



REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE.



MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE

SCIENTIFIQUE

UNIVERSITE DE BLIDA -1-

FACULTE DES SCIENCES DE LA NATURE ET DE LA VIE

DEPARTEMENT DE BIOTECHNOLOGIES

MEMOIRE DE FIN D'ETUDE

En vue de l'obtention du diplôme de master Académique

Option : Biotechnologie végétale

THEME

**Régénération des protoplastes par embryogénèse
somatique chez le palmier Dattier (*Phoenix dactylifera L.*)**

Présenté par :

Naceur Bessma

Heraoui Meriem

Devant le jury composé de :

Mme Benrebiha.F.	Pr	Univ Blida 1	Présidente
Mr Derouiche.B	MAA	Univ Blida 1	Examineur
Mme Kebour.D	MCA	Univ Blida 1	Promotrice
Mme Yatta.D	Directrice	INRAA	Co-promotrice

Promotion : 2015-2016

Remerciements

Oh ! Combien fut enrichissante cette expérience, qui au départ paraissait comme une simple activité routinière. Alors, qu'elle fut notre surprise quant au fur et à mesure de l'évolution de notre travail, nous mesurions le fossé qui nous séparait de cette masse de connaissance à combler pour parvenir à finir notre mémoire. C'est au contact de la dure réalité de la recherche scientifique que nous avons mesuré combien le chemin est ardu. Et c'est grâce à des personnes qui se consacrent totalement au savoir, sans lesquelles nous n'aurions pas pu traverser les obstacles naturelles, pour arriver à mener à terme ce travail. C'est à ces personnes précisément que nous souhaitons présenter nos remerciements.

Nous tenons vivement à exprimer notre profonde reconnaissance et gratitude à Madame Yatta Djamila, chargé de recherche et directrice de la division biotechnologie et amélioration des plantes, qui malgré son énorme charge professionnelle n'a ménagé aucun effort pour nous aider et faire preuve de son aimable bienveillance à diriger ce travail. Nous lui présentons nos sincères remerciements pour sa patience, ses conseils, ses orientations ainsi que ses qualités humaines et sa bonne humeur tout au long de se travail. Son encadrement était des plus exemplaires, nous souhaitons qu'elle puisse trouver ici notre reconnaissance pour l'ampleur de ses connaissances, nous tenons à l'assurer de notre admiration.

Nous exprimons également nos remerciements particulièrement à Madame Kabbour Djamila professeur au département de biotechnologie à l'université Saad Dahleb Blida pour ses orientations et ses conseils et pour les connaissances qu'elle nous a transmis. Nous souhaitons vivement continuer à bénéficier de son expérience et son aide pour nos travaux ultérieurs.

Nous tenons à exprimer toute notre gratitude et nos remerciements les plus profondes à tout le personnel du laboratoire C.I.V de l'INRAA, en particulier Mr Amara Belkacem, Mr Yakho Med. Said, Mme Djemmali Lamia et Belouad Dalia pour leur sympathie et leur gentillesse et surtout pour leur aide. Grâce à eux nous avons beaucoup appris.

Nos vifs remerciements vont également à Mme Benrbiha pour l'honneur qu'elle nous a fait de présider notre jury et à Mr Derouich.B notre examinateur, nous lui remercions d'avoir accepté de juger ce travail. Nous sommes convaincus que leurs judicieuses remarques nous seront d'une grande utilité.

Par la même occasion, nous remercions M^{elle} Ezzouaoui Sanaa pour son aide, ses conseils et son encouragement, ainsi qu'à toutes les personnes qui ont contribuées de près ou de loin pour le bon déroulement de ce travail, Merci à vous tous.

Dédicaces

A ma mère

Affable, honorable, aimable, Tu représentes pour moi le symbole de la bonté par excellence, la source de tendresse et l'exemple du dévouement, qui n'a pas cessé de m'encourager et de prier pour moi. Ta prière et ta bénédiction m'ont été d'un grand secours pour mener à bien mes études. Aucune dédicace ne saurait être assez éloquente pour exprimer ce que tu mérites pour tous les sacrifices que tu n'as cessé de me donner depuis ma naissance, durant mon enfance et même à l'âge adulte. Tu as fait plus qu'une mère puisse faire pour que ses enfants suivent le bon chemin dans leur vie et leurs études. Je te dédie ce travail en témoignage de mon profond amour. Puisse Dieu, le tout puissant, te préserver et t'accorder santé, longue vie et bonheur.

A mon père

Aucune dédicace ne saurait exprimer l'amour, l'estime, le dévouement et le respect que j'ai toujours eu pour toi. Rien au monde ne vaut les efforts fournis jour et nuit pour mon éducation et mon bien être. Ce travail est le fruit de tes sacrifices que tu as consentis pour mon éducation et ma formation. Je te remercie pour tes valeurs nobles et pour ton soutien permanent. Puisse dieu te procurer bonne santé et longue vie.

A mes frères

Un remerciement particulier et sincère pour tous vos efforts fournis, votre amour et votre soutien. Les mots ne suffisent guère pour exprimer l'attachement, l'amour et l'affection que je porte pour vous. Que ce travail soit un témoignage de ma gratitude et mon profond respect.

A mon binôme Meriem

Je te remercie infiniment pour les moments agréables que nous avons partagés durant cette expérience, merci pour ta sagesse, ta sincérité, tes soutiens, tes conseils et ton amour. Je te souhaite tout le bonheur qui puisse exister.

*Une dédicace particulière à mes camarades de classe **Lakhel Riadh** et **Oukal Ryma**, vous avez toujours trouvez les mots pour m'encourager et me soutenir dans les moments les plus durs. Je vous remercie infiniment*

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

**Aimablement,
Bessma.**

Je dédie ce mémoire à :

Mes parents

*A **mon très cher père**, qui peut être fier et trouver ici le résultat de longues années de sacrifices et de privations pour m'aider à avancer dans la vie. Puisse Dieu faire en sorte que ce travail porte son fruit ; Merci pour les valeurs nobles, l'éducation et le soutien permanent venu de toi.*

*A **ma très chère mère**, qui a œuvré pour ma réussite, de par son amour, son soutien, tous les sacrifices consentis et ses précieux conseils, pour toute son assistance et sa présence dans ma vie, reçois à travers ce travail aussi modeste soit-il, l'expression de mes sentiments et de mon éternelle gratitude.*

Mes frères

Je vous remercie à travers ce mémoire pour vos encouragements et votre aide dans les moments difficiles de cette vie, je vous souhaite un avenir radieux plein de réussite. Que dieu vous accorde santé et prospérité.

A mes tantes et mes oncles

Pour toute l'affection qu'ils m'ont donnée et pour leurs précieux encouragements.

Mon binôme et toute la famille Naceur

*Je te considère comme ma grande sœur, Je te remercie **Bessma** pour tous les moments inoubliables qu'on a partagé ensemble, pour tous tes conseils, ta tendresse et ta sagesse. Je te souhaite une longue vie pleine de réussite.*

À toutes mes amies et mes enseignants

Une spéciale Dédicace à ma très chère amie et ma sœur de

cœur °Ryma° À toute ma Famille

A toute la promotion de Biotechnologie végétale 2015-2016

Vous qui m'admirez tant, soyez sûrs que ce travail est le résultat de votre confiance en moi. Soyez-en remerciés.

Meriem

Résumé

L'objectif de ce travail est de régénérer des protoplastes par l'embryogénèse somatique chez le palmier dattier (*Phoenix dactylifera L.*). L'importance de l'application d'embryogénèse somatique en culture des tissus sert nécessairement à la préservation de notre phoeniciculture.

Des souches de cals friables embryogènes de trois cultivars Deglet Nour, Takerboucht et Tegaza ont été utilisées pour l'obtention de la suspension cellulaire, cette dernière a été établie sur le milieu de culture P₅ contenant 5mg/l de picloram.

Des protoplastes ont été isolés à partir des suspensions cellulaires embryogènes sous l'action de la combinaison enzymatique (cellulase 2% et Hémicellulose 6%). Cette solution a donné de meilleurs résultats et confirme les travaux obtenus au sein de l'équipe du laboratoire biotechnologie et amélioration des plantes de l'INRAA.

Les protoplastes obtenus ont été mis en cultures sur le milieu PcM₂ (couche nourricière) contenant tous les éléments nutritifs nécessaires pour la régénération des protoplastes et qui sont semblable à ceux des cellules et des tissus en cultures. Lors de la reconstitution des parois, les cellules des protoplastes prennent une forme ovale et se divisent intensément induisant la formation des petits cals embryogènes.

Après un mois de mise en culture sur la couche nourricière, les micros cals obtenus ont été transférés sur un milieu M₁₀₀ qui permet leur développement en cals. Les cals sont ensuite transférés sur un milieu dépourvu de régulateurs de croissance GMN₂₀₀ qui a permis leur évolution en embryon.

Les embryons néoformés germent et évoluent en plantules feuillées, après leur germination, ils sont ensuite transférés sur le milieu GMP contenant de l'AIB pour leur développement rapide en plantules et leur enracinement.

Mots clés : palmier dattier, embryogénèse somatique, protoplastes, régénération de protoplastes, micro cal embryogène, couche nourricière, suspension cellulaire.

Abstract

The objective of this work is to regenerate protoplasts by the somatic embryogenesis in the date palm (*Phoenix will dactylifera L.*). The importance of the somatic application of embryogenesis in culture of fabrics is necessarily used for safeguarding of our phoeniciculture.

Stocks of friable callus embryogenic of three cultivars Deglet Nour, Takerboucht and Tegaza were used for obtaining the cellular suspension; the latter was established on the culture medium P5 containing 5mg/l picloram.

Protoplasts were isolated starting from the cellular suspensions embryogenesis under the action of enzymatic combination SE (cellulase 2% and Hemicellulase 6%). This solution gave better results and confirms the work obtained within the team.

The protoplasts obtained were put in cultures on the medium PcM2 (feeder layer) containing all the nutritive elements necessary for the regeneration of the protoplasts and which are similar to those of the cells and fabrics in cultures. During the reconstitution of the walls, the cells of the protoplasts take an oval form and divides intensely inducing the formation of the small callus embryogenesis.

After one month of setting in culture on the nurse layer, the micro callus obtained were transferred on a M₁₀₀ medium which A allows their development in callus. The callus are then transferred on a medium deprived of growth regulators GMN₂₀₀ which allowed their evolution in embryo.

The newly formed embryos germinate and evolve/move in seedlings broken into leaf, after their germination, they are the transferred on medium GMP containing from the AIB for their fast development in seedlings and their rooting.

Key words: date palm, somatic embryogenesis, protoplasts, regeneration of protoplasts, micro callus embryogenic, feeder layer, cellular suspension.

ملخص

الهدف من هذا الانجاز هو تجديد البروتوبلاست من خلال التطور الجنيني الجسدي في النخيل . أهمية تطبيق مرحلة التطور الجنيني الجسدي في زراعة الأنسجة هي الحفاظ على النخيل.

ثلاثة أصناف سلالات كالس استعملت من أجل الحصول على التحليل الخلوي. وقد أنشئت هذه الأخيرة في وسط الزرع P 5 .

تم عزل البروتوبلاست عن طريق التحليل الخلوي في مزيج من انزيمات يحتوي على 2 بالمئة سيلولاز و6 بالمئة ايمي سيلولاز. أعطى هذا المزيج أفضل النتائج.

تم وضع البروتوبلاست التي تم الحصول عليها في الوسط PCM2 الذي يحتوي على العناصر اللازمة لتجديد البروتوبلاست, و التي هي مماثلة لتلك الخلايا والأنسجة في الزرع. خلال إعادة بناء الجدران البروتوبلاست تأخذ شكل بيضوي وتنقسم بشكل مكثف محفزة على تكوين الكالس. بعد الحصول على الكالس من تجديد البروتوبلاست تم استعمال اوساط زرع مختلفة من أجل الانبات. الوسط M 100 من أجل مضاعفة الكالس والوسط GMN₂₀₀ من أجل انبات الأجنة والوسط GMP من أجل تنمية الشتلات .

الكلمات الرئيسية : النخيل , التحليل الخلوي , البروتوبلاست, تجديد البروتوبلاست, كالس, وسط غذائي .

Sommaire

Sommaire

Introduction.....	01
-------------------	----

Première partie : données bibliographiques

1. Historique et origine	03
2. Taxonomie du palmier dattier.....	03
3. L'ancêtre sauvage du palmier dattier	04
4. Morphologie du palmier dattier.....	05
5. Cycle de développement.....	07
6. L'appareil de reproduction.....	08
7. Mode de multiplication	08
8. Technique de multiplication.....	10
9. Maladie du palmier dattier.....	11
10. Distribution géographique et importance	13
11. Importance socio-économique du palmier dattier.....	15
12. Production.....	16
13. Ecologie du palmier dattier.....	18
14. Etat de la diversité génétique du dattier	18
15. Notion de cultivars	19
16. Culture de cellule de protoplastes.....	19
17. Caryotype	24

Deuxième partie : Matériel et méthodes

1. Etablissement de l'embryogenèse somatique à partir des protoplastes.....	25
2. Culture des protoplastes.....	30
3. Régénération des protoplastes.....	31

Troisième partie : Résultats et discussion

1. Etablissement de l'embryogenèse somatique à partir des protoplastes.....	35
2. Régénération des protoplastes	47
Conclusion.....	61

Références bibliographiques

Annexes

Liste des figures

Figure 01 : schéma du palmier dattier (d'après Munier, 1973).....	06
Figure 02: a : Le premier symptôme du bayoud (Hakkou et <i>al.</i> ,2011).....	12
b : Stade final de la maladie (Hakkou et <i>al.</i> ,2011)	
Figure 03 : Distribution géographique du palmier dattier dans le monde.....	13
(Sakin Abdrabo ,2013)	
Figure 04 : Répartition du genre Phoenix.....	13
(Gros-Balthazard et <i>al.</i> , 2013d'après Barow (1998) et Henderson (2009).	
Figure 05 : Carte de l'Algérie indiquant les.....	15
différents secteurs avec des palmiers dattiers, les secteurs inscrit en rouge sont ces zones infestés par le bayoud et les secteurs inscrits en vert les zones non infestées. (Bouguedoura et <i>al.</i> ,2015)	
Figure 06 : Production mondiale de dattes	17
(chambre algérienne du commerce et d'industrie., 2015, ministère de l'agriculture, service des statistique Mr Ait Ouarrebe)	
Figure 07 : La production de dattes en Algérie	18
Figure 08 : Les différentes étapes de la suspension cellulaire.....	26
(Photo personnelle.,2016.	
Figure 09 : Stérilisation de la solutions enzymatique sous.....	28
la hotte à l'aide d'une pompe à vide.(Photo personnelle.,2016)	
Figure 10: Les différentes étapes de la macération enzymatique.....	29
à partir des microcals.(Photo personelle.,2016)	
Figure 11: Les différentes étapes de la macérations.....	30
à partir de suspension cellulaire.(Photo personnelle.,2016)	
Figure 12 : Préparation du milieu PcM2. (Photo personnelle.,2016).....	31

Figure 13 : Distribution et stérilisation de milieu de culture	33
(A : Préparation du milieu de culture, B : L'ajustement du PH, C : Distribution du milieu de culture, D : Stérilisation du milieu de culture). (Photo personnelle.,2016)	
Figure 14 : La mise en culture de la suspension cellulaire.....	35
(Photo personnelle.,2016).	
Figure15 : Cal embryogène dissocié en petits groupes cellulaires(Grx40).....	37
(Photo personnelle.,2016).	
Figure 16 : Cellule colorée avec fluorecine diacétate. (Photo personnelle.,2016)....	37
Figure 17 : Observation des protoplastes issus des micros cals	43
sous microscope optique (Grx40). (Photo personnelle.,2016).	
Figure18 : Observation des protoplastes issus des suspensions cellulaires	44
sous microscope optique (Grx40). (Photo personnelle.,2016).	
Figure 19 : Début de régénération des protoplastes après 72h.....	47
de mise en culture.	
Figure 20 : Cal issu de la culture de protoplastes sur le milieu pcM2.....	48
Figure 21 : (A : transfère des cals dans le milieu M ₁₀₀ ; B : cals fiable sous loupe)..	49
(Photo personnelle.,2016).	
Figure 22 : Cals embryogènes après 8 semaines d'induction sur le milieu M ₁₀₀	50
(Photo personnelle.,2016).	
Figure 23 : (A : cals développé dans le milieu M ₁₀₀ après la 3 ^{ème} subculture.....	51
B+C : cals misent dans le milieu M ₁₀₀ après la 5 ^{ème} subculture) . (Photo personnelle.,2016).	
Figure 24 : Obtention des embryons et leurs germination.....	52
(Photo personnelle.,2016).	
Figure 25 : L'apparition des embryons nodulaires après deux.....	53
repiquages successifs (Photo personnelle.,2016).	
Figure 26 : La multiplication des cals et leurs développements.....	55

en embryons et touffes d'embryons % chez les trois cultivars (DN, TKB, TGZ).

Figure 27 : les jeunes plantules repiquées dans le milieu GMP.....56

(Photo personnelle.,2016)

Figure 28 : Développement en plantules chez les différentes souches.....57

des cultivars (DN, TKB, TGZ).

Liste des tableaux

Tableau 01: Composition de la solutions enzymatique.....	27
testée (pour 100ml de solution).	
Tableau 02 : Les différentes étapes appliquées tout au long de la période.....	35
de culture et prolifération des cals.	
Tableau 03 : Influence du génotype , du matériel de base et de la solution.....	42
enzymatique SE ₁ sur le rendement en protoplastes ($\times 10^6$ /g) chez DN, TKB et TGZ.	
Tableau 04: La régénération des protoplastes et le développement des cals chez les..	54
cultivars (DN, TKB, TGZ).	
Tableau 05: Le développement des cals en plantules et touffes de plantules	56
chez les génotypes (DN, TKB, TGZ).	

Liste des abréviations

2,4-D : Acide 2,4-Dichlorophénoxyacétique.

µm : Micro mètre

AIB : L'acide indole butyrique

APG III : Angiosperm Phylogeny Group

DN: Deglet Nour.

FAO: Food and Agriculture Organization

FDA : Fluorescéine Di Acétate.

INRAA : Institut National de Recherche Agronomique d'Algérie.

IPA : Isopentyl-adénine.

M₁₀₀ : Milieu solide contenant 100mg/l de 2,4-D.

Mhz : Méga hertz.

MS : Murashige et Skoog (1962).

P_{12.5} : Milieu solide avec 12,5mg /l de Picloram.

P₅ : Milieu liquide de suspension cellulaire avec 5mg/l de Picloram.

pH : Potentiel d'hydrogène.

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

SCE : Suspension cellulaire embryogène.

SE : Solution enzymatique.

TGZ : Tegaza.

TKB : Tekerboucht

xg : L'accélération due à la force centrifuge.

Introduction

Introduction

Le palmier dattier *phoenix dactylifera L.* , appartenant à la famille des Arecaceae, est une espèce largement cultivée pour ses multiples usages et ses services écosystémiques, en particulier pour ses fruits comestibles et pour sa capacité d'adaptation aux conditions des climats arides les plus sévères **(Ben aïssa., 2008)** .Il constitue le pivot de l'économie rurale des oasis sahariennes. **(Chabane., 2007; Yatta.,2007).**

Le palmier dattier demeure une ressource vitale dans les zones arides et semi-arides. Il fut propagé en dehors de son air de culture non seulement pour ses fruits mais aussi pour ses intérêts culturels et ornementaux. **(Daher meraneh, 2010).**

Les fruits du dattier constituent un aliment végétal assez complet, riche en glucide, en élément minéraux et en quelques vitamines indispensable au bon fonctionnement de l'organisme humain **(Bouna., 2002).**

La production mondiale en fruit des palmiers dattiers est variable mais a une grande importance économique **(Aberlenc-bertossi., 2012)**. L'Égypte est le premier pays producteur mondial de dattes avec environ 1 300 000 tonnes ce qui correspond à 18,5% de la production mondiale **(FAO., 2013)**.

L'Algérie est un pays phoenicicole possédant un patrimoine génétique extrêmement riche et varie. La production de datte en Algérie a connu une hausse avec plus de 8 500 000 de quintaux qui s'est corrélée avec le roulement alternatif du palmier dattier, des pratiques culturelles, des risques climatiques, et de la région de la culture. **(Bouguedoura et al.,2015).**

Le palmier est une espèce hétérozygote, monocotylédone pérenne confortée a deux problèmes majeurs, le vieillissement du verger phoenicicole qui limite le nombre de rejets disponibles, et les maladies dont la plus redoutable est le Bayoud .

La fusariose vasculaire du palmier dattier (*Phoenix dactylifera L.*) causée par *Fusarium oxysporum fsp albedinis (F.o.a.)* présente une menace permanente pour de nombreux régions phoenicicoles de l'Afrique du Nord, notamment l'Algérie. Cette maladie sévit dans toutes les palmeraies marocaines et a progressé vers l'est pour atteindre les oasis du Sahara occidental et central Algériens entraînant ainsi d'énormes dégâts sur le plan écologique et surtout économique compte tenu de l'importance des exportations des dattes qui génèrent des apports en devises importants pour l'économie Algérienne **(Mechta et al.,2015)**. D'après Tirichine (2003) plus de trois millions d'arbres ont été détruits en Algérie à cause du Bayoud. Pour lutter contre cette maladie, plusieurs méthodes chimiques et biologiques ont

Introduction

été utilisées, ce qui n'a pas empêché cette maladie d'avancer (**Chabane., 2007**). La fusariose vasculaire du palmier dattier ne peut être combattue actuellement de manière efficace que par l'utilisation de génotypes résistants au bayoud et de bonne qualité de datte (**Belaid., 2015**), par leur multiplication rapide par culture *in vitro* et ainsi la création des cultivars améliorés (**Bougedoura., 1991**).

Nos travaux entrent dans le cadre des actions d'un programme d'amélioration et de conservation du palmier dattier par les techniques de culture *in vitro* lancé par l'équipe de la division biotechnologie et amélioration des plantes.

Le but de notre travail est la régénération des protoplastes par l'embryogenèse somatique.

Notre présent manuscrit est divisé en trois parties :

- ✓ Dans une première partie, nous présentons une synthèse bibliographique sur le palmier dattier.
- ✓ Dans la deuxième partie, nous exposons le protocole expérimental de notre travail.
- ✓ Et en fin, nous consacrons la troisième partie aux résultats et discussion.

Etude bibliographiques

1. Historique et origine

Le dattier *Phoenix dactylifera* L. est exploité puis cultivé depuis plusieurs millénaires au Moyen-Orient et dans le nord de l'Afrique (**Zohary et al., 2012**). Il s'agit d'une plante pérenne dioïque, dont les pieds femelles sont pollinisées à la main en culture. C'est « l'arbre » emblématique des régions arides et semi-arides de l'Ancien Monde.

C'est Linné, en 1734, qui a donné le nom de *Phoenix dactylifera* et a fait la description morphologique complète de cette espèce. Par ailleurs, plusieurs auteurs (**Munier., 1973 ; Djerbi., 1994 ; Peyron., 2000 ; Zaid et al., 2002**) ont décrit la signification de *Phoenix dactylifera* ; dans la l'étymologie, du mot "Phoenix" dérive de nom de Dattier chez les Grecs, qui considéraient comme l'arbre des phéniciens et "dactylifera" vient de latin "dactylus" dérivant du grec dactylis, signifiant doigt, en raison de la forme du fruit et à "fero" qui signifie "qui porte" en latin (**Munier.,1973; Linné.,1753; Popenoe.,1938; Dransfield.,2008; Gros-Balthazard et al.,2013; Littardi.,2015**).

Cependant, l'origine géographique précise du Palmier Dattier paraît très controversée, selon (**Munier., 1973 ; Pintaud et al., 2010**), est le résultat de l'hybridation de plusieurs types de *Phoenix*. Bien que, plusieurs hypothèses ont été abordées sur son origine, mais toujours ont révélé que son origine fréquemment dans la Bible (se trouve à Babylone et datent de 4 000 ans avant Jésus. Christ). Alors que selon **Newton et al., (2008)** dans la région du Golfe Persique. Depuis ce lieu d'origine, la culture du Palmier Dattier s'est étendue vers l'Est et vers l'Afrique orientale (15e siècle) et du nord (11e siècle). Dès le 20e siècle, il est introduit en Amérique par les conquêtes espagnoles et en Australie.

Par contre, la propagation du Palmier Dattier au pays du Maghreb s'est effectuée en suivant plusieurs voies : par les navigateurs arabes, qui remplaçant le commerce caravanier à travers le Sahara, et l'introduction des noyaux de dattes par les esclaves ; par la sélection paysanne dans les anciennes transactions commerciales où les dattes étaient utilisées comme monnaie d'échange ; et par la colonisation qui favorisant la plantation de la variété Deglet Nour (**Ouennoughi et al., 2005 ; Yatta.,2007**).

2. Taxonomie du palmier dattier

Le palmier dattier appartient à l'une des Plus grandes familles d'angiospermes monocotylédones, celle de Palmaceae, représentée par 200 genres et 2700 espèces, répartie en six sous familles, qui permet de la placer au 14^{ème} rang après les graminées, les liliacées et les orchidées. Le genre Phoenix comprend 14 espèces réparti dans les régions tropicales et subtropicales de l'ancien monde (**Henderson., 2009**).

Le dattier est la seule espèce de ce genre à être cultivée pour ses fruits (**Newton et al., 2013 ; Littardi., 2015**).

La classification botanique du palmier dattier d'après Marck (2006) et l'APG (2009) III est la suivante :

▪ **Classification de Mark 2006**

❖ Règne :	Plantae
❖ Sous règne :	Tracheobionta= plantes vasculaires
❖ Embranchement (division) :	Magholiophyta=angiospermes
❖ Classe :	Liliopsida=monocotylédones
❖ Sous- classe :	Arelidae
❖ Ordre :	Arecales ou palmales
❖ Sous-famille :	Coryphoideae
❖ Tribu :	Phoeniceae
❖ Genre :	Phoenix
❖ Espèce :	<i>Phoenix dactylefera</i> L.

3. L'ancêtre sauvage du dattier cultivé

Les difficultés à distinguer les espèces de *Phoenix* et à identifier les parents proches du dattier ont longtemps entravé les recherches sur son origine. De nombreuses hypothèses ont été avancées pour lui attribuer un ancêtre sauvage (**Munier., 1973**). Certains auteurs affirment que le dattier cultivé proviendrait d'une ou plusieurs formes sauvages de la même espèce (**Zohary et Spiegel-Roy., 1975**). D'autres stipulent qu'il dériverait d'une autre espèce du genre *Phoenix* : *Phoenix sylvestris*, *Phoenix canariensis*, *Phoenix atlantica* et *Phoenix reclinata* ont été proposés (**Munier., 1973**).

Une analyse génétique basée sur des marqueurs microsatellites nucléaires et un mini satellite chloroplastique a récemment réfuté les deux dernières hypothèses (**Pintaud et al., 2010**). En effet, le profil allélique du dattier apparaît fortement divergent des autres *Phoenix* indiquant que *Phoenix dactylifera* est une espèce distincte qui a été domestiquée indépendamment des autres (**Pintaud et al., 2010**).

Comprendre la domestication du dattier passe donc par l'identification de populations de dattiers sauvages si toutefois elles existent toujours. Des dattiers spontanés sont signalés dans tout son air de distribution : Sahara, sud du bassin de la mer Morte, péninsule Arabique, montagnes du Zagros, Béloutchistan (**Zohary et al., 2012**).

Les populations de *Phoenix iberica* du sud de l'Espagne pourraient également constituer des populations sauvages de *Phoenix dactylifera*.

Cependant, les formes cultivées peuvent retourner à l'état sauvage et s'y maintenir formant des populations dites férales ou subsponsanées. Ainsi, après leur abandon, certaines palmeraies peuvent avoir pris l'aspect de peuplements naturels.

▪ Classification phylogénétique 2009

❖ Clade :	Angiospermes
❖ Clade :	Monocotylédones
❖ Clade :	Commelinidèe
❖ Ordre :	Arecales
❖ Famille :	Arecaceae
❖ Sous-famille :	Coryphoideae
❖ Tribu :	Phoeniceae
❖ Genre :	Phoenix
❖ Espèce :	<i>Phoenix dactylefera</i> L.

4. Morphologie de palmier dattier

4.1. L'appareil végétatif

4.1.1. Le stipe ou tronc

Le tronc, perpétuellement en structure primaire quels que soient son âge et sa taille, est appelé stipe (**Bouna., 2002**). Le stipe est droit et élancé, avec une couronne de feuilles à son sommet. Les ramifications de base sont appelées rejets et celles en hauteur gourmands. Les gourmands ont un développement limité, alors

que les rejets présentent une croissance indéfinie et peuvent fleurir et produire à leur tour de nouvelles ramifications basales (Zaid., 2002).

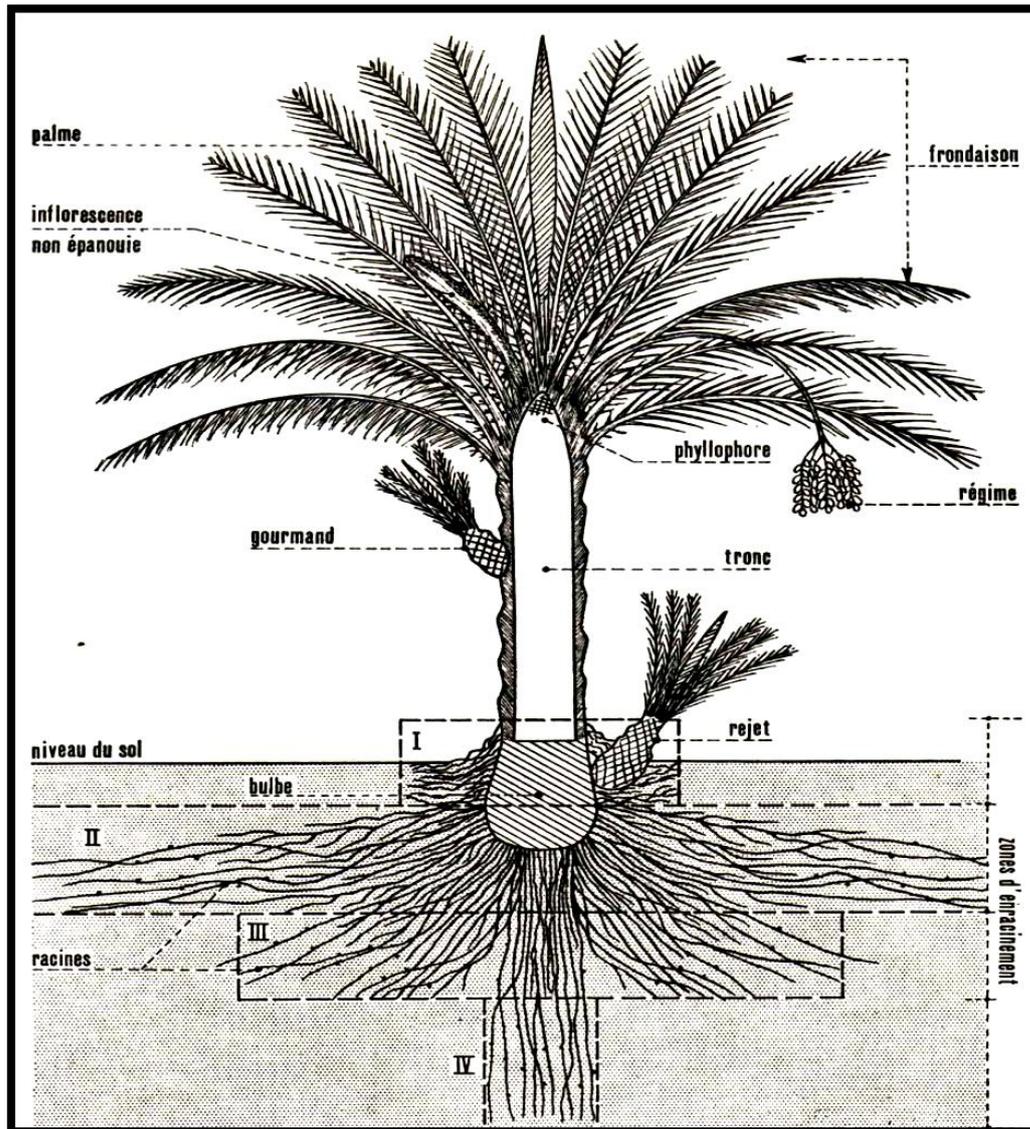


Figure 01 : schéma du palmier dattier (d'après Munier, 1973).

4.1.2. Les bourgeons

A l'aisselle de chaque palme, se trouve un bourgeon axillaire qui peut se développer pour donner naissance à un rejet, à la base du stipe ou aérien attaché au tronc, dénommé vulgairement "rekeb" dans la partie basale de l'arbre ou une inflorescence dans la partie supérieure. La plupart des bourgeons axillaires végétatifs finissent par avorter durant la phase juvénile du palmier. Le bourgeon apical ou terminal est responsable de la croissance en hauteur du palmier et du développement des feuilles et de bourgeons axillaires.

4.1.3. Les palmes

Ce sont des feuilles composées pennés (**Figure01**). Les folioles sont régulièrement disposées en position oblique le long du charis, les segments inférieurs sont transformés en épines. En général, les premières folioles situées au – dessus des épines sont plus longues que celles situées à l'extrémité supérieure de la palme. Durant la vie du palmier dattier, on divise les feuilles en trois types : Feuilles juvéniles, Feuilles semi juvéniles, Feuilles adultes.

4.2. Le système racinaire

La partie souterraine du dattier est formée d'un bulbe volumineux, qui émerge en partie au-dessus du niveau du sol, et à partir duquel, partent les racines. Selon Munier (1973) il existe quatre zones d'enracinement chez les palmiers dattiers dont L'extension de ces quatre zones d'enracinement est fonction de la nature du sol, du mode de culture, de la profondeur de la nappe phréatique, de la variété cultivée et de l'origine de la plante.

4.2.1. La zone de respiration

Elle est localisée dans la partie superficielle du sol, près de la base du tronc et ne dépassant pas 0,25 mètre de profondeur. Ces racine ont un géotropisme négatif et jouent un rôle de respiration.

4.2.2. La zone à racine de nutrition

Ces racines présentent une faible inclinaison au fur et mesure de l'éloignement du stipe, Elles se développent dans un horizon allant de 40 cm à 100 cm de profondeur.

4.2.3. La zone supérieure à racine d'absorption

Cette zone se situe dans un horizon qui va de 100 cm à 180 cm de profondeur.

4.2.4. La zone inférieure à racine d'absorption en profondeur

L'importance de cette zone dépend de la profondeur de la nappe phréatique (**Munier.,1973; Peyron.,2000; Meraneh.,2010**).

5. Cycle de développement

Selon Belguedj (2002), le palmier dattier en Algérie comporte généralement quatre phases de développement :

- ❖ **Phase jeune** : Depuis la plantation jusqu'aux premières productions. Cette phase dure entre 5 à 7 années.
- ❖ **Phase juvénile** : C'est la pleine production. Elle se situe autour de 30 ans d'âge du palmier.
- ❖ **Phase adulte** : Autour de 60 ans d'âge, début de décroissance de la production.
- ❖ **Phase de sénescence** : 80 ans et plus. Chute de la production.

6. L'appareil de reproduction

6.1.1. Les organes floraux

Le palmier dattier étant dioïque, les fleurs mâles et femelles sont portées par des individus différents, il est nécessaire d'attendre 6 à 8 ans l'induction des premières floraisons pour connaître le sexe des plantes (**ABERLENC-BERTOSSI., 2012**). La différenciation morphologique entre ces organes est extrêmement précoce puisque celle-ci est déjà marquée lorsque l'inflorescence ne mesure que 10 mm de longueur (**DAHER., 2010**).

6.1.2. L'inflorescence femelle

Les inflorescences femelles présentent une élongation marquée du pédoncule ainsi qu'une bilatéralisation. Les inflorescences et les épillets sont plus longs (**Ghillot., 2010**).

6.1.3 L'inflorescence mâle

L'inflorescence mâle à une forme conique et le nombre de méristèmes floraux est plus élevé sur les épillets (**Zango.,2011**).

6.1.4. Le fruit

Les dattes ne sont pas que le résultat au développement d'un carpelle après fécondation de l'ovule (**Bouguedoura .,1991**). Ces fruits sont portés par des régimes qui sont le résultat de l'évolution de l'inflorescence femelle portée par un individu femelle.

La datte est une baie avec une seule graine ovoïde (18-110) mm avec un poids qui varie entre 2 et 60g (**Zaid.,2002**).

7. Mode de multiplication du palmier dattier

Le palmier dattier peut être propagé naturellement par deux manières : la multiplication par semis et la plantation de rejet. L'utilisation des techniques de

culture de tissus est une troisième méthode récemment développée, qui est maintenant adoptée par les laboratoires commerciaux **(Raj Bhansail.,2010)**.

7.1. Multiplication par semis

La multiplication du palmier dattier par semis produit des descendants non conforme aux pied mère. Composé théoriquement de 50% de pied mâle et 50 % de pied femelle **(El bakr.,2013)**.

C'est une technique de multiplication très facile et rapide. Elle demeure la technique la plus anciennement pratiquée par les agriculteurs mais elle présente beaucoup d'inconvénients.ependant ce mode de propagation n'est pas rentable **(Kriaa et al.,2012)** et ne permet pas le maintien des palmeraies et la production de fruit. Malgré ces contraintes, il est utilisé pour obtenir des cultivars qui peuvent se révéler d'excellentes qualité **(Bougedoura.,1991)**.

7.2. Multiplication par rejet

C'est une multiplication végétative, qui permet une reproduction pratiquement conforme et une transmission génétique fidèle des caractères des parents **(SEDRA 2003)**.

Ce mode de multiplication est le plus stable, car il constitue une copie conforme du pied mère en conservant intégralement les aptitudes de ce dernier, en ce qui concerne le genre, la qualité du fruit, la précocité et l'aptitude à donner des rejets **(MUNIER, 1973)**.

Le matériel utilisé est le rejet prélevé de la partie basale du stipe ou se développe le tronc lui-même **(MUNIER, 1973)**. Les rejets sont produits pendant la phase de jeunesse de l'arbre.

7.3. La multiplication par voie végétative (micropropagation)

La méthode de multiplication par in vitro (CIV) est l'une des biotechnologies végétales qui permet la multiplication à l'identique et en masse des espèces végétales. Elle permet en outre la multiplication des tissus indemnes et résistants aux maladies comme la fusariose. Cependant la réussite de cette technique nécessite des conditions d'asepsie rigoureuse ainsi qu'une parfaite maîtrise de la

technique (Yatta.,2007 ;Bougedoura.,2012). A ce jour en Algérie plusieurs cultivars ont pu être multipliés par CIV, embryogenèse somatique, organogenèse ou par protoplastes (Yatta.,2007; Abed.,2012; Yatta et al.,2013;Abed et al.,2014). Les premiers pas de culture in vitro sont dus à un allemand Herlandt en 1902, il a pu faire survivre durant plusieurs mois de petits amas cellulaires mais il n'y avait pas de multiplication cellulaire (Augé et al.,1989). Mais la date qui marque réellement le début de la culture in vitro est 1932 avec les travaux de White à l'USA sur la croissance indéfinie en milieu liquide de racines de tomates.

Des 1934 Gautheret obtient à partir de prélèvement de tissus cambiaux d'arbre des proliférations de tissus qui malheureusement, ne dépassèrent pas huit mois (Morel.,1952) (Scriban.,1988). Après les travaux de White en 1932 sur le tabac, Limasset et Cornuet en 1949 qui publiaient leurs observations sur l'absence de virus dans les méristèmes de tabac virosé. Morel et Marten, en 1952 mirent à profit ces observations et entreprirent de mettre en culture in vitro des méristèmes de Dahlia et de pomme de terre atteints de maladies à virus.

A partir de ces méristèmes, ils obtinrent in vitro des plantes entières qui furent remises en culture normale et se révélèrent saines au contrôle (Augé et al., 1989).

8. Techniques de multiplication

8.1. L'organogenèse

Chez les végétaux, l'organogenèse est assurée par les méristèmes qui sont constitués de massifs de cellules non différenciées, conservant la capacité de se divisé activement. L'obtention de plantules via cette technique suppose l'initiation des bourgeons pour l'établissement des souches réactives, leur multiplication, élongation et enracinement et, l'acclimatation des plantules (Anjarne et al.,2005).

8.2. Embryogenèse somatique

L'embryogenèse somatique est le processus par lequel les cellules somatiques se développent en embryons somatiques après une série de changements biochimiques et morphologiques, et les embryons formés soient morphologiquement semblables aux embryons zygotiques à partir duquel se développent une pousse et une racine (Mazri et Meziani.,2015). elle est considérée comme le processus de

régénération le plus efficace pour la micropropagation du palmier dattier (**Al-Khayri.,2016 ; Yatta.,2016**) .

Il existe deux voies d'embryogenèse somatique

- L'embryogenèse somatique directe : elle s'opère à partir de cellules embryogénèses individualisées au sein de l'explant primaire sans passage par le stade cal.
- L'embryogenèse somatique indirecte : elle est induite après une phase de multiplication cellulaire. Cette prolifération permet la formation de cals ou de suspensions cellulaires embryogène qui induiront la néoformation des embryons somatiques. Ce sont ces derniers qui se développent en plants (**Khalifi.,2012**).

Dans les années 1970 la recherche a été entreprise chez le palmier dattier, Schroeder (1970),Reuveni et al 1972, Bouguedoura (1979) sur les fragment de cœur de rejet n'ont pas permis la formation d'embryon somatique. Ce n'est qu'à partir de l'année 1979 que Lisserd obtient les premiers résultats d'embryogenèse somatique à partir de bourgeons latéraux de cœurs de rejets. Puis de nombreux travaux utilisant divers méthodes furent rapporté (**Shorma et al.,1984;Yakoub-Bougdal.,1984;Abotnil.,1986;Mater.,1986;Lachqer Sillou.,1989;Saka et Abed.,1989;Fergani.,1998;Yatta.,2007;Masouni.,2008**) sur le fragment de cœur de rejet.

9. Maladie du palmier dattier (bayoud)

La culture du palmier dattier est sujette à divers problèmes phytosanitaires qui entravent son développement et son extension. Le Bayoud, causée par un champignon *Fusarium oxysporum* fsp *albedinis* (**Killian et Maire., 1930**), est la maladie la plus destructive et la plus menaçante dans l'Afrique du nord. Elle est répandue surtout au Maroc et dans une grande partie des palmeraies de l'Algérie (**Pereau Leroy., 1958 ; Djerbi., 1982 ; Brac et Benkhalifa., 1991**). En effet, au cours d'un siècle, il a détruit plus de dix millions de palmiers au Maroc (**Pereau – Leroy., 1958 ; Sedra., 2005**) et trois millions en Algérie (**Dejerbi., 1982**). La catastrophe causée par le Bayoud ne s'arrête pas à l'érosion génétique causée par la disparition de nombreuses variétés parmi les meilleures, mais conduit également à

Etude bibliographiques

l'accentuation de la désertification et à l'appauvrissement des phoeniculteurs qui finissent par émigrer.

La maladie a commencé sa progression dans la vallée du Draa au Nord du Zagora, ensuite elle s'est propagée vers l'ouest et surtout l'est en suivant les cordons des palmeraies (**Pereau-Leroy., 1958 et Toutain., 1965**). C'est en 1898, que ce fléau atteint les palmeraies de Figuig et Bénéounif situées côte à côte des deux côtés de la frontière algéro-marocaine (**Pereau-Leroy., 1958**). Entre 1920 et 1950, la maladie a contaminé les palmeraies du Sud algérien, puis durant la période 1960-1978, elle a gagné des palmeraies du centre de Sud algérien, la région de Mzab et El Goléa (**Djerbi., 1982 ; Kada et Dubost., 1975**).

Le premier symptôme externe de la maladie s'observe sur une palme de la couronne moyenne; qui prend un aspect plombé et se dessèche selon un processus très particulier. En effet, les folioles ou les épines se dessèchent progressivement (**figure 02.a**) et prennent la couleur blanchâtre et se replient vers le rachis. Le côté dorsal du rachis est marqué d'une strie brune longitudinale, qui avance de la base vers l'apex de la fronde, et qui correspond au passage du mycélium dans les faisceaux vasculaires du rachis, puis l'attaque se généralise à l'ensemble du palmier entraînant sa mort au bout de 6 mois à 2 ans. (**figure02. b**)



Figure 02 a : Le premier symptôme du bayoud (Hakkou et *al.*,2011)

b : Stade final de la maladie (Hakkou et *al.*,2011)

10. Distribution géographique et importance

10.1. Dans le monde

Le palmier dattier est localisé dans l'hémisphère nord, là où les conditions climatiques le permettent, entre le 10^{ème} degré sud (Somalie) et le 39^{ème} degré nord (Espagne ou Turkménistan). Les secteurs les plus favorables pour cette culture sont situés entre le 24^{ème} degré et 34^{ème} degré Nord (Maroc, Algérie, Libye, Egypte, Irak, Iran, Arabie saoudite...etc.) (**Figure 03**). Le palmier dattier se trouve aussi aux Etats-Unis entre le 33^{ème} degré et le 35^{ème} degré Nord, d'autre surface négligeable pour la culture du dattier sont à l'hémisphère sud (Australie, Mexique, Argentine,... etc.) (**SakinAbdrabo,2013**) .

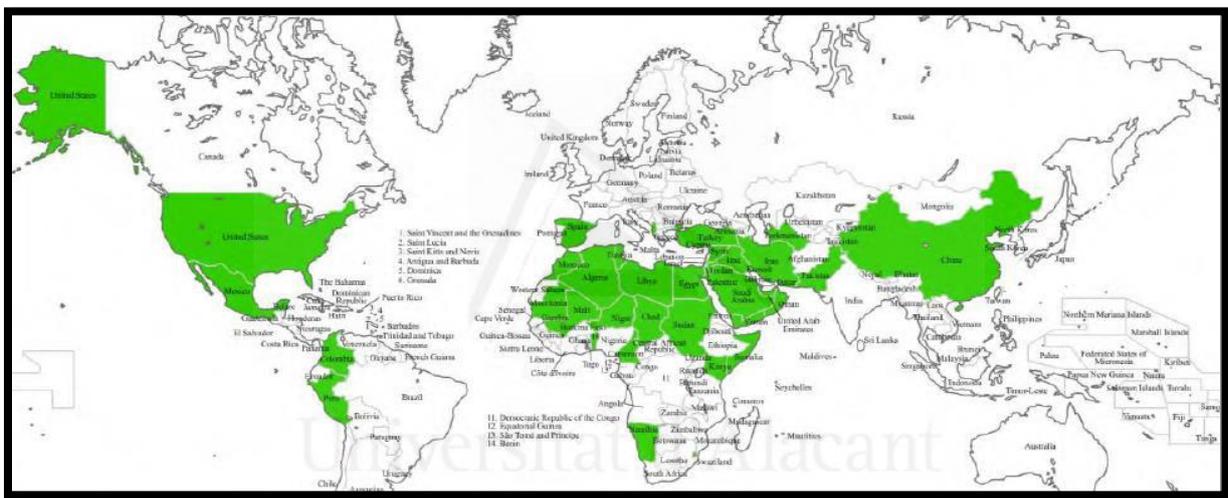


Figure 03 : Distribution géographique du palmier dattier dans le monde (Sakin Abdrabo,2013)

10.2. Dans l'Afrique

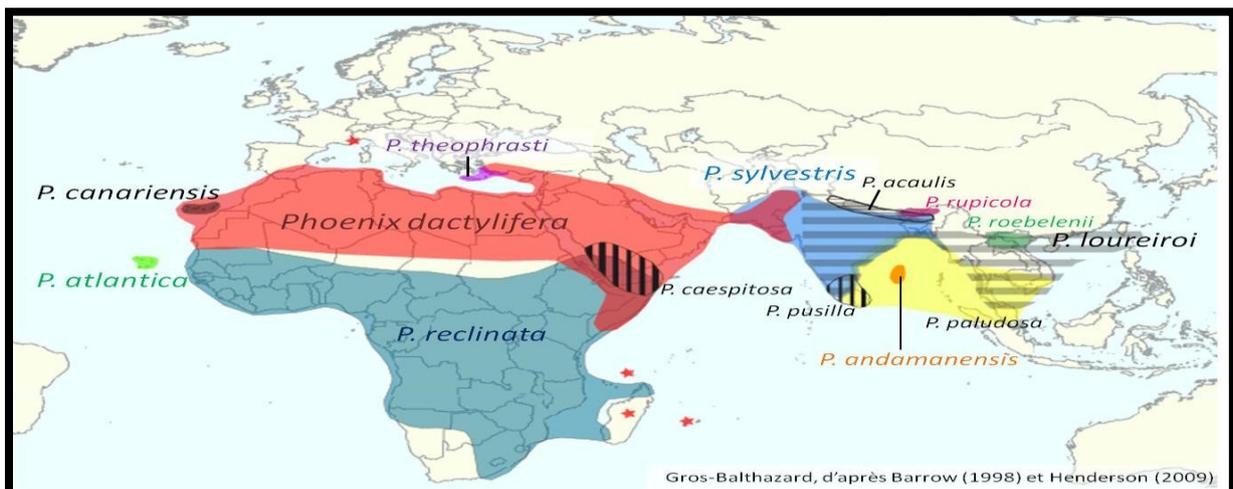


Figure 04 : Répartition du genre Phoenix (Gros-Balthazard et al., 2013 d'après Barow (1998) et Henderson (2009).

10.3. En Algérie

Selon Yatta et Bouguedoura (2013), le palmier dattier est développé dans de nombreuses oasis il est réparti dans la partie méridionale du pays, là où le climat est chaud et sec. Les oasis sont les espaces vivants qui ont été artificiellement établis au milieu d'un grand secteur aride où l'eau est présente. Dans ces derniers endroits, des ksars (un village fabriqué à partir de l'argile) ont été bâtis autour de ces dattiers ont été plantés. Ces systèmes d'oasis de production intensive sont complexes et maintenus dans un équilibre très fragile. Étant donné la géographie de l'Algérie, il est possible de définir plusieurs régions où la culture de palmier dattier est pratiquée :

- ❖ Dans les collines de montagnes d'atlas (Ksour Ouled Naïl, Zibans, et Aures), là où est implantée une chaîne d'oasis qui marque le passage du Sahara.
- ❖ Dans l'est, Zibans (Biskra), Oued Ghir, Oued Souf (EL Oued), et le bassin d'Ouargla particulièrement avec le cultivar de Deglet Noor dont la valeur marchande est élevée.
- ❖ Dans l'ouest, Saoura (Beni Abbes), le Touat (Adrar), le Gourara (Timimoun), et le Tidikelt (Reggane) qui sont relativement de basses qualités commerciales. C'est dans ce secteur où le cultivar Tekerboucht résistant au bayoud existe vraiment.

- ❖ Au centre. EL Golea, le M'zab (Ghardaïa), et Laghouat.

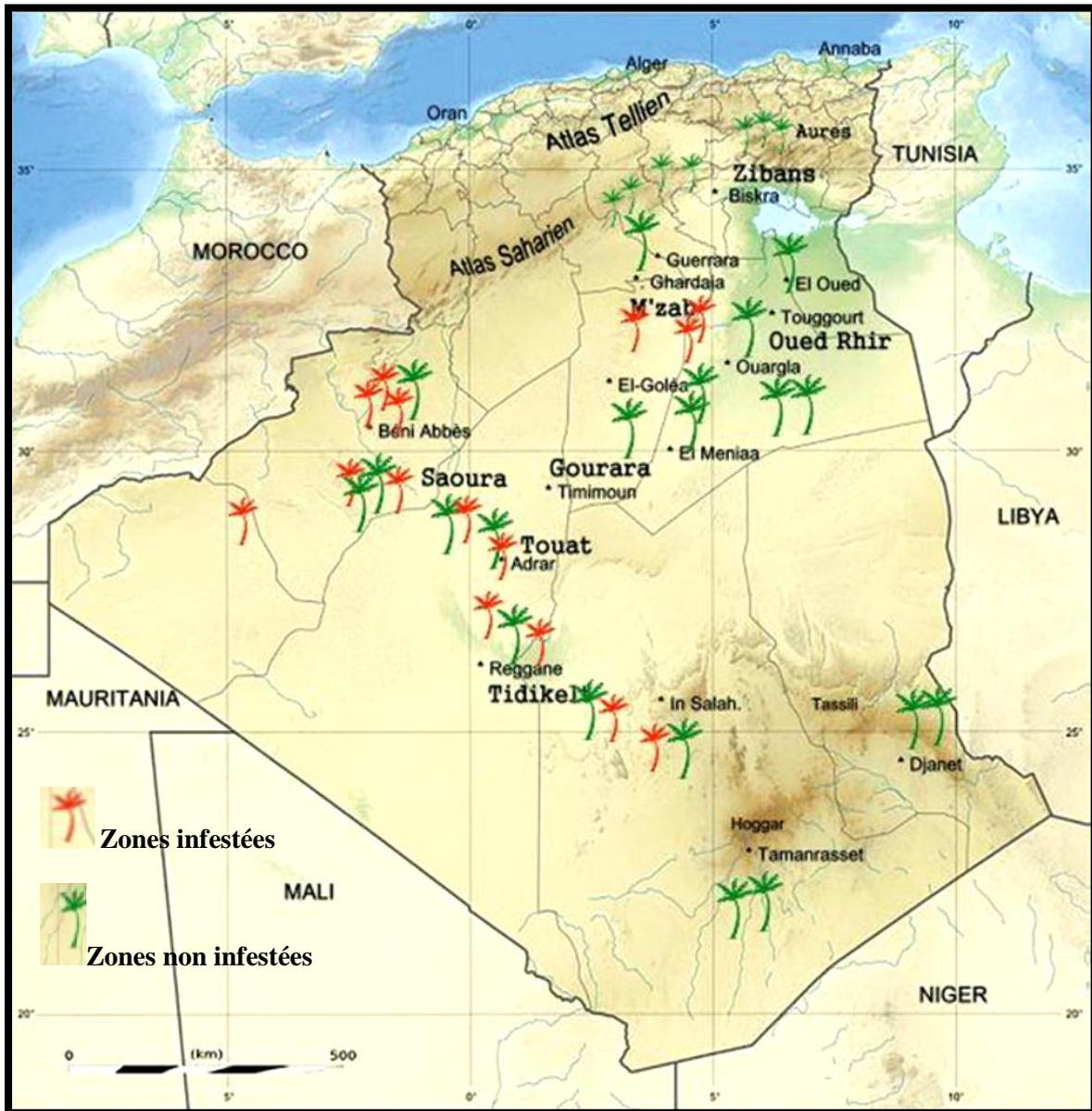


Figure 05 : Carte de l'Algérie indiquant les différents secteurs avec des palmiers dattiers, les secteurs inscrits en rouge sont ces zones infestées par le bayoud et les secteurs inscrits en vert les zones non infestées. (Bougedoura et al.,2015)

11. Importance socio-économique du palmier dattier

Le palmier dattier (*Phoenix dactylifera* L.) est l'arbre fruitier par excellence du désert ou il constitue le pivot de l'agriculture oasienne caractérisée par une stratification et une association de plusieurs cultures sous-jacentes. Aussi, le dattier présente l'immense bénéfice de lutter contre la désertification par l'interception du rayonnement solaire intense et la mise en place d'un barrage vert et productif, l'oasis. La présence de cet arbre fruitier dans ces zones lui confère un rôle

écologique indéniable en y limitant la progression des espaces steppiques et l'ensablement des terres agricoles.

Dans le milieu oasien, la culture du palmier dattier revêt une importance socio-économique permettant la subsistance de nombreuses familles dont les moyens d'existence reposent sur les produits générés directement et indirectement par cet arbre fruitier.

En effet, le palmier dattier est cultivé essentiellement pour ses dattes qui représentent la base de l'alimentation des populations oasiennes et la composante vitale dans les oasis compte tenu de leur importance nutritionnelle et économique. Les dattes sont des fruits hautement énergétiques riches en hydrate de carbone, en éléments minéraux et en vitamines en plus d'un grand pouvoir antioxydant attribué à leur richesse en composés phénoliques. Ceci permet de classer la datte parmi les fruits les plus chers au monde faisant ainsi de la phoeniciculture un des secteurs les plus rémunérateurs. A titre indicatif, une plantation qui s'étend sur un hectare peut comporter 100 pieds de palmier dont chacun peut produire jusqu'à 100 kg de dattes au cours d'une seule récolte.

12. Production

12.1. Dans le monde

La production mondiale est estimée à 7 627 624 de tonnes pour l'année 2013 dont 43,8% soit 3 343 322 tonnes proviennent de l'Afrique. L'Egypte est classée au premier rang avec une production de 1 393 760 tonnes, suivi de l'Iran au 2eme rang avec 1 049 986 tonnes et en 3eme position l'Arabie saoudite avec 1 021 263 tonnes de dattes (**Figure 06**).

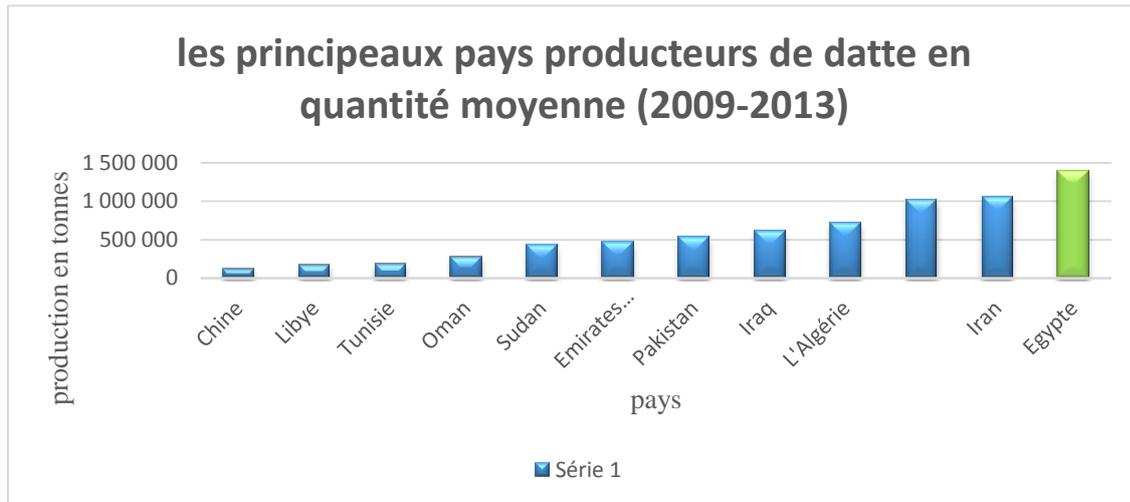


Figure 06 : Production mondiale de dattes (chambre algérienne du commerce et d'industrie., 2015, ministère de l'agriculture, service des statistique Mr Ait Ouarrebe)

12.2. En Algérie

La production de datte en Algérie change annuellement qui s'est corrélée avec le roulement alternatif du palmier dattier, des pratiques culturelles, des risques climatiques, et de la région de la culture. (Bouguedoura et al.,2015)

Selon les statistiques récentes disponibles, occupe une superficie évaluée à près de 174 000 hectares pour un nombre de palmiers estimé à plus de 18 millions d'unités, la production de dattes en Algérie a connu une hausse avec plus de 8,5 millions de quintaux marqués pour l'année 2012-2013, contre 7,8 millions lors de la campagne 2010-2011, ainsi que 6,5 millions durant la saison 2009-2010. Les régions phoenicicoles se situent généralement au sud de l'atlas saharien et couvrent 17 wilayas (en réalité 16 wilayas seulement car la wilaya de M'sila a perdu son potentiel phoenicicole).

La wilaya de Biskra est la première région phoenicicole avec 25. 6% de la superficie totale, 23,1 % du nombre total de palmiers dattiers, 37.88% de la production nationale de dattes (Figure 06). Elle est suivie par la wilaya d'El Oued avec respectivement 22%, 20,5% et 25,6%. Ces deux wilayas totalisent à elles seules 62,6% de la production nationale des dattes. (DSI.,2016)

Dans des plantations de dattes ailleurs, la production est moins importante, Et elle est de 24 % de la production nationale totale de datte. Elle se répartit comme suit : sud-ouest (15 %) et centre du sud (9 %). **(Yatta et Bouguedoura.,2014 ; Bouguedoura et al., 2015)**

Le tableau ci-dessus montre les différentes variétés existantes en Algérie avec leurs productions et rendement.

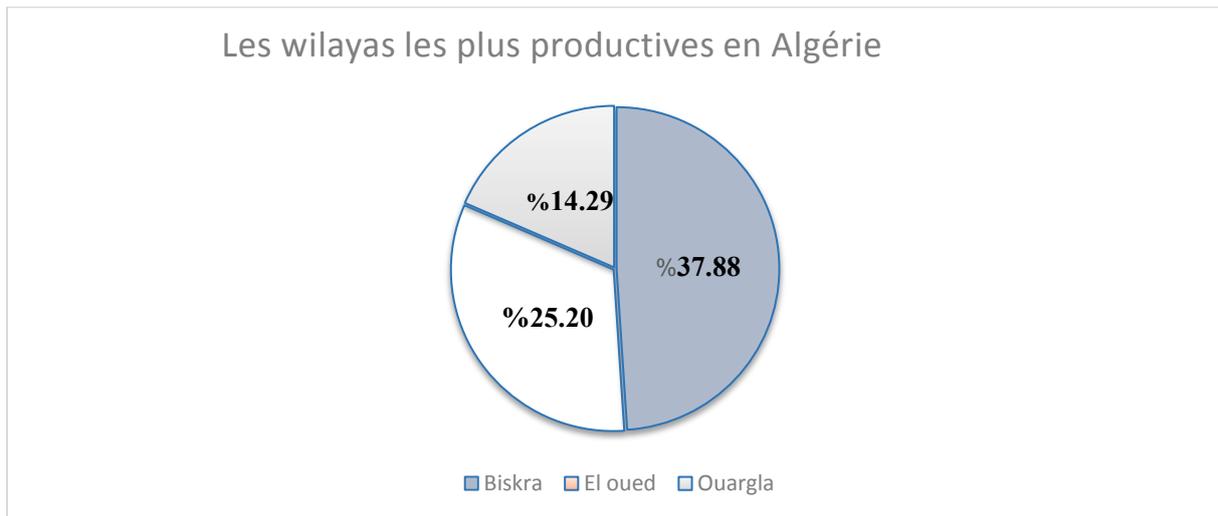


Figure 07 : La production de dattes en Algérie.

13. Ecologie du palmier dattier

Les palmiers dattiers sont distribués principalement dans les régions tropicales et Subtropicales, bien que quelques-unes peuvent être trouvées à plus hautes latitudes dans l'hémisphère sud **(RIVAS et al., 2012)**. Il offre de larges possibilités d'adaptation, C'est un arbre qui s'adapte à tous les sols. Il est sensible à l'humidité pendant la période de pollinisation et au cours de la maturation **(Munier., 1973 ; Ozenda., 2004**

C'est une espèce thermophile, sa végétation s'arrête à partir de 10 C⁰ (zéro de végétation). L'intensité maximale de végétation est atteinte à des températures de 30 à 40 C⁰. En effet, la période de maturation des fruits correspond aux mois les plus chauds de l'année **(Baaziz.,2003)**.

14. Etat de la diversité génétique du dattier

Le palmier est une plante dioïque, hétérozygote à reproduction allogame. C'est une espèce diploïde dont le nombre de chromosome est de 2n=36 (n=18). Le palmier dattier se multiplie, entre autres, par graines, produisant des hybrides et créant une diversité génétique considérable.

Les pays phoenicicoles possèdent de manière générale un patrimoine génétique extrêmement riche. Il est nécessaire pour bien rendre compte de cette richesse d'en distinguer deux formes : Le patrimoine lié à l'existence de millions de palmiers dattiers hybrides provenant de semis de graines et le patrimoine variétal provenant de la reproduction végétative. Concernant ce dernier, il nous faut préciser que, chez le palmier dattier, on appelle conventionnellement cultivar, tous les plants multipliés par propagation végétative à partir de rejets provenant initialement d'un unique hybride qui a été sélectionné. Une variété correspond donc à un clone (**Ferry et al., 1998**).

15. Notion de cultivars

Elle repose sur la description morphologique du fruit, mais de façon moins évidente, sur la description de l'arbre. L'appellation de variété ne peut être appliquée qu'aux palmiers femelles, car ils sont les seules à produire les fruits. Il est difficile de distinguer des variétés pour les palmiers mâles. D'une manière générale et pour éviter toutes confusions, il est préférable de retenir la notion de cultivar pour dénommer l'arbre, et la notion de variété pour dénommer le fruit. En Algérie, il existe plus de 1000 cultivars (**Benkhalifa., 2006**).

16. Culture de cellules et de protoplaste

16.1. Suspension cellulaire

Le terme suspension cellulaire est souvent utilisé pour décrire les cultures en suspension de cellules individuelles et d'agrégats cellulaires (**Auge et al.,1989;Yatta et al.,2014;Yatta et Bouguedoura.,2015**).

L'aération et la dispersion des cellules sont assurés généralement par les suspensions cellulaires établies en milieu liquide maintenu en agitateur à partir d'un cal friable (**El hamdouni et al.,1999; Yatta et al.,2012**). En suite l'entretien de la suspension cellulaire par repiquage régulier est absolument nécessaire, alors les embryons somatiques individualisés présentant un développement relativement synchrone qui se développe à partir d'agrégats cellulaires (**Rival et al.,1997; Yatta et Fergani.,2007;Yatta et al.,2013**) .

La régénération à partir de suspension a été réalisée avec succès chez plusieurs monocotylédones, on peut citer *Asparagus ossicimalis* (asperge) (**Steward et Mapes.,1971**) et *Lilium arboricola*(Lys)(**Krikorian et Kann.,1981**), chez les

graminées *Fennistum americanum* (millet)(**Vasil et Vasil.,1981**) ainsi que d'autre espèces et aussi chez les monocotylédones pérennes tel que le *Phoenix dactylefera L.* (**Sané et al .,2006**).

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

La suspension cellulaire possède une capacité à produire les métabolites secondaires (alcaloïdes..) caractéristiques de la plante d'origine (**Assani et al.,2005**).

Pour maintenir une suspension cellulaire, il faut vérifier régulièrement la présence de contamination et le potentiel de régénération ainsi que le taux de **croissance (Auge et al.,1989)**. Cependant la qualité d'une suspension cellulaire diminue avec le nombre de repiquages. Ceci se traduit par un risque plus élevé de contaminations. Pour réduire les problèmes liés aux repiquages, un protocole de cryoconservation qui consiste à transformer tout ou partie de l'eau cellulaire en glace, sans léser les cellules. Ceci se fait grâce à un refroidissement progressif jusqu'à -40°C qui permet aux cellules de résister ultérieurement à une congélation dans l'azote liquide (**Sané et al .,2012**).

16.2. Isolement de protoplastes

16.2.1. Plasmolyse

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

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

16.2.2. Dégradation de la paroi

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

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

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

16.3. Culture de protoplastes

Les protoplastes sont des cellules débarrassées de leur paroi squelettique. Ils conservent les potentialités des cellules végétales entières, en particulier la capacité de reformer la paroi cellulaire voire de régénérer des plantes par culture in vitro, l'absence de la paroi facilite les manipulations impossibles à réaliser avec cellules entière (**Ducieux.,2002**), car la paroi empêche les échanges cellulaires. Ils participent activement à la mise en œuvre de protocoles visant à élargir la viabilité (**Haïcour; Sihachkr.,1996**).

Les protoplastes sont un outil de valeur inestimable pour des études sur la perméabilité des ions et des solutés(Cornel et al.,1983;Rahat et al.,1983), la photosynthèse (**Chpman et al .,1983**), les phytohormones(**Chang et al.,1983**),le phytochrome(Kim et al.,1981) et l'entretien de la totipotence (**Assani et al.,2001**).

L'intérêt des protoplastes, réside dans le fait que ce sont des cellules libres isolées pouvant être soumises à des traitements mutagènes permettant de réaliser

des modifications génétiques, en vue de l'amélioration de plantes. Les potentialités de l'outil protoplastes sont immenses.

L'intérêt des protoplastes le plus cité est leur possibilités de fusionner, de produire des hybrides et des cybrides (**Haïcour ; Sihachkr.,1996**). Ils ont aussi l'avantage de produire des fusions asymétriques, c'est-à-dire des cybrides par transfert de génomes cytoplasmiques (mitochondrie et/ou chloroplastes) pour la production des plantes mâles stériles cytoplasmiques ou pour la correction d'une déficience chloroplastique. En plus les protoplastes sont un excellent système pour des études sur la génétique des cellules et même pour virologie végétales (**Haïcour et al.,2004**).

L'isolement de protoplastes a été mis en point en 1960 sur les racines des plantules de tomate. Néanmoins, c'est en 1968 que l'isolement des protoplastes à partir des plantes a été réalisé sur les parenchymes foliaires du tabac (**Takebe et al.,1968**). Nagata et Tekeb (1970) ont pu induire la division des protoplastes en cultures chez nicotiana.

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

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

Yatta et *al.*, (2013,2014 et 2015) ont isolé et régénéré des protoplastes de trois cultivars du palmier dattier (Tegeza, Deglet Nour, Tekerboucht).

16.4. Fusion de protoplastes

Les techniques de fusion de protoplastes ont été développées pour permettre l'agrégation de deux ou plusieurs protoplastes, elle aboutit à l'addition totale de trois compartiments héréditaires : nucléaire, mitochondrial et chloroplastique. Cette addition accroît le niveau de ploïdie (**GLEBA et al. 1980 ; MELCHERS et al. 1978 in DEMERLY., 1985 ; Yatta., 2016**).Il existe deux stratégies efficaces de fusion des

protoplastes : les méthodes chimiques (au polyéthylène glycol (PEG)) et la méthode électrique. La PEG est la méthode la plus utilisée pour sa facilité et son efficacité.

16.4.1. La fusion au polyéthylène glycol (PEG)

A cause des charges électrostatiques négatives présentes à la surface de la membrane plasmique, dues au majorité aux groupes phosphates et plus rarement a des protéines, les protoplastes se repoussent mutuellement (**Sihachakr.,2002 ;Yatta .,2016**).

La capacité du polyéthylène glycol (PEG) à induire la fusion cellulaire a été simultanément découverte par deux groupes de chercheurs en 1974 : kao et Michayluk(1974) au Canada et l'équipe de professeur Erickson (**Wallin et al., 1974**) en Suède. Cette substance "surface active" non ionisée provoque l'accolement des protoplastes en neutralisant les charges négatives présentes à la surface de la membrane, conduisant ainsi au contacte membranaire. La dilution de cette substance induit des perturbations au niveau moléculaire provoquant ainsi la fusion des protoplastes (**Haïcour et Sihachakr.,1996 ; Sihachakr.,2002**).

Cette méthode est la plus utilisée car elle est simple et efficace ne nécessitant aucun équipement sophistiqué.

16.4.2. La fusion électrique

L'accolement des protoplastes par voie électrique a été mis au point par Zimmermann et Scheurich (1981). Les protoplastes placés dans un milieu de très faible conductivité sont soumis à un champ électrique induit par un courant sinusoïdal de haute fréquence (0.5 à 1.5 Mhz) et non uniforme crée entre deux électrodes asymétriques. Sous effet de ce champ électrique, la répulsion naturelle qui s'exerce entre les protoplastes en raison de leurs charges négatives de surface, est levée. D'autre part, dans un champ électrique non uniforme, les protoplastes se comportent comme des dipôles électriques et migrent vers les régions à plus forte intensité c'est-à-dire au voisinage des électrodes. Au cours de la migration des protoplastes l'interaction, de leurs dipôles et la grande hétérogénéité du champ à leur voisinage, provoquent leur attraction mutuelle et la formation de chaînes de protoplastes entre les électrodes.

Après l'accolement des protoplastes, leur fusion est obtenue par l'application d'un champ électrique, qui est induit par l'envoi d'impulsion de courant continu de fort voltage (1 à 3 kV/cm) mais pendant de très brèves durées (quelque microseconde). Lorsque le champ appliqué atteint une valeur seuil, le potentiel induit provoque la formation de pores transmembranaires. Lorsque deux pores formés sur deux protoplastes accolés entrent en contact la fusion se produit (**Sihachakr.,2002**).

17. Caryotype

Le caryotype permet l'identification et le classement des chromosomes d'un individu. C'est donc la configuration chromosomique d'un sujet.

L'étude des paramètres caryologique et de l'organisation des chromosomes, peut fournir des indications évolutives. La technique classique de Feulgen permet de construire un caryotype pour chaque espèce. L'étude des caryotypes se fait généralement en métaphase mitotique où les chromosomes sont bien individualisés et présentent la meilleure morphologie. Différents paramètres interviennent dans la description de la morphologie des chromosomes : la taille, la position du centromère, la présence de satellites et les constriction secondaires. D'autres caractères sont également utilisés pour l'étude des caryotypes ; la longueur totale des chromosomes, la longueur relative des chromosomes, l'asymétrie du caryotype mesurée par l'indice d'asymétrie (IAs %), le rapport de la plus longue paire de chromosomes sur la paire de chromosomes la plus courte. Différentes méthodes ont été employées pour localiser le centromère, ce qui a engendré l'apparition de diverses nomenclatures de morphologie chromosomique, cependant la nomenclature du caryotype la plus consensuelle est celle de Levan et *al.*, 1964. Le caryotype est représenté par une plaque métaphasique, un cartogramme et un idiogramme. Le cartogramme qui consiste, à partir d'une photographie d'une cellule en métaphase, à juxtaposer les chromosomes homologues, par ordre décroissant de longueur. L'idiogramme est la représentation idéale des chromosomes selon un diagramme établi à partir des mesures statistiques au moins 5 plaques métaphasiques. Il est le plus souvent haploïde. Dans le cas où il existe une homologie (non homologie) entre les chromosomes d'une paire, il est souhaitable de présenter un idiogramme diploïde.

Matériel et Méthodes

Ce travail a été réalisé au sein de la division de recherche en biotechnologie et amélioration des plantes de l'Institut Nationale de la Recherche Agronomique (INRAA) dans le cadre des activités de recherche de l'équipe Palmier Dattier. La durée du stage est de Novembre-Juin 2016.

1. Etablissement de l'embryogenèse somatique à partir des protoplastes

Notre expérience a été basée sur l'utilisation d'un matériel végétal constitué de cals de trois cultivars du palmier dattier issus de rejets prélevés des palmerais d'Adrar et Touggourt.

- Le cultivar Deglet Nour est sensible à la maladie du bayoud, mais il donne une excellente qualité de datte.
- Le cultivar Takerboucht est résistant a la maladie du bayoud, mais il a une qualité moyenne de datte.
- Le cultivar Tegaza est sensible à la maladie du bayoud , mais il donne une qualité médiocre de datte.

1.1. La suspension cellulaire

1.1.1. Matériel biologique

Les souches de cals friables embryogènes âgées de trois mois des trois cultivars ont été utilisées pour l'établissement de la suspension cellulaire, et ont été prélevées des milieux d'induction ($P_{12.5}$ et M_{100}).

1.1.2. Préparation et stérilisation du milieu de culture liquide P_5

Le milieu de culture utilisé pour l'établissement de la suspension cellulaire est le milieu liquide P_5 . Il contient 5mg/l de l'auxine picloram , 1mg/l de thiamine (vitamine) et 1mg/l de cytokinine (IPA) (**Annexe 03**). Le milieu est distribué dans des erlenmeyers à raison de 50ml par erlenmeyer a l'aide d'un distributeur automatique. Le pH est ajusté a 5.8 avant leur stérilisation à l'autoclave pendant 20min a 120°C . (**Annexe 01**).

1.1.3. Conditions de culture

Les cals sélectionnés sont écrasés sous la hotte à flux laminaire à l'aide d'un pilon stérile, ensuite repiqués dans le milieu liquide P_5 à raison de 2g/50ml par erlenmeyer. Les erlenmeyers sont placés à l'obscurité à une température de 28°C

Matériel et méthodes

sur un agitateur rotatif et horizontal à une vitesse de 100tours/min. Le repiquage des cultures se fait tous les 8 jours dans un milieu liquide frais jusqu'à l'obtention de la suspension cellulaire. (**Figure 08**)

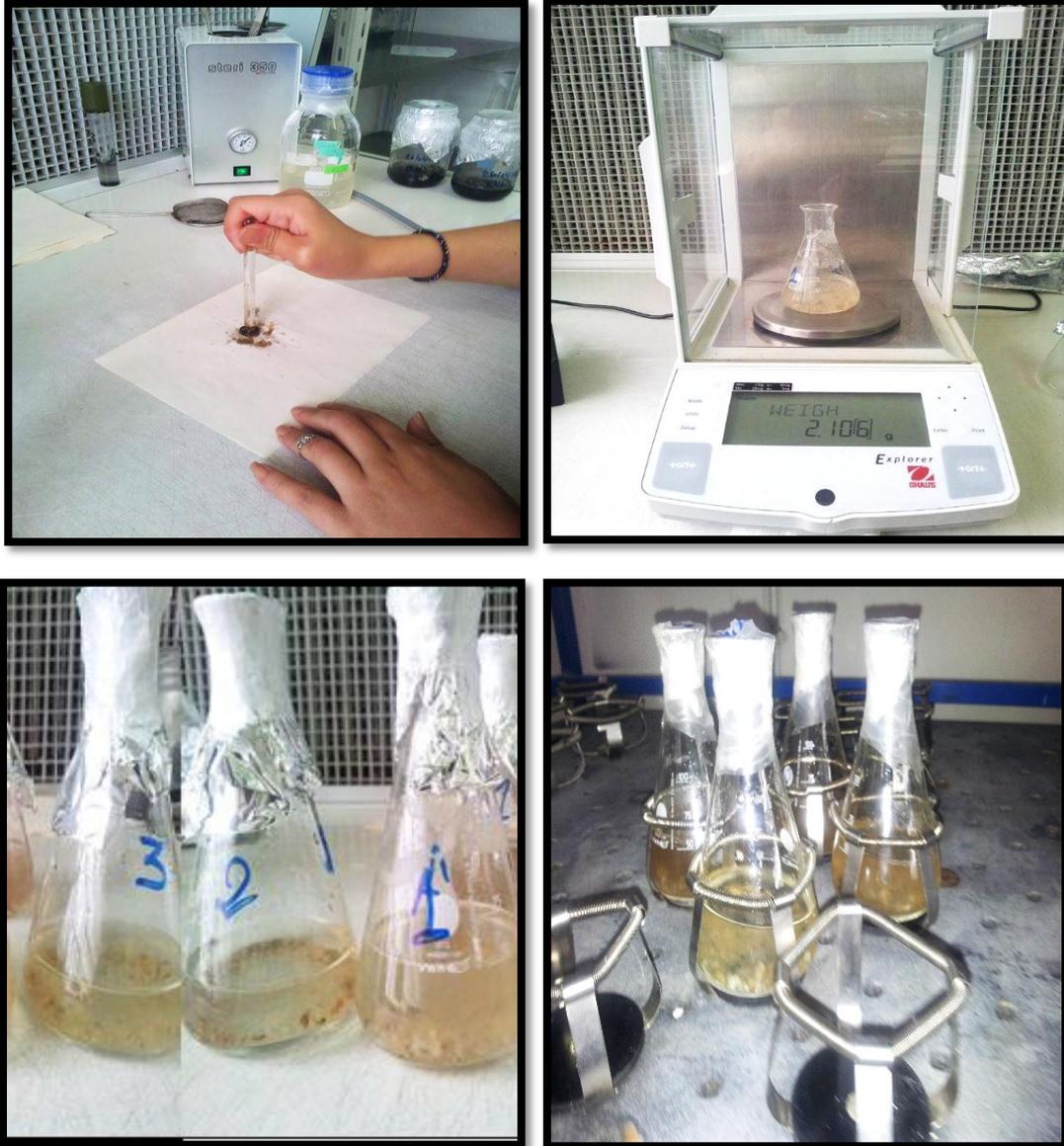


Figure 08: Les différentes étapes de la suspension cellulaire.
(Photo personnelle.,2016)

1.1.3. Test de viabilité

Pour une meilleure observation des cellules viables, nous avons pris 1 ml de suspension cellulaire a qui nous avons rajouté une goutte de la solution FDA (Fluorescéine Diacétate). Après 10 min de pause nous avons fait une observation

Matériel et méthodes

sous microscope inversé et nous avons remarqué que les cellules sont devenues fluorescentes avec une coloration verte (estérases actives).

1.2. L'isolement des protoplastes

Pour l'établissement de l'isolement des protoplastes, nous avons suivi le protocole établi par les étudiantes de la promotion précédente.

Après avoir mis le matériel végétal utilisé dans la solution enzymatique, les protoplastes libérés ont été purifiés, fusionnés, puis cultivés pour leur régénération en plantes, laquelle constitue le but de notre travail.

La suspension cellulaire des trois cultivars (Deglet Nour, Tekerboucht, Tegaza) est considérée comme le matériel végétal de base pour effectuer l'isolement des protoplastes .

1.2.1. Préparation de la solution enzymatique

La solution enzymatique est composée de (cellulase RS, pectolyase Y-23, pectinase et hemicellulase) et comme la paroi des cellules végétales est constituée de pectine et cellulose, la solution enzymatique doit renfermer au moins une pectinase et une cellulase pour bien fonctionner.

A fin que les protoplastes soient dépourvu de leurs parois celluloses, nous avons utilisé la solution enzymatique SE₁ déjà utilisé par les étudiantes de la promotion précédente et qui a donné de meilleurs résultats (**tableau 02**). Le tableau 02 résume la composition de la solution enzymatique employée.

Tableau 01 : Composition de la solutions enzymatique testée (pour 100ml de solution).

Produits	SE ₁
Cellulase RS	2%
Pectinase	/
Hémicellulase	6%
Pectolyase Y-23	/
CaCl ₂	0.5%
Kcl	3%
MES	0.005%
pH = 5.6	

Cette solution est agitée, et ajustée à un pH 5.6 ensuite stérilisée sous hotte à l'aide d'une pompe à vide. (**Figure 09**)



Figure 09: Stérilisation de la solutions enzymatique sous la hotte à l'aide d'une pompe à vide.(**Photo personnelle.,2016**)

1.2.2. Macération enzymatique

Pendant notre expérimentation , nous avons suivi un protocole de macération bien défini, la suspension cellulaire des trois cultuvars (DN, TKB, TGZ) a été la base de notre travail pour l'isolement des protoplaste.

Comme première étape, sous la hotte nous avons filtré les microcals sélectionnés en utilisant un tami de 380 μm de diamètre, nous les avons mis dans des boites de Pétri , certains cals on été écrasés à l'aide d'un pilon, alors que les autres ont été laissés tels qels, puis nous avons ajouté 8 à 12 ml de chaque solution enzymatique à l'aide d'une pipette. Ces boites ont été fermées hermitiquement avec de la parafilm. (**Figure 10**).



Figure 10: Les différentes étapes de la macération enzymatique à partir des microcal.(Photo personnelle.,2016)

Dans la deuxième étape, nous avons utilisé la suspension cellulaire issues après 9 semaines de cultures, on l'a centrifugé à 50 tour/min pendant 5 minutes puis nous avons prélevé juste le culot. Ce dernier a été mis dans les boites de Pétri. Ensuite nous avons ajouté 8 à 12 ml de la solution enzymatique et cela se fait en maintenant les même conditions de culture (**Figure 11**).

Toutes les boites de Pétri sont incubées à l'obscurité à 24°C à différents temps (20 à 72h) sans agitation, tandis que d'autres sont agitées pendant 45 minutes avant d'être incubées pendant 10h dans les conditions déjà cités.



Figure 11 : Les différentes étapes de la macérations enzymatiques à partir de suspension cellulaire.(Photo personnelle.,2016)

2. Culture des protoplastes

Les protoplastes isolés sont mis en culture dans un milieu nutritif solide PcM2 à raison de $3 \text{ à } 7 \times 10^6$ protoplastes/g avec apport de milieu frais (P5) tous les 10 jours.

La préparation du milieu PcM2 se fait en deux étapes :

- En premier lieu nous avons préparé le milieu liquide MS modifié (**annexe 03**), ajusté le pH à 5.7 puis stériliser à l'aide d'une pompe à vide sous la hotte à flux laminaire.
- En second nous avons préparé de l'agarose et nous l'avons stérilisé à l'autoclave à 120°C pendant 20 minutes.

Les deux préparations sont mélangées et agitées manuellement sous la hotte jusqu'à l'obtention d'un liquide homogène. Le mélange est versé dans des boites de pétris (5.5 cm de diamètre) à raison de 15 ml par boite, et enfin elles sont mises à l'obscurité avec une température de 28°C . (**Figure 12**)



Figure 12 : Préparation du milieu PcM2. (Photo personnelle.,2016)

3. Régénération des protoplastes

La régénération s'est faite à partir des protoplastes obtenus après avoir effectué le processus d'isolement, ceux-ci ont été mis sous des conditions bien définies et un bon milieu de culture a été recommandé pour la réussite de ce processus. Pour le début de la régénération le milieu PcM2 est le plus adéquat pour assurer un bon développement et une bonne prolifération cellulaire. Les protoplastes ont été placés dans le milieu pcM2 jusqu' à l'apparition des micros cals et cela a pris 2 à 3 mois. Ces derniers ont une croissance très active et leur évolution donne ce qu'on appelle cals embryogène.

3.1. Multiplication des cals (phase d'initiation)

Après avoir obtenu des cals embryogènes, nous les avons entretenus et cela a eu lieu dans un milieu d'induction solide MS(1962) : **M₁₀₀**.

Les cultures sont repiquées successivement toutes les 5 semaines sur le milieu nutritif sous la hotte à flux laminaire, cette dernière doit être nettoyée avec de l'alcool 70° et allumée au moins 30 minutes avant son utilisation, après cela les cultures sont placées à l'obscurité dans une chambre de culture dont une température varie entre 24°C et 27°C.

Pour éviter l'accumulation des polyphénols et assurer une bonne prolifération cellulaire, soit le double et peut être le triple, selon leur taille (0.5 cm à 4 cm), cela doit se faire nécessairement dans des tubes ou bien des bocaux.

3.1.1. Stérilisation du matériel de culture

Le lavage de la verrerie (tubes à essai, erlenmeyers, éprouvettes ...etc.) se fait en utilisant des produits détergents (eau de Javel) puis le rinçage avec de l'eau distillée. La stérilisation de ces matériaux s'effectue à l'aide d'un autoclave à 120°C pendant 20 minutes.

Les instruments utilisés lors des différentes manipulations (pinces, bistouris, spatules, scalpels) sont stérilisés dans l'étuve à 180°C pendant 24 heures, ces derniers sont misent avant chaque manipulation dans le stérilisateur à billes en moins pour une quinzaine de minutes. **(Annexe 01)**

3.1.2. Préparation de milieu de culture solide (M₁₀₀)

Un milieu de culture est une solution aqueuse, contenant des éléments essentiels au développement des tissus végétaux. Il est composé principalement des éléments minéraux, des éléments organiques, des phytohormones ou régulateurs de croissance et le charbon actif...etc. Les milieux de culture utilisés au cours de ce travail sont de base Murashige et Skoog (MS) (1962). **(Annexe 03)**

- **Les éléments minéraux**

- **Les macroéléments** : contiennent l'azote (N), et le phosphore (P) , Le potassium (K), le magnésium (Mg) et le calcium (Ca). **(Annexe 02)**

- Les Microéléments** : appelés aussi oligo-éléments, contiennent le fer (Fe), sulfate (S), manganèse (Mn), le cobalt (Co)...etc. Ils jouent un rôle important dans les mécanismes enzymatiques. **(Annexe 02)**

- **Les éléments organiques**

- **Source de carbone** : le saccharose c'est une source d'énergie.

- Vitamines** : il s'agit de la thiamine ajouté à 1mg/l et du myoinositol à 100mg/l. Elles participent notamment au bon déroulement de la prolifération tissulaire.

- Acides aminés et autres additifs** : adénine, glutamine.ils ont un effet sur la prolifération des cals et la germination des embryons somatiques.

Matériel et méthodes

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

- **Les phytohormones ou régulateurs de croissance**

Les auxines (picloram2-4D), cytokinine (IPA) permettent la régularisation de la croissance des tissus par un équilibre parfait entre les cytokinines et auxines dans le milieu. **(Annexe 01)**

- **Agents gélifiants**

C'est le phytagel qui permet la solidification du milieu

3.2.2. Stérilisation des milieux de cultures

Les milieux de culture sont distribués soit dans des tubes stérilisés à raison de 15ml de milieu nutritif par tube, ou bien des bocaux avec un volume de 80ml par bocal, la distribution ce fait automatiquement. Le pH du milieu est ajusté à 5.8 avant que la stérilisation ne s'effectue dans l'autoclave pendant 20minutes à 120°C. **(Figure 13).**

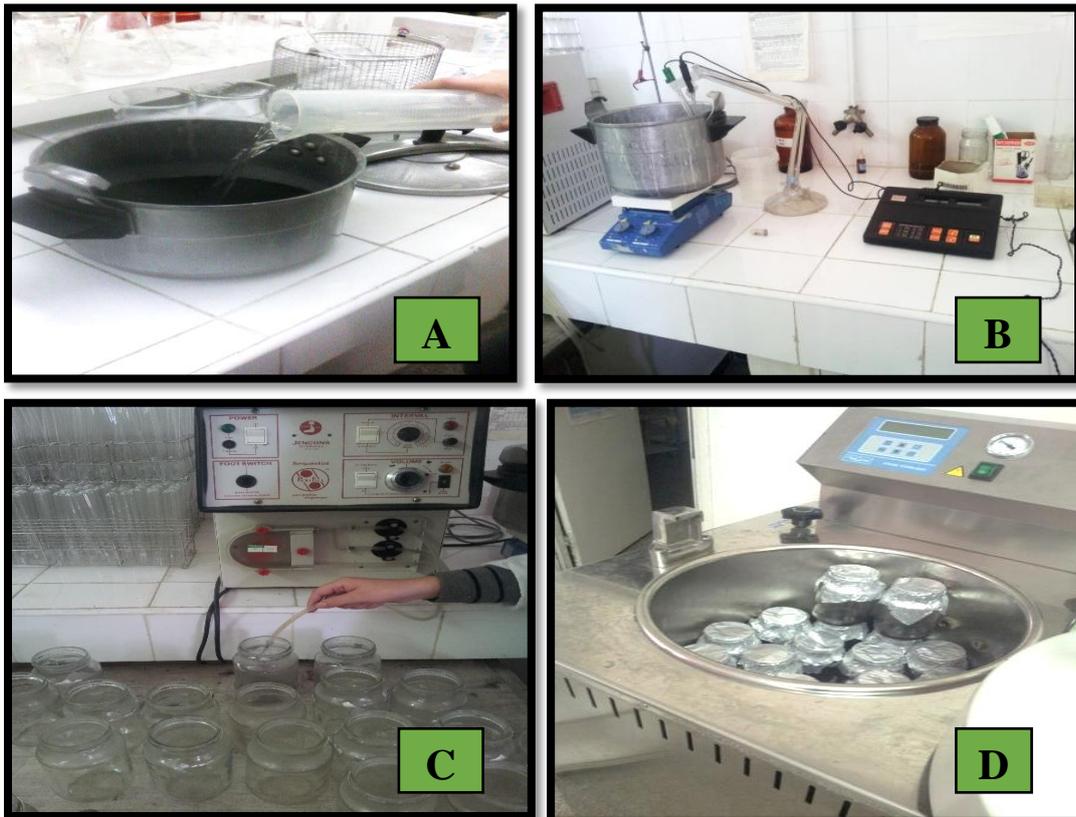


Figure 13 : Distribution et stérilisation de milieu de culture (A : Préparation du milieu de culture, B : L'ajustement du PH, C : Distribution du milieu de culture, D : Stérilisation du milieu de culture). **(Photo personnelle.,2016)**

3.2. Germination des cals (phase de différenciation)

Pour permettre l'induction des embryons somatiques et leur germination, les cals sont transférés petit à petit dans un milieu de germination GMN₂₀₀.

Le GMN₂₀₀ est un milieu de base dépourvu des hormones, constitué de solutions mère MS, de vitamines, de saccharose et d'autres additifs tel que les acides aminés et les agents gélifiants. Ces composants assurent le bon développement du processus **(Annexe 04)**. Les cultures sont repiquées sous hotte à flux laminaire dans des bocaux bien stérilisés contenant 80ml de milieu de culture, ceux-ci sont placés dans la chambre de culture soumis à une photopériode de 16 heures de lumière à une température ambiante de 28°C et de 8 heures d'obscurité à 23°C. Les subcultures sont effectuées chaque 2 mois.

NB : la préparation du milieu GMN₂₀₀ se fait de la même manière que celle du M₁₀₀ avec les mêmes conditions de stérilisation.

3.3. Développement des plantules

Les cultures sont mises au fur et à mesure dans le milieu de prolifération GMP. Ce dernier est un milieu d'induction contenant tous les éléments nécessaires pour la prolifération des plantules. Il est constitué des solutions mères, des vitamines Ms ainsi qu'une hormone de croissance (AIB), qui aide la plantule à bien enraciné dans une courte période **(Annexe04)**.

Les repiquages se font toujours dans les conditions déjà mentionné, ensuite les cultures sont placées dans la chambre de culture exposée à la lumière continue avec une température de 28°C. Les subcultures sont faites avec un intervalle de deux mois.

Résultats et Discussion

Résultats et discussion

1. Etablissement de l'embryogenèse somatique à partir des protoplastes

1.1. Suspension cellulaire

1.1.1. Mise en culture et évolution



Figure 14 : La mise en culture de la suspension cellulaire. (Photo personnelle.,2016)

Après la mise en culture en milieu liquide P₅, nous avons remarqué que la croissance des cals est différente pour chaque souche de trois cultivars utilisés. Les résultats obtenus sont exprimés dans le tableau ci-après (02).

Tableau 02 : Les différentes étapes appliquées tout au long de la période de culture et prolifération des cals.

Cultivars	souches	Poids du départ	1 ^{ère} semaine	2 ^{ème} semaine	3 ^{ème} semaine	Poids final
DN	DN ₁	2g	/	+	-	5.02g
	DN ₂	2g	/	+	-	3.75g
	DN ₃	2g	/	-	+	2.5g
TKB	TKB ₁	2g	/		+	4.85g
	TKB ₂	2g	/	+	-	4.25g
	TKB ₃	2g	/		+	3.75g
TGZ	TGZ ₁	2g	/	+	-	4g
	TGZ ₂	2g	/	+	-	4.96g
	TGZ ₃	2g	/	-	-	2.8g

Résultats et discussion

/ : Absence de résultats

+ : Apparition de cals secondaires

- : Première filtration sur tamis de 380 μm de diamètre.

Le tableau 02 relève les cals secondaires sont apparus à partir de la 2^{ème} semaine pour les souches DN₁ et DN₂ pour le cultivar DN, ainsi que pour les souches TGZ₁ et TGZ₂ pour le génotype TGZ. Alors en ce qui concerne le cultivar TKB seule la souche TKB₂ a montré des cals secondaires. Certains cals compacts des souches TGZ₁ et TGZ₂ deviennent friable au bout de la 2^{ème} subculture, donnant ainsi de bonnes sources pour l'établissement de suspension cellulaire qui sont la base d'une prolifération cellulaire importante. Le reste des souches n'a connu l'apparition des cals secondaires qu'à partir de la 3^{ème} semaine.

Certaines souches ont connu une filtration à partir du 16^{ème} jour (DN₃ et TGZ₃) et d'autres tel que (TGZ₂, TGZ₁, TKB₂, DN₁, DN₂) leurs filtration s'est faite qu'à partir du 21^{ème} jour.

Après la 3^{ème} semaine nous avons constaté que la prolifération des souches était différente d'un cultivar à un autre. La meilleure prolifération a été observée chez la souche DN₁ qui est passée de 2g à 5.02g en 21 jours seulement suivie par les souches (TGZ₁, TGZ₂ et TKB₁, TKB₂) qui ont commencées par 2g et ont fini respectivement par (4g, 4.96g, 4.85g, 4.25g). Nous avons observé également que les plus faibles proliférations ont été signalées chez les deux souches DN₃ et TGZ₃. Ces dernières, malgré leur faible prolifération, se dissociant très. Nous avons remarqué que les cals compacts du cultivar TGZ₂ dissociés, ont un comportement différent des cals friables, et donnent naissance à des suspensions cellulaires à forte croissance.

Au bout de 21 jours de culture après renouvellement de milieu les fragments de cals initiaux ont été totalement dissociés et la culture est devenue une suspension très fine de petits agrégats ou de cellules isolées qui sont presque entièrement récolées après filtration. Le matériel obtenu à la fin de la suspension cellulaire servira en processus d'isolement.

1.1.2. Observation microscopique

Les cellules observées au microscope optique sont pour la plupart allongées et vacuolisées. Cependant nous avons également observé des cellules petites et rondes à fort rapport nucléocytoplasmique et cytoplasme dense qualifié "d'embryogènes". (Figure15)

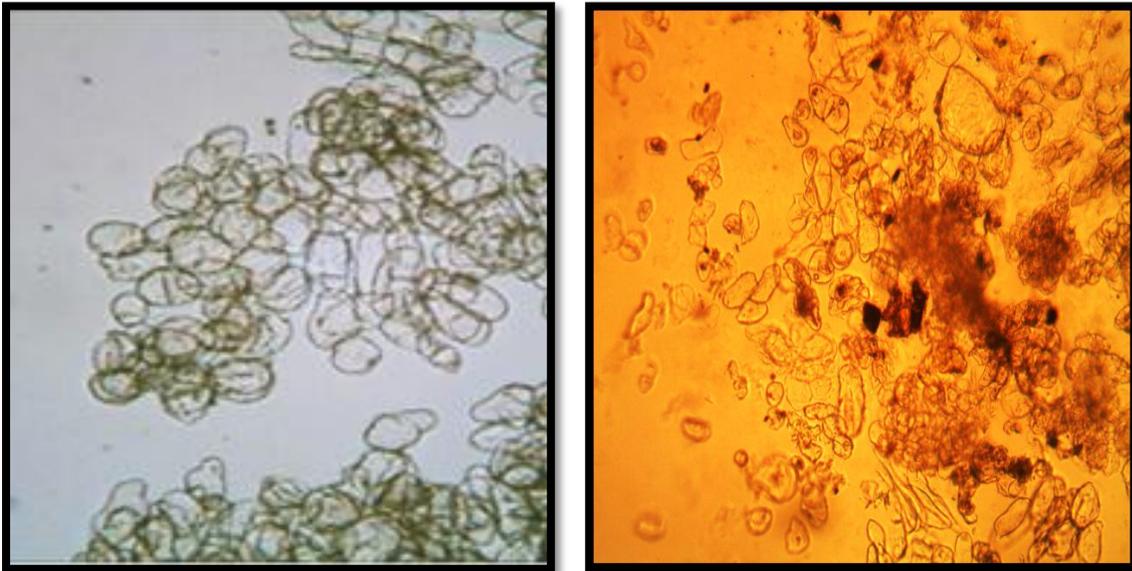


Figure15 : Cal embryogène dissocié en petits groupes cellulaires(Grx40). (Photo personnelle.,2016)

1.1.3. Test de viabilité par la coloration à la Fluorescénine DiAcétate (FDA)

La viabilité des cellules est déterminée par le test à la fluorescéine diacétate avec lequel les cellules vivantes deviennent fortement fluorescentes sous rayonnement ultraviolets. Ce teste montre des amas cellulaires de différentes tailles avec des cellules colorées en vert ce qui indique la viabilité des cellules (Figure 16).

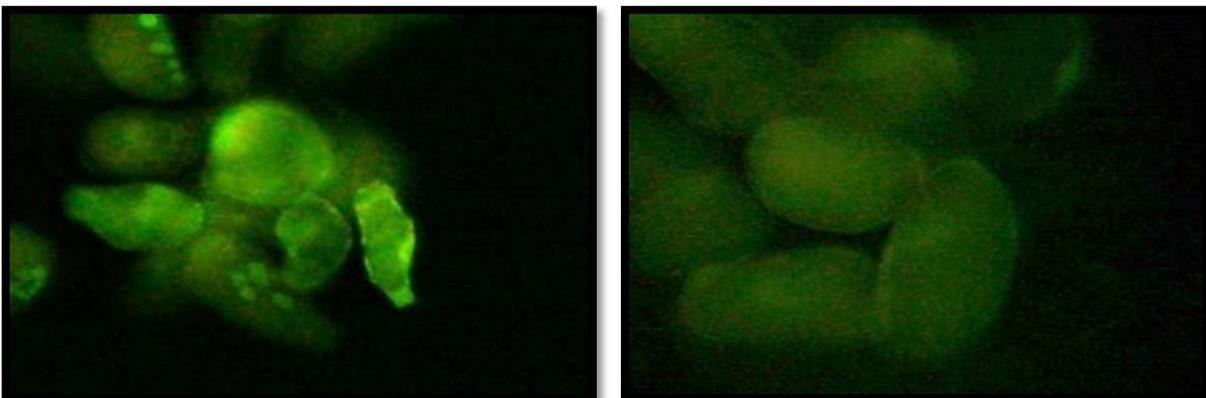


Figure 16 : Cellule colorée avec fluorecine diacétate. (Photo personnelle.,2016)

Discussion

L'initiation d'une suspension cellulaire embryogène (SCE) de bonne qualité dépend de la qualité et du volume du cal embryogène sélectionné en fonction de la présence de seuls embryons développés. Une observation attentive et régulière du cal idéal choisi au préalable est nécessaire pour la sélection de cals embryogènes qui sont en l'équilibre entre « la bonne taille » et la « bonne phase de développement ». (Hannelore et *al.*,2003)

Durant notre expérimentation nous avons constaté que l'utilisation des cals friables donne naissance à des cellules isolées avec un cytoplasme vacuolisé. Par contre les cals compactes donnent des agrégats de cellules amylofères apte à se diviser mêlées à des cellules allongées qui ne le sont pas. Les résultats obtenus sont conforme aux travaux de Chabane et *al.*,2006; Yatta et *al.*,2016.

Dans notre étude, l'écrasement des cals choisi est effectué dans le but d'obtenir un détachement rapide des micros cals également pour la suspension cellulaire. conformément aux travaux de Tiecoura et *al.*,2014.

L'utilisation du milieu liquide P₅ augmente d'une façon considérable le rendement de l'embryogenèse somatique et celui-ci induit une augmentation de masse des cals nodulaires. Nos résultats confirment ceux de Fki.,2005; Yatta et *al.*,2014; Mahmado Adamou et Sani Gaoh. B.,2010.

La suspension cellulaire avait été réalisée à partir de cals friables qui sont les plus à même de se dissocier et former des suspensions dispersées, à croissance rapide intéressante pour des études au niveau unicellulaire. Ces résultats correspondent avec ceux de Yatta et Bouguedoura., 2015. Ces auteurs confirment que les suspensions cellulaires doivent être repiquées très régulièrement pour une bonne croissance, même si la densité saturante ne semble pas avoir été atteinte.

La qualité d'une suspension cellulaire diminue avec le nombre de repiquage et ceci mène à un risque élevé de contamination et aussi à une diminution de taux de croissance. Pour éviter ces risques un protocole de cryoconservation a été

développé dans le but de stocker pour de longue période les suspensions cellulaires.

Selon Hannelore et *al.*,2003 une bonne suspension cellulaire est caractérisé par la présence d'une grande proportion (>80%) d'agrégats de cellules embryogènes en prolifération. Cette opération commence à apparaître après deux semaines entre repiquages.

D'après nos résultats, nous avons constaté que l'apparition des cals secondaires n'était pas la même pour les trois génotypes, certaines souches ont donné des cals secondaires dès la 2^{ème} semaine et d'autres à la 3^{ème} semaine. Ce qui montre que les souches embryogènes répondent différemment au milieu de culture liquide. Ces résultats valide les travaux de Monnier.,1990 et Yatta.,2014.

Nous avons pris nos suspensions cellulaires pour l'isolement durant la phase de multiplication exponentielle, car une phase stationnaire est observée après trois semaines durant laquelle la multiplication des cals est diminuée. Ce résultat a été rapporté en 1991 par Abe et Ftsuhara et Assani et *al.*,2002.

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

1.2. Isolement des protoplastes

La maîtrise de la culture et de la régénération des plantes à partir des protoplastes ouvre plusieurs voies de recherche telle que, la transformation génétique, amélioration des plantes, études d'échange de métabolites, ainsi que la fusion des protoplastes. Nous avons souligné l'importance de la qualité du matériel végétal pour obtenir des suspensions cellulaires.

L'obtention de protoplastes se fait habituellement par digestion enzymatique de la paroi, grâce notamment à des enzymes telles que la pectinase, la cellulase, et la pectolyase Y-23. Du fait de la pression osmotique, les cellules végétales ont

Résultats et discussion

normalement une forme du à une contrainte. La suppression de la paroi permet aux protoplastes d'adopter une forme sphérique.

La réussite du processus d'isolement dépend de plusieurs facteurs indispensables tels que

une meilleure combinaison enzymatique et le temps d'incubation.

Durant notre travail nous avons isolé les protoplastes à partir des suspensions cellulaires âgées d'une à trois semaines et issues des trois cultivars (DN, TKB, TGZ). Nous les avons mis dans une solution enzymatique déjà optimisée et jugée par sa fiabilité et son efficacité dans le rendement en protoplastes.

1.2.1. Effet de la solution enzymatique

L'obtention des protoplastes nécessite la suppression de la paroi pectocellulosique et ceci dépend d'une bonne combinaison enzymatique.

Vu que la paroi des protoplastes est constituée d'une cellulose et d'une pectine. La présence des enzymes dégradent ces deux constituantes. Cette opération est indispensable pour qu'il y ait une rupture des liaisons covalentes.

Dans le but de libérer des protoplastes issus de la suspension cellulaire ou de micros calcs friables, nous avons utilisé la combinaison enzymatique : Cellulase et Hémicellulase optimisé par les étudiantes de la promotion précédente.

La solution enzymatique est aussi composée de : CaCl_2 , KCl, MES. L'ion Ca^{2+} est utilisé pour son rôle de stabilisateur des parois et le tampon MES est employé pour éviter la variation brutale du pH lors de l'incubation (éclatement de certains protoplastes causant un relâchement du contenu vacuolaire).

L'ajustement du pH de la solution enzymatique joue un rôle très important en ce qui concerne la libération des protoplastes, un pH de 5.7 est le plus recommandé pour éviter qu'il y ait un choc lors du transfert des protoplastes dans la solution enzymatique.

Après l'opération de la macération, nous avons constaté que la production des protoplastes varie dans le même sens qu'une concentration croissante de cellulase.

1.2.2. Effet des conditions d'incubation

La réussite du processus d'isolement nécessite l'intervention de plusieurs facteurs notamment l'agitation et le temps d'incubation. Ces derniers influencent la rentabilité et le rendement des protoplastes et aussi le taux de leur variabilité. Notre

travail a été basé sur l'étude de l'effet de ces deux facteurs lors du traitement enzymatique.

1.2.2.1. Effet de l'agitation

Durant notre travail nous avons constaté que l'agitation joue un rôle primordial pour ce qui touche le détachement et le rendement des protoplastes, quel que soit la nature et la concentration de la solution enzymatique et le temps d'incubation.

Des incubations à l'état agité ou non ont été conduites avec de différentes fréquences allant de 25 à 100 tours/min pendant 45 minutes. En effet nous avons remarqué qu'après 45 minutes d'agitation à une fréquence de 50 à 80 tour/min il y a eu une forte libération de protoplastes intacts et viables. Les incubations laissés au-delà de 45 minutes en agitation, menés à une fréquence dépassant les 80 tour/min, ont été abimés avec un éclatement complet des protoplastes et qui est peut être dû à une forte pression d'agitation.

1.2.2.2. Effet du temps d'incubation

Dans notre expérimentation nous avons constaté que le facteur d'incubation conditionne à son tour le rendement en protoplastes. Nous avons essayé de combiner entre l'action du temps et le complexe enzymatique. Nous sommes ainsi arrivés dans ce cas et après avoir utilisé la solution enzymatique SE₁ (Cellulase RS 2%, Hémicellulase 6%), à la conclusion que la réponse optimale ne peut être obtenue qu'après 24h d'incubation sans agitation.

1.2.3. Rendement des protoplastes

Sur le tableau 03 sont consignés les résultats obtenus en utilisant comme matériel de départ les micros calcs et les suspensions cellulaires.

Résultats et discussion

Tableau 03 : Influence du génotype, du matériel de base et de la solution enzymatique SE₅ sur le rendement en protoplastes (x10⁶/g) chez DN, TKB et TGZ.

Génotype	Deglet Nour (DN)			
Source du matériel végétal	Micro cals		Suspension cellulaire	
Temps d'incubation (heure)	24	10	24	10
Agitation (60 tours/min)	/	45 min	/	45 min
Rendement x10 ⁶ (protoplastes/g)	2.5	3	7	6
Viabilité (%)	58	60	70	68
Génotype	Takerboucht (TKB)			
Source du matériel végétal	Micro cals		Suspension cellulaire	
Temps d'incubation (heure)	24	10	24	10
Agitation (60 tours/min)	/	45 min	/	45 min
Rendement x10 ⁶ (protoplastes/g)	3	4	7	6
Viabilité (%)	54	55	64	65
Génotype	Tegaza (TGZ)			
Source du matériel végétal	Micro cals		Suspension cellulaire	
Temps d'incubation (heure)	24	10	24	10
Agitation (60 tours/min)	/	45 min	/	45 min
Rendement x10 ⁶ (protoplastes/g)	3	4	5	5.74
Viabilité (%)	40	54	64	67

Résultats et discussion

D'après le tableau, la solution enzymatique SE₁ et les suspensions cellulaires ont donné des résultats optimaux, pratiquement chez les trois cultivars avec un taux de viabilités variés.

En ce qui concerne les micros cals, l'effet de la solution SE₁ a été testé en premier sans agitation avec un temps d'incubation de 24h. Nous avons noté que le taux de rendement chez les trois cultivars est presque de 3×10^6 protoplastes/g avec un taux de variabilité différents, 58% chez DN, 54% chez TKB et enfin 40% chez TGZ. En second lieux nous avons effectué un test avec une agitation de 45 min avant incubation de 10h. Nous avons relevé des taux de rendement différents chez les trois cultivars, ce qui nous a donné les suivants :

- 3×10^6 protoplastes/g et 60% de taux de variabilité chez le génotype DN.
- 4×10^6 protoplastes/g avec 55% de variabilité TKB.
- Chez le génotype TGZ. 4×10^6 protoplastes/g et une rentabilité de 54%.

(Figure 17)

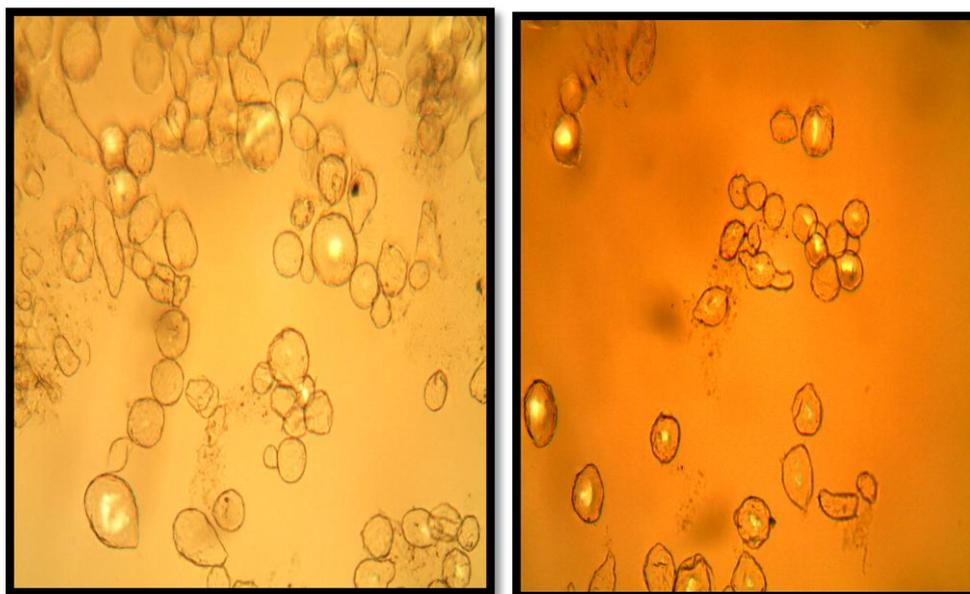


Figure 17 : Observation des protoplastes issus des micros cals sous microscope optique (Grx40). (Photo personnelle.,2016)

Sur les suspensions cellulaires nous avons constaté que l'action de la solution enzymatique dans les deux conditions déjà cité ci-dessus a donné de meilleurs résultats chez les trois cultivars, arrivant ainsi à 7×10^6 protoplastes/g avec 68% de taux de variabilité. (Figure18)

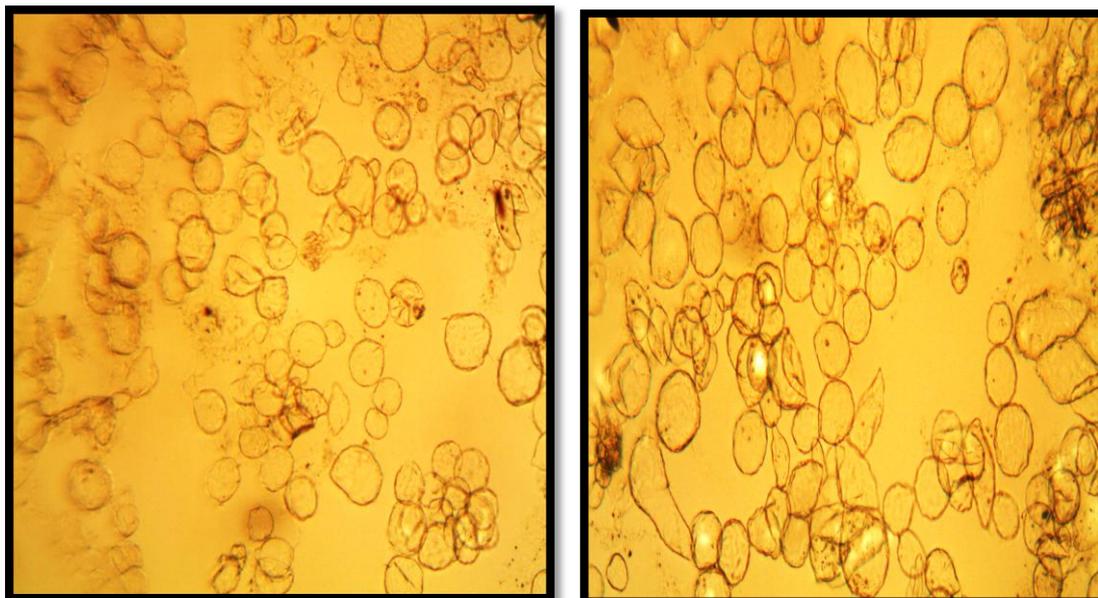


Figure18 : Observation des protoplastes issus des suspensions cellulaires sous microscope optique (Grx40). **(Photo personnelle.,2016)**

Durant notre expérimentation, nous avons constaté que les cals utilisés doivent être friables et compacts et agés au minimum d'une année. Pour les cals noduleux la solution enzymatique ne peut pas les digérer. Aussi les suspensions cellulaires repiquées régulièrement, doivent être en phase de croissances, par contre les essais effectués sur des suspensions âgées n'ont pas été fructueux.

1.2.4. Variabilité morphologiques des protoplastes

Nous avons observé à l'aide d'un microscope optique le contenu cytoplasmique des protoplastes issus de cals friables et de suspensions cellulaires.

Nous avons constaté que la morphologie des protoplastes dépend de l'origine du matériel végétal et aussi du génotype.

Aussi, nous avons trouvé deux types de protoplastes :

Les protoplastes de grande taille à cytoplasme vacuolisé en abondance, et c'est le cas pour le génotype Deglet Nour.

Les protoplastes de petit taille à cytoplasme peu vacuolisé avec un rendement moins abondant et c'est le cas pour les deux cultivars Tekarbouch et Tegaza.

Le premier type tend à bourgeonner dans les 48 h après l'isolement perdant son contenu cellulaire en se transformant en sphère vide. Le seconde type, plus actif, se vacuolise peu et tend a néoformé une paroi cellulaire.

Résultats et discussion

La culture des protoplastes nécessite un milieu adéquat qui va stimuler la division et la régénération de la paroi pectocellulosique.

La couche nourricière englobe tous les éléments nutritifs nécessaires pour la régénération des protoplastes et qui sont semblable à ceux des cellules et de tissus en culture.

Les protoplastes commencent à régénérer leurs parois cellulaires quelques heure après leur mise en culture. Après quelques jours seulement, ils perdent leur forme sphérique, ce qui indique le début de la régénération de la paroi qui induit par la suite la formation des micros cals et enfin celle des cals.

Discussion

Dans le but d'isoler des protoplastes à partir de suspensions cellulaires et de cals friables, Nous avons utilisé la combinaison d'enzymes (Cellulase, Hémicellulase) avec des conditions expérimentales optimales (temps, agitation), afin d'obtenir un meilleur rendement et un plus grand pourcentage de viabilité en protoplastes.

Nos résultats dénote que le rendement en protoplastes dépend du matériel végétal. Nous avons constaté que lorsque les suspensions cellulaires sont utilisées, la rentabilité est élevée, par contre l'utilisation des cals friables donne des rendements faibles. Ces résultats sont en accord avec les travaux réalisés sur le bananier par plusieurs chercheurs cités par Haïcour et *al.*,2004 et Guedira (2006).

Nous avons constaté que le génotype influence le rendement en protoplastes. En effet, les plus hauts rendements de protoplastes sont obtenus à partir de cals friables et de suspensions cellulaires issues de cultivars Deglet Nour quel que soit la combinaison enzymatique utilisée. Ces résultats sont correspondent à ceux obtenue par Si-Dehbi et *al.*,(2013) et Yatta et *al.*,(2014).

L'utilisation du complexe enzymatique SE₁ constitué de 2% cellulase RS et 6% Hemmicellulase, a donné de meilleurs résultats avec les trois génotypes, quel que soit le matériel végétal (cal ou suspension) et les conditions utilisé (agitation et temps d'incubation). Après notre expérimentation nous n'avons constaté qu'une agitation de 45 min avant incubation de 10h donne des résultats positifs, induisant la

Résultats et discussion

libération d'un grand nombre de protoplastes. Ce résultat correspond aux travaux de Yatta et *al.*, 2014 et Yatta et *al.*, 2015 .

La présence d'une cellulase RS et une pectinase est essentiellement indispensable pour l'obtention d'excellent rendement en protoplastes. Une concentration de cellulase inférieure à 1% peut induire un faible rendement selon Haïcour et *al.* (2004). Un pourcentage supérieur à 2 % peut provoquer la digestion du matériel végétal. Ce est en accord avec les travaux de Guedira., 2006.

Le maintien d'agitation avec une durée de 45 min à 80 tour/min est important, car au-delà de ce temps, nous remarquons un éclatement des cellules sous l'effet de pression. Cela concorde avec les travaux de Haïcour et *al.*, 2004.

Notre étude a permis la production des protoplastes viables de formes arrondies de taille variables, ceci est en accord avec les travaux de (Chabane., 2007; Yatta et *al.*, 2013 et Bouguedoura ., 2013).

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

2. Régénération des protoplastes

A l'origine, les techniques d'embryogenèse somatique ont été envisagées pour deux objectifs principaux : la micropropagation de masse d'une part, et le développement d'outils cellulaires pour l'amélioration génétique d'une autre part (par exemple la transformation génétique et la fusion de protoplastes). Ces techniques reposent sur l'utilisation de régulateurs de croissance synthétiques (auxines) pour induire la dédifférenciation des tissus et la formation de cals embryogènes et l'obtention des suspensions cellulaires. Les suspensions cellulaires est le matériel de départ pour l'obtention des protoplastes. La régénération des protoplastes par embryogenèse somatique et leur développement en plantules ont été réalisées.

2.1. Survie des protoplastes

L'objectif de cette phase est d'obtenir des cals à partir des protoplastes isolés des trois génotypes (DN, TKB, TGZ).

D'après nos travaux et les résultats obtenus par les étudiantes de la promotion 2015 sur le début de régénération, la formation des parois a été observée sur la couche nourrice après 72 h de culture. **(Figure 19)**

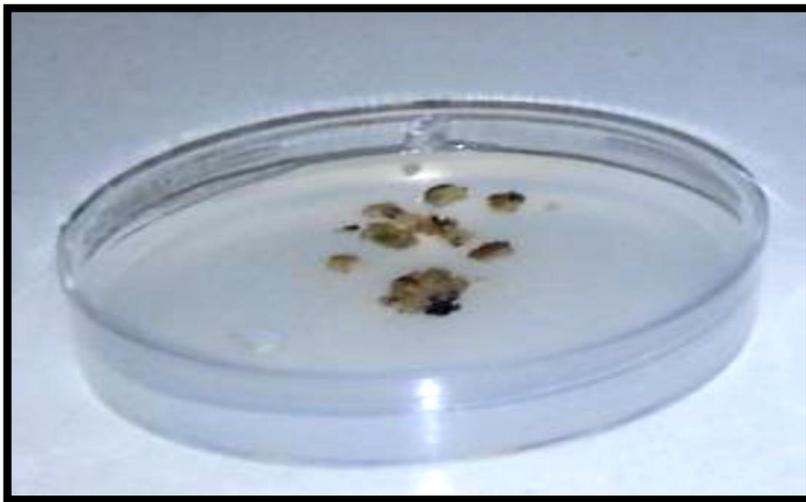


Figure 19 : Début de régénération des protoplastes après 72h de mise en Culture .

2.2. Développement des protoplastes isolés

Durant notre expérimentation, nous avons observé que lors de la formation des parois, les cellules changent de forme et se divisent fortement. Ces nombreuses divisions induisent la formation des micros cals de couleur blanche.

Les premiers signes de régénérations des protoplastes se traduisent par le changement de leurs formes qui passe d'une forme sphérique à ovale et ceci se fait en un temps très réduit.

Nous avons observé que la majorité des protoplastes obtenus ont régénéré leur paroi cellulaire au bout de quelques jours, une fois les membranes sont formées, les cellules dérivant des protoplastes isolés subissent une série de divisions dont chaque une donne naissance à des cellules plus importante en masse et volume par rapport aux premières obtenues. **(Figure 20)**



Figure 20 : Cal issu de la culture de protoplastes sur le milieu PcM2

Après plusieurs divisions, nous avons observé la formation de petites colonies cellulaires et leur multiplication intense a conduit à la formation des micros cals sur la couche nourricière de la suspension cellulaire de génotype DN.

Nous avons constaté que certains protoplastes n'ont présenté aucune évolution, ceci est peut-être dû soit à des erreurs de manipulation, à l'éclatement des protoplastes ou bien à des contaminations.

Résultats et discussion

Le suivi du développement de protoplastes après 10 jours de cultures nous a permis d'analyser leur évolution et déduire l'importance de leur origine et aussi celle de la couche nourrice.

2.3. Évolutions des micros cals en cals

Après 45 jours, le transfert des micros cals formés sur la couche nourricière vers un milieu d'induction M_{100} de base MS contenant (100mg/l de 2.4-D) associé à (3mg/l d'IPA), permet leur transformation en cals de couleur blanchâtre plus ou moins friables. Ces cals entrent en développement et doublent leur volume après quelques semaines de mise en culture. (Figure 21)

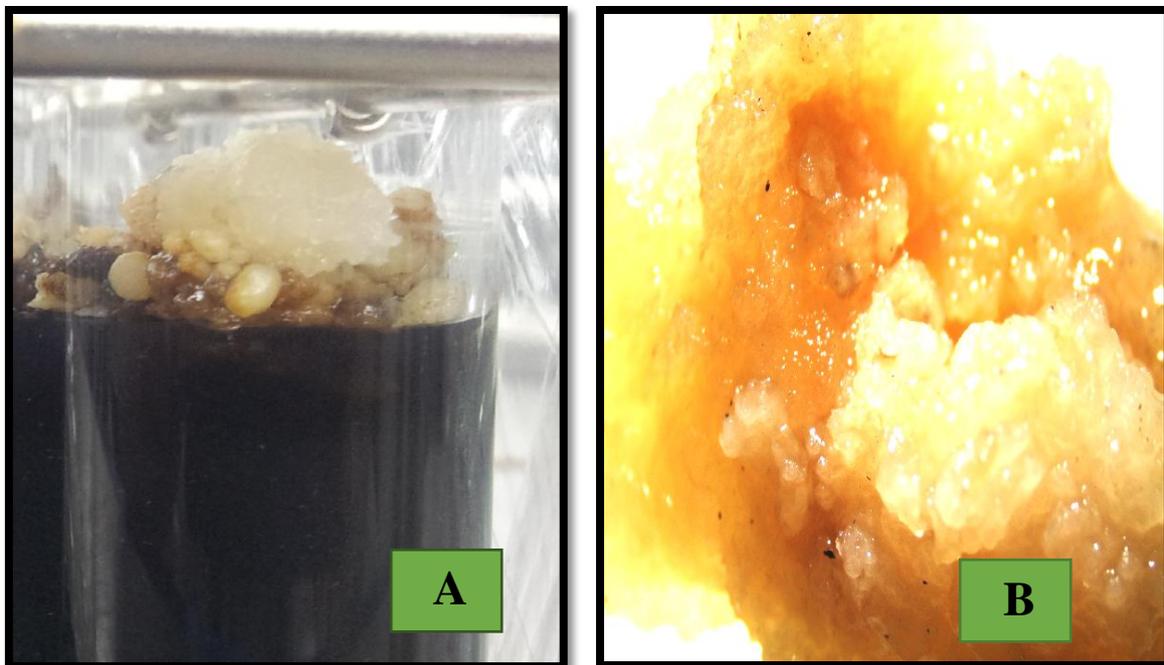


Figure 21 : (A : transfère des cals dans le milieu M_{100} ; B : cals friable sous loupe).
(Photo personnelle.,2016)

2.4. Multiplication des cals (phase initiation)

Sous la hotte à flux laminaire, les cals sont repiqués successivement tous les 4 à 5 semaines dans des bocaux sur des milieux neufs M_{100} , les cultures ont été mises dans une chambre de culture obscure avec une température de $25 \pm 2^\circ\text{C}$, et une hygrométrie de 70 % (humidité relative). Pour chaque combinaison hormonale (génotype/milieu) plusieurs répétitions ont été réalisées. Le taux d'induction des cals

Résultats et discussion

et l'intensité de prolifération des cals ont été évalués après 8 semaines de culture. (Figure 22)

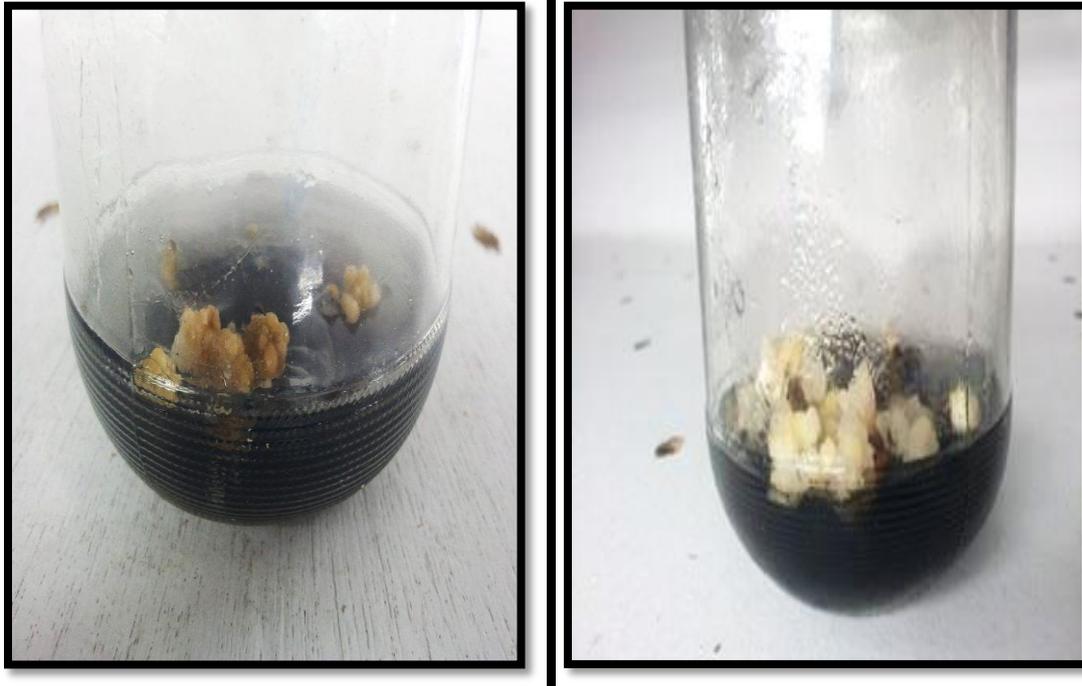


Figure 22 : Cals embryogènes après 8 semaines d'induction sur le milieu M₁₀₀. (Photo personnelle.,2016)

L'initiation des cals à partir des protoplastes isolés a été favorisée par la présence d'hormones de croissance dans le milieu.

L'association auxine/cytokinine (2-4D/IPA) conduit non seulement à la production des cals mais aussi à la multiplication intense et rapide de la callogenèse.

Après 3 mois (3^{ème} subcultures), les résultats obtenus montrent que le milieu M₁₀₀, est révélé stimulateur d'une multiplication intense de callogenèse et nous avons remarqué une prolifération et un développement important des cals embryogènes. (Figure23)

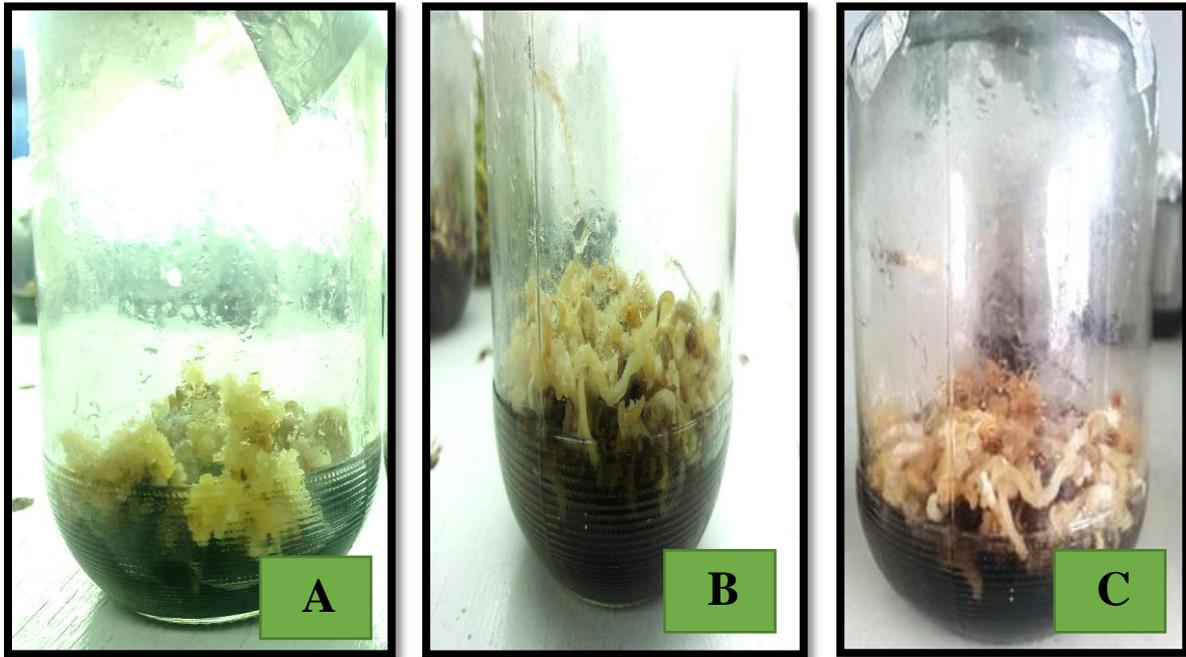


Figure 23 : (A : cals développés dans le milieu M₁₀₀ après la 3^{ème} subculture ; B+C : cals mis en culture dans le milieu M₁₀₀ après la 5^{ème} subculture). (Photo personnelle.,2016)

Nos résultats montrent que ces milieux ont permis la viabilité des cals ainsi qu'une bonne activité de multiplication, et aussi nous avons constaté que l'aptitude à la callogenèse diffère selon les cultivars utilisés.

2.5. Induction à l'embryogenèse somatique

Certains cals obtenus à partir des protoplastes régénérés, ont été transférés au fur et mesure sur un milieu de germination de base MS (GMN₂₀₀), ce dernier est dépourvu d'hormones de croissance. Le but de cette phase est l'induction des embryons somatiques ainsi que leur germination, les cultures ont été soumises à une photopériode à une température de 28°C avec des repiquages continus chaque 60 jours.

Le GMN₂₀₀ contient tous les éléments nécessaires qui permettent aux cellules de se développer et transformer du stade cal au stade nodule embryonnaire

Après la première subculture (2 mois), nous avons observé que la réponse des cals sur le milieu d'induction de l'embryogenèse somatique (GMN₂₀₀), se manifeste dans un premier temps par l'apparition en petite proportion de cal blanc d'aspect nodulaire à la surface du cal. Ces nodules évoluent en petites formes allongées. Ces derniers peuvent être isolés ou restés sous forme de touffes et se multiplie grâce aux



Figure 24 : Obtention des embryons et leurs germinations. **(Photo personnelle.,2016)**

Après 4 semaines d'induction, nous avons remarqué que la lumière semble avoir un effet positif sur la multiplication des cals et leur transformation en embryon, ces derniers sont restés hydratés et entrent totalement en prolifération fibreuse à la lumière. Nous avons constaté aussi qu'à présence de la lumière les cals se sont vite transférés en embryon et après quelques semaines les embryons en touffes d'embryon accompagné par verdissement de tissus.

La formation des territoires nodulaires ne semble pas freinée à la lumière, du fait que les nodules formés ont tendance à " germer" précocement en jeunes plantules.

Nos résultats montrent que à la lumière et à la faveur de milieu de culture, au bout de la 2^{ème} subculture des petits départs de plantules chlorophylliennes sont visibles, des nodules embryogènes apparaissent également mais deviennent chlorophylliens et forment des feuilles chétives et fines ainsi prennent une teinte bien distinguée, secrètent des phénols et forment des petites racines à la fin de la phase de multiplication. **(Figure 25)**

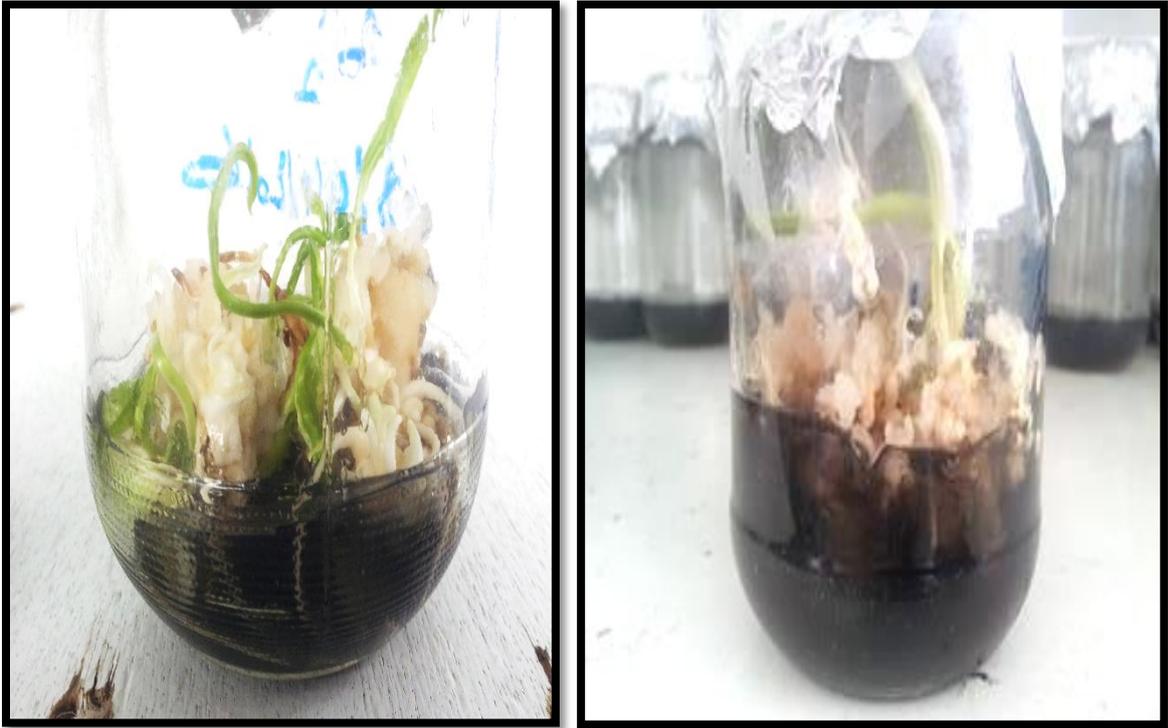


Figure 25 : L'apparition des embryons nodulaires après deux repiquages successifs.(Photo personnelle.,2016)

Au cours de notre expérimentation nous avons suivis l'évolution et la multiplication des embryons mis à notre disposition ci-après (**tableau 04**).

Résultats et discussion

Tableau 04 : La régénération des protoplastes et le développement des cals chez les cultivars (DN, TKB, TGZ).

Cultivars	Production des protoplastes obtenus x10 ⁶ /g	Cals	Embryon	multiplication pour les embryons %	Touffe d'embryon	Multiplication pour touffe d'embryon %
Iso DN ₁	7x10 ⁶ g/l	51	45	88.23%	49	96.07%
IsoDN ₂	6.65x10 ⁶ g /l	28	28	100%	23	82.14%
IsoDN ₃	6.33x10 ⁶ g /l	11	02	18.18%	02	18.18%
IsoTKB ₁	7x10 ⁶ g/l	36	16	44%	04	11.11%
IsoTKB ₂	5.99x10 ⁶ g /l	39	13	39%	06	15.38%
IsoTKB ₃	6.03x10 ⁶ g /l	25	19	76%	16	64%
IsoTGZ ₁	5.74x10 ⁶ g/l	02	/	0%	/	0%
Iso TGZ ₂	4.23x10 ⁶ g /l	01	/	0%	/	0%
IsoTGZ ₃	3x10 ⁶ g/l	12	1	8.33%	/	0%

En comparant entre les résultats obtenus des différentes souches des trois cultivars, nous avons constaté que les trois souches (IsoDN₁, IsoDN₂ et IsoTKB₃) ont donnés les meilleurs résultats que ce soit pour le rendement en protoplastes, ou pour leur régénération en cals et aussi pour le nombre obtenu des embryons, et des touffes d'embryons. Nous avons noté un rendement en protoplastes approximatif à 7x10⁶g/l pour les trois souches, avec des taux de multiplications embryonnaires respectivement noté (88.23%, 100% et 76%) et (96.07%, 82.14%et 64%) pour les touffes d'embryons.

Le tableau 04 ressort aussi que les souches IsoTKB₁, IsoTKB₂ et IsoDN₃ malgré leurs meilleurs rendements en protoplastes, ont données des résultats moins faibles par rapport aux trois déjà cité. Nous avons noté des taux de multiplications

Résultats et discussion

embryonnaires approximatifs respectivement de (39%,44% et 18.18%) ainsi que (15.38%,11.11% et 18.18%) pour les touffes d'embryons.

Nous avons noté aussi que les trois souches du cultivar TGZ n'ont connu aucun développement. **(Figure 26)**

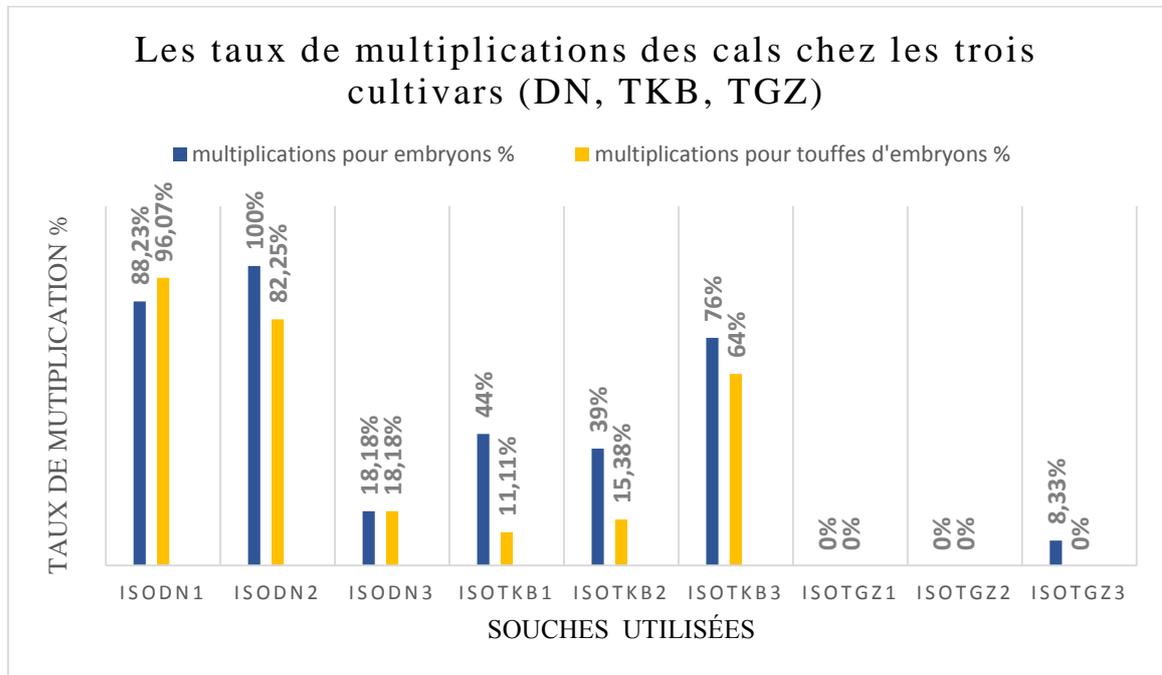


Figure 26 : La multiplication des cals et leurs développements en embryons et touffes d'embryons % chez les trois cultivars (DN, TKB, TGZ).

2.6. Développement des plantules

La néoformation des jeunes plantules à partir des protoplastes se fait grâce un milieu de prolifération GMP de base (MS) contenant une composition de vitamines MS (Thiamine 1mg/l, Acide nicotinique 1mg/l, pyridoscine 1mg/l) avec la présence facultative d'hormone de croissance (AIB 1mg/l), cette dernière joue un rôle très important dans l'enracinement des plantules.

Pour cette phase les mêmes conditions déjà cité ont été suivies avec un repiquage à un intervalle de 50 à 60 jours.

Durant notre expérimentation nous avons observé que la vitesse de néoformation des plantules est liée à différentes paramètres dont : le milieu d'entretien des cals et embryons.

Résultats et discussion

Nous avons remarqué que le développement de toutes les jeunes plantules sur un cal n'est pas synchrone, des plantules bien individualisées et des plantules en touffes. (Figure27)



Figure 27 : les jeunes plantules repiquées dans le milieu GMP. (Photo personnelle.,2016)

Au cours de notre expérimentation nous avons suivis le développement de matériel végétal et les résultats obtenus sont résumés dans le tableau ci-après (tableau 05).

Tableau 05 : Le développement des cals en plantules et touffes de plantules chez les génotypes (DN, TKB, TGZ).

Cultivars	Cals	Plantules	Multiplication pour les plantules %	Touffe de plantule	Multiplication pour touffe de plantules %
Iso DN ₁	51	48	94.11%	44	86.27%
IsoDN ₂	28	25	89.28%	21	75%
IsoDN ₃	11	3	27.27%	1	9.09%
IsoTKB ₁	36	16	41.02%	13	36.11%
IsoTKB ₂	39	22	56.10%	18	46.15%
IsoTKB ₃	25	21	84%	15	60%
IsoTGZ ₁	02	/	0%	/	0%
Iso TGZ ₂	01	/	0%	/	0%
IsoTGZ ₃	12	4	33.33%	1	8.33%

Résultats et discussion

Le tableau 05 ressort que les souches choisies ont montrés des développements qui ne sont pas semblable. Nous avons noté que les souches IsoDN₁, IsoDN₂ et IsoTKB₃ ont données des meilleures taux de multiplications que ce soit pour les plantules ou les touffes de plantules. Les taux ont été inscrit respectivement comme suit : (94.11%,89.28% et 84%) pour les plantules et (86.27%,75% et 60%) pour les touffes de plantules. Nous avons observé ainsi que les souches IsoTKB₁, IsoTKB₂ et IsoDN₃ ont connu des taux moins faibles avec (41.02%,56.10% et 27.27%) pour les plantules et (36.11%,46.15% et 9.09%) pour les touffes de plantules, tandis que les souches du cultivar TGZ n'ont connus aucun développement. (Figure28)

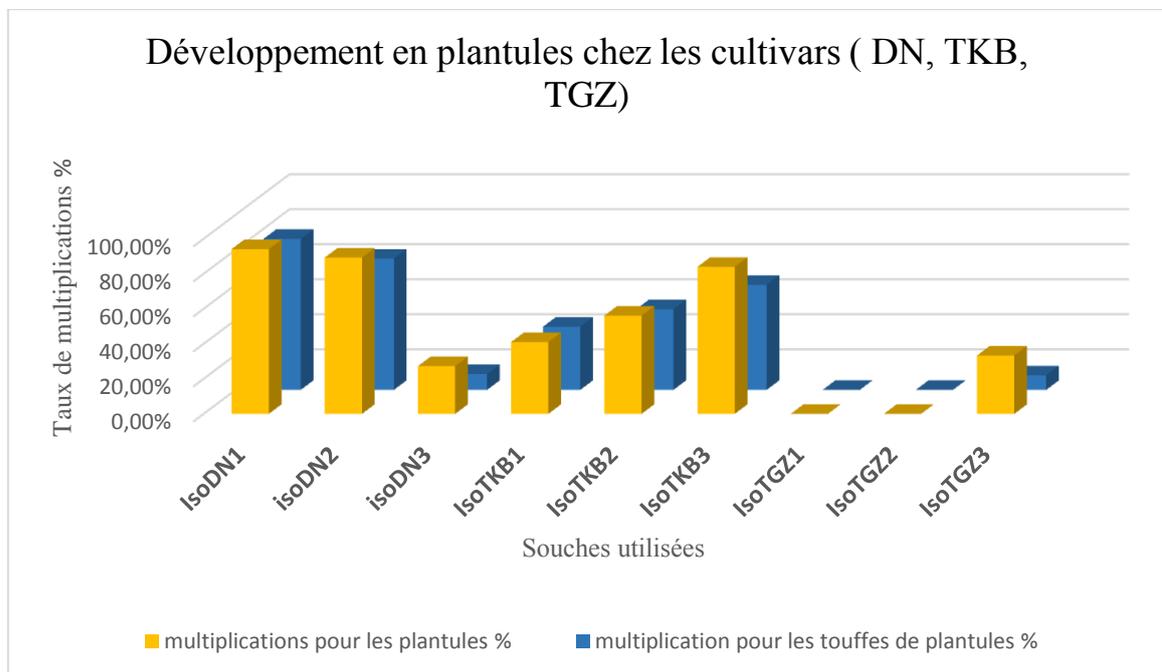


Figure 28 : Développement en plantules chez les différentes souches des cultivars (DN, TKB, TGZ).

Discussion

De nombreux facteurs influencent l'isolement de protoplastes, tels que l'épaisseur de la paroi, le temps d'incubation et le pH de la solution enzymatique, la manière d'agitation, la palmolyse avant la digestion enzymatique). Il est clair que l'application d'une palmolyse avant la digestion enzymatique influence le taux de protoplastes obtenus et leurs variabilités (Davey et al.,2004 ;Power et al.,2004). Durant notre expérimentation, les proroplastes obtenus ont montré la régénération

Résultats et discussion

de paroi, des divisions cellulaires et la formation de micros cals puis de cals, dont certains cals se sont transformés en embryons puis en plantules.

Nos résultats, ont montrés l'importance primordiale de la couche nourricière et son efficacité pour l'induction de l'activité mitotique des protoplastes et l'obtention d'un nombre considérable de micros cals. Ces résultats concorde à ceux de (Sun et *al.*,2004; Assani et *al.*,2006; Chabane.,2007; Yatta et *al.*,2015; Yatta et *al.*,2016).

La couche nourrice contient tous les éléments nécessaires pour la régénération rapide des protoplastes. Selon Komaï et al (2006), les protoplastes exigent la couche nourricière pour servir de stimulus à leurs divisions cellulaires.

Il ressort de nous travaux, que la paroi se fait pendant les 3 à 5 premiers jours de culture sur couche nourrice, mais elle ne débute qu'après 24 h. cette reconstitution s'exprime par l'apparition de la forme ovale de la cellule, ceci confirme que les cellules reconstituent leur paroi rapidement.

La formation de la paroi cellulaire est généralement suivie par des divisions cellulaires. Au bout de quelques mois, il y a formation de micros cals. Le nombre de micros cals formés paraît être influencé par la présence de cellules nourricières présentes dans la couche nourricière.

La présence d'auxine seule ou en combinaison avec cytokinine, relève une efficacité dans la régénération de protoplastes (Davey et *al.*,2005). Ainsi l'optimisation du développement des protoplastes se fait en fonction de la combinaison en régulateurs de croissance. Nous avons constaté que seule l'association 2.4-D/IPA induit des divisions cellulaires actives et la formation de cals.

Protoplastes pures et viables. Dans certaines conditions en culture, ces protoplastes ont reformés leurs parois et ont entamés une série de divisions. Nous ne sommes cependant par parvenu à faire poursuivre ces divisions, aux structures pluricellulaires obtenues de façon répétable, jusqu'à la formation d'une micro colonie.

La multiplication des cals est une étape importante qui demeure le problème fondamental dans le programme d'embryogenèse somatique du palmier dattier. Ce résultat concorde avec celui de nombreux auteurs (Bougedoura., 1979; Chabane.,2007; Yatta .,2007; Bougedoura.,2015) qui ont rencontré une grande difficulté à maintenir les cals en survie.

Résultats et discussion

Le 2,4-D est une substance de choix pour l'obtention de cals (Norma et *al.*, 1988). Il possède une capacité auxinique marquée et provoque à forte concentration de 100 mg/l, une dédifférenciation des tissus, suivie d'une prolifération cellulaire conduisant à la production de cals (Yatta., 2007). Des chercheurs rapportent l'efficacité du picloram par rapport au 2,4-D (Zaid., 1989; Murashing., 1983).

Nos résultats montrent que la production des cals s'est installée sur le milieu et présente des structures callogènes différentes (friable et compacte). En effet l'emploi des différents régulateurs de croissance (2,4-D 100mg/l, IPA 3mg/l pour le M₁₀₀) s'est révélé très efficace pour la multiplication des cals embryogènes. Ces résultats confirment ceux obtenus par (Bhaskaran et Roberta.,1995; Mater.,1986; Daguin et Letouze.,1988; Zaid et Tisserat., 1989; Yatta et Fergani., 2007, Vanneste et Friml., 2009).

L'ajout de l'acide aminé Glutamine contribue à la multiplication en améliorant leur pourcentage et nature callogènes sans modifier l'aspect et la taille des cals néoformés, ces résultats affirment les travaux de Reuveni.,1979; Reynold et Murashige.,1979; Sharma et *al.*, 1998; Daguin et Letouze 1988; Zaid 1989; Chabane 1995; Yatta et Fergani 2007; Vanneste et Friml.,2009; Yatta et Bouguedoura.,2013. VANNESTE et FRIML (2009) montrent que la glutamine à 100mg/l améliore le pourcentage des cals et non pas l'aspect et la taille des cals néoformés.

Plusieurs auteurs (Reuveni.,1979; Reynold et Murachige.,1979 ; Daguin et Letouze., 1988 ; Zaid.,1989 ; CHabane.,1995; Yatta., 2007; Yatta., 2013), confirment la performance et la rapidité de ces deux hormones dans l'induction et la multiplication des cals embryogènes. Ceci est confirmé aussi par Tisserat (1979) sur les embryons zygotiques.

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

Résultats et discussion

Les protoplastes du palmier dattier comme ceux de la plupart des monocotylédones sont considérés comme récalcitrants. La mise en culture des protoplastes n'est envisageable que s'ils sont isolés en quantité suffisante. Ce résultat est en accord avec Assani et *al.*, 2002. Leur culture pose de nombreux problèmes. C'est pour cela que l'utilisation des couches nourricières reste pour l'instant le milieu favorable pour stimuler les divisions cellulaires de protoplastes du palmier dattier.

Nous considérons ce résultat comme un succès dans le domaine des biotechnologies végétales

Conclusion

Conclusion

La culture du palmier dattier est sujette à divers problèmes phytosanitaires qui entravent son développement et son extension. Le bayoud causé par un champignon *Fusarium oxysporum* fsp *albedinis* est la maladie la plus destructive et la plus menaçante.

Ce travail nous a permis de réaliser en grande partie les objectifs que nous avons fixés au départ à savoir l'obtention de la suspension cellulaire à partir des cals embryogènes chez les trois cultivars Deglet nour, Takerboucht et Tegaza, ainsi l'isolement et la régénération des protoplastes par embryogénèse somatique.

Nous avons établi des suspensions cellulaires à partir des cals embryogènes friable des trois cultivars, ces suspensions ont été utilisées pour l'isolement des protoplastes, Ce sont les suspensions cellulaires et les cals qui ont permis l'obtention du rendement en protoplastes le plus élevé, les cellules produites chez le cultivar Deglet Nour montre une dissociation continue des agrégats cellulaires par rapport aux cellules des cultivars Takerboucht et Tegaza.

L'isolement de protoplastes dépend de plusieurs facteurs, le choix du génotype étudié, de la nature et de la composition de la solution enzymatique, et du temps d'incubation de matériel végétal dans la solution enzymatique. Le meilleur rendement obtenu a été noté par les protoplastes isolés à partir de la solution enzymatique SE contenant 2% de cellulase et 6% d'Hémicellulase.

Nos travaux ont permis aussi de révéler l'importance de la couche nourricière et son efficacité pour l'induction de l'activité mitotique des protoplastes, elle est aussi un outil très important pour la régénération de la paroi des protoplastes et la formation d'un nombre considérable de micro cals.

Notre expérience a relevé que la formation de la paroi se fait pendant les premiers 72h de la mise en culture et elle ne débute qu'après 24h. La reconstitution de la paroi se manifeste par l'apparition de la forme ovale cellules ce qui indique que l'état d'un vrai protoplaste est très bref et que les cellules vont bientôt reconstituées leurs parois.

Conclusion

La formation de la paroi est souvent suivie par des divisions cellulaires, et la formation des micros cals aura lieu dès le premier mois grâce aux constituants de la couche nourrice qui améliore essentiellement le rendement des micros cals.

Les cals issus de micros cals, cultivés sur le milieu GMN₂₀₀ dépourvu de substances de croissances, donnent naissance à des embryons somatiques. Ces derniers se développent soit directement en racines sans partie aérienne, mais un faible pourcentage de ces derniers se développe en plantules. Malgré l'obtention d'un faible taux de régénération de protoplastes, nous considérons que ces résultats est un succès dans le domaine de la biotechnologie et l'amélioration des plantes.

En perspective, nous proposons quelques idées qui pourraient être prises en considération pour la réussite de la culture des protoplastes et l'obtention d'hybrides somatiques après fusion des protoplastes chez le palmier dattier.

- Tester d'autres concentrations d'auxines responsables de la croissance désorganisée des cellules embryogènes.
- Mettre en culture uniquement des cals friables dans le milieu liquide P₅.
- Développement d'une suspension cellulaire embryogène stable comme source principale de la production de protoplastes.
- Maitre du temps d'expositions des micros cals sur la couche nourrice.
- Evaluer la culture de protoplastes par des techniques histologique, caryologique, moléculaire et cytofluorimétrique

Références bibliographiques

- **ABERLENC-BERTOSSI F.** 2012- *La détermination du sexe du palmier dattier*. Diade newsletters 3:1-8.
- **AL-KHAYRI JAMEEL M.**, 2011 - *basal salt differ according to culture stage and cultivar in date palm somatic embryogenesis*. *American journal of biochemistry and biotechnology* 7(1):32-42.
- **AJANE M ., BOUGERFAOUI M. ET ABAHMANE L.**2005 – *Les techniques de micropropagation du palmier dattier : Expérience de l'INRA –Maroc*. Symposium International sur le Développement Durable des Systèmes Oasiens du 08 au 10 Mars 2005 Erfoud, Maroc –B.Boulanouar & C.Kradi (Eds.).
- **ASSANI A., CHABANE D., HAÏCOUR R., BAKRY F., WENZEL G. ET FOROUGHI-WEHR B.** 2005 - *protoplast fusion in banana (musa spp): comparison of chimical (peg : polythylene glycol) and electrical procedure*. *Plant cell, tissue and organ culture*, pp.145-151.
- **ASSANI A., HAÏCOUR R., WENZEL G., CÔTE F.X., BAKRY F., FOROUGHI-WEHER B., DUCREUX G., AGUILLAR M.E.** 2001 -*plant regeneration from protoplasts of dessert banana cv. Grande Naine (Musa spp., Cavendish sub-group AAAA) via somatic embryogenesis*. *Plant cell Reports*, 20: 482-488.
- **ABE T. , FUTSUHARA Y.** 1991 – *Regeneration of rice plants from suspension cultures , in Biotechnology in Forestry and Agriculture , vol 14 , Rice (Bajaj , Y , P , S., ed) , Springer –Verlag,Heidelberg , pp.38-469.*
- **AUGE R., BEAUCHESNE G.J., BOCCON-GIBOD L., DECOURTY L., GET. B., JALOUZOUT R ., MINIER R., MORAN J., REYNORD J.P., STULLY D.G ET VIDALIE H.** 1989 - *la culture in vitro et ses applications horticoles*. 3^{eme} Ed., TEC. Et DOC., Lavoisier p225.
- **ABO EL -NIL M.** 1986 - *refining methods for date palm propagation*. In second symposium on date palm in Saudi Arabia. March 3-6
- **BELAID DJ.** 2015 – *la culture du palmier dattier en algérie*.col.sciences et technique agronomique.
- **BOUGUEDOURA N., BENNACEUR M., BABAHANI S, and BENZIOUCHE S-D.,** 2015 - Chapter 4, *Date Palm Status and Perspective in Algeria*. Springer Science+ Business Media Dordrecht 2015 125 J.M. Al-Khayri et al. (eds.), *Date Palm Genetic Resources and Utilization: Volume 1 :Africa and the Americas*, <https://www.researchgate.net/publication/281291951>.

- **BEZATO T.Z.F.** 2013 - les palmiers dattiers "*phoenix dactylefera*" à Toliara : étude de la filière, utilisation et diversité variétal p 22;23.
- **BENZIOUCHE S-E .,** 2012- *Analyse de la filière dattes en Algérie, constats et perspectives de développement.* Etude du cas de la Daïra de Tolga. Thèse Doc en agronomie, ENSA, El-Harrach.
- **BENKHALIFA A.** 2006 - Un système d'information au service des ressources génétiques du palmier dattier et de la lutte contre la Fusariose.*Journées Internationales sur la Désertification et le Développement durable. Biskra 10 et 12 juin.*
- **BAAZIZ M.** 2003 - *contraintes biotiques et abiotiques de la culture du palmier dattier (Phoenix dactylefera L.).* Exemples relatifs aux pays du Maghreb. Laboratoire de biochimie et biotechnologie des plantes, université Cadi ayyad, faculté des sciences samlalia, Marrakech, Maroc.
- **BANAT, F., AL-ASHEH, S., AL MAKHADMEH L.**2003 - *Evaluation of the use of the raw and activated date pits as potential adsorbents for dye containing waters.*porc. Biohem. 39:193-202.
- **BELGUEDJ M.** 2002 - *les ressources génétiques du palmier dattier, caractéristiques des cultivars de dattier dans les palmeraies du sud-est algérien.* INRAA, 289 p.
- **BOUNA Z.E.A.O.** 2002 - Contribution à l'étude bio-systématique, ethnobotanique.
- **BARROW S.** 1998 - *A monograph of phoenix L. (palmae: coryphoideae).* Kew bulletin 53:513-575.
- **BHASKARAN S.ET ROBERTA H.S.**1995 – *Somatic embryogenesis in date palm (phoenix Dactylifera L.).*In: Jain S., Gupta P et Newton R .(eds) Somatic Embryogenesis in Woody Plants.Vol .2:461-470.
- **BARREVELT, W.H.** 1993- *Date palm products.*FAO agricultural services bulltin No.101.
- **BRAC DE LA PERRIERE, R.A., BENKHALIFA, A.,** 1991. *Progression de la fusariose du palmier dattier en Algérie.* Sécheresse, 2 : 119-128.
- **BOUGEDOURA N.,** 1991- *Connaissance de la morphogenèse du palmier dattier. Étude In situ et in vitro du développement morphogénétique des appareils végétatifs et reproductifs.* Thèse de Doctorat. U.S.T.H.B .Alger.
- **BOUGUEDOURA N.,** 1979 - *Contribution à la connaissance du palmier dattier Phoenix dactylifera L'étude des productions axillaires.* Thèse de Doctorat Troisième Cycle, USTHB, Alger.
- **BOHNKE E. ET KOHLENBACH H.W.**1978 - Cultivaion of protoplasts of hyscymus .en / A.W.Alferman y.E.Reinhard , Eds.Production of natural compounds by cell culture

methods. Gesellschaft für Strahlen und Umweltforschung mbH, München, pp. 266-273.

- **CHABANE D., BOUGUEDOURA N., ASSANI A.** 2010. *Importance of protoplast culture in the genetic improvement of date palm (Phoenix dactylifera L.)*. Acta Horti 882:185-192.
- **CHABANE D, ASSANI A., BOUGUEDOURA N., HAÏCOUR R., DUCREUX G.,** 2007 - *induction of callus formation from difficult date palm protoplasts by means of nurse culture*. C.R. biologies, 330, p 382-401.
- **CIRAD et GRET**, 2002 - *Mémento de l'agronome*. Edit. Quae, 2002. ISBN 2876145227.1691 p. CIRAD/Centre de coopération International en Recherche Agronomique pour le Développement France, GRET/ Groupe de Recherche d'Echanges Technologiques.
- **CHAPMAN J.B., JOHNSON E.A., KOOTSEY, J.M.,** 1983 - *Electrical and biochemical properties of an enzyme model of the sodium pump*. J Member Biol 74: 139-53.
- **DAHER A.M.,** 2010 - *Détermination du sexe chez le palmier dattier : approches histocytologiques et moléculaires*. Thèse de doctorat en Biologie cellulaire. Université Montpellier II.
- **DRANSFIELD J.,** 2008 - *Genera palm arum: the evolution and classification of palm*, 131p
- **DAVERY M.R., ANTHONY P., POWER J.B ET LOWE K.C.** 2005 - *Efficient fertile plant regeneration from protoplasts of the India rice breeding line (Oryza sativa L.)*. plant cell Reports , 11:229-233.
- **DUCREUX G., SEYNI R.S.D., ELLISSECH D., SIHACHAKR D., JOUAN B.,** 2002 - *result of water stress in eight varieties of potato (Solanum tuberosum L.)* Acta Botanica Gallica 149.2.139-148.1253-8078.
- **DJERBI M.,** 1994 - *précis de phoeniciculture*. FAO.ROME, pp139, 146,147.
- **DJERBI M.,** 1982- a. *Le Bayoud en Algérie, Problème et Solution*. F.A.O. Regional Projet for palm and Dates Research centre in the Near East and North. Africa, Baghdad Iraq, 45 p.
- **DJERBI M.,** 1982 - b. *Bayoud disease in North Africa: history, distribution, diagnosis and control*. Date palm Journal, 1 (2): 153-97.
- **EL HAMDOUNI E., LAMARTI A., et BADOUC A.,** 1999 - *la régénération in vitro du fraisier (Fragaria X Ananassaduch): les possibilités offertes par la culture in vitro*. Bull. Soc. Oharm., Bordeaux, 138: 49-74.
- **FAOSTAT.2013-** United Nations Food and Agriculture Organisation FAO stat ; 2013 – <http://faostat.Fao.org/>.

- **FKI L .,** 2005 – *Application des suspensions cellulaires embryogenes au clonage et a l'amelioration in vitro du palmier dattier .These d'Universite , Faculte des sciences de Sfax , Sfax Tunisia.*
- **FERGANI K .,** 1998 - *embryogenèse somatique du palmier dattier (phoenix dactylefera L), cultivar Deglet Nour.* Thèse de magister en biologie, univ de Sci. Et Tech. Alger, 131p.
- **FERRY M ., BOUGUEDOURA N., ET EL HADRAMI I .,** 1998 - *patrimoine génétique et techniques de propagation in vitro pour le développement de la culture du palmier dattier, sècheresse 9,* p139-146.
- **GROS-BALTHAZARD M.,** 2013 – *Hybridization in the genus Phoenix: A review. Emirates Journal of Food and Agriculture 25: 831–842.*
- **GHILLOT G.,** 2010 - *la planète fleur.* Ed. Quae. France, 208 p.
- **GUEDIRA A.,** 2006 - *Mise en oeuvre des biotechnologies : suspension cellulaire , protoplastes , en vue de l'amelioration des bananiers a la resistance aux nematodes au Maroc.*These d'etat , Universite Mohamed V , faculte des sciences Rabat , 203p.
- **HENDERSON A.,** 2009 - *Palms of Southern Asia.* Princeton, Princeton University Press.
- **HAICOUR R., ASSANI A., MATSUMOTO K. ET GUEDIRA A.,** 2004 - *banana protoplasts. In: banana improvement: cellular, molecular biology and induced mutations.* Mohan Jain S. et Swennen R. Eds, INIRBAP, p.p. 11-125.
- **HENNELORE S., REGIS D., BART P., ESCALART J-V., VEZINA A ET PICQ C.,** 2003 – *suspension cellulaires embryogènes de bananier et bananier planta.* ed inibap. Parc Scientifique Agropolis 2, 34397 Montpellier Cedex 5, France.
- **KARIAA W ., SGHAIER-HAMMAMI B ., MMASMOUDI-ALLOUCH, BENJEMAA-MASMOUDI R .? DRIRA N .,** 2012 – *the date palm (phoenix dactylifera.) Micropropagation using completely mature female flowers. Plant biology and pathologie.C.R.biology , 335 : 194 – 204.*
- **KHALIFI H.,** 2012 - *propagation in vitro de 07 cultivars de palmier dattier (Phoenix dactylefera L.). Évaluation de leur résistance vis-à-vis de Fusarium oxysporum F.sp albedinis, agent causal du bayoud.* Thèse. ENSA, Alger. 80p.
- **KRIKORIAN A.D ET KANN R.P.,** 1981 - *plantlet production from morphogenetically competent cell suspension of daylily.* Ann Bot 47: 679-686.
- **KADA, A., DUBOST, D.,** 1975 - *Le bayoud à Ghardaia.* Bull. Agron. Saharienne, Algérie, 1(13): 29-61.
- **KILLIAN, C., MAIRE, R.,** 1930 - *Le Bayoud, maladie du dattier.* Bull. Soc. Hist. Nat. Agr., 21: 89-101.

- **LITTARDI C.**, 2015 - *palm di liguria*. Economia, paesaggio e significato simbolico nell'estrema riviera di ponente (secoli XIII-XX) 293p.
- **LACHEB F.**, 2010 - *extraction et caractérisation physico-chimique et biologique de matière grasse du noyau des dattes : essai d'incorporation dans une crème cosmétique de soin*. Mémoire de magister, spécialité génie alimentaire, faculté des sciences de l'ingénieur, université, M'Hamed Bougara, Boumerdès.
- **LACHQER – SILLOU K.**, 1989 - *étude de l'embryogenèse somatique du palmier dattier (Phoenix dactylefera L.) à partir des tissus de cœurs de rejets*. Thèse de 3^{ème} cycle, univ CAD Ayyad Marrakech, 120p.
- **LINNÉ C. (VON).**, 1753 - *Species Plantarum*, tome 2. Stockholm, Impensis Laurentii Salvii, 776 p.
- **MAZRI AND MEZIANI.**, 2015 - *Micropropagation of Date Palm: A Review*, *Cell Dev Biol* 2015, 4:3 m p5. <http://dx.doi.org/10.4172/2168-9296.1000160>.
- **MECHTA N ., AZOUAOUI-AIT KETTOUT T ., RAHMANIA F .,** 2015 – *Fusarium oxysporum f.sp. albedinis : effets du milieu de culture sur la croissance mycelienne , la sporulation et la production de l'acide fusarique*. Laboratoire de Recherche sur les zones Arides , Faculté des sciences Biologiques Université de Sciences et de la Technologie Houari Boumediene (USTHB) , Alger , Algérie.pp82.
- **MERANEH A.D .,** 2010 - *détermination du sexe chez le palmier dattier : approche histocytologiques et moléculaires*. Thèse de doctorat de l'université Montpellier II.
- **MOHAMADOU ADAMOU N.ET SANI GAOH B.**, 2010 *.Essai d'isolement de protoplastes de deux cultivars de palmier dattier (phoenix dactylifera L.) Taquebucht et Tegaza en vue de leur fusion* These d'ingénieurat.Universite de Mostaganem.
- **MONNIER M.**, 1990. *Induction of embryogenesis in suspension culture .In POLLAND J.Methods of Molecular Biology .Humana Press,USA,P 149-156.*
- **MATE A.A.**, 1986 - *in vitro propagation of phoenix dactylifera L.* date palm journal, 4(2), p 137-152
- **MUNIER P.**, 1973 - *Le palmier-dattier*. Paris, Maisonneuve et Larose, 221 p.
- **MOREL, G ET MARTIN, G.**, 1952 - *guérison de dahlias atteintes d'une maladie à vitus*. C.R. ACAD. SCI. (Paris) 235 : 1324-5p.
- **NEWTON C., GROS-BALTHAZARD M., IVORRA S., PARADIS L., PINTAUD J.- C., TERRAL J.-F.,** 2013 - *Phoenix dactylifera and P. sylvestris in Northwestern India: A glimpse into their complex relationships*. *Palms* 57: 37–50.
- **NEWTON C., TERRAL J.-F., IVORRA S., GROS-BALTHAZARD M., TITO DE MORAIS C., PICQ S., TENGBERG M., PINTAUD J.-C.,** 2008 - *Graines d'histoire :*

Approche morphométrique de l'agrobiodiversité du palmier dattier, actuelle et d'Égypte ancienne. Revue d'Ethnoécologie XXX.

- **OUENNOUGHI M. & DUBOST D.**, 2005 - Le voyage forcé des dattiers en Nouvelle-Calédonie. *Sécheresse* 16 (4): 241-246.
- **OZENDA P.**, 2004 - *Flore et végétation du Sahara*. Troisième édition. CNRS édition. 750005 Paris, 92, 438,662.
- **PINTAUD J.-C., ZEHDİ S., COUVREUR T., BARROW S., HENDERSON S., ABERLENC-BERTOSSI F., TREGEAR J. & BILLOTTE N.**, 2010 - *Species delimitation in the genus Phoenix (Arecaceae) based on SSR markers, with emphasis on the identity of the date palm (Phoenix dactylifera L.)*. In Seberg O., Petersen G., Barfod A. & Davis J. (Ed.), *Diversity, phylogeny and evolution in the Monocotyledons*, Aarhus University Press : 267-286.
- **PEYRON G.**, 2000 - *Cultiver le palmier dattier*. Groupe de recherché et d'infirimation pour le développement de l'agriculture d'oasis (GRIDAO) ,109p.
- **PEREAU-LEROY, P.**, 1958 - *Le Palmier dattier au Maroc*. Min .Agric. Maroc, Service. Rech. Agron. et Inst Français Rech. Fruit Outre Mer, (I.F.A.C), 142 p.
- **POPENOE W.**, 1938 - *Manual of tropical and subtropical fruits*. New York, the Macmillan Company, 544 p.
- **RIVAS M., BARBIERI, R.L. DA MAIA L.C.**, 2012 - *Plant breeding and in situ utilization of palm trees*. *Ciencia Rural Santa Maria* 42: 261- 269.
- **RAJ, R., BHANSALI.**, 2010 - *date palm cultivation in the changing scenario of Indian arid zones: challenges and prospects*. In: *desert plants*, K.G Ramawat (Ed), springer, p.p.423-459.
- **RIVAL A., BEULÉ T., BARRE P., HAMON S ., DUVAL Y. ET NOIROT M.**, 1997 - *comparative flow cytometric estimation of nuclear DNA content in oil palm (Elaeisguineensis Jacq.) tissue cultures and seed-derived plants*. *Plant cell. Rep.*, 16: 884-887.
- **REUVENI O.**1979 - *Embryogenesis and plantlets growth of date palm (phoenix dactylifera L.) deriied from callus tissues – plant physiol.*63, 138 p.
- **SAKIN ABDRABO S.** Analytical methods applied to the chemical characterization and classification of palm dates (*Phoenix dactylifera L.*) from Elche's Palm Grove.2013 [consultéen janvier 2015]. <http://hdl.handle.net/10045/28817>.
- **SI-DEHBI F., CHABANE D ET BOUGUEDOURA N.**, 2013 - *improvement of date palm (Phoenix dactylefera L.) by using cell suspension*. In *proc. First is on date palm eds*. Bouguedoura et al., *Acta Hort.* 1994. 303p.

- **SANÉ D., ABERLENC-BERTOSSI F., DJITININGO DIATTA L.I., GUÈYE B., DAHER B., SAGNA M., DUVAL Y., ET BORGEL A.**, 2012- influence of growth regulator on callogenesis and embryo development in date palm (*Phoenix dactylifera* L.) sahelian cultivars .The scientific World journal , pp.1_8.
- **SANÉ D ., ABERLENC-BERTOSSI F .? GASSAMA-DIA Y.K ., SANGA M ., TROUSLOT M.F ., DUVAL Y . ET BORGEL A .** 2006 – *histological analysis of callogenesis and somatic embryogenesis from cell suspension of date palm (Phoenix dactylifera)*.Ann Bot.98 :301-308.
- **SEDRA, MY.H.**, 2005 - a. la maladie du Bayoud du palmier dattier en Afrique du Nord: Diagnostic et caractérisation. *Actes du symposium International sur le développement Durable des Systèmes oasiens du 08 au 10 mars*. Erfoud Maroc. B. Boulanouar ET C. Kradi (Eds).
- **SEDRA, MY.H.**, 2003 - Le bayoud du palmier dattier en Afrique du nord, FAO, RNE/SNEA-Tunis. Edition FAO sur la protection des plantes. Imprimerie Signes, Tunis, Tunisie, 125p.
- **SEDRA .H.**, 2003 - *le palmier dattier base de la mise en valeur des oasis au Maroc*. Techniques phoenicicoles et création d'oasis, 25 p.
- **SIHACHAKR D.**, 2002 - *protoplastes : isolement, culture, régénération et fusion au polythylene glycole*. In : biotechnologies végétales, techniques de laboratoire. Tec et Doc Ed., pp.177-199
- **SHARMA D.R.,CHOWDHORI J.B ET YADAN N.** 1998 - *Somatic embryogenesis and plantlet regeneration from shoot tip calli of wild date phoenix sylvestris Roxb*. Indian Journal of Experimental Biology , 26 :854-857.
- **SEDRA, MY.H.**, 1996 - *Résultats de prospections effectuées dans la vallée Ait Mansour (Région de Tizint-Taфраoute au sud du Maroc)*. Rapport de mission, INRA- Maroc
- **SAKA ET ABED.**, 1989 - la multiplication végétative in vitro du palmier dattier par embryogenèse somatique. *Compte rendu du 2eme séminaire maghrébin sur la multiplication rapide du palmier dattier par les techniques de culture in vitro*, FAO/PNUD/RAP/88/024,P.71-73.
- **SHARMA, D.R., SUNITA, D., CHOWDHURY, J.R.**, 1984 - *Somatic embryogenesis and plant regeneration in date palm (Phoenix dactylifera L.) cv. 437 "Khadravi" through tissue culture*. Indian J. Exp. Biol. 22, 596–598..
- **STEWART F.C ET M.O. MAPES.**, 1971 - *Morphogenesis and plant propagation in aseptic cultures of asparagus*. Bot. Gaz. 133: 70-79.

- **SCHROEDER C.A., 1970** - *tissue culture of date shoots and seedling*. Date grower's institute report 447: 25-27.
- **TIECOURA K., KOUASSI A.B ., N'NAN –ALLA O.DINANT M.ET LEDOU L.** 2014 – Optimisation des conditions d'établissement de suspensions cellulaires embryogènes à partir de cals d'apex caulinaire de Mil (*Pennisetum glaucum* L.).
- **TERRAL J.-F., NEWTON C., IVORRA S., GROS-BALTHAZARD M., TITO DE MORAIS C., PICQ S., TENGBERG M. & PINTAUD J.-C.,** 2012 - *Insights into the historical biogeography of the date palm (Phoenix dactylifera L.) using geometric morphometry of modern and ancient seeds*. *Journal of Biogeography* 39 (5): 929-941.
- **TENGBERG M.,** 2003 - *Research into the origins of date palm domestication*. In the Emirates Center for Strategic Studies and Research (Ed.), *the date palm: from traditional resource to green wealth*. Abu Dhabi, the Emirates Center for Strategic Studies and Research: 51-64.
- **THORPE. T.A.,** 1988 - *In vitro somatique embryogenesis*. *ISI. Atlas science*, 1: 81-88.
- **TISSERAT B .**1979 - *Propagation of date palm (Phoenix dactylifera L.) in vitro*. *Journal of Experimental Botany*, 30 (119): 1275-1283.
- **TAKEBE I. 1969** – *Isolation of tobacco mesophyll cells in intact and active state plant ce 11* *physiol.*, 115-124.
- **TOUTAIN, G.,** 1965 - Note sur l'épidémiologie du Bayoud en Afrique du Nord. *Al awamia*, 15: 37-45.
- **VANNESTE S .ET FRIML J. 2009- AUXIN** : a trigger for change in plant development .*Cell* 136 :1005-1016.
- **VASIL V. ET VASIL I.K.,** 1981 – *somatic embryogenesis and plant regeneration from suspension cultures of pearl millet (Fennisetum americanum)* – *Ann. Bot.* 47. 669-678.
- **WALLIN A.,** 1974 – *The induction of aggregation and fusion of Daucus Carota protoplasts by polyethylene glycol*.*Z.Pflanzenphysiol.* 74:64-80.
- **YATTA D., ABED F ET BOUGUEDOURA N., 2016** – communication orale « in vitro technics used for date palm improvement and their relationship to bayoud disease ».XVI international meeting europs (European network of palm scientists -7- 10 May 2016, Las Palmas de Gran Canaria - Spain.
- **YATTA D ET BOUGUEDOURA N.,** 2015 - *micropropagation of date palm (Phoenix dactylefera L.) using cell suspension established from vegetative and floral explants*.

- **YATTA D., ABED F., AMARA B., YAKHOU M.S., BELOUED D., BEULE T., BENNACNEUR M. ET BOUGUEDOURA N .,** 2014 - *Somatic embryogenesis and molecular analysis for conformity test of date palm vitroplant (Phoenix dactylefera L.) and their relationship to bayoud disease.* Journal of agriculture scene and technology, pp. 144-150.
- **YATTA D ET BOUGUEDOURA N .,** 2013 - *"the date palm in Algeria"*, San Romeo (Italy).
- **YATTA D., ABED F., AMARA B., YAKHOU M.S., BENHAFSI F.,** 2012 - *participation à la manifestation sur la recherché scientifique et développement technologique.* Célébration du 50^{eme} anniversaire de l'indépendance nationale.
- **YATTA D., ABED F., AMARA B ET YAKHOU M.S.,** 2009 - *isolement et culture de protoplaste de palmier dattier Phoenix dactylefera L. séminaire international sur " la protection et la préservation des écosystèmes sahariens".*
- **YATTA D ET FERGANI.,** 2007 - *multiplication et amélioration du palmier dattier (Phoenix dactylefera L.) par les biotechnologies. Atelier National de recherche sur le palmier dattier et le bayoud : préservation et valorisation.* INRAA.
- **YATTA EL DJOUZI DJAMILA .,** 2007 - *étude de l'embryogenèse somatique chez le palmier dattier (Phoenix dactylefera L.) Et caractérisation moléculaire du matériel végétale initial en vue de l'étude de la conformité des vitroplants.* Thèse USTHB, 96p.
- **YAKOUB -BOUGDAL S.,** 1984 - *Etudes des radiations rouges sur les méristèmes et sur des embryons en culture in vitro chez le palmier dattier (Phoenix dactylefera L.).* Approches quantitatives. DEA Pierre et Marie Curie, Paris VI. Pp 58.
- **ZOHARY D., HOPF M. & WEISS E.,** 2012 - *Domestication of plants in the Old World.* 3^{eme} édition. New York, Oxford University Press, 264 p.
- **ZANGOO.,** 2011 - *Étude comparative de l'architecture et de la géométrie de l'inflorescence mâle et femelle du palmier dattier.* Biodiversité Végétale Tropicale (BVT). Pp. 1-47.
- **Zaid A. (Ed.)** 2002 - *Date palm cultivation.* Food and agricultural organization of the United Nations, Rome, (enligne).. URL <http://www.fao.org/docrep/006/y4360e/y4360e00.htm>.
- **ZAHRAN M.A. & WILLIS A.J.,** 1992 - *The vegetation of Egypt.* Londres, Chapman & Hall, 424 p.
- **ZAID A.,** 1989 - *Etude histologique de l'embryogénèse somatique chez le palmier dattier (phoenix dactylifera L.).Compte rendu du 2^{eme} séminaire magrébin sur la multiplication rapide du palmier dattier par les techniques de culture in vitro.* FAO/PNUD/RAB/88 /024.PP.81-95.

- **ZRÿD J.P.**1988 – *Cultures de cellules, tissus et organes végétaux.Fondement théorique et utilisations pratiques.* Ed Press. Polytechnique Romandes Suisse.
- **ZOHARY D. & SPIEGEL-ROY P.**, 1975 – *Beginnings of fruit growing in Old World.* *Science* 187 (4174):319-327.

Annexes

Annexe 01

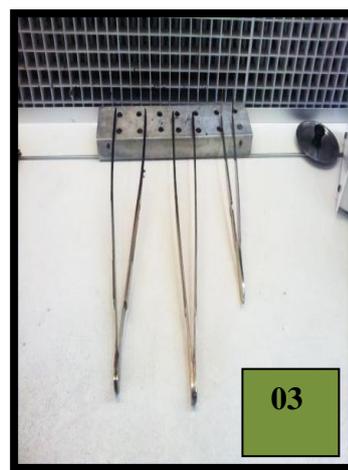


Figure 01 : Stérilisateur à billes. **Figure02 :** Etuve. **Figure03 :** Matériel de repiquage.



Figure 04 : Balance. **Figure 05 :** Balance de précision. **Figure 06 :** Verrerie.

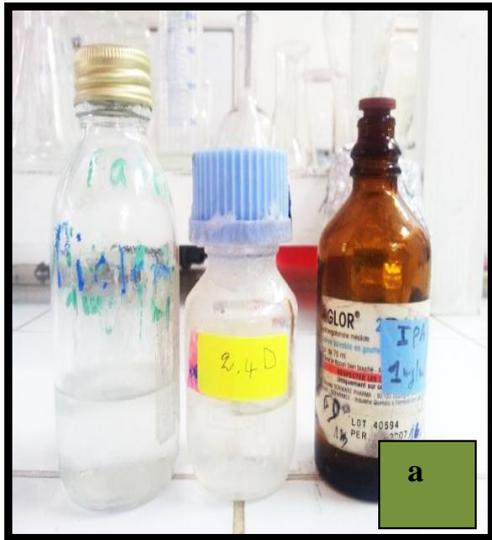


Figure 07: (a) IPA, 2,4D, Picloram.



(b)Thiamine, Vitamines Morel, Vitamines Ms.



Figure 08 : Distributeur automatique.



Figure 09 : Macro Ms, Micro Ms et Fer Ms.



Figure 10 : Les produits utilisés (chambre des pesées)



Figure 11 : Agitateur.



Figure 12 : Centrifugeuse.



Figure 13 : Hotte a flux laminaire.



Figure 14 : Chambre de culture.

Annexe 02

Tableau 01 : Les composants de la solution mère des Macro MS.

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

Tableau 02 : Les composants de la solution mère des Micro MS.

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

Tableau 03 : Les composants de la solution mère Fer MS.

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

Annexe 03

Tableau 04 : Milieux solides pour l'induction et la multiplication des cals.

Eléments	Milieu M ₁₀₀
Solutions mères Murashig et Skoog Macro éléments Micro éléments Fer MS	40 ml 10 ml 10 ml
Vitamines Thiamine Myo-inositol	1 mg/l 100 mg/l
Hormones de croissances IPA Piclorame 2-4D	3 mg/l / 100 mg/l
Source de carbone Saccharose	45 g/l
Autres constituants KH ₂ PO ₄ Na ₂ H ₂ PO ₄ Adénine Citrate d'ammonium L-Glutamine Charbon actif	100 mg/l 170 mg/l 40 mg/l 200 mg/l 100 mg/l 3 g/l
Agent de solidification phytagel	7 g/l
pH= 5.84	

Tableau 05 : Milieu liquide pour la suspension cellulaire (P5).

Eléments	Quantités
Solutions mères de Murashig et Skoog	
Macro éléments	40 ml
Micro éléments	10 ml
Fer	10 ml
Vitamines	
Thiamine	1 mg/l
Inositol	100mg/l
Hormones de croissances	
Piclorame	5 mg/l
IPA	1 mg/l
Source de Carbone	
Saccharose	45 g/l
Autres additifs	
KH_2PO_4	100 mg/l
NaH_2PO_4	170 mg/l
L-Glutamine	100 mg/l
Adenine	40 mg/l
PVP	2 g/l
Citrate d'ammonium	200 mg/l
MnSO_4	40 mg/l
pH= 5.84	

Tableau 06 : Milieu PcM2 (couche nourricière pour la mise en culture des protoplastes et l'induction du cal embryogène).

Produits	Concentration
Solution mères de Murashig et Skoog Macro éléments Micro éléments Fer	40 ml 10 ml 10 ml
Source de carbone Glucose Maltose Saccharose	0.5 g 0.1 g 45 g
Mannitol	45g
Hormones de croissance 2-4D	2.5ml
Vitamines Vitamines Morel	1ml
Agent de solidification agarose	20g
pH= 5.7	

Annexe 04

Tableau 07 : Milieu solide pour la germination des cals. (Pour 1L de milieu)

Eléments	Milieu GMN ₂₀₀
Solutions mères Murashig et Skoog	
Macro éléments	40 ml
Micro éléments	10 ml
Fer MS	10 ml
Vitamines	
Thiamine	1mg/l
Hormones de croissances	/
Source de carbone	
Saccharose	60g
Autres additifs	
Myo-inosito	100mg
L-Glutamine	200mg
Adenine	40mg
NH ₄ NO ₃	200mg
KH ₂ PO ₄	100mg
NaH ₂ PO ₄	170mg
Charbon actif	200mg
Agent de solidification	
Phytigel	2g
pH = 5.84	

Tableau08 : Milieu solide de prolifération (Pour un 1L de milieu).

Eléments	Milieu GMP
Solutions mères Murashig et Skoog	
Macro éléments	40 ml
Micro éléments	10 ml
Fer MS	10 ml
Vitamines MS	
Thiamine	1mg/l
Acide nicotinique	1mg/l
pyridoscine	1mg/l
Hormones de croissances	
AIB (pas toujours)	1mg/l
Source de Carbone	
Saccharose	60g
Autres additifs	
Myo-inosito	100mg
L-Glutamine	200mg
Citrate d'ammonium	200mg
KH ₂ PO ₄	100mg
NaH ₂ PO ₄	170mg
Charbon actif	200mg
Agent de solidification	
Phytigel	2g
pH = 5.84	

Annexe 05

Tableau 09 : Les principaux travaux d'embryogenèse somatique du palmier dattier (Yatta.,2009).

Auteurs	Explants	Résultats
Reuveni et al.,1979	Embryon zygotique entier	Obtention de cals embryogènes
Bouguedoura.,1979	Apex, bourgeons axillaires, stipe, et rachis	Formation de plantules
Reynolds et murachige.,1979	Embryon excisés de noyaux immatures	Proembryon
Tisserat.,1979	Embryon excisés de graines apex, bourgeons axillaire, fragment de rachis ainsi que des inflorescences	Formation de plantules
Mater.,1986	Embryons zygotiques immatures, fragment, de cœur de rejets	Formation de plantules
Sharma et al.,1984 et 1987	Apex, bourgeons axillaires, explants foliaires de viro plants	Formation de plantules
Yakoub bougdal., 1986	Apex, bourgeons auxillaires meritèmes, apex, bourgeons axilaires	Formation d'inflorescences et étude des phychromes, dosage de l'ADN
Daikh et Demarly.,1987	Explant foliaires de vito-plant	Formation de plantules
Daguin et Letouze.,1987	Tissus cœur de rejet	Formation de plantules
Lachqer sillou.,1989	Tissus de cœur de rejet, embryon zygotiques	Formation de plantules
Loutfi.,1989	Jeune inflorescence mâle et femelle	Formation de plantules
Scoarnec.,1991	Tissus de cœur de rejet	Formation de plantules
Chabane.,1995	Apex, bourgeons axilliaire, stipe, et rachis, feuilles de cœur de rejets	Formation des plantules d'explants de cœur de rejets
El hadrami et baaziz.,1995	Tissus de cœur de rejets	Formation de plantules
Fergani.,1998	Apex, stipe, jeunes feuilles	Formation de plantules
Yakoub-bougdal.,2005	Apex, bourgeons axillaires	Formation d'inflorescences et étude comparative entre le palmier dattier voir deglet nour et une dicotylédone l'olivier Chamlal
Chukwuemeka et al.,2005	Tissus de cœur de rejets	Formation de plantules
Yatta.,2007	Tissus de cœur de rejets	Formation de plantules
Massouni.,2008	Etude de l'embryogenèse zygotique	Formation de plantules

Table de matières

Résumé	
Abstract	
الملخص	
Liste de figures	
Liste de tableaux	
Liste d'abréviations	
Introduction	01

Première partie : données bibliographiques

1. Historique et origine.....	03
2. Taxonomie du palmier dattier.....	04
3. L'ancêtre sauvage du palmier dattier.....	04
4. Morphologie du palmier dattier.....	05
4.1. L'appareil végétatif.....	05
4.1.1. Le stipe ou tronc.....	05
4.1.2. Les bourgeons.....	06
4.1.3. Les palmes	07
4.2. Le système racinaire	07
4.2.1. La zone de respiration.....	07
4.2.2. La zone à racine de nutrition.....	07
4.2.3. La zone supérieure à racine d'absorption.....	07
4.2.4. La zone inférieure à racine d'absorption en profondeur	07
5. Cycle de développement.....	07
6. L'appareil de reproduction.....	08
6.1.1. Les organes floraux.....	08
6.1.2. Les inflorescences femelles	08
6.1.3. Les inflorescences mâles	08
6.1.4. Le fruit.....	08
7. Mode de multiplication.....	08
7.1. Multiplication par semis.....	09
7.2. Multiplication par rejet.....	09
7.3. Multiplication par voie végétative.....	09
8. Technique de multiplication.....	10
8.1. L'organogenèse.....	10
8.2. L'embryogenèse somatique.....	10
9. Maladie du palmier dattier.....	11

10. Distribution géographique et importance	13
10.1. Dans le monde.....	13
10.2. Dans l'Afrique.....	13
10.3. En Algérie.....	14
11. Importance socio-économique du palmier dattier	15
12. Production	16
12.1. Dans le monde.....	16
12.2. En Algérie.....	17
13. Ecologie du palmier dattier	18
14. Etat de la diversité génétique du dattier	18
15. Notion de cultivars	19
16. Culture de cellule de protoplastes	19
16.1. Suspension cellulaire.....	19
16.2. Isolement des protoplastes.....	20
16.2.1. Plasmolyse.....	20
16.2.2. Dégradation de paroi.....	21
16.3. Culture des protoplastes.....	21
16.4. Fusion de protoplaste.....	22
16.4.1. La fusion au polyéthylène glycol (PEG).....	23
16.4.2. La fusion électrique.....	23
17. Caryotype	24

Deuxième partie : Matériel et méthodes

1. Etablissement de l'embryogenèse somatique à partir	24
des protoplastes.	
1.1. La suspension cellulaire.....	25
1.1.1. Matériel biologique.....	25
1.1.2. Préparation et stérilisation du milieu.....	25
de culture liquide P ₅	
1.1.3. Conditions de culture.....	25
1.1.4. Test de viabilité.....	26
1.2. L'isolement des protoplastes.....	27
1.2.1. Préparation de la solution enzymatique.....	27
1.2.2. Macération enzymatique.....	28
2. Culture des protoplastes	30
3. Régénération des protoplastes	31
3.1. Multiplication des cals (phase d'initiation).....	31

3.1.1. Stérilisation du matériel de culture.....	32
3.1.2. Préparation de milieu de culture solide (M ₁₀₀).....	32
3.1.3. Stérilisation des milieux de culture.....	33
3.2. Germination des cals (phase de différenciation).....	34
3.3. Développement des plantules.....	34

Troisième partie : Résultats et discussions

1. Etablissement de l'embryogenèse somatique à partir des protoplaste..	35
1.1. Suspension cellulaire.....	35
1.1.1. Mise en culture et évolution.....	35
1.1.2. Observation microscopique.....	37
1.1.3. Test de viabilité par la coloration à la (FDA).....	37
✚ Discussion.....	38
1.2. Isolement des protoplastes.....	39
1.2.1. Effet de la solution enzymatique.....	40
1.2.2. Effet des conditions d'incubation.....	40
1.2.2.1. Effet de l'agitation.....	41
1.2.2.2. Effet du temps d'incubation.....	41
1.2.3. Rendement des protoplastes.....	41
1.2.4. Variabilité morphologiques des protoplastes.....	44
✚ Discussion.....	45
2. Régénération des protoplastes.....	47
2.1. Survie des protoplastes.....	47
2.2. Développement des protoplastes isolés.....	48
2.3. Evolution des micros cals.....	49
2.4. Multiplication des cals (phase initiation).....	49
2.5. Induction à l'embryogenèse somatique.....	51
2.6. Développement des plantules.....	55
✚ Discussion.....	57
Conclusion.....	61

Références bibliographique

Annexes