feuilles déshydratées ont finalement été broyées à l'aide d'un broyeur électrique. Nous avons collecté 04 échantillons de pieds mères et 04 échantillons des vitro plants dans cette étude (**Fig. 10**).

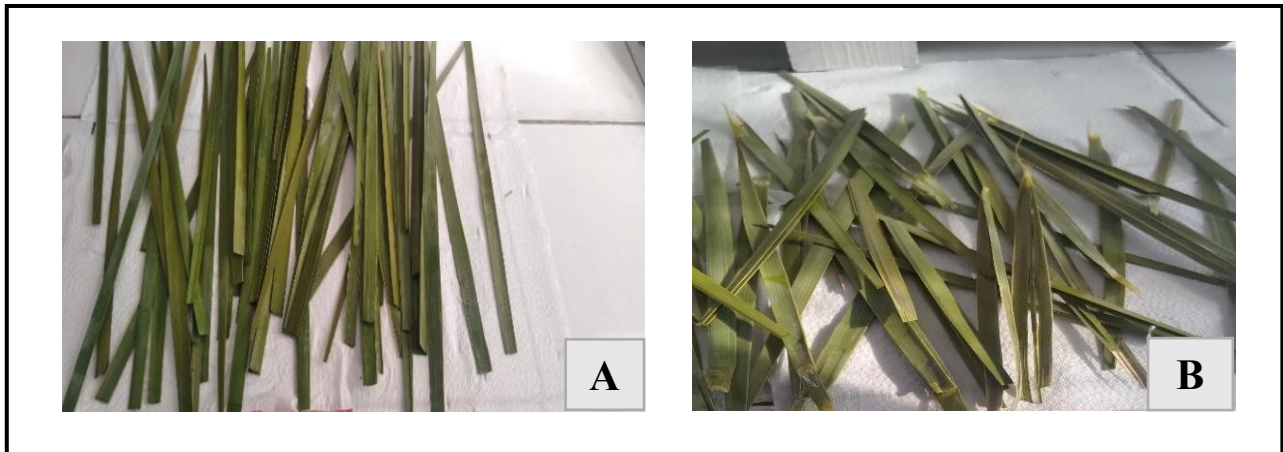


Figure .9. A) échantillons des pieds-mères / B) échantillons des vitro plants (Touggourt)

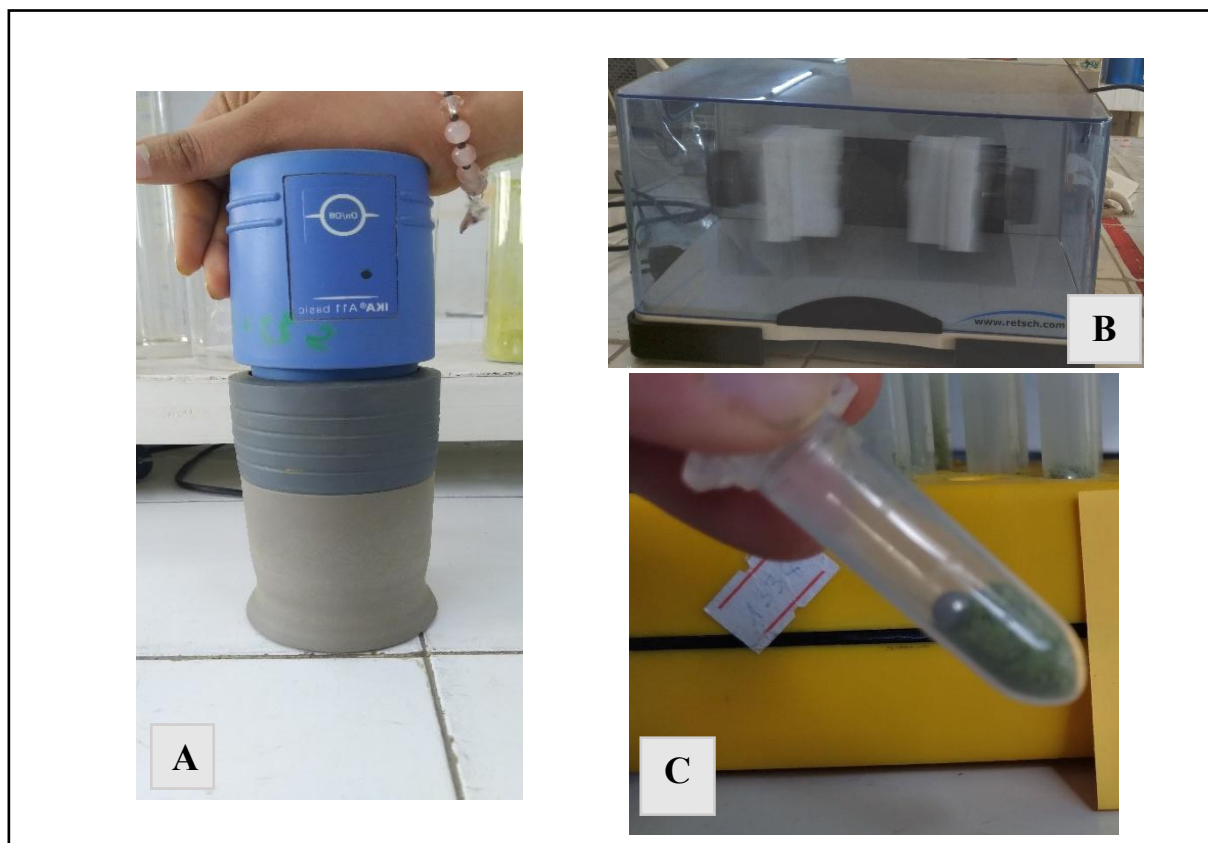


Figure .10. A) broyeur électrique / B) broyeur à billes (Shaker) / C) échantillon avant broyage à bille

2.1.2. Matériel non biologique

Le matériel utilisé au sein de laboratoire de biologie moléculaire regroupe un certain nombre d'instruments, verrerie, appareillage, réactif (**Annexe 2**).

2.2. Méthode expérimentale

Pour assurer le succès de notre expérimentation, il est crucial de prendre en compte et de suivre les mesures aseptiques. C'est pourquoi nous avons d'abord stérilisé toute la verrerie utilisée lors des séances de manipulation, avant de préparer les différentes solutions qui seront utilisées pendant le processus d'extraction.

2.2.1. Extraction d'ADN

Pour préparer l'échantillon, il convient de broyer finement 4 grammes de feuilles de palmier dattier (*Phoenix dactylifera*. L) préalablement lyophilisées dans l'étuve à 45° C pendant 72h. Cette étape est réalisée à l'aide d'un broyeur électrique, Ce qui permet d'obtenir une poudre homogène et fine, et qui assure une meilleure surface de contact pour les réactions chimiques ou les extractions, tout en préservant les composés bioactifs grâce à la lyophilisation préalable qui maintient l'intégrité des molécules sensibles (**Fig. 11**).

.

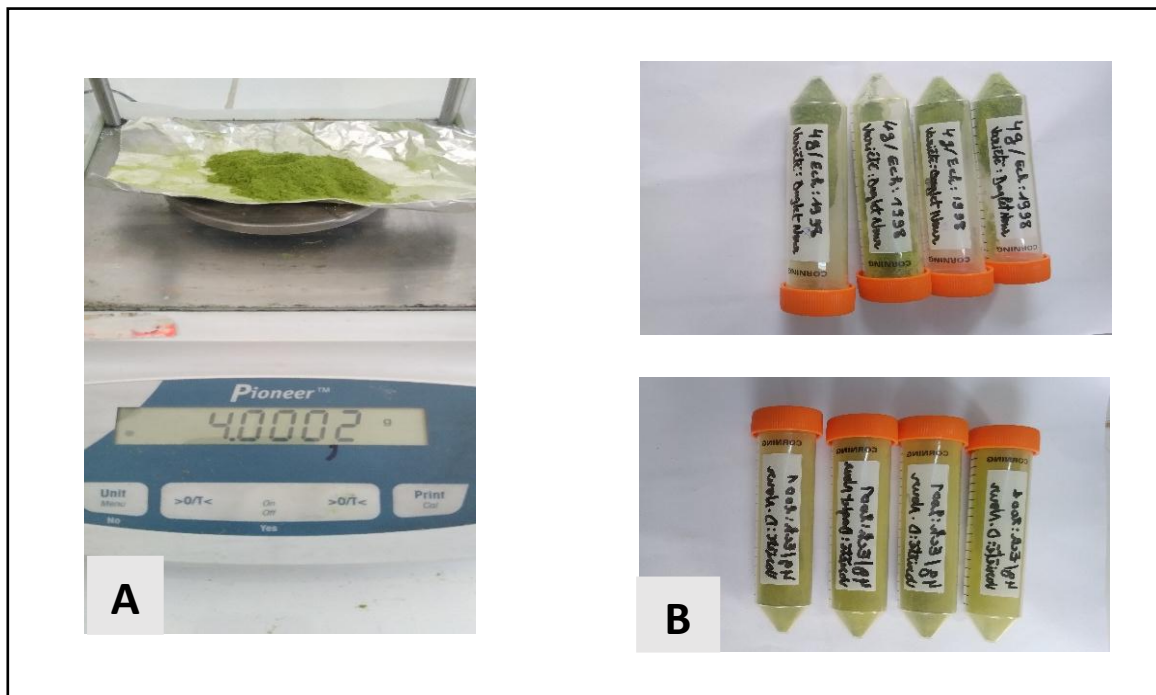


Figure.11. A) poids des échantillons / B) échantillons conservés dans les tubes

2.2.1.1. Protocole d'extraction d'ADN de palmier dattier par la méthode MATAB

La lyse cellulaire a été initiée par l'ajout de 200 ml de tampon d'extraction à l'échantillon. Après une agitation douce de 10 minutes pour la libération des composants cellulaires, Nous avons filtrée la solution à travers une toile à butée afin d'éliminer les débris solides (**Fig.12**). Les filtrats obtenus ont ensuite été répartis en quatre tubes de 50 ml pour les prochaines étapes de l'extraction.



Figure.12. Lyse des cellules par le tampon d'extraction et à l'aide de toile à butter

Après avoir obtenu la solution, nous avons centrifugé à 4 000 tours par minute pendant 30 minutes. Une fois ce temps écoulé, nous avons jeté délicatement le surnageant pour ne conserver que les culots. Ces derniers sont ensuite remis en suspension dans 30 ml de tampon de lyse (**annexe 1**). Les tubes sont ensuite placés dans un bain-marie à 65 °C pendant 4 heures d'incubation, avec une légère agitation de temps en temps pour bien homogénéiser le mélange. Une fois l'incubation terminée, nous avons laissé les tubes refroidir pendant environ 5 minutes sur pailasse. Nous avons ajouté ensuite un volume de chloroforme isoamylique (dans un rapport de 24/1, v/v), puis nous avons agité doucement pour bien mélanger. Enfin, une seconde centrifugation est réalisée à 4 000 tours par minute pendant 10 minutes pour séparer les phases (**Fig.13**).

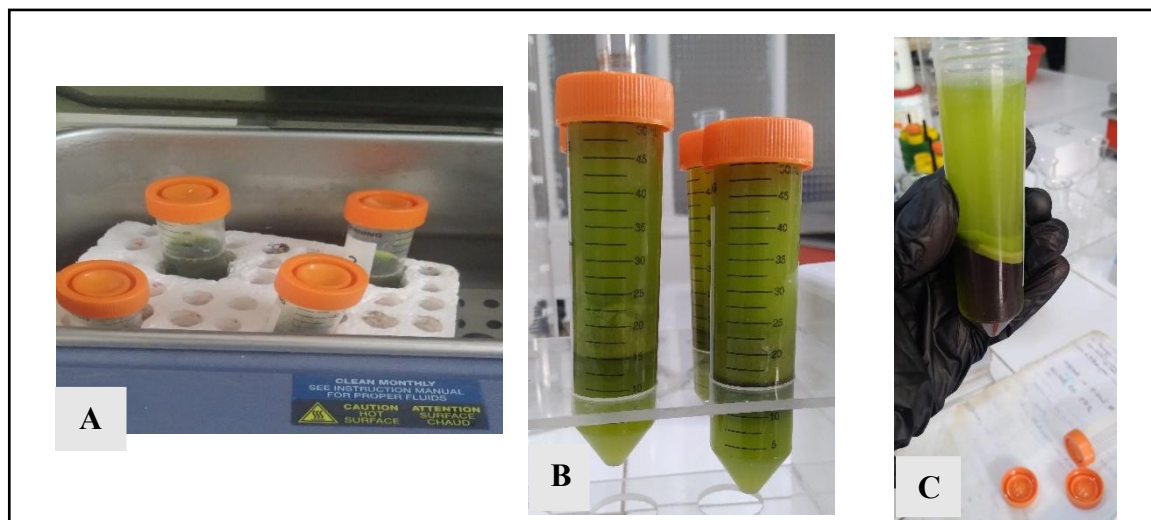


Figure.13. A) incubation au bain-marie / B) ajout de chloroforme isoamylique / C) solution après centrifugation

Pour précipiter l'ADN, nous avons récupéré avec précaution la phase aqueuse obtenue après centrifugation dans un tube de 50 ml ensuite nous avons ajouté 200 μ L de RNase. Cette enzyme va permettre de dégrader l'ARN restant, pour ne garder que l'ADN. Nous avons ajouté à parts égales de l'isopropanol, ce qui va faire apparaître une pelote d'ADN, souvent visible à l'œil nu (**Fig. 14**). Une fois formée, cette pelote est délicatement récupérée à l'aide d'une pipette Pasteur.



Figure14. A) phases obtenues après centrifugation / B) préparation RNase / C) pelote d'ADN

Une fois la pelote d'ADN récupérée, nous avons rincé doucement avec de l'éthanol à 70 % pour éliminer les dernières impuretés, puis nous avons laissé la sécher tranquillement à une température ambiante. Lorsqu'elle est bien sèche, nous avons dissous dans le tampon TE, juste ce qu'il faut pour la faire revenir en solution. Enfin, nous avons transféré le tout dans un petit tube Eppendorf, que l'on place au congélateur pour bien conserver l'ADN jusqu'à son utilisation future.

A

B

C

2.2.1.2. Protocole d'extraction d'ADN de palmier dattier par la méthode CTAB

Pour obtenir un ADN de qualité adapté aux analyses moléculaires, nous avons commencé par chauffer le tampon CTAB à une température entre 65 et 69 °C dans un bain-marie, tout en veillant à refroidir la centrifugeuse à 4 °C. Nous avons mis dans un tube de 50 mL, 4g de poudre avec 30 mL de tampon CTAB. Nous avons également incorporé 40 mg de PVP pour complexer les polyphénols, et 1.2 mL de β -mercaptoéthanol, préalablement chauffé. Enfin,

nous avons mélangé vigoureusement le tout à l'aide d'un vortex pendant une minute pour assurer une bonne homogénéité.

Le mixte est ensuite incubé à une température de 65 à 69 °C pendant 90 minutes. Pour réaliser la séparation des phases organiques, nous avons ajoutés 30 mL chloroforme/alcool isoamylique (24 :1, v/v). Nous avons ensuite procédé à une centrifugation à 11 000 tr/min pendant 15 minutes à 4 °C, afin de permettre une séparation nette des phases. À l'issue de cette étape, la phase aqueuse, située en surface, a été soigneusement transférée dans un nouveau tube. Afin d'améliorer la pureté de l'ADN et d'éliminer les contaminants organiques résiduels, nous avons répété l'extraction à l'aide du mélange chloroforme isoamylique une à deux fois supplémentaires, nous avons centrifugé le mélange pendant 15 minutes à 11 000 tr/min à 4 °C avec précaution nous avons ajouté 10 µl de RNase pour permettre de dégrader l'ARN restant, pour ne garder que l'ADN pur et nous avons incubé le mélange à 37 °C sur un thermomix à 600 tr/min pendant 30 minutes. , après nous avons centrifugé pendant 15 min à 12 000 tr/min ensuite nous avons retiré le surnageant délicatement. Puis nous avons lavé le culot deux fois avec 10 mL d'éthanol à 70 % pour la précipitation. Enfin, nous avons laissé sécher le culot à l'air libre et à température ambiante pendant 20 minutes. Ensuite, nous avons dissous notre ADN dans 40 µl de tampon TE, Enfin, nous avons transféré le tout dans un micro tube Eppendorf (**Fig.15**) et le conserver à 4 °C pour une future utilisation.



Figure.15. Conservation d'ADN dans un Eppendorf

2.2.1.3. Protocole d'extraction d'ADN de palmier dattier par la méthode de dneasy maxi KIT Qiagen

La méthode du kit DN easy Plant maxi de Qiagen a été employée pour extraire l'ADN à partir de 4 échantillons de pied-mères et leur vitro plants de palmier dattier.

Pour la lyse des cellules, 4 g de poudre est mélangé avec 10 μ L RNase et 5 ml de tampon AP1 (préalablement chauffé à 65°C au bain-marie), puis vortexé et incubé pendant 10 minutes au bain-marie à 65°C, en inversant régulièrement le tube pour maintenir l'homogénéité de la solution.



Figure.16. Préparation d'RNase

Pour précipiter les protéines, les polysaccharides et les détergents indésirables, nous avons ajouté 1,8 ml de tampon AP2 au mixte tout en mélangeant au vortex pour bien disperser le réactif. Ensuite le mélange est incubé dans la glace pendant 10 minutes.

Après centrifugation à 3000 xg pendant 5min, nous avons délicatement transféré le surnagent dans une colonne violette placée dans un tube de 50 ml. Une seconde centrifugation identique est réalisée pour filtrer davantage le liquide, qui est ensuite transféré dans un nouveau tube de 50 ml. Le volume total recueilli est estimé à 6 ml.

Nous avons préparé le filtrat en ajoutant 7.5 ml de tampon AP3 à 6 ml de filtrat, ce qui a permis d'ajuster les conditions chimiques requises pour la purification de l'ADN sur une colonne échangeuse d'anions.

Nous avons ajusté le mélange et l'avons chargé progressivement, par volumes n'excédant pas 15 ml, sur une colonne échangeuse d'anions placée dans un tube conique de 50 ml. Nous avons centrifugé pendant 5 minutes à 3000 × g, puis nous avons éliminé le filtrat et conservé le tube. Nous avons ensuite lavé la colonne afin d'éliminer les contaminants, en ajoutant 12 ml de tampon AW, puis nous avons de nouveau centrifugé pendant 5 minutes à 3000 × g. Nous avons éliminé le liquide de lavage, ce qui a permis de sécher la membrane de la colonne.

Nous avons transféré la colonne dans un nouveau tube conique de 50 ml propre pour procéder à l'élution de l'ADN purifié. Nous avons ajouté 1 ml de tampon AE, préchauffé à 65 °C, sur la colonne, puis nous avons laissé reposer 5 minutes à température ambiante afin de permettre l'élution (**Fig.16**). Ensuite, nous avons centrifugé pendant 5 minutes à 3000 × g pour récupérer l'éluât (éluât A). Nous avons répété cette opération une seconde fois dans les mêmes conditions pour obtenir un deuxième éluât (éluât B). Nous avons conservé les deux fractions d'éluât pour les analyses ultérieures.

2.2.2. Dosage de L'ADN

2.2.2.1 par gel d'agarose

Les analyses de l'ADN sont réalisées sur des gels d'agarose à 1% dans une solution TAE à 1X, avec une migration à 60 volts. Les dilutions de la solution d'ADN commencent par une dilution 1/20, obtenue en mélangeant 2 µl d'ADN avec 38 µl d'eau stérile (**Fig. 17**). Pour chaque échantillon, 13 µl est déposé sur le gel, comprenant 10 µl d'ADN dilué et 3 µl de bleu de migration.



Figure.17. Les dilutions d'ADN

Les conditions d'écoulement requises sont de 600 à 1200 mA et de 36 à 72 W de puissance, avec une énergie consommée variant entre 0.036 kWh et 0.072 kWh. Après la migration, le gel est coloré au bromure d'éthidium pour permettre la visualisation des bandes d'ADN sous lumière UV.



Figure.18. Le protocole d'électrophorèse

Chapitre II : Matériels et Méthodes

Le support contenant le gel est ensuite placé dans la cuve d'électrophorèse en veillant à ce que les puits soient orientés verticalement, avec le côté cathode (fil noir) vers le bas. Cela est crucial car l'ADN, étant négativement chargé, migrera vers l'anode. Une fois le gel en place, la cuve est remplie avec le tampon TAE 1X, assurant ainsi un environnement adéquat pour la migration électrophorétique des molécules d'ADN (**Fig. 18**).

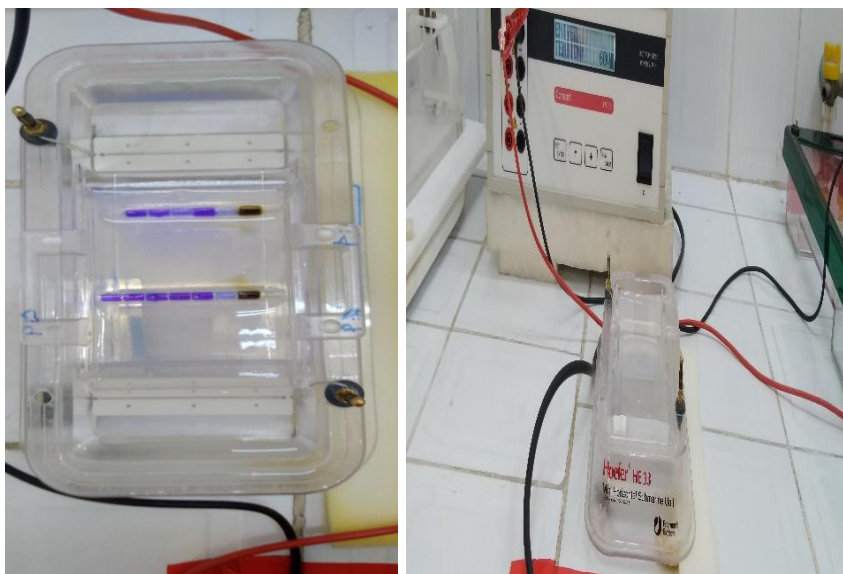
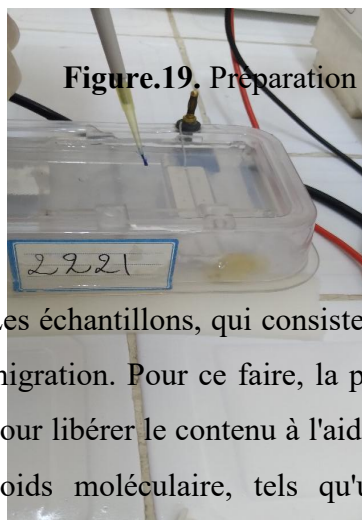


Figure.19. Préparation de cuve d'électrophorèse et les différentes étapes de migration ADN sur gel d'agarose.



Les échantillons, qui consistent en extraits d'ADN, sont chargés dans les puits du gel avant la migration. Pour ce faire, la pipette est positionnée à la surface de chaque puits, et on pivote pour libérer le contenu à l'aide du cône. Il est également important d'inclure des marqueurs de poids moléculaire, tels qu'une échelle ADN de 1 Kb, ainsi qu'un colorant (bleu de bromophénol) pour suivre la migration sur le gel. Cela permet non seulement de visualiser le progrès de l'électrophorèse, mais aussi de déterminer la taille des fragments d'ADN en comparaison avec les marqueurs (**Fig. 19, 20**).

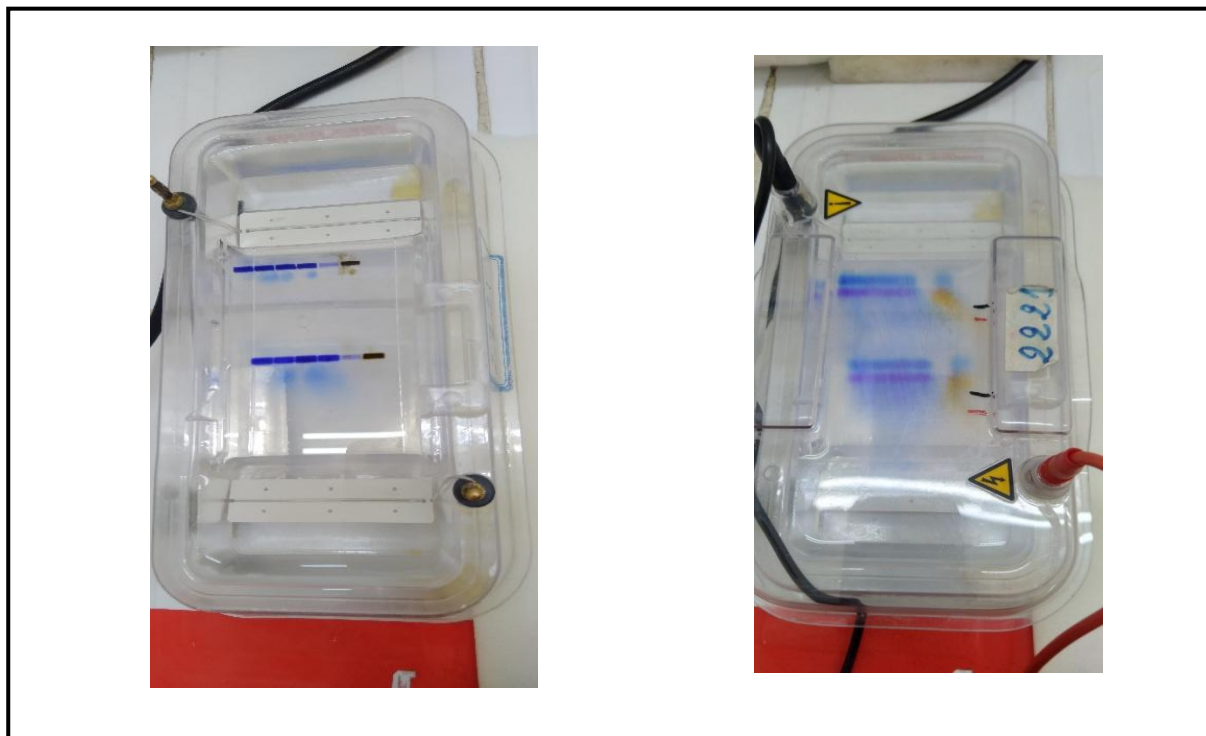


Figure.20. Stades de migration

La révélation de l'ADN sur le gel d'agarose est réalisée à l'aide de bromure d'éthidium, un agent intercalant. Pour ce faire, 250 μ l de bromure d'éthidium sont ajoutés à 1 litre d'eau distillée, une fois l'électrophorèse terminée. Les fragments d'ADN deviennent visibles lorsque le gel est exposé aux rayons UV dans l'obscurité.

2.2.2.2 Par Nanodrop

Nous avons utilisé le Nanodrop 2000c pour la quantification de l'ADN, un appareil permettant de mesurer de très faibles volumes d'échantillons de ADN, de l'ordre du 1 μ L, grâce à une technologie de pointe. Dans un premier temps, nous avons procédé au nettoyage des surfaces optiques supérieures et inférieures du système de rétention à l'aide de 1 μ l d'eau distillée ultra pure, en les essuyant soigneusement avec un chiffon sec et non pelucheux. Dans un second temps, nous avons ouvert le logiciel Nanodrop, puis choisi l'application pour les acides nucléiques, en cliquant ensuite sur l'option « Blank ». Après la réalisation d'un blanc dont les surfaces optiques avaient été à nouveau nettoyées, 1 μ l de notre échantillon d'ADN a été déposé sur le piédestal optique, le bras du levier refermé, puis la mesure effectuée via l'onglet « Measure »; le logiciel affichait automatiquement la concentration en acides nucléiques, leur pureté, ainsi que le spectre d'absorbance de l'échantillon (**Fig.21**).



Figure.21. Appareillage Nanodrop

2.2.3. Méthode des SCoT : Start Codon Target

La réaction d'amplification a été réalisée dans un volume total de 25 μL , contenant environ 5 ng d'ADN génomique, 0,5 mM de chaque (désoxyribonucléotides triphosphates) contenant (d'ATP, d'CTP, d'GTP, d'TTP), un tampon de réaction Taq fourni par Appligène à une concentration finale de 1X, Hot FIREPol® Master Mix 1,5 U, 10 μM amorce. Le mélange réactionnel est préparé pour l'ensemble des amplifications et réparti dans des micro-tubes de 0.5 ml. L'ADN est alors ajouté dans chaque tube. Ainsi pour 20 réactions il faut

Hot FIREPol® Master Mix 1.5U	17 μL
d'NTP	150 μL

Chaque tube contient, 10 μL de mélange PCR, 1 μL d'amorce (10 μM), 0.5-1 μL d'ADN (\approx 25ng), eau qsp 25 μL

2.2.3.1. Programme de l'amplification

Les amplifications de l'ADN sont réalisées dans un thermocycleur de marque Pekin Elmer selon le programme suivant

- Un cycle comprenant : 5 minutes à 94 °C pour dénaturer l'ADN et détruire toutes les structures secondaires
- 35 cycles comprenant : 45 secondes à 94°C
- 45 secondes à 50 °C
- 1 minute à 72 °C
- 1 dernier cycle d'extension de 10 minutes à 72°C permet la polymérisation de toutes les fragments amplifiés.

2.2.3.2 Les Amorces testées

Les amorces SCoT (Start Codon Targeted markers) testées, proviennent de kit SCoT primer. Ce sont les SCoT1, SCoT2, SCoT3, SCoT4, SCoT5, SCoT6, SCoT7, SCoT8, SCoT9, SCoT10, SCoT11, SCoT12, SCoT36, SCoT41 (**Tab 1**). Elles ciblent des régions hautement conservées de l'ADN situées autour du codon de départ (start codon) des gènes, en particulier le triplet ATG, qui initie la traduction des protéines.

Tableau.1. Amorces SCoT utilisées

Primer	Séquence (5' → 3')
SCoT-1	CAACAATGGCTACCACCA
SCoT-2	CAACAATGGCTACCACCC
SCoT-3	CAACAATGGCTACCACCT
SCoT-4	CAACAATGGCTACCACCG
SCoT-5	CAACAATGGCTACCACGA
SCoT-6	CAACAATGGCTACCACGC
SCoT-7	CAACAATGGCTACCACGT
SCoT-8	CAACAATGGCTACCACAG
SCoT-9	CAACAATGGCTACCACAT
SCoT-10	CAACAATGGCTACCACCAAG
SCoT-11	CAACAATGGCTACCACGAG
SCoT-12	CAACAATGGCTACCACGAG
SCoT-36	GCAACAATGGCTACCACC
SCoT-41	CAATGGCTACCACTGACA

2.2.3.3. Préparation de gel et migration

La migration est réalisée sur un grand gel d'agarose 1.5% dans du TBE1 X sous un voltage à 100 v (rouge et noir), pour un gel de 20 X 30 X 0.5 (soit 3 peignes de 21 puits). Le volume du dépôt d'environ 1.3µL (10µL d'ADN dilué + 3µL de bleu de migration). Après la migration le gel est coloré GelRed® 0.5 mg.ml⁻¹.

Pour préparer une solution de coloration au GelRed®, on ajoute 5 µL de GelRed® 10 000× dans 100 mL d'eau distillée ou de tampon (TAE ou TBE), dans un flacon opaque ou

enveloppé de papier aluminium afin de protéger la solution de la lumière. Le gel est ensuite immergé dans cette solution pendant 20 à 30 minutes à température ambiante, de préférence avec une agitation douce pour favoriser une coloration homogène. Un rinçage rapide à l'eau distillée peut être effectué si le fond apparaît trop fluorescent.

2.2.4. Analyse des données

Les images d'amplification PCR sont traitées par le logiciel PAST (PAleontological STatistics), qui permet d'attribuer à chaque bande le poids moléculaire correspondant. Au cours de cette analyse, nous avons pris en considération que les bandes intenses et reproductibles. A partir d'un ADN utilisé, la présence sur le gel de chaque bande prend une valeur numérique (1) et son absence prend une valeur (0) basé sur la matrice de similarité (Jaccard, Dice, Euclidien).

La version PAST v5 intègre de nombreuses fonctions de l'ACP permettant de visualiser la variabilité entre échantillons ou taxons, DCA (Analyse des Correspondances Détendue), utile pour détecter pour les données de présence/abondance où les gradients peuvent être non linéaires. ; Richness : Nombre total de taxons présents ; Origination : Nombre de nouveaux taxons apparaissant dans un intervalle ; extinction : Nombre de taxons disparaissant dans un intervalle.

Chapitre III :

Résultats et discussions

1.1. Extraction d'ADN

Nous avons réalisé l'extraction de l'ADN à partir des vitro plants issus de cultivars Deglet Nour de palmier dattier (*Phoenix dactylefera* L.) en utilisant trois différentes méthodes. De la variété Deglet Nour récoltés dans la région de Touggourt. Les vitroplants et les pieds mère sont récoltés dans la région de Touggourt. L'extraction de l'ADN prit départ par le broyage électrique afin d'obtenir une substance poudreuse. Une fois broyée nous avons pesé le matériel végétal à 4 grammes et nous avons mis dans des tubes de 50ml.

Le palmier dattier est riche en composés phénoliques, polysaccharides, tanins et mucilages, ce qui rend l'extraction d'ADN particulièrement difficile.

Dans une première extraction, la méthode CTAB a été appliquée pour permettre une extraction efficace de l'ADN génomique, avec une bonne pureté et un rendement satisfaisant. La méthode CTAB est une méthode chimique classique d'extraction d'ADN, surtout utilisée pour les tissus végétaux. Elle est fondée sur l'usage d'un détergent cationique : le CTAB (chlorure de cetyltriméthylammonium). Ce détergent permet de lyser les cellules (casser les membranes) et de séparer l'ADN des contaminants comme les polysaccharides et les protéines. Dans notre expérimentation nous avons observé que le rendement est souvent faible et la pureté médiocre. La couleur de l'ADN varie jaune clair à jaune foncé après précipitation avec isopropanol, rinçage avec l'éthanol 70%, séchage et récupération dans le TE (**Fig.22**). Le CTAB est méthode est recommandée pour les Plantes peu riches en polyphénols ou mucilages.



Figure 22. ADN extrait par la méthode CTAB

Dans la deuxième extraction par la méthode MATAB, nous avons observé la suite qu'après l'étape de l'ajout du tampon de lyse et de l'incubation au bain marie pendant 4heures à 65 °C et avec une légère agitation un léger changement au niveau de la couleur du mélange ainsi obtenu a viré du vert clair au vert foncé. La centrifugation réalisée après l'ajout du mélange chloroforme-isoamylique a permis l'apparition de trois phases bien distinctes. Après l'ajout de la solution de RNase pour la dégradation de l'ARN et garder que l'ADN pur avec incubation pendant une demi-heure à 37°C, nous avons précipité l'ADN en ajoutant de l'isopropanol, nous avons observé de la pelote d'ADN à l'œil nu est méticuleusement récupérée en suite rincé avec l'éthanol 70 % et séché. L'extraction par la méthode MATAB que nous avons utilisée est plus longue, mais les résultats obtenus est plus pur et stable (**Fig.23**).

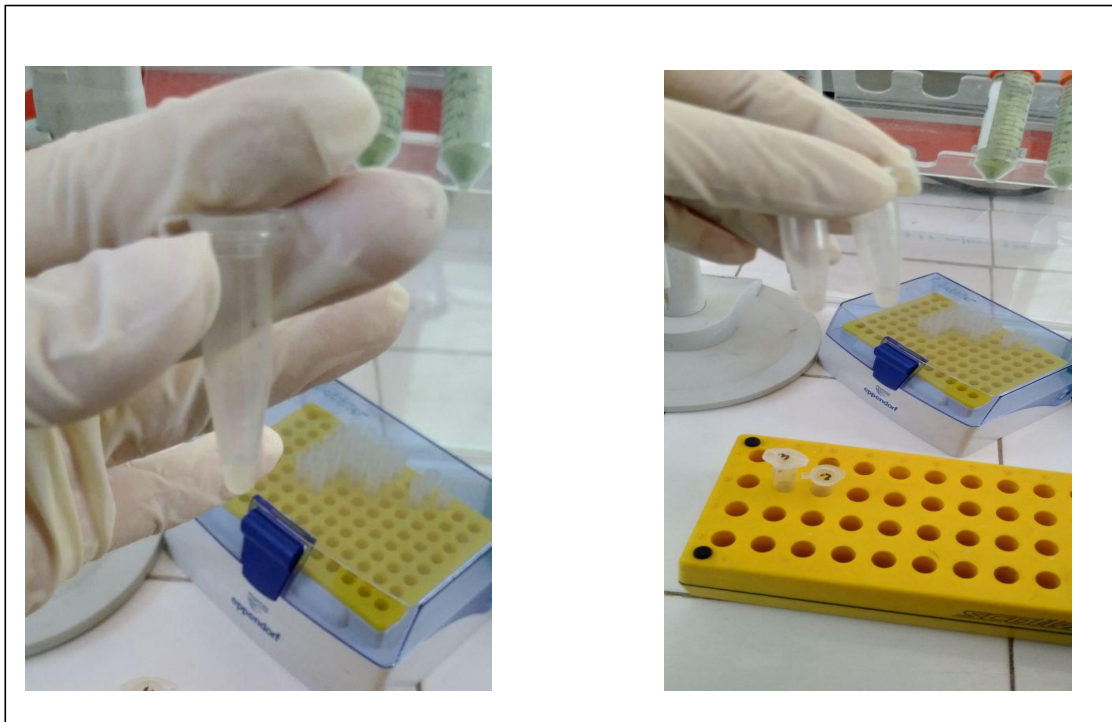


Figure 23. ADN extrait par MATAB

Dans une troisième extraction qui a été réalisée par la méthode de DN easy Plant maxi kit Qiagen, permet une extraction rapide de l'ADN génomique, offrant une meilleure pureté ainsi qu'un rendement accru. Les kits d'extraction ADN sont des solutions industrielles optimisées. Ils contiennent tous les réactifs et colonnes nécessaires pour extraire rapidement de l'ADN avec haute pureté, souvent sans danger (pas de solvants toxiques comme le chloroforme).

Ce kit est capable de traiter jusqu'à 2 g de tissu végétal. En résumé, le matériel végétal est d'abord homogénéisé puis incubé dans un tampon de lyse cellulaire avec tampon et protéinase. Après la lyse, l'ADN se lie à une colonne de silice ou à des billes magnétiques en présence de sels chaotropiques puis on procède à son lavage pour enlever les impuretés. Élué de l'ADN pur est réalisé dans de l'eau ou un tampon. Avec cette méthode, nous ne pouvons pas d'obtenir une pelote d'ADN. C'est méthode très rapide et reproductible (diagnostic, génomique, etc.). **(Tab.2).**

Chapitre III : Résultats et discussions

Tableau 2. Comparaison des méthodes d'extraction de l'ADN chez le cultivar Deglet Nour de palmier dattier : CTAB, MATAB et kits commerciaux

Critère	Méthode MATAB	Méthode CTAB	DNeasy Plant Maxi Kit (Qiagen)
Principe	Détergent cationique + solvant	Détergent anionique + extraction organique	Colonnes de silice + sels chaotropiques
Durée d'extraction	Longue (2 jours)	Moyenne (5h)	Courte (1–2 h)
Rendement	Élevé	Faible	Moyen à élevé
Pureté de l'ADN	Bonne	Moyen	Excellente
Complexité technique	Élevée	Moyenne	Faible
Présence de solvants organiques	Oui	Oui	Non
Coût	Faible	Faible	Élevé
Idéal pour	Plantes difficiles, applications fines	Plantes standard, PCR classique	Diagnostic, recherche haut débit

Discussions et conclusion

Chapitre III : Résultats et discussions

L'extraction efficace d'ADN de haute qualité à partir de tissus végétaux représente un enjeu majeur en biologie moléculaire, notamment lorsqu'il s'agit d'espèces ligneuses ou riches en métabolites secondaires, comme le palmier dattier (*Phoenix dactylifera* L.). Dans cette étude, nous avons comparé trois protocoles d'extraction d'ADN sur les tissus foliaires de palmier dattier (*Phoenix dactylifera* L.), connus pour leur richesse en polyphénols et polysaccharides : la méthode MATAB, la méthode CTAB, et le kit commercial DNeasy Plant Maxi de Qiagen, en tenant compte de critères tels que le rendement, la pureté, l'intégrité de l'ADN, la reproductibilité, la facilité d'exécution et les coûts associés.

La méthode MATAB (Mixed Alkyl Trimethyl Ammonium Bromide), développée comme une alternative à la méthode CTAB pour les plantes difficiles, repose sur l'action synergique du bromure de triméthylammonium (un détergent cationique), de **sorbitol** et d'agents chélateurs comme l'EDTA. Le sorbitol joue un rôle essentiel en maintenant l'osmorégulation et en complexant les polyphénols présents en grande quantité dans les tissus de palmier dattier (Yatta ,2007 ; Naciri et al., 2021). Par ailleurs, l'EDTA protège l'ADN en inhibant les DNases dépendantes des ions divalents (Ca^{2+} , Mg^{2+}), tandis que la lyse est renforcée par une incubation prolongée à 65 °C (jusqu'à 4 h), favorisant la dissociation des membranes cellulaires et nucléaires. Dans notre étude, la méthode MATAB a permis d'obtenir un ADN de haut poids moléculaire, visualisable par une pelote dense après précipitation à l'isopropanol. Ce profil est particulièrement adapté aux applications de biologie moléculaire de type Southern blot, PCR longue, séquençage de nouvelle génération (NGS) ou analyse de méthylation (Yatta et al., 2023 ; Prajapati et al., 2023 ; Alwadani et al., 2023). Cependant, l'utilisation de solvants organiques (chloroforme/isoamylalcool) soulève des questions de sécurité et d'environnement, ce qui peut en limiter l'usage dans les laboratoires ne disposant pas d'un équipement de sécurité adéquat (hotte à flux laminaire, EPI).

La méthode CTAB (Cetyltrimethyl ammonium bromide), standardisée par Doyle et Doyle (1990), reste largement utilisée dans les laboratoires de génétique végétale et souvent revisitée (Chakraborty et al., 2021 ; Boukhatem et al., 2022). Elle est particulièrement efficace pour les plantes riches en polysaccharides et polyphénols, deux inhibiteurs majeurs des enzymes de la PCR. Dans notre adaptation, l'ajout de RNase A au stade précoce de la lyse cellulaire a permis de réduire la contamination par l'ARN, améliorant ainsi la précision des mesures spectrophotométriques ($A_{260/280}$ et $A_{260/230}$). Cette précaution, déjà soulignée dans les

Chapitre III : Résultats et discussions

travaux récents de (Singh et al. 2022), permet d'éviter une surestimation artificielle des concentrations d'ADN.

La méthode CTAB a généré des extraits d'ADN de qualité correcte, avec des ratios A260/280 généralement supérieurs à 1.7, mais inférieurs à ceux obtenus par le kit Qiagen. En revanche, la méthode est nettement plus économique et moins dépendante de matériels spécialisés. Son temps de traitement est raisonnable (2–3 heures), ce qui justifie son adoption courante dans de nombreux laboratoires de biologie moléculaire végétale.

Le kit commercial DNeasy Plant Maxi de Qiagen s'appuie sur la technologie des membranes de silice, permettant l'adsorption sélective de l'ADN en présence de sels chaotropiques, suivie de lavages rigoureux et d'une élution finale dans une solution tampon. Ce système élimine efficacement les contaminants (protéines, polysaccharides, phénols), et assure une reproductibilité élevée, un critère crucial dans les analyses de type qPCR, génotypage SNP, NGS et barcoding moléculaire (Zhang et al., 2023). Notre évaluation a montré que cette méthode produisait des ADN d'une pureté remarquable, avec des ratios A260/280 souvent supérieurs à 1,9, et A260/230 proches de 2,0, ce qui est le seuil recommandé pour les applications sensibles (Qiagen, 2022 ; Al-Daoude et al., 2024). La simplicité du protocole réduit considérablement les risques d'erreurs humaines, d'oxydation ou de contamination croisée. Néanmoins, son coût reste un facteur limitant, en particulier dans les programmes à grande échelle ou les laboratoires aux ressources limitées. En outre, l'absence de précipitation à l'isopropanol signifie qu'aucune pelote d'ADN n'est visualisable, ce qui complique une évaluation qualitative rapide en l'absence de spectrophotomètre. Toutefois, son coût plus élevé peut représenter un frein pour une utilisation à large échelle dans des projets à budget limité.

En conclusion, cette étude met en évidence que le choix d'une méthode d'extraction d'ADN ne peut être arbitraire : il doit être guidé de manière rigoureuse par les objectifs analytiques visés, les contraintes logistiques et économiques du laboratoire, ainsi que la composition biochimique du matériel végétal utilisé. Dans le cas du palmier dattier (*Phoenix dactylifera* L.), espèce caractérisée par une forte teneur en polyphénols et en polysaccharides, les protocoles classiques d'extraction doivent souvent être ajustés, voire combinés, pour garantir un rendement optimal, une pureté élevée et une intégrité moléculaire suffisante de l'ADN extrait.

Les résultats obtenus confirment que la richesse en métabolites secondaires peut sérieusement compromettre l'efficacité d'un protocole. Dans ce contexte, une approche combinée — intégrant une extraction initiale par MATAB ou CTAB suivie d'une purification sur colonne de silice — peut représenter une stratégie optimale, conjuguant efficacité, qualité, et adaptabilité aux diverses exigences des plateformes de biologie moléculaire (Fang et al., 2022 ; Kumari et al., 2024).

En définitive, aucune méthode ne s'impose comme universellement supérieure. Le protocole idéal devra toujours résulter d'un compromis raisonné entre les contraintes techniques, le niveau de pureté requis, et les finalités scientifiques du projet. L'essor continu des technologies génomiques et des biobanques végétales rend crucial le choix d'une méthode fiable, reproductible et adaptée aux caractéristiques spécifiques de l'espèce étudiée.

2. Dosage de l'ADN du palmier dattier (*Phoenix dactylifera* L.)

2.1. Dosage de l'ADN par migration sur gel d'agarose

L'extraction et l'évaluation de l'ADN à travers les tissus végétaux sont des actions cruciales pour des analyses au niveau moléculaire. Nous avons effectué le dosage de l'ADN par l'électrophorèse sur gel d'agarose à 1 %. Cette technique est un moyen d'évaluer la concentration approximative de l'ADN extrait à l'aide d'une série étalon et également de vérifier la qualité de l'ADN à travers l'intégrité des bandes formées. Après migration, les gels ont été soumis à une coloration par bromure d'éthidium, puis visualisés sous une lampe UV Trans illuminatrice, ensuite les images ont été prises avec un appareil photo du système d'imagerie de gel BIORAD (imageur moléculaire Gel Doc[™] XR+).

Dans cette expérience, nous avons décidé d'utiliser de folioles de palmiers dattiers issues des plantes mères ainsi que des vitroplants afin de comparer les différentes méthodes d'extraction de l'ADN. Trois protocoles ont été mis en œuvre : la méthode MATAB (Mixed Alkyl Trimethyl Ammonium Bromide), la méthode CTAB (Cetyl Trimethyl Ammonium Bromide) ainsi que l'utilisation du kit commercial DNeasy Plant Maxi Kit de Qiagen. Les extraits d'ADN ont été analysés par électrophorèse sur gel d'agarose à 1 %, qui permet d'observer et de visualiser les bandes. En prenant comme référence une série d'ADN de phage lambda digéré par EcoRI et HindIII, il a été possible d'estimer les concentrations en ADN obtenues, qui variaient entre 10 et 60 ng/μl, et la qualité du matériel végétal.

Ces trois protocoles ont permis d'obtenir des molécules d'ADN de bonne qualité, qui ne présentent pas de symptômes dus notamment à la dégradation visible car aucune traînée n'est révélée sur le gel. Parmi ces méthodes, celle de kit Qiagen se distingue particulièrement par la pureté et la qualité d'ADN qu'elle procure à la fois comme en témoigne la netteté des bandes observée. (**Fig.22**). L'absence de traînées suggère une faible contamination par les protéines ou les polysaccharides, souvent responsables de sm

Le protocole CTAB, bien que plus sensible aux conditions de préparation (température, pH, homogénéité du tampon), a également permis l'obtention d'ADN de qualité acceptable.

Une troisième série d'extractions a été réalisée à l'aide d'un protocole MATAB optimisé, spécialement conçu pour le palmier dattier. Les résultats étaient similaires à ceux du kit Qiagen, tant en termes de concentration que de qualité, ce qui témoigne de la flexibilité de cette méthode pour l'extraction d'ADN des espèces de palmiers.

Cependant, l'ADN extrait des feuilles de pieds mères, après séchage et stockage pendant deux mois, s'est avéré de moins bonne qualité. Cette dégradation pourrait être due à un séchage inadéquat ou à un stockage en milieu humide, activant ainsi les nucléases endogènes et, par conséquent, fragmentant l'ADN. En revanche, les feuilles séchées rapidement après la récolte ont donné un ADN de bonne qualité, ce qui démontre l'importance des conditions post-récolte pour le maintien de l'intégrité moléculaire.

Il convient également de souligner que, bien que l'ADN extrait ait été stocké pendant une courte période, sa stabilité n'a pas posé de problème. Cela reste un aspect essentiel pour l'utilisation de l'ADN dans des applications de biologie moléculaire telles que la PCR, le génotypage ou le séquençage.

2.2. Dosage et analyse spectrophotométrique de l'ADN par Nanodrop

Le dosage de l'ADN a été réalisé à l'aide du spectrophotomètre **Nanodrop 2000**, sur un total de neuf échantillons appartenant à la variété *Deglet Nour*, extraits à partir de vitroplants ainsi que de plantes mères. Chaque échantillon a été analysé à quatre longueurs d'onde spécifiques : 230 nm, 260 nm, 280 nm et 340 nm. Ces longueurs d'onde permettent de caractériser le profil

Chapitre III : Résultats et discussions

d'absorption typique des acides nucléiques et de détecter d'éventuelles contaminations par des protéines, des solvants organiques ou d'autres composés (**Fig.27**).

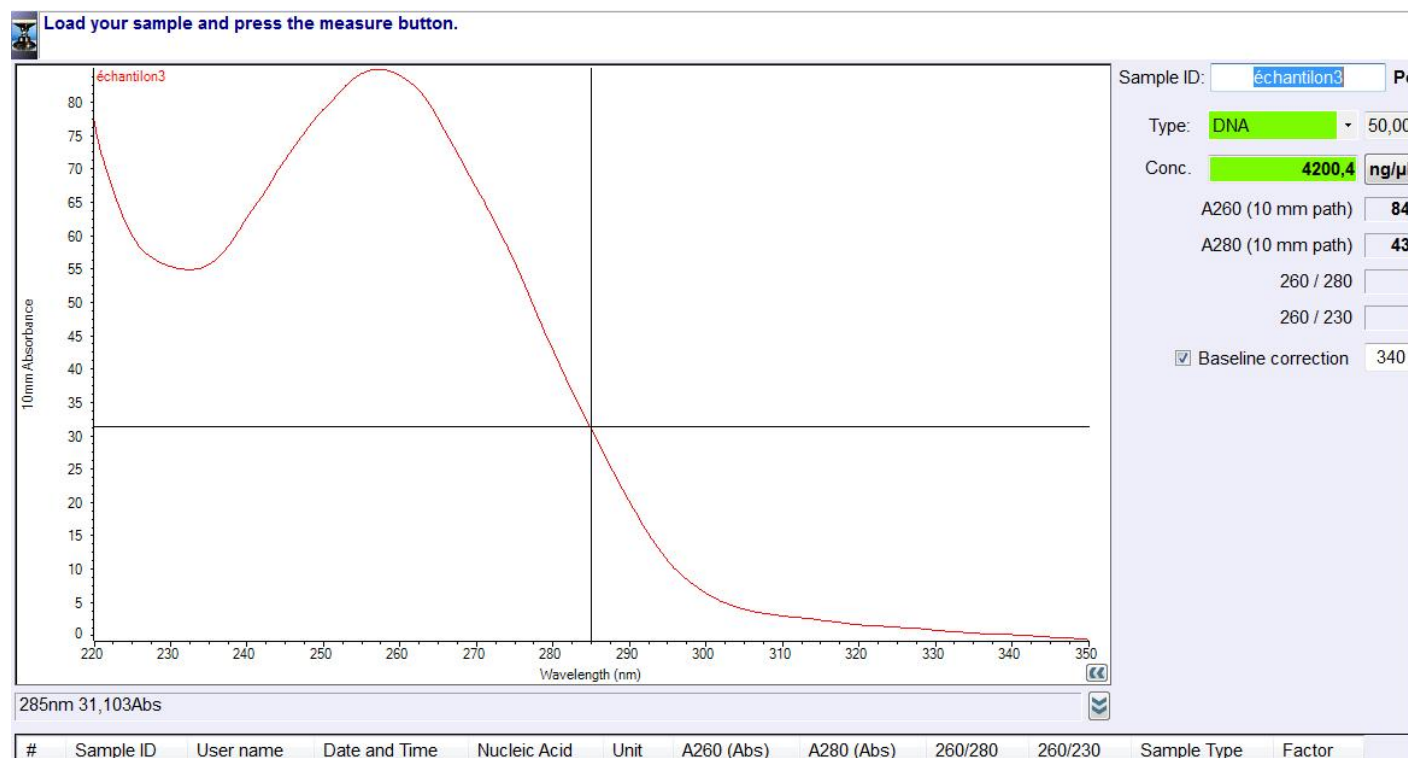


Figure 24. Spectre Nanodrop de l'échantillon d'ADN

Discussion et conclusion

Le dosage de l'ADN a été réalisé à l'aide du spectrophotomètre Thermo Scientific Nanodrop 2000c, un instrument de référence pour l'analyse microvolumique, permettant de quantifier les acides nucléiques à partir d'un volume minimal de 1 μ l. Cet appareil fournit un spectre complet pour chaque échantillon, ce qui permet d'évaluer à la fois la concentration et la pureté des extraits d'ADN. De par sa large plage dynamique, il n'est pas nécessaire d'effectuer des dilutions, ce qui améliore la rapidité, la fiabilité et l'efficacité des mesures.

Dans notre étude, nous avons dosé neuf échantillons d'ADN extraits de la variété Deglet Nour, comprenant des vitroplants et des échantillons des pieds-mères. Les résultats révèlent des différences significatives de concentration entre les échantillons, variant de 62 ng/ μ l (échantillon ech1998/2smir) à 34 078 ng/ μ l (ech1998/4), ce qui reflète une variation distincte

dans le rendement d'extraction, probablement influencée par des facteurs tels que l'état physiologique du matériel végétal ou l'efficacité du protocole d'isolement.

La pureté des échantillons a été déterminée par les ratios 260/280 et 260/230, selon les normes internationales. Un ADN de haute qualité est généralement défini par un ratio 260/280 proche de 1.8, ce qui indique une contamination protéique limitée, et un ratio 260/230 compris entre 1.8 et 2.2, montrant une faible présence de contaminants organiques comme les phénols ou les polysaccharides.

Les résultats montrent que les ratios 260/280 varient de 1.62 à 2.05. La majorité des échantillons affichent des valeurs proches ou supérieures à 1.8, indiquant une bonne pureté protéique, sauf pour quelques exceptions comme ech1998/2smir, dont la valeur extrême de 4.68 (rapports inversés dans le tableau) est probablement due à une concentration très faible entraînant une lecture instable du spectrophotomètre. Cet échantillon présente également un ratio 260/230 de 1.38, confirmant une contamination importante par des composés organiques ou des résidus de solvants.

En revanche, les autres échantillons analysés montrent des ratios 260/230 allant de 0.68 à 2.11, ce qui est acceptable pour la plupart d'entre eux. Les valeurs les plus élevées (par exemple ech2001/1 avec 2.11) révèlent un ADN d'une pureté exceptionnelle.

En conclusion, ces résultats montrent que la majorité des échantillons d'ADN analysés présentent une qualité satisfaisante, tant sur le plan quantitatif que qualitatif, et peuvent être considérés comme adaptés aux analyses moléculaires ultérieures.

3. Évaluation de la conformité génétique des vitroplants

Comme il a été indiqué dans la revue de littérature, la variation somaclonale est un générateur possible de polymorphisme génétique chez des plantes qui ont été régénérées in vitro, notamment chez des dattiers. Cette variation peut apparaître à cause des différentes phases du processus de culture in vitro, comme la différenciation cellulaire, la prolifération des cals embryogènes, ou la régénération, et elle peut changer la stabilité génétique du matériel qui se multiplie. Elle peut être enregistrée sous la forme de changements au niveau de morphologie, physiologie ou moléculaire entre les plantes de vitro et la plante donneuse, la plante-mère, qui est la plante à partir de laquelle les explants ont été prélevés initialement.

Pour cette étude, la conformité génétique des vitroplants du cultivar Deglet Nour a été déterminée en faisant une comparaison entre leurs profils électrophorétiques et ceux du pied-

mère. Les amorces SCoT (Start Codon Targeted) ont été employées pour cela car elles localisent des parties conservées autour du codon d'initiation de la traduction dans les gènes exprimés. Ces marqueurs, qui sont très efficaces pour repérer des zones polymorphes très minimales, sont parfaits pour l'étude de la fidélité génétique des végétaux clonés.

L'étude a été faite sur les profils obtenus par électrophorèse après amplification par PCR. Les bandes produites ont permis de visualiser les différentes séquences de l'ADN confiées (bandes communes) ainsi que les bandes spécifiques pouvant apparaître dans un seul des génotypes. Cette méthode de comparaison cherche à établir si la présence ou l'absence de diversité génétique, qui peut avoir apporté les procédés de culture in vitro, est due à ces derniers. Suite à cela, toute disparité vis-à-vis du profil attendu serait vue comme une altération du génome provoquée par la variation somaclonale.

Ce type d'analyse est un outil clé dans les programmes de micropropagation, surtout pour des espèces qui ont une grande importance économique comme le palmier dattier, où il est crucial de préserver la pureté génétique. L'utilisation de marqueurs SCoT se révèle donc être une méthode fiable et sensible pour assurer la qualité et l'authenticité génétique des vitroplants produits.

3.1 Marqueurs SCoT (Start codon Target)

Dans le cadre de notre expérimentation, les marqueurs SCoT (Start Codon Targeted) utilisés résultent d'une sélection rigoureuse d'amorces et de produits d'amplification.

Un total de quatorze a été soumis à des tests sur six échantillons de palmier dattier, visant à évaluer leur capacité à générer des profils d'amplification reproductibles et informatifs. L'objectif était d'évaluer leur capacité à produire des profils d'amplification clairs et exploitables. À l'issue de ces essais, quatre amorces ont été jugées satisfaisantes et ont donc été retenues sur la base de la clarté, et de la reproductibilité des bandes amplifiées. Ces amorces sélectionnées ont ensuite été utilisées pour l'analyse moléculaire de six échantillons de palmier dattier (*Phoenix dactylifera* L.), répartis en deux génotypiques :

- Trois échantillons du premier groupe des pieds mères : PM1, PM2, PM3
- Trois échantillons du deuxième groupe des vitroplants : PV1, PV2, PV3

Cette sélection ciblée permet de maximiser la qualité des résultats tout en précisant les biais liés à l'utilisation d'amorces peu spécifiques ou peu performantes. Elle constitue une étape

Chapitre III : Résultats et discussions

essentielle pour assurer la fiabilité des analyses de polymorphisme génétique réalisées dans cette étude.

D'autres amorces SCoT testées dans le cadre de cette étude n'ont pas été sélectionnées pour l'analyse finale en raison de plusieurs critères d'exclusion. Certaines de ces amorces sont très inefficaces et ne produisent aucune amplification lors des réactions de PCR. Cette absence de signal résulte soit d'une absence de correspondance avec les séquences cibles du génome du palmier dattier, soit de conditions de réaction non optimales pour les amorces choisies, les rendant ainsi inapplicables à l'évaluation de la diversité génétique et de des vitro plants. De plus, certaines amorces ont produit des produits d'amplification avec succès, mais les profils électrophorétiques obtenus étaient soit trop complexes, présentant un nombre très élevé de bandes et empêchant ainsi leur analyse, soit ambigus, non reproductibles ou difficiles à différencier. Ainsi, seules les amorces ayant généré des profils simples, reproductibles et clairs ont été conservées dans l'étude, tandis que les autres ont été supprimées, afin de préserver la rigueur et la validité des résultats obtenus.

L'utilisation de la technique SCoT (Start Codon Targeted Polymorphism), en combinaison avec les quatre amorces sélectionnées, a permis d'obtenir un profil de bandes caractérisé par un pourcentage très élevé de fragments monomorphes. En effet, le pourcentage de ces fragments monomorphes est compris entre 98 % et 100 %, ce qui indique que les profils électrophorétiques des descendants sont très similaires, voire identiques, à ceux des pieds-mères. En d'autres termes, il existe une forte homogénéité génétique entre les parents et leur descendance, traduisant une faible variabilité génétique détectée par cette approche.

En revanche, le pourcentage de fragments polymorphes reste très faible, allant de 0 % à 2 %, ce qui témoigne de la conformité génétique des vitroplants par rapport à leurs pieds-mères, telle qu'évaluée par la méthode SCoT. Ces résultats soutiennent fortement la fiabilité des protocoles de culture in vitro développés via l'embryogenèse somatique. Ils confirment également l'efficacité des procédures élaborées par l'équipe de l'INRA au sein du laboratoire spécialisé en techniques in vitro, en assurant une stabilité génétique élevée des plants régénérés.

Les profils électrophorétiques obtenus à l'aide des amorces SCoT-1, SCoT-2, SCoT-36 et SCoT-41 révèlent une grande similitude entre les vitroplants du cultivar Deglet Nour et leur pied mère. Cette homogénéité des profils suggère une stabilité génétique importante au niveau des loci amplifiés par ces amorces.

Chapitre III : Résultats et discussions

Plus précisément, l'amorce SCoT-1 a généré des fragments exclusivement monomorphes, traduisant une absence totale de polymorphisme détectable entre les vitro plants et le pied mère. Chez le vitro plant 1 (PV1), un seul fragment monomorphe a été observé. En revanche, sept fragments monomorphes ont été amplifiés chez le vitro plant 2 (PV2), tandis que trois fragments monomorphes ont été détectés chez le vitro plant 3 (PV3).

Aucun fragment polymorphe n'a été détecté, ni chez les vitro plants ni chez le pied mère, ce qui témoigne d'une conservation parfaite des séquences ciblées par l'amorce SCoT-1 au sein de ce matériel végétal. Ce résultat indique que le processus de multiplication in vitro n'a pas induit de variations génétiques détectables par ce marqueur particulier chez les individus analysés.

L'analyse des profils électrophorétiques obtenus à l'aide des amorces SCoT-2, SCoT-36 et SCoT-41 révèle une forte homogénéité génétique entre les vitroplants du cultivar Deglet Nour et leurs pieds mères. L'amorce SCoT-2 a généré huit fragments monomorphes identiques chez tous les génotypes, sans aucune variation détectée, tandis que l'amorce SCoT-36 a amplifié cinq fragments monomorphes communs, confirmant une stabilité génétique marquée, à l'exception de deux bandes polymorphes observées uniquement chez PV2. De même, l'amorce SCoT-41 a produit deux fragments monomorphes parfaitement identiques chez tous les individus, attestant d'une fidélité clonale remarquable et de l'absence de divergence génétique détectable.

Ces résultats traduisent une stabilité génétique élevée des vitroplants obtenus par micropropagation, indiquant que ce procédé n'a pas induit de modifications au niveau des loci amplifiés. L'évaluation du PIC (Polymorphic Information Content) a confirmé le monomorphisme général des marqueurs, avec des valeurs faibles pour les amorces SCoT-2 (0,50) et SCoT-36 (0,71), et plus élevées pour SCoT-1 (0,81) et SCoT-41 (0,89), soulignant la spécificité et la fiabilité des marqueurs utilisés. Dans l'ensemble, ces observations démontrent la fidélité génétique et la stabilité moléculaire du matériel végétal régénéré, validant l'efficacité des amorces SCoT pour le suivi de la fidélité clonale du palmier dattier Deglet Nour.

Discussions et conclusion

Les analyses électrophorétiques et moléculaires réalisées à l'aide des amorces SCoT ont révélé une forte similarité génétique entre les vitroplants du cultivar *Deglet Nour* et leurs

Chapitre III : Résultats et discussions

plantes mères, avec un taux de monomorphisme très élevé (98 à 100 %). Ces résultats traduisent une stabilité génétique remarquable du matériel régénéré par embryogenèse somatique et confirment la fiabilité des protocoles de culture *in vitro* appliqués au laboratoire de l'INRA pour la production de clones conformes (Jain, 2001 ; Zaid *et al.*, 2002). Le fort taux de bandes monomorphes, corroboré par les travaux de (Alkhateeb *et al.*, 2010 ; Al-Qurainy *et al.*, 2011), indique une faible incidence de variation somaclonale. Seules les amorces SCoT-1, SCoT-2, SCoT-36 et SCoT-41 ont été retenues après un criblage rigoureux basé sur la reproductibilité et la clarté des profils électrophorétiques, conformément aux recommandations de (Xiong *et al.*, 2011 ; Collard *et al.*, 2009 ; Al-Khayri et Naik, 2021). L'amorce SCoT-1 a généré exclusivement des fragments monomorphes (100 %), tout comme SCoT-2 et SCoT-41, tandis que SCoT-36 a révélé un faible polymorphisme (2 %) chez un vitroplant (PV2), indiquant de possibles altérations ponctuelles lors de la régénération (Miguel & Marum, 2011).

L'analyse du Polymorphism Information Content (PIC) a montré des valeurs comprises entre 0.50 et 0.89, témoignant d'une variabilité informative modérée à élever selon les amorces. Ces valeurs concordent avec celles rapportées pour diverses populations de palmier dattier, notamment algériennes, californiennes, iraniennes et africaines (Arabnezhad *et al.*, 2011). La carte radar illustrant cette répartition met en évidence la sensibilité accrue de certaines amorces, telles que SCoT-01 et SCoT-41, pour la détection de divergences génétiques subtiles, en accord avec (Roldán *et al.*, 2000). Ainsi, la technique SCoT s'avère être un outil fiable, reproductible et sensible pour l'évaluation de la fidélité clonale et de la stabilité génétique du palmier dattier *Deglet Nour*, validant l'efficacité des protocoles de micropropagation pour une multiplication *in vitro* sûre et conforme sur le plan génétique.

Conclusion générale et Perspectives

Conclusion

Dans cette recherche sur l'extraction d'ADN du palmier dattier (*Phoenix dactylifera* L.) des vitroplants et leurs pieds mères, du cultivar Deglet Nour, nous avons voulu comprendre comment les nombreux polyphénols et polysaccharides de ce tissu interfèrent avec le protocole d'extraction. Pour cela, trois protocoles ont été étudiés : la méthode CTAB traditionnelle, la méthode MATAB, et le kit DNeasy Plant Maxi du fabricant Qiagen. Chaque approche a ses points forts et ses faiblesses, et ces différences se traduisent directement par une qualité et une quantité d'ADN variées.

La technique CTAB, bien que largement utilisée et rentable, présente souvent de très faibles rendements et un ADN dont la pureté reste médiocre. La méthode MATAB, certes plus lente et exigeante des solvants organiques, permet d'obtenir un ADN plus propre et stable. Enfin, le kit DNeasy Plant Maxi offre les résultats les plus satisfaisants, avec un ADN aux ratios A260/A280 et A260/A230 ne montrant pratiquement aucune trace de contamination protéique ou résiduelle. Associer et combiner ces protocoles à des études moléculaires précises semblent donc prometteurs pour la recherche et la sauvegarde des ressources génétiques du palmier dattier.

Ces résultats éclairent déjà les axes de travaux futurs, notamment l'étude de la diversité génétique de cette espèce et la mise au point de programmes d'amélioration qui tiendront compte de ses traits particuliers.

Pour vérifier la conformité génétique de nos vitroplants, nous avons recours aux marqueurs SCoT, une technique qui cible spécifiquement les zones codantes des gènes et qui nous permet donc d'avoir une image précise de la diversité.

Nos analyses montrent en parallèle que les vitroplants sont très proches de leurs pieds mères. Cette homogénéité élevée, mise en évidence par les mêmes marqueurs SCoT, témoigne d'une similitude génétique remarquablement stable.

Les profils électrophorétiques du SCoT ont montré un taux de monomorphisme variant entre 98 et 100 %, ce qui indique que les conditions de culture in vitro n'ont provoqué de variation somaclonale significative, un facteur essentiel pour la pérennité des cultivars produits.

Conclusion générale et Perspectives

En effet, les variations somaclonales significatives peuvent altérer la qualité et les performances agronomiques des plants issus de ces cultures, raison pour laquelle ce constat est si encourageant.

Ainsi, la rareté du polymorphisme enregistrée dans notre étude confirme que les protocoles de micropropagation que nous avons appliqués sont à la fois fiables et sûrs pour garantir une stabilité génétique.

Ces résultats soulignent l'importance de choix rigoureux des protocoles d'extraction d'ADN appropriée aux caractéristiques de chaque espèce et en lien avec les objectifs posés.

Lorsque les analyses de conformité et d'identité génétique sont intégrées aux programmes de micropropagation, les chercheurs et les producteurs peuvent suivre la diversité, garantir que chacun des cultivars de palmier dattier préserve ses atouts (fruits de bonne qualité, résistance aux maladies, adaptabilité au climat) cela permet de préserver ces ressources pour les générations futures, et faire face notamment au changement climatique et à l'augmentation des pressions sur les cultures.

Références bibliographiques

- Abaab, A., Ben Mohamed, M., Zouari, M., & Gharbi, A., 2021. Microclimate under date palm canopies and its impact on understory crops. *Agricultural Water Management*, 250, 106825.
- Abdellatif, E. M., Meriem, B., 2022. Utilisation des marqueurs SSRs dans l'identification du sexe chez le palmier dattier (*Phoenix dactylifera* L.). Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie, Université Mentouri Constantine.
- Aberlenc-Bertossi, F., 2010. Biotechnologies du palmier dattier. IRD Éditions
- Ahmed, T. A., et Al-Khayri, J. M., 2020. Genetic markers and molecular breeding in date palm: Current status and future prospects. *Biotechnology Reports*, 26, e00492. DOI: 10.1016/j.btre. 2020.e00492.
- Al- Mssallem, I. S., Al-Dous, E. K., Al-Attas, S. G., Al-Muammar, M. Y., Al-Faifi, S. A., 2018. *Extraction d'ADN et amplification par PCR des marqueurs microsatellites chez le palmier dattier (Phoenix dactylifera L.)*. CAB International Digital Library, 5(1), 34–45.
- Alkhateeb, A. A., Bahieldin, A., Al-Khateeb, S. A., 2010. Detection of somaclonal variation in tissue culture-derived date palm using RAPD and SSR markers. *Biotechnology*, 9(3), 311–317. (Alkhateeb *et al.*, 2010 ; Al-Qurainy *et al.* 2011).
- Al-Khayri, J. M., Jain, S. M., & Johnson, D. V., 2021. Date palm: A review of its biology, uses, and potential for crop improvement. *Frontiers in Plant Science*, 12, 635421.
- Al-Khayri, J. M., Jain, S. M., Johnson, D. V., 2021. Date palm: A review of its biology, uses, and potential for crop improvement. *Frontiers in Plant Science*, 12, 635421.
- Al-Khayri, J.M. et Naik, P.M., 2017. Somaclonal variation. In: *Date Palm Biotechnology*. Springer, pp. 219–231. https://doi.org/10.1007/978-3-319-48496-0_11.
- Amir, H., Sabaou, N., 1983. Le palmier dattier et la fusariose. Étude de l'antagonisme dans le sol de deux actinomycètes vis-à-vis du *Fusarium oxysporum* f.sp. *albedinis*.
- Angiosperm Phylogeny Group (APG III), 2009. An update of the Angiosperm Phylogeny Group classification for the orders and families of flowering plants: APG III. *Botanical Journal of the Linnean Society*, 161 (2): 105–121.

- Arabnezhad, H., Bahar, M., Hassanzadeh, A., Yari, A., et Rezaee, M., 2011. Genetic variation and diversity among Iranian date palm (*Phoenix dactylifera* L.) genotypes using microsatellite markers. *African Journal of Biotechnology*, 10(76), 17521–17527. <https://doi.org/10.5897/AJB11.1191>.
- Barrow, C. J., 1998. Trees and tree planting in drylands: Examples from Sudan and the Sahel. *GeoJournal*, 45 (3), 259–270.
- BATTESTI V., 2005. Jardins au désert, Évolution des pratiques et savoirs oasiens, Jérid tunisien. Paris : IRD, Coll. A travers champs.
- Beccari, O., 1890. *Revista monografica delle specie del genere Phoenix L. Malesia*, 3(5), 345–416.
- Becker, J., Vos, P., Kuiper, M., Salamini, F., Heun, M., 1995. AFLP analysis of genetic diversity in barley (*Hordeum vulgare* L.). *Molecular and General Genetics MGG*, 249 (6), 653-658.
- Ben Abdallah, A., Mars, M., Trifi, M., Said, A., 2000. Assessment of genetic diversity in Tunisian olive cultivars using RAPD markers. *Plant Genetic Resources Newsletter*, (121), 44-48.
- Benhamada, I., Bougheddad, A., 2022. Utilisation des marqueurs SSRs dans l'identification du sexe chez le palmier dattier (*Phoenix dactylifera* L.). Mémoire de Master, Université Frères Mentouri, Constantine 1, Algérie.
- Benkhalifa, M., Khelifi, D., 2020. Détermination du sexe chez le palmier dattier (*Phoenix dactylifera* L.) : Approches cytogénétiques, biochimiques et moléculaires. *Acta Horticulturae*, 1299, 251-260.
- Bouchireb, M., 1996. Caractérisation de la diversité génétique chez le palmier dattier (*Phoenix dactylifera* L.) au Maroc par l'utilisation des marqueurs RAPD. *Fruits*, 51(5), 297-306.
- Boudjemaa, A., 2012. Le palmier dattier en Algérie : aspects socio-économiques et environnementaux. Thèse de doctorat, Université de Biskra.
- Boudjemaa, K., Benguerai, D., Benziouche, H., 2021. Structure et contraintes de la filière dattes en Algérie. *New Medit*, 20 (4), 43-52.

-BOUGUEDOURA N., 1979. Contribution à la connaissance du palmier dattier (*Phoenix dactylifera* L.) : étude des productions axillaires. Thèse de doctorat troisième cycle, U.S.T.H.B, Alger, 201p.

-Bouguedoura N., 1982. Development and distribution of axillary buds in *Phoenix dactylifera* L. Paper presented at the First Symposium on the Date Palm, 23-25 March 1982, Al-Hassa, Saudi Arabia. Proceedings of the First Symposium on the Date Palm, Coll. Agri. Sci. & Food, King Faisal University, Al-Hassa, Saudi Arabia.

Boukhatem, Z. F., Bouchabke-Coussa, O., Bouchabke, K., et Benaissa, H., 2022. CTAB method revisited for North African date palm (*Phoenix dactylifera* L.) varieties. African Journal of Plant Science, 16(2), 44–51.

-Brac de la Perrière, R. A., Benkhalifa, A., 1991. Progression de la fusariose du palmier dattier en Algérie. Sécheresse, 2, 119-128.

-Collard, B. C. Y., Mackill, D. J., 2009. Start codon targeted (SCoT) polymorphism: a simple, novel DNA marker technique for generating gene-targeted markers in plants. Plant Molecular Biology Reporter, 27 (1), 86–93.

-Daherb Maraneh., 2010. Origines et domestication du palmier dattier (*Phoenix dactylifera* L.). Études sur les zones arides et semi-arides chaudes, avec un focus sur le croissant fertile entre l'Euphrate et le Nil. Revue des Écosystèmes Arides, 12 (3), 45-60.

-Devos, K. M., Faurie, E., Gale, M. D., 1992. RFLP-based genetic maps of the homoeologous group-3 chromosomes of wheat and rye. Theoretical and Applied Genetics, 83 (7), 784-792.

-Djerbi, M., 1991. Bilan des activités de recherche sur le Bayoud en Afrique du Nord (1989-1990). Rapport PNUD/FAO/RAB/88/024, FAO, Rome, 29 p.

-Dunand, N. M., 1987. Le Bayoud, fusariose vasculaire du palmier dattier : contribution à l'identification et étude de la toxicité des différents constituants de la toxine sécrétée par *Fusarium oxysporum* f. sp. *albedinis*. Thèse de doctorat, Université de Dijon.

-El-Demerdash, M. A., 2020. Date Palm (*Phoenix dactylifera* L.): A Review. Journal of Horticulture and Postharvest Research, 3 (1), 1-10.

Références bibliographiques

- El-Hadrami, A., El-Hadrami, I et Daayf, F., 2020. Somatic embryogenesis in date palm:current status and future perspectives.Emirates Journal of Food and Agriculture,32(12),857-866.
- Elkhalil Benzohra, I., 2019. Le bayoud du palmier dattier en Algérie : état des lieux et stratégie de lutte. Editions universitaires européennes, 76 p.
- El-Moneim, A. M. A., Al-Ghamdi, A. A., Al-Huqail, A. A., & Alfarraj, S., 2022. Date palm-based agroforestry systems: A review of their benefits and challenges. *Agroforestry Systems*, 105 (1), 1–25.
- Fang, Y., You, J., Xie, K., Xie, W., and Xiong, L., 2020. Systematic comparison of three methods for extracting genomic DNA from different plant species. *Molecular Plant Breeding*, 11(3), 90–96.
- FAO.,2024. Statistiques mondiales de la production de dattes. Données relayées par CuisineDZ, « L’Algérie 3e producteur mondial de dattes en 2024, selon la FAO », 5 juin 2024.
- FAOSTAT., 2023. *Production mondiale de dattes*. Organisation des Nations Unies pour l'alimentation et l'agriculture (FAO).
- Ferchichi, A., Daoud, D., Messaoud, O., 2020. Genetic diversity assessment ofTunisian date palm cultivars using SCoT markers. *Silvae Genetica*, 69 (1), 1–8.
- Fernandez, D., Lourd, M., Ouinten, M., Tantaoui, A., Geige, J.P., 2000. Le Bayoud du palmier dattier : une maladie qui menace la phœniciculture. *Fruits*, 55 (6), 371-382.
- Foued, J., Ben Abdallah, F., Trabelsi, M., & Khouja, M. L., 2023. Effect of temperature on date palm growth and fruit development. *Journal of Arid Environments*, 210, 104523.
- George, E. F., Hall, M. A., De Klerk, G. J. (Eds.), 2008. Plant propagation by tissue culture (3rd ed.). Springer.
- George, E. F., Hall, M. A., et De Klerk, G. J., (Eds.), 2008. Plant propagation by tissue culture (3rd ed.). Springer.
- Ghawana, S., Paul, A., Kumar, H., Kumar, A., Singh, H., Bhardwaj, P.K., Rani, A., Singh, R.S., Raizada, J., and Singh, M. 2021. An efficient protocol for DNA isolation

from plants rich in secondary metabolites. *Indian Journal of Experimental Biology*, 59(3), 180–185. <https://nopr.niscair.res.in/handle/123456789/56514>.

-Hadj Sahraoui, A., Benmohamed, H., 2023. Étude de la diversité génétique de quelques accessions de palmier dattier (*Phoenix dactylifera* L.) en Algérie moyennant les marqueurs SSR. *African Journal of Biotechnology*, 22 (4), 89-102.

Hadjraoui, M., Abohatem, M. A., Baaziz, M., et al., 2017. *Plant Regeneration from Somatic Embryogenic Suspension Cultures of Date Palm (Phoenix dactylifera L.)*. Dans **Abohatem, M. A., Baker, Y., & Baaziz, M. (Éds.),** *Methods in Molecular Biology*, vol. 1637, pp. 203–214. Humana Press. doi:10.1007/978-1-4939-7156-5_17.

-Hajer, A., Chaabane, R., Triki, T., 2021. Genetic diversity analysis in Tunisian date palm (*Phoenix dactylifera* L.) using SCoT markers. *Genetic Resources and Crop Evolution*, 68(5), 1271-1284. DOI : 10.1007/s10722-021-01110-9

-Hartmann, H. T., Kester, D. E., Davies, F. T., Geneve, R. L., 2011. Hartmann & Kester's plant propagation: Principles and practices (8th ed.). Pearson.

-Hartmann, H. T., Kester, D. E., Davies, F. T., Geneve, R. L., 2011. Hartmann and Kester's plant propagation: Principles and practices (8th ed.). Pearson.

-Healey, A., Furtado, A., Cooper, T., and Henry, R.J., 2014. Protocol: a simple method for extracting next-generation sequencing quality genomic DNA from recalcitrant plant species. *Plant Methods*, 10, Article 21. <https://doi.org/10.1186/1746-4811-10-21>.

J'Aiti, F., Verdeil, J.-L. & El Hadrami, I., 2009. *Effect of jasmonic acid on the induction of polyphenoloxidase and peroxidase activities in relation to date palm resistance against Fusarium oxysporum f. sp. albedinis*. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, 74, 84–90.

-Jahiel, M., 1996. *Le palmier dattier : biologie, culture, produits*. Paris : INRA Éditions.

-Jain, S.M., 2001. Tissue culture-derived variation in crop improvement. *Euphytica*, 118, 153–166.

-Johnson, D., Dupont, L., Kamara, S., Mbaye, A., 2022. Techniques de multiplication végétative des palmiers d'importance économique : cocotier et palmier à huile. *Revue Internationale de Botanique Appliquée et d'Agriculture Tropicale*, 33 (363), 127–135.

- Khierallah, H. S. M., Al-Sammarrae, K. W., Al-Azawi, A. F., 2021.** Using cDNA-SCoT method to identify differentially expressed genes in date palm (*Phoenix dactylifera* L.). Plant Genetic Resources, 19 (4), 305–312.
- Khouldia O., Rhouma A., Marro J. P., Brun J., 1997.** Premières observations sur *Oryctes Agamemnon*, ravageur du palmier dattier en Tunisie. Fruit vol., 52 : 111-115.
- Kumari, S., Singh, A., Verma, P., et Sharma, R., 2024.** Cost-efficient protocols for plant genomics in low-resource labs. Plant Methods, 20, Article 45. <https://doi.org/10.1186/s13007-024-00912-3>.
- Larkin, P. J., Scowcroft, W. R., 1981.** Somaclonal variation—a novel source of variability from cell cultures for plant improvement. Theoretical and Applied Genetics, 60 (3), 197-205.
- Linné C. (von)., 1753.** *Species Plantarum*, tome 2. Stokholm, Impensis Laurentii Salvii, 776 p.
- Lopes, T., Araujo, T., 2020.** Somaclonal variation in horticultural crops: a critical review. Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC), 140 (2), 221-236.
- Malençon, G., 1934.** Le Bayoud, maladie fusarienne du palmier dattier au Maroc. Fruits, 5, 279-289.
- Malençon, G., 1934.** *Nouvelles observations concernant l'étiologie du Bayoud*. In Comptes rendus hebdomadaires des séances de l'Académie des Sciences, 196, 1259–1262 (aussi en résumé dans *Revue Appliquée de Mycologie*, 13 : 505).
- Mammadov, J. A., Yildiz, M., 2021.** Somaclonal variation: a valuable resource for crop improvement. Frontiers in Plant Science, 12, 684145.
- Maryam, N., Sajid, A., 2017.** Sex-specific molecular markers in *Phoenix dactylifera* L. using RAPD and SCoT markers. Genetics and Molecular Research, 16 (3), gmr16039783.
- Meudt, H. M., et Clarke, A. C., 2007.** Almost forgotten or still in vogue. AFLP applications, reproducibility and data analysis. Frontiers in plant science, 1, 19.
- Miguel, C., et Marum, L. 2011.** *An epigenetic view of plant cells cultured in vitro: somaclonal variation and beyond*. Journal of Experimental Botany, 62(11), 3713–3725. <https://doi.org/10.1093/jxb/err155>.

- Ministère de l'Agriculture., 2021.** *Le patrimoine phoenicicole algérien : enjeux et perspectives*. Ministère de l'Agriculture et du Développement Rural, Algérie.
- Moussa, M., Chatti, K., Ben Saad, A., 2022.** Molecular characterization of Fusarium-resistant date palm varieties using SCoT markers. *Plant Pathology Journal*, 38 (3), 289-301. DOI: 10.5423/PPJ.OA.10.2021.0156
- Munier, P., 1973.** Le palmier dattier. Collection Techniques Agricoles et Productions Tropicales, XXIV. Maisonneuve et Larose, Paris, 221 p.
- Muylle, H., Van Bockstaele, E., De Loose, M., 2004.** AFLP analysis: protocols, applications, and prospects. *Methods in molecular biology*, 260, 223-238.
- OIHABI A., 1991.** Etude de l'influence des mycorhizes à vésicules et arbuscules sur le Bayoud et la nutrition du Palmier dattier. Thèse de Doctorat d'Etat en sciences. Université Cadi Ayyad-Marrakech.
- on the composting of date palm (*Phoenix dactylifera* L.) by products infected by *Fusarium oxysporum* f.sp. *Albedinis*. *Advances in Environmental Biology*. 2011, 5(7): 1638-1646.**
- Quinten, M., 1996.** Contribution à la connaissance du Bayoud : les dattes ne sont pas une source de contamination. In : *Le Bayoud du palmier dattier : une maladie qui menace la phœniciculture*, Actes du Symposium, 1996.
- Phillips, R. L., Kaeppler, S. M., Peschke, V. M., 1990.** Somaclonal and gametoclonal variation. *Plant Breeding Reviews*, 6, 1-55.
- Porebski, S., Bailey, L.G., and Baum, B.R., 1997.** Modification of a CTAB DNA extraction protocol for plants containing high polysaccharide and polyphenol components. *Plant Molecular Biology Reporter*, 15(1), 8–15. <https://doi.org/10.1007/BF02772108>.
- Quiros, C. F., Truco, M. J., Hu, J., Jiang, N., 1991.** Use of arbitrary primer polymerase chain reaction (AP-PCR) in the detection of polymorphism and genetic mapping in Brassica. *Theoretical and Applied Genetics*, 82(6), 669-676.
- Rajput, S., Singh, A. K., Kumar, S., 2020.** Induction of somaclonal variation in sugarcane through in vitro culture techniques. *Sugar Tech*, 22 (4), 601-610.
- Rhouma, S., Saad, F., Ben Saad, A., Moussa, M., et Chatti, K., 2023.** Using cDNA SCoT method to identify differentially expressed genes in date palm (*Phoenix dactylifera* L.). *Plant Genetic Resources*, 20 (4), 297-303. DOI : 10.1017/S1479262123000211

Références bibliographiques

- Roldán-Ruiz, I., Dendauw, J., Van Bockstaele, E., Depicker, A., et De Loose, M., 2000.** AFLP markers reveal high polymorphic rates in ryegrass (*Lolium* spp.). *Molecular Breeding*, 6, 125–134.
- Saaidi, M., Toutain, G., Bannerot, H., & Louvet, J., 1981.** La sélection du palmier dattier (*Phoenix dactylifera* L.) pour la résistance au Bayoud. *Fruits*, 36, 241-249.
- Sedra, M. Y., Lashermes, P., Trouslot, P., Combes, M. C., et Hamon, S. 1998.** Genetic diversity in the genus *Coffea* L. using random amplified polymorphic DNA markers. *Euphytica*, 103 (2), 235-244.
- Sedra, M.H., 2003.** Le palmier dattier : base de la mise en valeur des oasis au Maroc, techniques phoénicoles et création d'oasis. Institut National de la Recherche Agronomique (INRA), Maroc. ISBN : 9981-1994-3-5.
- Sharma, A., Kumar, A., 2022.** Somaclonal variation: mechanisms, applications and limitations. *Plant Biotechnology Reports*, 16 (1), 1-15.
- Smith, B., 2023.** Optimisation des explants et des conditions de culture pour la micropropagation du palmier dattier.
- Smith, J. S., Chin, E. C., Shu, H. V., Smith, O. S., Wall, S. J., Senior, M. L., 1997.** Use of short sequence repeats for the genetic analysis of water-stressed maize. *Theoretical and Applied Genetics*, 95 (5), 833-840.
- Souna, R., El Bouhssini, M., & Boulanouar, M., 2010.** *Impact de la fusariose sur le palmier dattier au Maghreb*. *Revue de Phytopathologie Méditerranéenne*, 49(2), 123–130.
- Tounsi, L., Ennajeh, M., Vadel, A. M., Cochard, H., 2020.** Physiological and morphological adaptations of date palm to drought stress. *Plant Physiology and Biochemistry*, 152, 113–122.
- TOUTAIN G., 1967.** Le palmier dattier culture et production. Edition marocaines et internationales, 11 avril. De rabat atanger. 71p.
- Trifi, M., Marrakchi, M., et Said, A. 2000.** Genetic diversity in Tunisian fig (*Ficus carica* L.) cultivars revealed by RAPD markers. *Genetic Resources and Crop Evolution*, 47 (5), 513-520.

Références bibliographiques

- Wang, Y., Zhang, L., Chen, H., Liu, X., 2021. Somaclonal variation in rice: A comprehensive study of morphological, cytological and molecular changes. *Plant Breeding*, 140 (2), 253–264.
- Wang, Z., Weber, J. L., Zhong, G. Y., & Tanksley, S. D., 1997. Construction of a rice (*Oryza sativa* L.) genetic map with a large number of AFLP markers. *Genetics*, 148 (4), 1837–1852.
- Welsh, J., et McClelland, M., 1990. *Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers*. *Nucleic Acids Research*, 18 (24), 7213–7218.
- Williams, J. G. K., Kubelik, A. R., Livak, K. J., Rafalski, J. A., Tingey, S. V., 1990. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Research*, 18 (22), 6531-6535.
- Wrigley, G., 1994. Date palm: Morphology, physiology, production. CAB International.
- Xiong, F., Zhong, R.C., Han, Z.Q. et al. (2011). Start codon targeted polymorphism for evaluation of functional genetic variation and relationships in cultivated peanut (*Arachis hypogaea* L.). *Molecular Biology Reports*, **38**, 3487–3494.
- Yatta El Djouzi, D., 2007. *Étude de l'embryogenèse somatique chez le palmier dattier (Phoenix dactylifera L.) et caractérisation moléculaire du matériel végétal initial en vue de l'étude de la conformité des vitroplants* (Thèse de Magister, USTHB, 96 p.).
- Yatta, D., 2007. Etude de l'embryogenèse somatique chez le palmier dattier (*Phoenix dactylifera* L.)
- Yatta, D., Abed, F., Amara, B., Yakhou, M. S., et Bouguedoura, N., 2013. *Protoplast isolation from cell suspension of two Algerian cultivars of date palm ('Takerbucht' and 'Teggaza')*. In *Acta Horticulturae* (Vol. 994).
- Yatta, D., Ezzouaoui, S., Slamani, R., Bouamra, L., et Ayadi, R., 2024. *Morphologie et histologie des cals de trois cultivars de palmier dattier (Phoenix dactylifera L.) en réponse à deux milieux de culture in vitro*. *Recherche Agronomique*, 22(1), 33–49.
- ZAID A., ARIAS-JIMENEZ E.J., 2002. Date palm cultivation. F.A.O 2002
- Zaid, A. et de Wet, P.F., 2002. Date palm propagation. *Date Palm Cultivation (FAO Plant Production and Protection Paper - 156 Rev. 1)*. FAO, Rome.

Zaid, A., & Hughes, H., 1995. *Date palm tissue culture: a manual for the production of date palm plantlets*. FAO Plant Production and Protection Paper No. 121/1. Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO), Rome.

-Zehdi-Azouzi, S., Cherif, E., Santoni, S., 2021. Caractérisation des pollinisateurs de palmiers dattiers (*Phoenix dactylifera* L.) par l'utilisation de marqueurs SSR. *Journal of Genetic Resources and Crop Evolution*, 68 (3), 521-534.

-Zehdi-Azouzi, S., Cherif, E., Moussouni, S., Gros-Balthazard, M., Abbas Naqvi, S., Ludeña, B., Castillo, K., Chabrillange, N., Bouguedoura, N., Bennaceur, M., Si-Dehbi, F., Abdoukader, S., Daher, A., Terral, J.F., Santoni, S., Ballardini, M., Mercuri, A., Ben Salah, M., Kadri, K., Othmani, A., Littardi, C., Salhi-Hannachi, A., Pintaud, J.C., & Aberlenc-Bertossi, F., 2015. Genetic structure of the date palm (*Phoenix dactylifera* L.) in the Old World reveals a strong differentiation between eastern and western populations. *Annals of Botany*, 116 (1), 101-112.

-Zenchi, H and Abdoun, F., 2015. Palmier-dattier : Botanique et écologie, *Encyclopédie berbère*, 37, 6067-6076.

-Zhang, D., Gepts, P., Pastor-Corrales, M. A., 1997. The usefulness of RAPD markers for the genetic analysis of diversity in common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *Canadian Journal of Plant Science*, 77 (1), 109-115.

-Zhang, X., Li, Y., Huang, M., Zhou, Q., 2022. Genome-wide analysis of somaclonal variation in *Arabidopsis thaliana*. *Journal of Integrative Agriculture*, 21 (3), 789–801.

Annexes

Annexe1.préparation des solutions**1.1. Tampon d'extraction**

Sorbitol 0.35M / Tris 0.1M / EDTA 0.05M / Bisulfite de Na 0.5% / PH=8

Sorbitol	63.77g
Tris HCl 1M, PH8	100ml
EDTA 0.5M, PH8	10ml
QSP	1000ml

Remarque : Avant l'emploi du tampon rajouter dans la solution le busilfite

(Rajouter 5g /1000ml).

1.2. Tampon de lyse MATAB 4%

Tris 0.1M / NaCl 1.25M / EDTA 0.02M / MATAB 4% /PH=8

NaCL	73g
Tris HCl 1M, PH8	100ml
EDTA 0.5M, PH8	40ml
QSP	1000ml

Remarque : Avant l'emploi rajouter dans le tampon préchauffé au microonde le MATAB pour concentration de 4%.

(Rajouter 40g de MATAB dans 1000ml).

1.3. Tampon TE

Tris HCl 10M / EDTA 1M / PH=8

Tris HCl 10M	10ml
EDTA 0.5M	2ml
QSP	1000ml

1.4. EDTA

EDTA 0.5M / PH=8

EDTA 0.5M	46.5g
NaOH	5g
QSP	250ml

Remarque : l'EDTA se met en solution quand le PH atteint 8 et le faire autoclaver et conserver à 4° C

HCl 37%	21ml
QSP	1000ml

1.6. NaOH

NaOH	20ml
QSP	500ml

1.7. TAE

Tris	60.5g
Acide acétique glacial	14.27ml
EDTA	25ml
QSP	250ml

Remarque : si on met le TAE 50X dans l'appareil d'électrophorèse, elle se détruit donc par obligation on doit le diluer en TAE 1X par la méthode suivante ;

20ml	—————→	TAE 50X
QSP	—————→	1000ml

1.8. Tris HCl

Pour la préparation de 500ml de la solution Tris HCl on a besoin de ;

60.55g de tris qu'on le met dans 350ml d'eau distillé ultra pure après on doit ajuster le PH à 8 avec le HCl concentré et on ajuste jusqu'à 500ml bien que tous ça se fait sous la sorbonne après on le fait autoclaver et conserver à 4° C.

1.9. Chloroforme isoamylique

La référence du dosage : 24/1 :v/v

Pour la préparation de la solution chloroforme isoamylique on doit préparer la quantité de (144/6 :v/v) sous la sorbonne.

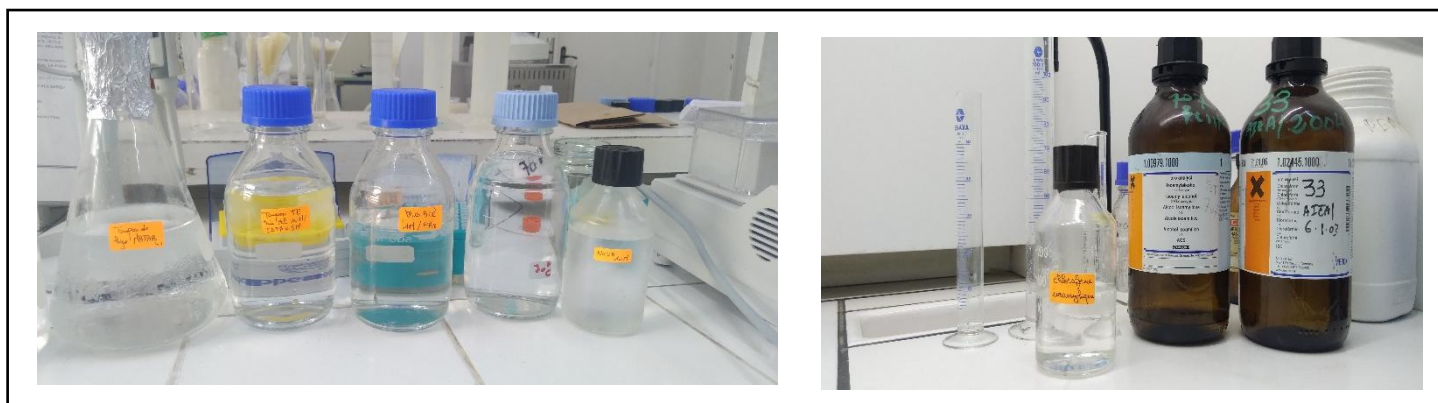


Figure 32. Préparation des solutions utilisées pour l'extraction d'ADN par le tampon MATAB 4% .

Annexe2.vérreries et appareillage utilisé



Figure 33. broyeur electronique



Figure 34. verrerie

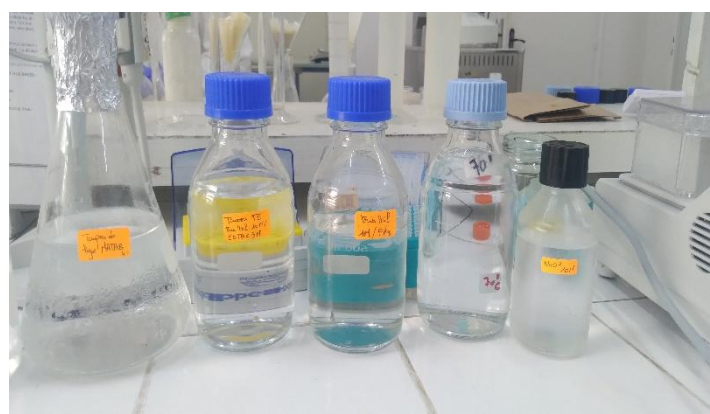
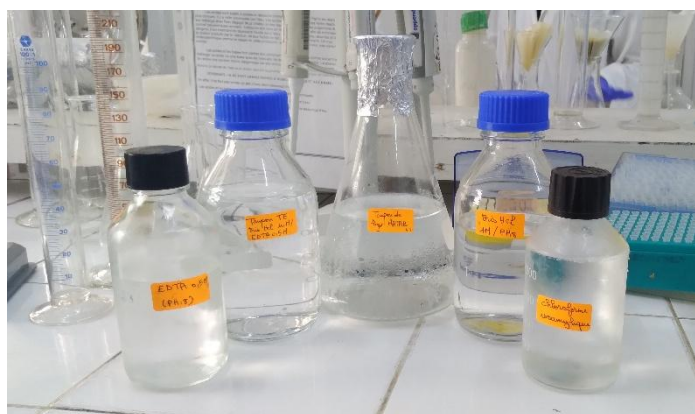


Figure35. Préparation des différentes solutions pour l'extraction d'ADN



Figure 36. Centrifugeuse (Multifuge 3L-R)



Figure 37. Centrifugeuse (centrifuge 5410)



Figure 38. Appareil de Bain-Marie



Figure 39. Thermomix (Eppendorf compact)



Figure 40. appareil BIO RAD

République Algérienne Démocratique et Populaire
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique
Université Saad Dahleb Blida 1



Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie
Département de Biotechnologie et Agroécologie

Mémoire de fin d'étude

En vue de l'obtention du diplôme de Master Académique

Option : Biotechnologie et Génomique Végétale

Thème

**Analyse de la conformité génétique des vitroplants de palmier
dattier**

(*Phoenix dactylifera* L.) à l'aide de la technologie de SCoT

Présenté par :

Si-Saber Sirine

Benbrih Anfel

Date de soutenance :

08/07/2025

Soutenu devant les membres de jury :

Dr Ayadi R.	MCA	USDB1	Présidente
Dr Mouas Y.	MCA	USDB 1	Examinatrice
Dr Yatta D.	Maitre de Recherche	INRAA/USDB 1	Promotrice
Dr. Bellag	Docteur	USDB1	Co-promoteur

Promotion : 2024/2025