

**UNIVERSITE SAAD DAHLEB DE BLIDA**

**Faculté des Sciences Agro-Vétérinaires**

**MEMOIRE DE MAGISTER**

En Sciences Agronomiques

Spécialité : Amélioration des productions végétales

**CULTURE DE PROTOPLASTES DE TROIS CULTIVARS  
DU PALMIER DATTIER (*PHOENIX DACTYLIFERA* L.) CV.  
DEGLET NOUR, CV. AKERBOUCH ET CV. DEGLA  
BEIDA.**

Par

**Khayreddine TITOUH**

Devant le jury composé de :

A. BOUTEKRABT  
A. BENCHABANE  
FZ. CHAOUCH  
FZ. BENREBIHA  
L. KHELIFI

Professeur, U. de Blida  
Maître de conférences, U. de Blida  
Maître de conférences, U. de Blida  
Maître de conférences, U. de Blida  
Professeur, ENSA, Alger

Président  
Examineur  
Examineur  
Examineur  
Promoteur

Blida, Avril 2011

## RÉSUMÉ

Afin de régénérer à partir des protoplastes de cals de trois cultivars du palmier dattier (Deglet Nour, Akerbouch et Degla Beïda), différentes étapes sont nécessaires : Isolement, purification et culture. Chaque étape doit être optimisée. Pour ce faire, l'étude a montré que les meilleures conditions pour :

❖ L'isolement de protoplastes viables sont : une solution enzymatique contenant 1,5 % de Cellulase et 1 % de Macérozyme en plus de 0,5 M ou 0,6 M de Mannitol avec une incubation pendant 16 à 18 h sous conditions stationnaires ou 50 rpm d'agitation selon le cultivar. Les résultats obtenus ainsi sont de  $4,67 \times 10^5$ ,  $4,92 \times 10^5$  et  $4,17 \times 10^5$  protoplastes / gmf respectivement pour Deglet Nour, Akerbouch et Degla Beïda.

❖ La purification se fait sur une couche de saccharose concentrée à 25 % pour Deglet Nour et Degla Beïda, et sur une couche de saccharose à 21 % pour Akerbouch. La centrifugation est faite pour les trois cultivars à 65 x g pendant 5 minutes. Les résultats en terme de pourcentage de récupération de protoplastes viables purifiés ainsi sont : 85 %, 87 % et 95 % respectivement pour Deglet Nour, Akerbouch et Degla Beïda.

❖ La culture des protoplastes ainsi isolés a été réalisée sur un milieu semi-solide contenant 0,3 % d'agarose contenant 0,5 ; 1 ou 2 mg/l de 2,4-D combinées respectivement avec 1, 0,5 et 0,5 mg/l de BAP. Une balance hormonale (BH N°1) contenant 2 mg/l de 2,4-D et 0,5 mg/l de BAP a permis un bon maintien de la viabilité des protoplastes cultivés (46,4 et 20 % après 15 jours de la mise en culture respectivement pour Deglet Nour et Akerbouch) avec une bonne régénération de la paroi (43,6 et 18 %) et division cellulaire (17,5 et 2,8 %) aboutissant après plus de deux mois de culture à des microcals visibles à l'œil nu composés d'un grand nombre de cellules.

## SUMMARY

In order to regenerate from calluses protoplasts of three date palm cultivars (Deglet Nour, Akerbouch et Degla Beïda), different steps are necessary : Isolation, purification and culture. Each step may be optimized. For this, the study demonstrated that the best conditions for :

❖ The isolation of viable protoplasts are : An enzymatic solution containing 1,5 % of Cellulase and 1 % of Macérozyme in addition to 0,5 M or 0,6 M of Mannitol with an incubation during 16 to 18 h under stationary conditions or 50 rpm of agitation depending the cultivar. The obtained results are  $4,67 \times 10^5$ ,  $4,92 \times 10^5$  et  $4,17 \times 10^5$  protoplasts / gmf respectively for Deglet Nour, Akerbouch et Degla Beïda.

❖ The purification is done on a layer of sucrose concentrated to 25 % for Deglet Nour and Degla Beïda, and on a layer of 21 % of sucrose for Akerbouch. The centrifugation is made for the three cultivars at  $65 \times g$  during 5 minutes. The results in terms of percentage of recuperation of viable and purified protoplasts are : 85 %, 87 % and 95 % respectively for Deglet Nour, Akerbouch and Degla Beïda.

❖ The culture of the isolated protoplasts was realized on a semi-solid medium containing 0,3 % of agarose with 0,5 ; 1 or 2 mg / l of 2,4-D combined respectively with 1, 0,5 and 0,5 mg / l of BAP. A hormonal balance (BH N°1) containing 2 mg / l of 2,4-D and 0,5 mg / l of BAP allowed a good maintenance of the viability of the protoplasts cultivated (46,4 and 20 % after 15 days of culture respectively for Deglet Nour and Akerbouch) with a good wall regeneration (43,6 and 18 %) and cell division (17,5 and 2,8%) leading after more than two months of culture to microcalluses visible to the naked eye composed of a large number of cells.

## ملخص

بهدف إعادة التوليد ابتداء من بروتوبلاست كالس ثلاثة أنواع لنخلة التمر (دقلة نور، أكربوش و دقلة بيضاء)، خطوات مختلفة مهمة: العزل، التنقية و الزراعة. كذا مرحلة تتطلب التحسين. من أجل هذا، الدراسة أظهرت بأن الظروف الملائمة ل:

❖ عزل البروتوبلاست هي: محلول إنزيمي مكون من 1,5% من "سيلولاز" و 1% من "ماسيروزيم" مع 0,5 أو 0,6 مول من المانيتول و تحت ظروف مستقرة أو تحت تأثير 50 دورة في الدقيقة خلال 16 إلى 18 ساعة حسب النوع. النتائج المتحصل عليها هي  $10^5 \times 4,67$ ،  $10^5 \times 4,92$  و  $10^5 \times 4,17$  بروتوبلاست / غم حسب النوع دقلة نور، أكربوش و دقلة بيضاء.

❖ التنقية أجريت بطبقة تحتوي على 25% من السكروز بالنسبة لدقلة نور و دقلة بيضاء و بواسطة طبقة 21% بالنسبة لأكربوش. الطرد المركزي أجري لجميع الأنواع ب: 65 د خلال 5 دقائق. النتائج المتحصل عليها بنسبة الاستعادة هي 85%، 87% و 95% حسب النوع دقلة نور، أكربوش و دقلة بيضاء.

❖ زراعة البروتوبلاست أجريت على وسط غذائي يحتوي على 0,3% من الأغاروز و نسب 1,2 و 0,5 مغ / ل من D-4,2 ممزوجة مع 0,5; 0,5 و 1 مع / ل من BAP. ميزان هرموني يحتوي على 2 مع/ل من D-4,2 و 0,5 مع/ل من BAP سمح بحفظ جيد لمستوى حياة البروتوبلاست (46,6 و 20% بعد 15 يوم بعد الزراعة بالنسبة لدقلة نور و أكربوش) مع إعادة جيدة لتوليد الجدران الخلوي (43,6% و 18%) و الانقسام الخلوي (17,5% و 2,8%) مؤدية، بعد أزيد من شهرين بعد الزراعة، إلى إنتاج ميكروكالس مشاهد بالعين المجردة و مكون من عدد كبير من الخلايا.

## REMERCIEMENTS

Au terme de ce travail je tien à exprimer ma forte gratitude et reconnaissance à mon promoteur M<sup>r</sup> KHELIFI, Professeur ; Docteur en biologie végétale et forestière pour la qualité de son encadrement, ses encouragements et ses précieux conseils.

Je remercie également M<sup>r</sup> BOUTEKRABT pour bien vouloir présider le jury de cette thèse.

Mes sincères remerciements vont également à M<sup>r</sup> BENCHABANE, M<sup>me</sup> CHAOUCH et M<sup>me</sup> BENREBIHA qui me font l'honneur de participer au jury de cette soutenance.

J'exprime mes sincères remerciements à ma fiancée HADJ MOUSSA KHADIDJA pour ses précieux encouragements durant la réalisation du travail.

J'exprime ma profonde reconnaissance à M<sup>me</sup> ZAOUI DJAMILA ingénieur du Laboratoire des Ressources Génétique et Biotechnologies (L-RGB) pour ses aides et sa disponibilité durant toute l'expérimentation.

Je tiens à remercier également mes frères amis : BELKACEM, BOUALEM, NAZIM, AMINA, AMEL, ZAKIA, SAIDA, M<sup>r</sup> et M<sup>me</sup> AMDOUN ainsi que KAHINA pour leur soutien, aides et conseils durant la réalisation de ce travail.

De plus, je dédie ce simple travail à toute ma famille qui n'a cessé de m'encourager pour continuer droit au but.

Je ne saurais oublier de remercier tous ceux qui ont, de près ou de loin, contribué à la réalisation de ce travail.

أخوكم في الله

Khayreddine خير الدين

## TABLE DES MATIÈRES

RÉSUMÉS	1
REMERCIEMENTS	4
TABLE DES MATIÈRES	5
LISTE DES ILLUSTRATIONS, GRAPHIQUES ET TABLEAUX	8
INTRODUCTION	13
1. RECHERCHE BIBLIOGRAPHIQUE	
1.1. Description systématique, botanique et diversité génétique du palmier dattier	17
1.1.1. Description systématique	17
1.1.2. Description botanique	17
1.1.3. Diversité génétique	20
1.2. Origine botanique et distribution géographique du palmier dattier	24
1.2.1. Origine botanique du palmier dattier	24
1.2.2. Origine géographique du palmier dattier	24
1.2.3. Distribution actuelle du palmier dattier	25
1.3. Valeurs et importance économique du palmier dattier	26
1.3.1. Valeurs du palmier dattier	26
1.3.2. Importance économique dans le monde	28
1.3.3. Importance économique en Algérie	29
1.4. Menaces pesant sur le palmier dattier en Algérie	30
1.4.1. Maladies du palmier dattier	30
1.4.2. Ravageurs du palmier dattier	35
1.4.3. Salinités	36
1.4.4. Autres menaces sur le palmier dattier en Algérie	38

1.5. Amélioration du palmier dattier	38
1.5.1. Méthodes classiques d'amélioration et collections	38
1.5.2. Méthodes biotechnologiques	40
1.5.3. Protoplastes et hybridations somatiques	43
1.5.4. Conformité variétale des régénérants par culture de tissus du palmier dattier	57
1.5.5. Méthodes de détection des variants	58
2. MATÉRIEL ET MÉTHODES	
2.1. Matériel végétal	59
2.2. Isolement des protoplastes	59
2.2.1. Macération enzymatique	61
2.2.2. Purification des protoplastes	63
2.2.3. Dénombrement des protoplastes	66
2.3. Mise en culture des protoplastes	67
2.3.1. Isolement des protoplastes pour la culture	67
2.3.2. Densité de culture ou densité d'étalement	67
2.3.3. Culture sur milieu semi-solide	67
2.3.4. Addition de milieu frais	68
2.3.5. Suivi du développement des protoplastes	69
2.4. Analyse statistique et représentations graphiques	72
3. RÉSULTATS EXPÉRIMENTAUX	
3.1. Isolement des protoplastes	73
3.1.1. Effet de la solution enzymatique et du mode de macération	73
Récapitulatif	80
3.1.2. Effet de la concentration du mannitol et du mode de macération	81
Récapitulatif	88
3.1.3. Effet de la durée et du mode de macération	89
Récapitulatif	101
3.1.4. Conclusion partielle	102

3.1.5. Diamètres des protoplastes libérés	103
3.1.5.1. Effet de la solution enzymatique	103
3.1.5.2. Effet de la durée et du mode de macération	105
3.1.5.3. Conclusion	105
3.1.6. Agglutination des protoplastes libérés	106
3.2. Purification des protoplastes	107
3.2.1. Effet de la couche de saccharose	108
3.2.2. Conclusion	112
3.3. Culture des protoplastes	113
3.3.1. Taux de viabilité	113
3.3.2. Taux d'allongement et de bourgeonnement	118
3.3.3. Taux de division	123
3.3.4. Formation des microcolonies et des microcals	127
3.3.5. Taille et structure des microcolonies et des microcals	131
3.3.6. Conclusion partielle	134
3.4. Conclusion générale sur les résultats obtenus	136
4. DISCUSSION DES RÉSULTATS EXPÉRIMENTAUX	
4.1. Isolement des protoplastes	138
4.2. Purification des protoplastes	148
4.3. Culture des protoplastes	149
CONCLUSION	158
APPENDICES	160
RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES	185



## LISTE DES ILLUSTRATIONS, GRAPHIQUES ET TABLEAUX

- Figure 1.1 :** Représentation schématique du palmier dattier *Phoenix dactylifera* L. [19]. 19
- Figure 1.2 :** Répartition géographique du palmier dattier dans le monde [19]. 26
- Figure 1.3 :** Répartition géographique du palmier dattier en Algérie [19]. 26
- Figure 1.4 :** Morphologie d'un palmier dattier et d'une palmeraie bayoudés. 33
- Figure 2.1 :** Cals des trois cultivars du palmier dattier utilisés pour l'isolement des protoplastes (Barre = 1,8 cm). 60
- Figure 2.2 :** Texture des cals de Deglet Nour et Akerbouch utilisés pour l'isolement des protoplastes (G = x 45). 60
- Figure 2.3 :** Etapes de la macération enzymatique des cals du palmier dattier pour l'isolement des protoplastes. 61
- Figure 2.4 :** Schéma résumant le protocole adopté pour la purification des protoplastes du palmier dattier. 64
- Figure 2.5 :** Schéma résumant le protocole adopté pour l'isolement des protoplastes du palmier dattier. 65
- Figure 2.6 :** Schéma résumant le protocole adopté pour l'étude de l'effet de la balance hormonale sur la culture des protoplastes du palmier dattier. 68
- Figure 3.1 :** Effet de l'interaction (Solution enzymatique x Mode de macération) sur le nombre de protoplastes totaux chez les trois cultivars du palmier dattier. 75
- Figure 3.2 :** Effet de l'interaction (Solution enzymatique x Mode de macération) sur le nombre de protoplastes viables chez les trois cultivars du palmier dattier. 76
- Figure 3.3 :** Protoplastes fraîchement isolés à partir des cals nodulaires des trois cultivars du palmier dattier sous l'effet des différentes solutions enzymatiques testées. 77

<b>Figure 3.4</b> : Effet de l'interaction (Solution enzymatique x Mode de macération) sur le taux de viabilité des protoplastes chez les trois cultivars du palmier dattier.	79
<b>Figure 3.5</b> : Effet de l'interaction (Concentration du Mannitol x Mode de macération) sur le nombre de protoplastes totaux chez les trois cultivars du palmier dattier.	82
<b>Figure 3.6</b> : Effet de l'interaction (Concentration du Mannitol x Mode de macération) sur le nombre de protoplastes viables chez les trois cultivars du palmier dattier.	84
<b>Figure 3.7</b> : Protoplastes fraîchement isolés à partir des cals nodulaires des trois cultivars du palmier dattier sous l'effet des différentes concentrations du Mannitol testées.	85
<b>Figure 3.8</b> : Effet de l'interaction (Concentration du Mannitol x Mode de macération) sur le taux de viabilité des protoplastes chez les trois cultivars du palmier dattier.	87
<b>Figure 3.9</b> : Effet de la durée et du mode de macération sur le nombre de protoplastes totaux chez le cultivar Deglet Nour.	90
<b>Figure 3.10</b> : Effet de la durée et du mode de macération sur le nombre de protoplastes viables chez le cultivar Deglet Nour.	91
<b>Figure 3.11</b> : Effet de la durée et du mode de macération sur le taux de viabilité des protoplastes chez le cultivar Deglet Nour.	93
<b>Figure 3.12</b> : Effet de la durée et du mode de macération sur le nombre de protoplastes totaux chez le cultivar Akerbouch.	94
<b>Figure 3.13</b> : Effet de la durée et du mode de macération sur le nombre de protoplastes viables chez le cultivar Akerbouch.	95
<b>Figure 3.14</b> : Effet de la durée et du mode de macération sur le taux de viabilité des protoplastes chez le cultivar Akerbouch.	97
<b>Figure 3.15</b> : Effet de la durée et du mode de macération sur le nombre de protoplastes totaux chez le cultivar Degla Beïda.	98
<b>Figure 3.16</b> : Effet de la durée et du mode de macération sur le nombre de protoplastes viables chez le cultivar Degla Beïda.	99
<b>Figure 3.17</b> : Effet de la durée et du mode de macération sur le taux de viabilité des protoplastes chez le cultivar Degla Beïda.	100

- Figure 3.18** : Effet de la solution enzymatique sur le diamètre ( $\mu\text{m}$ ) des protoplastes libérés chez les trois cultivars du palmier dattier sous agitation à 50 rpm. 104
- Figure 3.19** : Les différents diamètres des protoplastes isolés à partir des cals nodulaires des trois cultivars du palmier dattier sous l'effet des différentes solutions enzymatiques testées (Barre = 31,2  $\mu\text{m}$ ). 104
- Figure 3.20** : Agglutination des protoplastes des trois cultivars du palmier dattier suite à l'action des différentes solutions enzymatiques testées (Barre = 25,6  $\mu\text{m}$ ). 107
- Figure 3.21** : Effet de la concentration du saccharose (21 ou 25 %) dans la couche de purification sur le taux de récupération et le taux de perte des protoplastes chez les trois cultivars du palmier dattier. 109
- Figure 3.22** : Comparaison entre la purification des protoplastes des trois cultivars du palmier dattier par sédimentation sur couche de 21 ou 25 % de saccharose. 110
- Figure 3.23** : Protoplastes fraîchement isolés et purifiés à partir des cals nodulaires des trois cultivars de palmier dattier avec deux couches de saccharose (21 et 25 %). 111
- Figure 3.24** : Pertes en protoplastes des trois cultivars du palmier dattier lors de la purification par sédimentation sur couche de 21 ou 25 % de saccharose. 112
- Figure 3.25** : Les protoplastes à mettre en culture et fraîchement isolés des cals des deux cultivars du palmier dattier (**A** : Deglet Nour ; **B** : Akerbouch) (Barre = 30,7  $\mu\text{m}$ ). 113
- Figure 3.26** : Effet de la balance hormonale du milieu de culture sur l'évolution du taux de viabilité des protoplastes mis en culture (%) chez les deux cultivars du palmier dattier. 116
- Figure 3.27** : Effet de la balance hormonale du milieu de culture sur la viabilité des protoplastes de deux cultivars du palmier dattier mis en culture. 117
- Figure 3.28** : Effet de la balance hormonale du milieu de culture sur l'évolution du taux d'allongement des protoplastes mis en culture (%) chez les deux cultivars du palmier dattier. 120

- Figure 3.29** : Effet de la balance hormonale du milieu de culture sur l'allongement des protoplastes de deux cultivars du palmier dattier mis en culture (Barre = 10,0  $\mu\text{m}$ ). 122
- Figure 3.30** : Effet de la balance hormonale du milieu de culture sur le taux de division des protoplastes mis en culture (%) chez les deux cultivars du palmier dattier. 124
- Figure 3.31** : Effet de la balance hormonale du milieu de culture sur la division cellulaire des protoplastes mis en culture du cultivar Deglet Nour. 125
- Figure 3.32** : Effet de la balance hormonale du milieu de culture sur la division cellulaire des protoplastes mis en culture du cultivar Akerbouch. 126
- Figure 3.33** : Effet de la balance hormonale du milieu de culture sur la division cellulaire et la formation de microcolonies à partir des protoplastes mis en culture du cultivar Deglet Nour. 129
- Figure 3.34** : Effet de la balance hormonale du milieu de culture sur la division cellulaire et la formation de microcolonies à partir des protoplastes mis en culture du cultivar Akerbouch. 130
- Figure 3.35** : Effet de la balance hormonale du milieu de culture sur la formation de microcolonies et de microcals à partir des protoplastes mis en culture du cultivar Deglet Nour. 132
- Figure 3.36** : Effet de la balance hormonale du milieu de culture sur la formation de microcolonies et de microcals à partir des protoplastes mis en culture du cultivar Akerbouch. 133

<b>Tableau 2.1</b> : Composition des solutions enzymatiques (SE) testées.	62
<b>Tableau 2.2</b> : Concentrations du Mannitol (M) testées.	63
<b>Tableau 2.3</b> : Composition des solutions de rinçages (A et B) et de la couche de saccharose pour la purification des protoplastes du palmier dattier.	64
<b>Tableau 2.4</b> : Composition des milieux semi-solides de culture des protoplastes du palmier dattier.	68
<b>Tableau 3.1</b> : Résumé des meilleurs résultats par cultivar (Rendements en protoplastes totaux, viables et taux de viabilité) obtenus avec les différentes solutions enzymatiques testées en présence de 0,5 M de Mannitol.	80
<b>Tableau 3.2</b> : Résumé des meilleurs résultats par cultivar (Rendements en protoplastes totaux, viables et taux de viabilité) obtenus avec les différentes concentrations du Mannitol testées en présence de 1,5 % de Cellulase et 1 % de Macérozyme.	88
<b>Tableau 3.3</b> : Résumé des meilleurs résultats par cultivar (Rendements en protoplastes totaux, viables et taux de viabilité) obtenus avec les différents modes et durées de macération testées en conditions de macération optimales.	101
<b>Tableau 3.4</b> : Durées relatives à l'apparition de la première division et de la première microcolonie à partir de la culture des protoplastes de deux cultivars du palmier dattier sur les différentes balances hormonales.	126
<b>Tableau 3.5</b> : Nombre moyen, diamètre moyen et nombre moyen de cellules des microcolonies développées sur les différentes balances hormonales à partir des protoplastes de deux cultivars du palmier dattier (DN et AK).	131

# *INTRODUCTION*

## INTRODUCTION

Le palmier dattier, *Phoenix dactylifera* L. est une monocotylédone arborescente appartenant à une grande famille d'arbres à palmes "Palmacées" ou "Arécaceae". Il est largement cultivé pour ses fruits : les dattes [1]. C'est une plante dioïque à reproduction sexuée allogame, aboutissant à la formation de populations composées d'individus mâles et femelles difficiles à caractériser précocement. La caractérisation ne peut se faire qu'au stade reproducteur avec la formation des premières inflorescences [2]. Bien que la propagation sexuelle par semis soit utile pour les objectifs d'amélioration, elle ne constitue pas une méthode de propagation pour le dattier [1]. C'est la propagation végétative par rejet qui est privilégiée. Cependant, celle-ci reste tributaire du nombre de rejets produits par le cultivar choisi [3].

En Algérie, 35 cultivars essentiels parmi les 940 répertoriés, présentent une large distribution dans le sud algérien [4,5] dont deux cultivars sont d'une importance capitale à l'échelle nationale. Le cultivar (cv) "Takerboucht", qui a une faible valeur économique à cause de la qualité moyenne de ses dattes, est le cultivar probablement résistant au Bayoud. Ce cultivar est localisé dans les palmeraies du sud-ouest (Adrar...). Au sud-est, le cultivar le plus dominant est la "Deglet Nour" très productif de dattes de haute qualité organoleptique, malheureusement très sensible au Bayoud [6].

Afin de satisfaire une demande croissante en dattes de "Deglet Nour", l'évolution socio-économique du pays, a provoqué le passage d'une phœniciculture traditionnelle, riche et diversifiée à un système monovariétale ; bien qu'il existe d'autres variétés mieux adaptées et plus résistantes à la sécheresse et aux maladies et encore plus productives ou plus précoces [3]. Le cultivar Deglet Nour occupe actuellement 45 % des plantations en Algérie et approximativement 60 % en Tunisie [7].

Cette orientation sélective de quelques variétés de dattes, ne garantie en aucun cas la sauvegarde des milliers de clones qui composent les oasis traditionnelles qui se trouvent aujourd'hui menacés de disparation [5]. De plus, cette reconversion a entraîné une érosion sévère de la diversité génétique du patrimoine phoénicicole. Cette situation est fortement aggravée par divers stress biotiques et abiotiques [8].

Le palmier dattier est confronté à deux problèmes majeurs, le vieillissement, suite au manque d'entretien, manque des soins adéquats et la déficience des systèmes d'irrigation et d'assainissement, entraînant des rendements faibles, une production de moindre qualité et une dégradation des palmeraies ; en plus de l'étendu de l'aire atteinte par les maladies dont la plus redoutable qui est le Bayoud, maladie due à un champignon tellurique *Fusarium oxysporum* f.sp *albedinis* (Foa) qui continue à décimer de nombreux palmiers d'année en année en Algérie et au Maroc [8,9,10,11].

Plusieurs méthodes chimiques et biologiques ont été préconisées pour lutter contre cette maladie ; qui ne cesse d'avancer non seulement dans les jardins déjà infestés mais aussi dans de nouveaux jardins [12]. De plus, ces méthodes restent coûteuses et risquent d'engendrer des problèmes d'environnement et de santé humaine et animale. La lutte génétique par la recherche de cultivars résistants provenant soit des prospections soit de croisements dirigés, ou encore de populations naturelles issues de graines "Khalts" [13] apparaît comme étant l'approche la plus indispensable et la plus économique [14]. Cependant, peu de cultivars présentant une résistance naturelle à la maladie sont connus actuellement ; et même lorsqu'ils existent, ils sont le plus souvent de qualité dattière médiocre [7,12].

L'amélioration génétique est l'outil le plus efficace pour produire un matériel végétal résistant avec une bonne qualité dattière. Cependant, cette voie nécessite un temps long (15 à 30 ans) pour la production d'une nouvelle variété [6]. C'est pourquoi la culture *in vitro* se présente comme une alternative pour assurer la multiplication de génotypes d'élite et entrevoir l'amélioration de



l'espèce en alliant les méthodes classiques et biotechnologiques par le transfert de la résistance depuis les cultivars résistants vers les cultivars producteurs de dattes de qualité mais sensibles aux maladies [3]. Cependant, pour une bonne efficacité de ces méthodes de multiplication *in vitro*, une caractérisation génétique précoce des cultivars et des vitroplants est indispensables car les caractères phénotypiques varient en fonction des conditions climatiques [2].

Dans ce contexte, l'hybridation somatique par fusion de protoplastes des cultivars élites (résistance et bonne qualité dattière) peut constituer une alternative pour la résolution de ce problème ; du fait qu'elle est employée avec succès pour l'amélioration génétique de nombreuses autres espèces. Les biotechnologies permettent de combiner les génomes nucléaires et cytoplasmiques, entièrement ou partiellement, aux niveaux interspécifiques et intergénériques évitant les barrières d'incompatibilité sexuelle naturelle [6,15].

Notre travail fait suite aux travaux précédemment réalisés au sein du Laboratoire des Ressources Génétiques et des Biotechnologies de l'Ecole Nationale Supérieure Agronomique [16,17] et qui sont inscrits dans le cadre de la lutte contre la maladie dévastatrice du palmier dattier, le "Bayoud". L'utilisation potentielle des protoplastes pour l'amélioration génétique des plantes est immense, cependant, son application au palmier dattier est relativement moins exploitée. De ce fait, un système efficace d'isolement de protoplastes suivi par l'induction des divisions cellulaires en vue de la régénération de plantules est une condition préalable à l'amélioration du palmier dattier. Ainsi, l'objectif de nos travaux vise :

- ❖ Isolement de protoplastes à partir de cals nodulaires (embryogènes) formés à partir d'explants issus de rejets. Cette opération d'isolement des protoplastes a été effectuée séparément chez les trois cultivars "Deglet Nour" pour ses qualités dattières, "Akerbouch" pour sa résistance au Bayoud et "Degla Beïda". Les cals nous ont été fournis par BOUFIS [16] et DJILLALI [17]. Cette partie a porté sur l'optimisation des conditions d'isolement de protoplastes : Composition de la solution enzymatique employée, temps d'action de la solution enzymatique, méthode de purification et solutions de rinçage pour éviter leur éclatement.

- ❖ Culture de protoplastes de chaque cultivar séparément sur des milieux semi-solides combinant différentes balances hormonales pour tester leur réactivité. Ceci, afin de déterminer les conditions de culture les plus favorables à leur régénération de parois puis leur développement. Il était donc important de suivre le comportement des protoplastes à travers des observations au microscope, d'observer la succession des divisions cellulaires depuis la régénération de la paroi, jusqu'à la formation de microcals.

# RECHERCHE BIBLIOGRAPHIQUE

## CHAPITRE 1 RECHERCHE BIBLIOGRAPHIQUE

### 1.1. Description systématique, botanique et diversité génétique du palmier dattier

#### 1.1.1. Description systématique

Le palmier dattier, *Phoenix dactylifera* L. est une espèce monocotylédone arborescente appartenant à une grande famille d'arbres à palmes "Palmacées" ou "Arécaceae". "*Phoenix*" dérivant de "*Phoinix*" ou "*Phoinikes*" est le nom donné par les Grecs à cet arbre qu'ils considéraient comme l'arbre des Phéniciens. Le nom "*Phoenix*" aurait été attribué au dattier par analogie avec l'oiseau de légende, qui était capable de résister, et même de renaître, après avoir connu le feu. Quant à "*dactylifera*" du latin "*dactylus*" ou du grec "*daktulos*" ou de l'hébreu "*dache*" signifiant doigt, cet adjectif décrit les fruits du dattier, en forme de doigts [1]. C'est LINNE, en 1734 *in* PEYRON [18], qui a fait une description complète du dattier. La famille des Arécaceae comprend environ 200 genres [1] et 2600 espèces ce qui permet de la placer au 4<sup>ème</sup> rang après les graminées, les liliacées et les orchidées [10]. Le dattier appartient au genre *Phoenix* comportant 12 espèces ayant des appellations différentes et possédant plusieurs analogies dont 5 en dehors du dattier produisent des fruits consommables [1,19].

#### 1.1.2. Description botanique

##### 1.1.2.1. Appareil végétatif

###### 1.1.2.1.1. Tronc

La tige du dattier est monopodiale, cylindrique, porte le nom de "stipe" qui peut atteindre 30 à 40 m de hauteur [20]. Ce stipe est composé d'un ensemble de vaisseaux fibreux consolidés dans une matrice de tissu cellulaire

lignifié [1]. Son diamètre évolue en fonction du climat et des conditions de culture [18] (Figure 1.1).

#### 1.1.2.1.2. Feuilles

Les feuilles du dattier sont des palmes d'une longueur moyenne de 4 m avec une vie normale de 3 à 7 ans. Un palmier adulte possède entre 100 et 125 feuilles vertes avec une formation annuelle de 10 à 26 nouvelles feuilles [1] en perdant un nombre similaire de palmes par dessèchement. Le nombre moyen de palmes est fonction du cultivar, mais aussi des conditions agroclimatiques [18]. Les feuilles s'organisent en trois couronnes : externe, centrale et interne [1] (Figure 1.1).

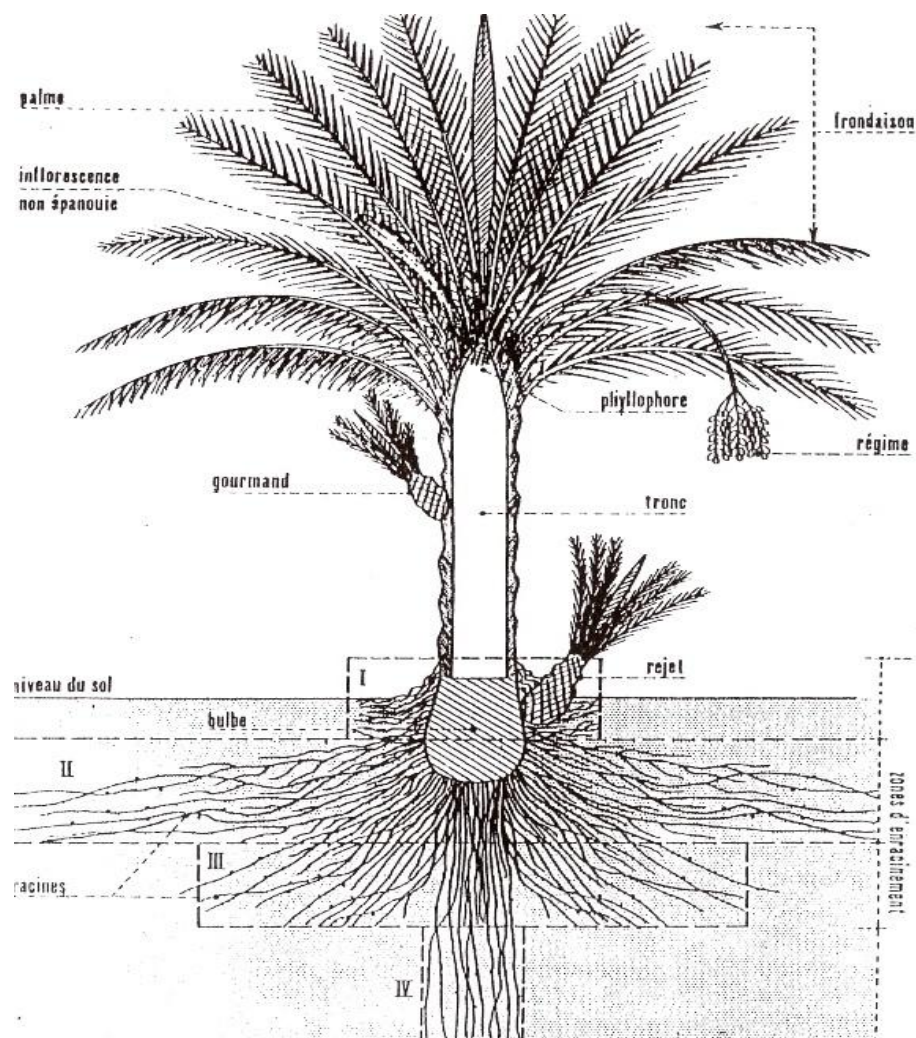
#### 1.1.2.1.3. Bourgeons

Le palmier dattier possède un bourgeon terminal, ou apex, qui assure sa croissance en hauteur. Il est unique, et il convient donc de le protéger. Il est cependant flanqué de bourgeons axillaires [18] qui se trouvent à l'aisselle de chaque palme qui en se développant, peuvent donner naissance à une inflorescence dans la région coronaire, à un rejet "Djerba" ou "Djebar" dans la région basale ou rarement à un gourmand "Rokeb" dans la région moyenne et sous coronaire. Le stipe ne se ramifié pas ; mais le développement des gourmands ou de rejets peut donner naissance à des pseudo ramifications [20] (Figure 1.1).

#### 1.1.2.1.4. Système racinaire

Le palmier dattier n'a pas de racines pivotantes. Son système racinaire est dit fasciculé, parfois ramifié avec beaucoup ou peu de radicelles. Les racines sont fibreuses similaires à celles du maïs [1,18]. Les racines secondaires apparaissent sur la racine primaire qui se développe directement de la graine. Ces racines secondaires produisent des racines latérales (racines tertiaires et plus) de même type avec approximativement le même diamètre à travers leur longueur. Toutes les racines du palmier dattier présentent des

pneumatodes, qui sont des organes respiratoires. Les racines du dattier sont découvertes à une distance de 25 m du palmier et à une profondeur de 6 m, mais 85 % des racines sont distribuées dans la zone de 2 m de profondeur et de distance [19]. Généralement le développement des racines du dattier dépend des caractéristiques du sol, type de culture, profondeur de l'eau souterraine et de la variété. Le "Bulbe", ou plateau racinaire, est volumineux et émerge en partie au dessus du niveau du sol. Le système racinaire est constitué selon PEYRON [18] et ZAID [1] de quatre zones qui sont : racines respiratoires, racines de nutrition, racines d'absorption et racines du faisceau pivotant (Figure 1.1).



**Figure 1.1 :** Représentation schématique du palmier dattier *Phoenix dactylifera* L. [19].

### 1.1.2.2. Appareil reproducteur

#### 1.1.2.2.1. Inflorescences et fleurs

Le dattier est une espèce dioïque, commençant à fleurir dès l'âge de 3 à 4 ans [20]. Les fleurs monosexuées de petite taille, de couleur blanchâtre, parfumées, sont réunies en inflorescences "spadices" axillaires longues jusqu'à 120 cm enveloppées dans une grande bractée membraneuse dite "spathe". Les fleurs femelles ont trois carpelles indépendants, dont un seul se développe pour former la datte. Le pollen du dattier est abondant mais il n'est pas déplacé lointain par le vent ; la pollinisation artificielle est indispensable [21,22].

#### 1.1.2.2.2. Fruit et graines

Le fruit ou "Datte", est une baie oblongue longue jusqu'à 5 cm, à péricarpe charnu et un endocarpe membraneux, de couleur orange foncée à maturité à chaire sucrée enveloppant un "noyau" osseux : la graine. L'ensemble des dattes est groupé en régimes. Le développement de la datte passe par 5 stades successifs qui sont : Hababouk, Kimri, Khalal, Rutab et Tamar [1].

### 1.1.3. Diversité génétique

#### 1.1.3.1. Nombre chromosomique du palmier dattier

Du point de vue cytologique, le nombre de chromosomes ( $n = 18$  et  $2n = 36$ ) a été observé chez six espèces de *Phoenix* et chez dix cultivars de *Phoenix dactylifera* selon BEAL (1937) *in* [3]. Cependant, NEMEC (1910) *in* [22] rapporte que le nombre de chromosomes du dattier est de  $2n = 28$  dans les embryons jeunes. Récemment un nombre chromosomique de  $2n = 26$  a été observé chez les cultivars marocains et dans les plantules régénérées *in vitro* [22]. AL SALIH et AL JARRAH (1987) *in* [3] rapportent des cas de polyploïdie chez des cultivars iraqiens ( $2n = 64$ ) en plus des différences de ploïdie (32, 34, 36, 64 chromosomes) entre cultivars et au sein du même cultivar. Les investigations sont rendues difficiles par l'absence de tissus végétaux en mitose, spécialement à partir des arbres adultes, et les nombreux petits chromosomes [22].

### 1.1.3.2. Diversité génétique chez le palmier dattier

La variété chez le palmier dattier, représente les individus femelles qui produisent les fruits. En effet, ce qu'on appelle communément "variété" n'est en réalité que des races ou métis [19]. Des hybrides multipliés végétativement formant des "variétés populations" ont permis par le biais d'une sélection empirique, réalisée au fil des années par les phoeniculteurs, d'obtenir ce qu'on appelle "cultivar" qui désigne l'ensemble des dattiers à caractéristiques phénotypiques homogènes et portant localement le même nom. Ces cultivars représentent la première catégorie de ressources génétiques du dattier. Une deuxième catégorie est représentée par les francs issus d'une multiplication sexuée "Khalts", représentant en moyenne 67 % des palmiers de 11 palmeraies marocaines [8], dont la descendance est hétérogène et peut être des mâles ou des femelles. Cette catégorie représente une richesse inépuisable qu'il faut exploiter. La notion de variété chez le palmier dattier peut être associée à la notion de clone, puisque tous les individus d'une variété donnée sont issus par voie végétative d'un même et unique individu de départ. Les palmiers mâles ont une grande importance dans la production phoénicole [20]. Ils sont appelés sans distinction "Dokkars".

### 1.1.3.3. Diversité variétale du palmier dattier

Des milliers d'années de sélection ont produit les 3000 cultivars à travers le monde dans les régions où les conditions climatiques arides et chaudes sont préférées par le dattier [1]. Ces variétés sont identifiées par des appellations vernaculaires à base du fruit facilitant ainsi leur distinction. Cependant l'évaluation du potentiel phoénicole des différentes palmeraies algériennes a fait apparaître des problèmes de synonymie et d'homonymie mettant en cause la nomenclature des cultivars [23]. C'est la raison pour laquelle HANNACHI et al [5] ont retenu la notion de "cultivar" au lieu de "variété" car les cultivars, fruit de la sélection paysanne, sont qualifiés comme des "variétés traditionnelles" ou "variétés locales", et jusqu'à présent les programmes de croisements dirigés n'ont pas encore donné des clones équivalents ou supérieurs à ceux qui existent dans les oasis. De même, BENKHALIFA et al [24] confirment la



synonymie pour des cas comme Tilemsu/Hmira et autres. De plus, l'homonymie et l'origine multiclonale sont démontrées pour le cas de Azerza/Tazerzayet des régions du Mزاب, Metlili et El-méniâa par rapport à Tazerzayet des régions du Gourara, Touat et Tidikelt. Ces auteurs ajoutent que les génotypes analysés ne s'organisent pas en structure différenciée. De plus, l'appartenance géographique n'est pas retrouvée. Ce constat préliminaire laisse supposer une origine commune des dattiers.

Les oasis algériennes sont caractérisées par une richesse génétique considérable vu la présence d'environ 940 cultivars répertoriés dont 2/3 ont été décrits [5] alors que les palmeraies marocaines contiennent environ 230 cultivars inscrits dont une trentaine uniquement sont connus et documentés [25,8]. En Tunisie 140 cultivars ont été recensés dont 20 seulement ont fait l'objet d'études phénologiques [20].

En Algérie, 35 cultivars essentiels présentent une large distribution dans le sud algérien [4,5] dont deux cultivars sont d'une très grande importance à l'échelle nationale. Au sud-ouest, Takerboucht, avec une faible valeur économique à cause de la qualité moyenne de ses dattes (demi sèche à sèche, couleur jaune orange, taille petite des fruits et maturation moyenne) et caractérisée par une certaine diversité variétale, est le cultivar véritablement résistant au Bayoud, se trouve dans les palmeraies du sud-ouest (Adrar...). Au sud-est, le cultivar le plus dominant est la Deglet Nour très productif de dattes à haute qualité organoleptique (doux, couleur rouge, parfumées, taille moyenne des fruits avec une maturation moyenne), mais malheureusement très sensible à cette maladie. Selon les régions, la datte la plus grosse est Deglet Talmine (40 g l'unité), la plus précoce est celle de Cheikh M'hammed ou Ferrana (maturité : juin) ; la datte la plus longue est celle de Seb'a Bedra (plus de 7 cm) [6]. En plus, il existe des palmeraies marginales qui conservent une grande diversité (Figure 1.3).

#### 1.1.3.4. Descripteurs des cultivars du palmier dattier

##### 1.1.3.4.1. Caractères morphologiques du fruit et du noyau

La reconnaissance des différents cultivars du dattier est encore, essentiellement, basée sur les caractères morphologiques du fruit et du noyau [5].

##### 1.1.3.4.2. Marquage isoenzymatique

Il n'y a pas de méthode moléculaire pour distinguer les palmiers mâles des palmiers femelles avant la première floraison, qui survient à partir de 5 ans après plantation. Plusieurs systèmes protéiques (isoenzymes) ont été élaborés pour caractériser les cultivars du dattier. Ainsi, la plupart des études ont utilisé les tissus foliaires prélevés des plantules dont les parents sont connus ou des plants adultes [22].

BENNACEUR et al (1991) *in* [22] en utilisant 31 cultivars ont démontré qu'une clé d'identification basée sur 5 enzymes – Glutamate Oxaloacétate Transaminase (GOT), Endopeptidase (ENP), Diapharase, Phosphoglucomutase et Leucino Amino Peptidase – est capable de caractériser 65 % des cultivars. Ce marquage enzymatique permet une identification précoces des cultivars et par conséquent une détermination de la composition et l'assortiment variétal des palmeraies du Maghreb [8].

##### 1.1.3.4.3. RAPD-PCR et microsatellites

Par utilisation de la technique RAPD-PCR, SOLIMAN et al [26] ont trouvé un degré de similarité variant de 87,5 % à 98,9 % entre quatre cultivars égyptiens femelles. L'utilisation des microsatellites du cocotier et du palmier à huile pour étudier la diversité du dattier indique que les cultivars se caractérisent par un nombre moyen relativement faible d'allèles par locus (faible hétérozygotie moyenne). Ce nombre faible d'allèles pourrait être le résultat des échanges permanents des cultivars dans les palmeraies traditionnelles et la

généralisation du cultivar Deglet Nour dans les palmeraies modernes. Ces échanges tendraient à restreindre la diversité génétique malgré la grande variabilité morphologique constatée au sein des cultivars. Cependant, les regroupements des cultivars ne répondent ni à une structuration génétique dépendante de l'origine géographique, ni à des caractéristiques morphologiques ou gustatives de la datte et ni à la résistance ou la sensibilité à la fusariose [23].

## 1.2. Origine botanique et distribution géographique du palmier dattier

### 1.2.1. Origine botanique du palmier dattier

Plusieurs opinions disent que le dattier provient d'une ou plusieurs formes sauvages plus ou moins passées dans les formes cultivées. Alors que d'autres opinions indiquent qu'il provient de l'hybridation de plusieurs palmiers qui se trouvent encore aux environs de son aire de distribution [19]. De plus, selon ZAID [1], LOUTFI et EL HADRAMI [22] et BAAZIZ et BENDIAB [8] des hybrides naturels peuvent être formés entre le dattier et d'autres palmiers (p. Canaris, p. nain et palmier à sucre).

### 1.2.2. Origine géographique du palmier dattier

Le dattier est natif de la région du Golf Arabe, et peut être du sud de l'Iraq [2]. On pense que le premier dattier domestiqué est originaire du sud du proche orient [22]. En effet, la première culture du dattier est datée d'environ 3700 ans avant J.C. dans la région située entre l'Euphrate et le Nil. Celle-ci est confirmée par les découvertes indiquant que le dattier a été un symbole pour l'année et sa feuille comme symbole du mois dans l'hiéroglyphe égyptien. De plus, les ruines historiques des Sumériens, Akkadiens et Babyloniens montrent que leurs maisons étaient construites à base de troncs de dattier. Ceci indique que le palmier dattier est peut être l'arbre cultivé le plus ancien dans le monde [1]. Sa distribution préhistorique allait du Sénégal au bassin du fleuve Indus au nord d'Inde, spécialement entre les latitudes 15° et 30°. Ce sont les arabes qui l'avaient introduit en Espagne (Palmeraie d'Elche). Ensuite, ce sont les

explorateurs espagnols qui ont introduit le dattier au Mexique et aux Etats-Unis [21].

### 1.2.3. Distribution actuelle du palmier dattier

Le dattier est caractéristique de la flore de nombreuses régions chaudes et désertiques de tous les continents. On peut néanmoins le trouver dans les régions chaudes tempérées [27]. Sa distribution actuelle à travers le globe a été déterminée par ses exigences climatiques, entre le 10° latitude du sud (Somalie) et le 39° latitude du nord (Espagne et Turkménistan), et spécialement dans les régions sèches et semi-arides [19]. Cependant, les zones les plus favorables à sa culture sont comprises entre les 24° et 34° latitudes Nord (Maroc, Algérie, Tunisie, Libye, Egypte, Iraq) [20]. De même, l'altitude est très importante dans la distribution géographique du dattier par la disponibilité de l'eau et les limites thermiques qui déterminent la survie de l'espèce. En effet, le dattier pousse et fleurit à partir de 390 m jusqu'à 1500 m au dessus du niveau de la mer [1] (Figure 1.2). Sa répartition géographique dans le monde, analysée par continent et zone géographique, montre une prédominance phoénicienne asiatique (Iran, Iraq essentiellement) avec 51 % des palmiers, 26 % en Afrique du Nord et méditerranéenne [3].

En Algérie, la culture du palmier dattier s'étend sur une surface de 159.871 ha, en particulier à l'est (Zibans, Oued-Righ, Oued-Souf, M'Zab) et à l'ouest (Saoura, Touat, Gourara et Tidikelt) [28] (Figure 1.3).

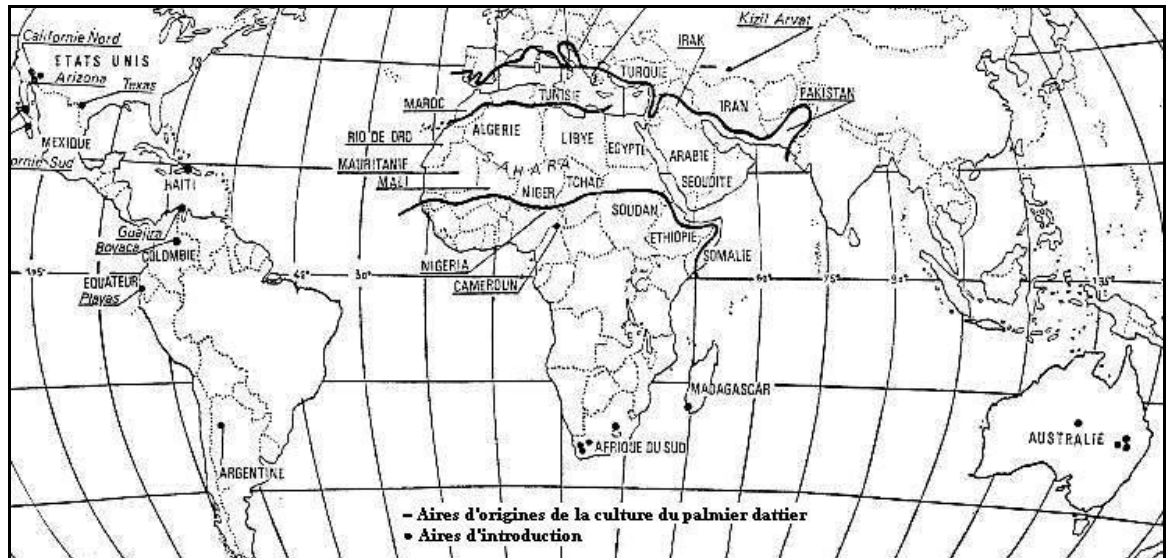


Figure 1.2 : Répartition géographique du palmier dattier dans le monde [19].

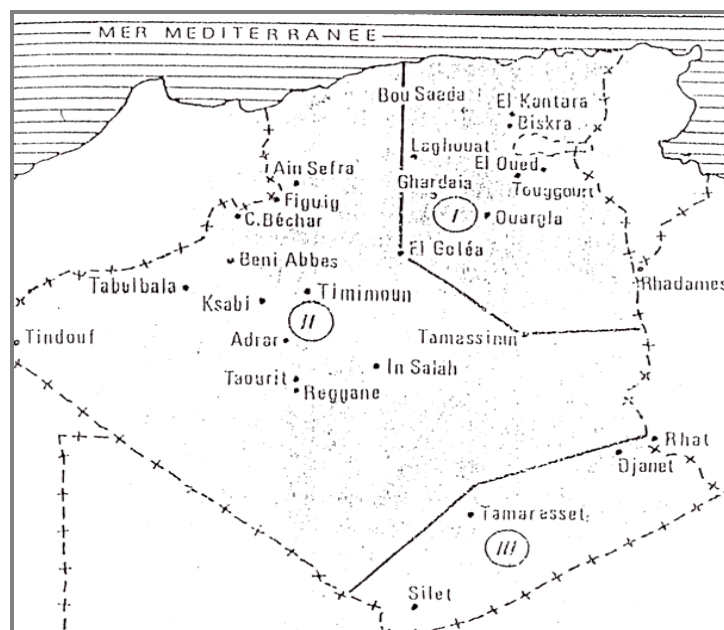


Figure 1.3 : Répartition géographique du palmier dattier en Algérie [19].

### 1.3. Valeurs et importance économique du palmier dattier

#### 1.3.1. Valeurs du palmier dattier

##### 1.3.1.1. Valeurs écologiques du palmier dattier

Le palmier dattier constitue, l'élément essentiel de l'écosystème oasien. Il joue un rôle important dans la protection des cultures sous jacentes (fruitières, maraîchères, fourragères ou céréalières) contre la chaleur, les vents chauds et secs et même les périodes du froid par la création d'un microclimat (effet oasis) tout en jouant un rôle d'écran protecteur contre le rayonnement solaire intense

dans ces zones, ce qui empêche la dégradation à long terme de cet environnement écologiquement fragile [29]. Il intervient aussi dans la lutte contre l'ensablement et la désertification [30,11,31] et l'agrandissement des espaces steppiques ou désertiques [10].

#### 1.3.1.2. Valeurs socio-économiques du palmier dattier

Le palmier dattier constitue non seulement la base de l'agriculture saharienne, mais aussi le moyen essentiel de fixation des populations, de création et du maintien des centres de vie [9]. C'est une plante d'intérêt socio-économique majeur pour de nombreux pays. Le développement de la phœniciculture permet de lutter durablement contre l'insécurité alimentaire et la pauvreté. Actuellement, le dattier retient même l'attention des pays situés au nord de la Méditerranée qui l'ont, jusqu'ici, considéré comme plante exotique n'ayant qu'un rôle ornemental et touristique. Cet intérêt au dattier est dû, surtout, à l'extension de la maladie du Bayoud et la nécessité de développer les génotypes résistants [30]. Son fruit, transformé ou non occupe une place prépondérante dans l'économie (devises). Son association avec des cultures variées et d'élevage constitue un revenu considérable et autorise des productions d'autoconsommation. Il fournit une multitude de produits secondaires (plus de 130 usages sont identifiés auprès des populations oasiennes) en plus de son exploitation en artisanat, où ses poutres et ses palmes constituent une matière première pour de multiples usages. Il permet aussi la construction de logements, la fabrication des meubles et d'outils exploités dans l'agriculture [11]. C'est un fournisseur de la matière première pour la fabrication de divers objets de vannerie à partir des feuilles qui, entières, sont utilisées pour couvrir les toits et surtout pour fixer les dunes (Afreg). Les palmes sèches, produits annuellement en grande quantité, sont utilisées dans ces régions arides comme brise-vent [32].

#### 1.3.1.3. Valeurs nutritionnelles et économiques des dattes

Avec l'incertitude actuelle de l'autosuffisance alimentaire mondiale et l'augmentation attendue de la demande, le dattier peut être une bonne source

de nourriture d'une grande valeur nutritionnelle du fait qu'il est l'arbre le plus productif (jusqu'à 200 kg de dattes par arbre et par an). En effet, les dattes sont riches en nutriments et fournissant plus de 3000 calories/kg de dattes ce qui les qualifie de premier fruit énergétique. La datte contient 70 % de carbohydrates (principalement des sucres) facilement digérées et absorbées, ce qui la rend l'aliment naturel le plus nutritif. La teneur en eau est entre 15 et 30 % suivant la variété et le stade de maturité du fruit. La datte est une bonne source d'éléments minéraux (fer, calcium, potassium, sodium, etc.). Les populations du Sahara consommatrices de dattes sont connues pour leurs plus faibles taux de cancer vu la teneur élevée des dattes en magnésium. Les fibres contenues dans les dattes sont bénéfiques pour le transit intestinal. De plus, les dattes sont une bonne source de vitamines A, B1, B2 et B7, en plus des protéines dont la teneur varie en fonction du cultivar [1]. La production de miel (Rob), d'alcool et de la vinaigre se fassent aussi à base de dattes [32].

La datte est un fruit qui se conserve bien, permettant une consommation étalée d'une saison à l'autre. Les dattes sont très appréciées, en particulier, par les peuples musulmans pendant le Ramadan ; c'est, entre autres, l'aliment de la rupture du jeûne [33]. La datte produite représente le pain des habitants et, depuis longtemps, la clé de la sécurité alimentaire dans les oasis où elle est la base d'une activité commerciale, des échanges et des trocs contre les denrées alimentaires de première nécessité. A titre d'exemple, environ un million d'habitants au Maroc tirent 50 % de leur revenu à partir du dattier. En Tunisie, 10 % (soit 0,8 à 1 million d'habitants) de la population vit de l'agriculture oasienne. En Algérie, le dattier représente une source de revenu pour près de 2,2 millions d'habitants [10,8].

### 1.3.2. Importance économique dans le monde

Le nombre total de palmiers dans le monde est d'environ 100 millions, dont près de 60 millions en Asie, 32,5 millions en Afrique, 600 milles aux USA et au Mexique suivis par l'Europe (Espagne) et l'Australie avec 32 et 30 milles palmiers respectivement [1]. Le nombre de palmiers est d'environ 25 millions

dans les pays du Maghreb. Cependant il est relativement faible par rapport à d'autres pays tels que l'Iraq (23 millions), l'Iran (21 millions) et l'Arabie Saoudite (12 millions) [8].

La palmeraie mondiale s'étend sur une surface de 1.127.440 ha. L'Iran possède la plus grande superficie de palmeraies avec 240 milles ha, Émirats Arabes Unis (186 milles), Algérie (environ 160 milles) ensuite l'Arabie Saoudite (151 milles). De ce fait, c'est l'Asie qui possède une plus grande surface de palmeraies (768.250 ha), ensuite l'Afrique (355.251 ha) dont 293.772 ha dans les pays du Maghreb, Amérique (2.989 ha) et en dernier l'Europe avec 950 ha [34].

La production mondiale de dattes est d'environ 6.481.246 tonnes. Les premiers producteurs sont l'Égypte (1.130.000 t), Iran (1.000.000 t), Arabie Saoudite (970.000 t), Émirats Arabes Unis (755.000 t), Pakistan (510.000 t) et l'Algérie (526.921 t). La majorité de la production dattière provient de l'Asie (4,05 millions de tonnes) ensuite l'Afrique (2,4 millions tonnes) et en dernier l'Amérique et l'Europe, respectivement, avec 19 et 13,2 milles tonnes. Cette production a diminué de près de  $\frac{1}{4}$  de million durant ces 5 dernières années en passant de 6.720.002 t en 2002 à 6.481.246 t en 2007 ; vue la diminution de la production iraquienne qui a été 866 milles tonnes en 2002 et devenir 290 milles en 2007 [34].

### 1.3.3. Importance économique en Algérie

L'Algérie 6<sup>ème</sup> pays producteur mondial avec une production annuelle de 526.921 tonnes [34,28] héberge un patrimoine génétique très diversifié. Elle compte plus de 17 millions de palmiers et 940 cultivars dont les plus importants sont Deglet Nour, Degla Beïda et Ghars. La superficie des palmeraies en Algérie est d'environ 160.000 ha avec une densité de plantation d'environ 110 palmiers/ha. L'Algérie enregistre annuellement un excédent de 100 milles tonnes de dattes [28].



La plus grande partie des palmeraies algériennes abritent plus de palmiers à dattes fines avec plus de 6,8 millions d'arbres (Deglet Nour) et sèches avec plus de 8,2 millions d'arbres (Degla Beïda et analogues) avec une minorité (moins de 3 millions d'arbres) de palmiers à dattes molles (Ghars et analogues). De même, les palmiers productifs appartiennent plus à la catégorie des dattes fines (4,27 millions) et sèches (4,17 millions) avec une minorité appartenant à la catégorie des dattes molles (1,93 millions).

La production nationale de dattes, entre 2002 et 2007, tourne aux environs de 480 milles tonnes/an avec peu de fluctuations d'une année à l'autre avec un rendement d'environ 47 kg/arbre. De plus, la plus grande partie de la production est constituée de dattes fines (250 milles tonnes) et sèches (177 milles tonnes) avec peu de dattes molles (93 milles tonnes) [28].

#### 1.4. Menaces pesant sur le palmier dattier en Algérie

##### 1.4.1. Maladies du palmier dattier

##### 1.4.1.1. Maladies à champignons

- Pourriture de l'inflorescence ou Khamedj ; Fréquente dans les régions de phœniciculture plus humides ou pendant les années très humides, où elle peut prendre des allures épidémiques. Elle est causée par un champignon imparfait *Mauginella scaetae*. La contamination se fait par pollinisation. Les cultivars présentent différents degrés de sensibilité ou de résistance à cette maladie [1]. La lutte se fait par l'entretien des palmeraies et l'utilisation de plusieurs fongicides [13].
- Pourriture du cœur à *Thielaviopsis* ou Mejnoun ou le dessèchement noir des palmes, elle a été observée dans différentes régions du Maghreb, Mauritanie, Egypte, Arabie Saoudite, Iraq, Emirats Arabes, Bahreïn ainsi qu'aux Etats-Unis. L'agent causal est *Thielaviopsis paradoxa*, le champignon envahit les deux parties de l'arbre en causant le dessèchement noir des feuilles, la pourriture des inflorescences, la pourriture du cœur et du stipe, la pourriture du bourgeon

terminal. La lutte consiste à détruire les parties malades et traiter par des fongicides [13].

- Brunissement local des feuilles ; observée en Afrique du Nord et au Moyen Orient. Elle attaque beaucoup plus les palmes, cependant les lésions peuvent être observées sur d'autres parties. L'agent causal est *Mycosphaerella tassiana*. Aucun traitement n'est préconisé pour cette maladie vu sa moindre gravité [1].
- Maladie de Diplodia causée par *Diplodia phoenicum*. C'est la maladie la plus commune chez Deglet Nour, plus particulièrement sur la base des jeunes feuilles des rejets sur lesquelles elle provoque une couleur brune jaunâtre [1].
- Pourriture du bourgeon ou Belaât qui signifie "étouffement". C'est une maladie peu fréquente, présente en Afrique du Nord, liée à de mauvaises conditions de drainage, elle est due à un champignon *Phytophthora* sp. Elle est caractérisée par un blanchiment des palmes du cœur et une pourriture humide progressive rapide amenant à sa mort. La lutte est surtout l'installation d'un réseau de drainage et l'incinération des sujets malades en plus des traitements fongiques [13,1].
- Pourriture des fruits durant les années humides au cours de la maturation, différents pourritures dues à des champignons comme *Alternaria*, *Penicillium* et *Aspergillus* peuvent affecter le bon développement des dattes [1].

#### 1.4.1.2. Bayoud ou trachéomycose du palmier dattier

##### 1.4.1.2.1. Agent causal du Bayoud

Le Bayoud est une maladie causée par un champignon deutéromycète, filamenteux, imparfait et tellurique (*Fusarium oxysporum* f. sp. *albedinis*) adapté aux conditions difficiles du sol en absence de son hôte jusqu'aux conditions optimales de propagation [7]. Ce parasite a été initialement isolé en 1921, et identifié en 1934 par MALENÇON. En conditions naturelles, les racines de certaines plantes (henné, luzerne, orge) cultivées en association avec les dattiers peuvent héberger le parasite sans montrer de symptômes externes. Ce

sont des "porteurs sains". Des analyses conduites sur des isolats de Foa provenant de plusieurs palmeraies marocaines et algériennes montrent qu'elles ont la même origine clonale ; avec l'existence d'une faible variabilité génétique [35,36].

#### 1.4.1.2.2. Historique du Bayoud

Le Bayoud a été observé pour la première fois au Maroc (avant 1870) dans la vallée de Drâa et s'est répandu vers l'ouest en suivant les cordons du dattier [13] ensuite, il s'est propagé continuellement, et spécialement dans la région et vers l'Algérie (à partir de 1898) où il a envahi les palmeraies de l'Ouest et du Centre par bonds successifs d'oasis en oasis. Il ne fait aucun doute que l'homme a été le principal vecteur par les échanges de rejets ou de produits dérivés des palmes ou de stipes (le Bayoud n'étant pas transmis par les dattes) ; car les chemins suivis par le Bayoud coïncident avec ceux des caravanes [25].

#### 1.4.1.2.3. Symptômes du Bayoud

Un des premiers symptômes externes est un dessèchement et un blanchiment unilatéral des palmes de la couronne moyenne. Ce dessèchement se généralise ensuite à toute la palme qui prend un aspect typique de "plume mouillée" et s'incline vers le stipe, les palmes voisines sont atteintes à leur tour et la totalité du bourgeon terminal se dessèche pour provoquer la mort du palmier (Figure 1.4). Ce symptôme est à l'origine du nom du Bayoud dérivant du mot arabe "Abyed" qui veut dire blanc, et de la forme spéciale du *Fusarium*, *albedinis*, tiré du latin "albus" blanc. Dans certains cas il est déjà arrivé de confondre une attaque du Bayoud avec un dessèchement dû à un stress hydrique ce qui nécessite un examen approfondi des plantes malades pour localiser et identifier le parasite [35]. Au champ, l'apparition des symptômes du Bayoud prend un temps long après la première infection *via* les vaisseaux cribrovasculaires du système racinaire pour envahir tout le système vasculaire de la plante, ensuite, la réaction devient rapide chez les plants issus des graines [35,37].



**Figure 1.4 :** Morphologie d'un palmier dattier et d'une palmeraie bayoudés.

#### 1.4.1.2.4. Mécanisme d'action du Bayoud

Le mécanisme d'action du Foa implique plusieurs volets. La croissance mycélienne, l'activité des enzymes de dégradation de la paroi (CWDE) et la sporulation du pathogène sont plus accentuées en présence de la paroi cellulaire des racines des cultivars sensibles qu'en présence de celle des cultivars résistants [38]. De plus, l'acide fusarique (AF) est la principale toxine trouvée dans les filtrats des souches agressives du Foa. Cette phytotoxine induit des modifications sur la perméabilité et le potentiel membranaires de plusieurs types de cellules et peuvent être impliquée dans des étapes précoces d'échange du signal entre le pathogène et la plante. L'AF inhibe les enzymes de défense et réduit la viabilité des cellules végétales [39].

#### 1.4.1.2.5. Impacts du Bayoud

La vitesse d'avancement du Bayoud est de 4 à 15 % de palmiers atteints par an [35] ; en détruisant en un siècle plus de 12 millions de palmiers au Maroc et plus de 3 millions en Algérie. Le Bayoud détruit les variétés les plus connues dans le monde qui sont sensibles à la maladie et particulièrement celles qui produisent des dattes de qualité et en grande quantité telles que Medjhoor,

Deglet Nour et Boufegous [35,25,1,7] alors que les plantations tunisiennes sont actuellement protégées par des méthodes prophylactiques [25] accompagnées d'opérations d'éradication qui ne feront que ralentir la maladie mais ne pourront jamais l'arrêter [40].

L'impact désastreux du Bayoud n'est pas seulement économique lié à la diminution de la production de dattes, mais il perturbe également l'écosystème oasien, vu le rôle du dattier à ce niveau, en accentuant ainsi le phénomène de désertification [40,35].

#### 1.4.1.2.6. Méthodes de lutte contre le Bayoud

Jusqu'à l'heure actuelle, il n'y a pas de traitement curatif contre cette maladie. Cependant, plusieurs moyens de lutte préventive ont été pratiqués contre cette maladie :

- **Lutte chimique** : L'utilisation du bromure de méthyle et de la chloropicrine donne de bons résultats [13] mais très coûteuse et engendre des risques encourus pour l'environnement et la santé humaine ;
- **Mesures prophylactiques** : Restent efficaces pour la préservation des régions non atteintes de l'est algérien et celles de la Tunisie [13] ;
- **Lutte génétique** : Par la recherche des cultivars résistants provenant soit des prospections ou de croisements dirigés, soit des populations naturelles issues de graines "Khalts" [13]. Cette stratégie de lutte apparaît comme étant l'approche la plus souhaitable et la plus économique, mais les génotypes naturellement résistants sont rares et avec une mauvaise qualité dattière [14].

#### 1.4.1.3. Maladies à cause inconnue

- Maladie à dépérissement ou Maladie des Feuilles Cassantes (MFC) qui provoque la brûlure des feuilles qui se recroquevillent et se sèchent, et des déformations se développent de façon plus ou moins épidémique en Tunisie et en Algérie [13]. Observée pour la première fois en 1960 dans les oasis de

Nefta-Tozeur en Tunisie et en 2003 à Biskra [41]. Elle n'est due ni à un champignon ni à une bactérie, elle est dite maladie des feuilles cassantes. Elle atteint aussi bien les sujets jeunes que les adultes. De plus, 4 à 6 ans peuvent séparer les premiers symptômes (quelques frondaisons montrent une chlorose et ayant une couleur vert olive sombre). Des stries nécrotiques et un jaunissement se développent sur les palmes et plusieurs frondaisons prennent l'apparence déchiquetée [41]. Ces symptômes sont suivis d'une diminution de la production et d'une mauvaise qualité des dattes, puis la mort de l'arbre. Il semble actuellement que cette maladie soit liée à un déséquilibre physiologique dû à une carence nutritionnelle (taux de Manganèse 10 fois plus bas au niveau des feuilles attaquées avec reprise en cas de pulvérisation par une solution de sulfate de Manganèse) [36]. De plus, la conductivité, la valeur du pH et les concentrations du phosphore dans le sol avec palmiers malades sont plus élevés que les autres sols à palmiers sains [1]. Bien qu'aucun pathogène n'a été encore associé avec la MFC, les aspects de son épidémiologie ne suggèrent pas entièrement une cause abiotique. Les arbres affectés apparaissent groupés en un foyer, et des analyses minérales ne montrent aucune différence significative entre les sols sur lesquels les arbres touchés et non touchés se sont développés [41]. Cependant, de nouvelles recherches basées sur la PCR ont montré qu'elle semble être due à un mycoplasme [1].

- Recourbement du bourgeon apical ou le "cœur qui penche"; maladie observée en Algérie, Egypte, Mauritanie et Tunisie. Elle concorde généralement avec la maladie du Mejnoun [1].

#### 1.4.2. Ravageurs du palmier dattier

- Boufaroua *Oligonychus afrasiaticus* qui est acarien appelé localement "Boufaroua" ou "Ghobar" au Maghreb, "Takar" en Mauritanie, "Goubar" en Iraq, il provoque la formation d'une toile soyeuse blanche ou grisâtre qui retient le sable et la poussière rendant les dattes inconsommables. Le poudrage au soufre reste le premier traitement préconisé [13].

- Cochenille rouge *Phoenicoccus marlatti* qui cause une perturbation métabolique suite à la couverture de la surface foliaire par une masse cotonneuse et l'aspiration de la sève [1].
- Cochenille blanche *Parlatoria blanchardi* Targ ; appelée localement "Djreb" ou "Sem" en Algérie, "Nakoub" au Maroc et "Rheifiss" en Mauritanie. Elle se retrouve dans toutes les régions de la culture dattière. Elle se nourrit de la sève et injecte une toxine qui altère le métabolisme, on assiste alors à une diminution de la respiration et de la photosynthèse et l'arrêt du développement des fruits. Ces fruits sont alors inconsommables. Parmi les moyens de lutte, l'utilisation des coccinelles prédatrices naturelles de la cochenille ainsi que d'autres prédateurs [13].
- Ver de la datte *Myelois ceratoniae* Zell ; lépidoptère appelé aussi pyrale de la datte. Elle est trouvée même sur d'autres fruits. Elle se développe sur champ et non pas dans les magasins. Plusieurs insecticides sont développés pour lutter contre cette pyrale en plus des essais de la lutte biologique avec des hyménoptères [13].
- Autres ravageurs du palmier dattier causent des dégâts sur le palmier dattier tels que le charançon rouge (*Rhynchophorus ferrugineus*), le scarabée Rhinocéros (*Oryctes rhinoceros* Linné), le criquet migrateur (*Schistocerca gregaria* Forskal), les rongeurs (rats et souris), les termites et les nématodes [1].

### 1.4.3. Salinités

#### 1.4.3.1. Salinité du sol ou acidité

La croissance végétale est influencée par les conditions salines ou acides du sol qui, en dernier lieu, vont aboutir à une perte du rendement potentiel. Les sols salins et alcalins sont fréquents dans les plantations du dattier et sont caractérisés, respectivement, par une forte concentration des sels solubles et sodium échangeable. Ces sols résultent d'une forte évaporation pendant des situations de sécheresse, l'utilisation d'eaux salées combinée avec

un mauvais système de drainage. Malgré que le dattier, est une espèce très tolérante au sel (chlorures) à une concentration extrême de 15 %, au-delà de 30 %, l'arbre dépérit. Les sulfates sont toxiques et les carbonates sont nocifs, notons que les sols des oasis sont très riches en sulfates de chaux, d'où la nécessité de réaliser un système efficace de drainage dans les sols à haute concentration en sels ainsi que l'irrigation avec une eau moins chargée [1]. De ce fait, la salinisation des sols et des nappes par les eaux d'irrigation chargées de sels constitue l'un des risques majeurs, inhérent à l'agriculture irriguée en zone aride et chaude [33] car elle est parmi les principales causes incriminées dans les faibles rendements obtenus à travers plusieurs pays [1]. En Algérie, un million de palmier est menacé d'asphyxie [9] et la majorité des palmeraies souffre d'une insuffisance de drainage, en plus de la pauvreté des sols qui présente de plus une richesse en sels ; ce qui nécessite des arrosages plus fréquents [20].

#### 1.4.3.2. Salinité des eaux d'irrigation

La qualité de l'eau d'irrigation semble avoir un effet direct sur la croissance des fruits et sur leur poids et par conséquent sur le rendement ; car l'effet de la salinité des eaux d'irrigation (9 à 16 g/l) n'affecte pas beaucoup la physiologie du dattier qui poussent, notamment les variétés communes, tout en ayant une vigueur presque normale avec une limite de 8 à 9 g/l de sels pour avoir un résultat économique valable [20]. Les eaux utilisées pour l'irrigation des palmeraies, en Algérie et en Tunisie, proviennent de la nappe du Continental intercalaire (albien) sont profondes (à partir de 1000 m), fossile et, en conséquences, les plus coûteuses. Elles sont de plus chaudes et parfois, trop chargées en sels dans certaines régions (Ouargla 6 g/l) [9,33] ce qui constitue un compromis avec la nécessité des irrigations qui doivent être plus nombreuses et volumineuses pour limiter les phénomènes de salinisation [1,20].



#### 1.4.4. Autres menaces sur le palmier dattier en Algérie

On peut citer la sécheresse (déficit hydrique) caractéristiques des zones sahariennes, la désertification et l'ensablement, l'engorgement des sols par endroits (Oued Souf) et la disparition des nappes phréatiques en plus de la culture monovariétale (Deglet Nour) et du vieillissement des palmiers menaçant, ainsi, la diversité variétale du patrimoine phoénicicole national.

#### 1.5. Amélioration du palmier dattier

##### 1.5.1. Méthodes classiques d'amélioration et collections

##### 1.5.1.1. Rappel des principales tentatives d'amélioration génétique du palmier dattier

Les premiers essais d'amélioration du dattier ont été initiés il y a environ 50 ans aux USA, le Maroc et l'Algérie. Aux USA le but était de produire de nouveaux cultivars possédant les caractéristiques parentales par plusieurs back-cross et améliorer les critères agronomiques de certains cultivars (surtout Deglet Nour) par des hybridations intervariétales. Au Maroc l'amélioration est focalisée sur l'obtention de génotypes de meilleure qualité dattière et résistants au Bayoud, en obtenant 38 hybrides femelles de bonne qualité dattière ; toutefois, seulement deux d'entre eux sont résistants et sont recommandés pour une large multiplication par la culture *in vitro* [22].

En Algérie, les travaux d'amélioration génétique du palmier dattier datent de la période coloniale où PIONNIER en 1943 a lancé un programme ambitieux visant la fixation des principaux caractères héréditaires du cultivar Deglet Nour en vue de la multiplication par graine car ce cultivar est caractérisé par une bonne transmission de sa qualité par le biais de la femelle, ensuite MONCIERO en 1949 s'est intéressé à la sélection de clones mâles précoces, à floraison échelonnée avec beaucoup de pollen de qualité. BROCHARD en 1973 a repris la sélection génétique du palmier dattier en Algérie vis-à-vis surtout de la résistance au Bayoud [30].

### 1.5.1.2. Objectifs et critères de sélection

Les programmes de sélection chez le palmier dattier visent la mise au point de variétés résistantes au Bayoud, qui constitue un caractère indispensable pour la survie des palmiers dans des zones infestées, et productrices de fruits de grande valeur marchande, critère imposé par les contraintes du marché. Toutefois, ces deux caractères ne se trouvent jamais réunis dans les variétés-clones les plus répandues [30].

### 1.5.1.3. Sélection des variétés-clones et Khalts

La sélection s'est d'abord opérée par prospection au sein des variétés-clones réputées résistantes parmi celles déjà multipliées largement en palmeraies. Ensuite elle s'est opérée parmi les populations naturelles d'individus issus de semis pour sélectionner des arbres résistants, mais plus intéressants au point de vue de la qualité des fruits. Au Maroc, six variétés, dont la résistance a été confirmée, constituent un remède au problème du Bayoud, cependant leur qualité organoleptique insuffisante a bloqué leur vulgarisation à grande échelle [30]. Cette catégorie "Khalts" ou "Saïrs" ou "Deguel", représente en moyenne 67 % des palmiers de 11 palmeraies marocaines [8]. De plus, cette sélection au sein des populations naturelles est confrontée au problème de la prédominance variétale dans chaque région par certaines variétés femelles et d'un nombre très limité d'individus mâles engendrant une conservation, parfois favorable, de certains caractères de qualité dattière, mais générant une consanguinité appauvrissant la diversité génétique [30]. Cette prospection a permis de sélectionner quelques 2337 têtes de clone au Maroc (Zagora et Errachidia) et quelques centaines de cultivars installés à Adrar [40]. En Tunisie, 203 palmiers mâles "Dokkars" en collection à Tozeur sont étudiés en vue de rechercher une haute valeur pollinisatrice matérialisée par un bon pouvoir germinatif, une abondante production de pollen ainsi que la précocité ou la tardivité de floraison des palmiers mâles [20].

#### 1.5.1.4. Croisements dirigés

Les hybridations contrôlées sont réalisées dans le but de créer des palmiers de meilleure qualité que ceux issus de la simple sélection naturelle. Les descendances des croisements dirigés sont jugées pour leur résistance au Bayoud par inoculation artificielle et par plantation en terrain infesté naturellement. De plus, ces hybridations contrôlées visent l'obtention de géotypes stables pouvant se reproduire fidèlement par graines et la création de mâles génétiquement très proches des clones femelles intéressants. D'autres critères (vigueur de l'arbre, productivité, capacité à produire des rejets, vitesse de croissance, précocité de mise à fruit et de maturation des dattes, rusticité et adaptation pédoclimatique) peuvent être impliqués dans un programme de croisements dirigés. La prédominance variétale par régions implique le recours à des croisements entre individus distants géographiquement, donc très probablement éloignés génétiquement, qui peuvent être très souhaitables pour augmenter les chances de progrès génétique surtout avec la forte hétérozygotie du palmier dattier vue sa dioïcie [30]. Cette deuxième voie d'amélioration du palmier dattier a permis de produire environ un million de graines issues de différents croisements et environ 20.000 palmiers résistants au Bayoud en observation à Zagora et à Adrar [40]. Cependant, cette voie en plus de l'inconvénient qu'elle présente du temps très long nécessaire pour juger les nouveaux sujets ; elle est confrontée, comme chez toutes les espèces végétales, au problème d'incompatibilité entre les parents mâles et femelles [20].

#### 1.5.2. Méthodes biotechnologiques

##### 1.5.2.1. Justification des méthodes biotechnologiques

A ce jour, l'amélioration du dattier, par les techniques classiques n'a pas réussi à créer et à fournir aux agriculteurs des variétés commerciales intéressantes, étant donné la lenteur de croissance de cette plante et le temps qui sépare deux générations [42].

De plus, la propagation par les semences n'est pas applicable pour les cultivars connus car les caractères génétiques incluant les caractéristiques du fruit ne sont pas maintenues [43]. Pour cela la multiplication rapide du dattier par les techniques de culture *in vitro* constitue l'unique voie pouvant apporter une solution dans un délai raisonnable avec une indemnité de Foa en évitant, ainsi, la dispersion de la maladie [40].

#### 1.5.2.2. Historique de la culture *in vitro* du palmier dattier

SHROEDER (1970) et REUVENI et LILIEN-KIPNIS (1974) *in* [22] ont été les pionniers à conduire les études *in vitro* sur le dattier en obtenant une certaine callogenèse et rhizogenèse. Dès les années 80, les techniques de la culture *in vitro* du dattier ont connu plus de succès, par l'utilisation de plusieurs types de tissus végétaux (bougeons, inflorescences, cœurs de rejets, etc.) aboutissant à plusieurs résultats (callogenèse, embryons somatiques, etc.).

#### 1.5.2.3. Principales méthodes biotechnologiques appliquées au palmier dattier

##### 1.5.2.3.1. Embryogenèse somatique et semences artificielles

Appelée encore embryogenèse asexuée, désigne la formation en condition *in vitro* d'embryons à partir d'une ou plusieurs cellules somatiques ou germinales sans fusion gamétique. Les embryons somatiques produits sont, en principe, génétiquement identiques et capables de produire des clones. Les explants utilisés sont pratiquement les mêmes que pour la technique d'organogenèse. Les explants provenant de la base de jeunes feuilles de cœurs de rejets ainsi que les inflorescences [10] sont cependant les plus utilisés. Elle passe par quatre principales étapes qui sont : l'induction de la callogenèse, maintenance, développement et maturation des embryons somatiques et en dernier leur germination et conservation [22].

Malgré que l'anatomie des embryons somatiques (ES) et zygotiques (EZ) soit la même, l'embryon somatique diffère de l'embryon zygotique par l'absence de la phase de dormance, et aussi l'absence du tégument et d'endosperme,

lesquels sont nécessaires pour la survie et la germination. Ceci explique pourquoi les plants issus des ES sont moins vigoureux, avec une longueur réduite de pousses et de racines, que ceux issus des EZ. Cette faible vigueur des plants issus des ES semble être liée à leur maturation incomplète (moins d'accumulation de carbohydrates et des protéines intracellulaires) par rapport à celle des EZ [44,45,46].

#### 1.5.2.3.2. Sauvetage d'embryons

C'est l'excision aseptique d'un embryon zygotique à partir de la graine, après hybridation, à cultiver sur un milieu nutritif stérile riche en auxine contenant du charbon actif permet d'avoir des cals nodulaires développant des bourgeons [1].

#### 1.5.2.3.3. Obtention d'haploïdes

Des essais de culture d'anthers (androgenèse) ou d'ovules (gynogenèse) du dattier ont abouti à des divisions cellulaires et formation d'embryons globulaires à partir des microspores uninucléées [42,47,22]. Les plantes obtenues n'ont qu'un seul lot de chromosomes, au lieu de deux, qui sera doublé artificiellement afin qu'elles deviennent fertiles. Notons, que ces méthodes permettent aussi de diminuer le niveau de ploïdie (comme le passage des variétés cultivées tétraploïdes de pomme de terre à un niveau diploïde) [48].

#### 1.5.2.3.4. Induction de mutations et variations somaclonales

L'induction de mutations par des rayons "γ" sur des cultures embryogènes du dattier pour régénérer sur un milieu contenant une phytotoxine, préalablement isolée et identifiée, du Foa permettant d'avoir des plants résistants au Bayoud fait l'objet d'un projet en cours de réalisation au Maroc [22]. KHELAFI et al [49] rapportent l'irradiation des cals embryogènes du cultivar Deglet Nour par le cobalt 60 pour induire des mutations de résistance au Bayoud. Ils ont obtenu des vitroplants présentant une résistance à

l'inoculation artificielle par une souche agressive du Foa, qui reste à vérifier en conditions naturelles. De même, des cals, des suspensions cellulaires et des embryons somatiques du dattier pourraient être réalisés en présence de filtrats d'acide fusarique ou des peptides toxiques plus ou moins purifiées. Les tissus qui survivent à des niveaux élevés de toxines devraient être transférés et maintenus dans le but d'induire et/ou d'augmenter la variabilité génétique et diagnostiquer précocement les nouveaux hybrides au lieu du temps fastidieux pour une évaluation en plein champ [7].

#### 1.5.2.3.5. Cryoconservation

La préservation du dattier à travers l'application de la technologie de cryoconservation ou congélation en gouttes, fondée sur un refroidissement ultrarapide des tissus préalablement déshydratés, a prouvé son efficacité dans le maintien de la survie et la possibilité de reprise sans affecter les capacités morphogénétiques [50].

#### 1.5.2.3.6. Microgreffage du palmier dattier

MESBAH (1985) *in* [22] a essayé de microgreffer des pousses sur une plantule enracinée afin d'éviter les problèmes liés à la transplantation. Cependant, la prolifération de cals ne s'est pas installée et il n'a pas eu de connexion vasculaire entre la partie enracinée et les greffons.

#### 1.5.2.3.7. Transformation génétique

Aucune étude ne rapporte la transformation génétique du dattier.

### 1.5.3. Protoplastes et hybridations somatiques

#### 1.5.3.1. Définition des protoplastes

C'est une cellule végétale, bactérienne ou fongique ou autres cellules vivantes débarrassée artificiellement de sa paroi squelettique [51], d'habitude, par digestion enzymatique [52]. Il apparaît alors sous forme sphérique, limité

par sa membrane plasmique [53] avec un contenu cellulaire plasmolysé [54]. L'ensemble des protoplastes d'une plante constitue le symplaste [55].

#### 1.5.3.2. Historique des protoplastes

KLERCKER en 1892 a isolé pour la première fois les protoplastes par le découpage des écailles du bulbe d'oignon avec un couteau mince dans une solution plasmolysante, résultant à la libération des protoplastes quand les parois sont coupées, mais avec un faible rendement. En 1960 COCKING a trouvé que les protoplastes peuvent être facilement isolés par incubation des tissus végétaux dans une solution concentrée de cellulase préparée à partir du champignon *Myrothecium verrucaria*. Vers 1968, des préparations commerciales d'enzymes dégradant les parois cellulaires sont devenues disponibles et facilitant ainsi l'isolement et la libération des protoplastes [56].

#### 1.5.3.3. Totipotence des protoplastes

Les protoplastes sont des cellules nues qui sont l'équivalent, en terme générale, des cellules animales. Cependant, non pas comme ces dernières. Les protoplastes montrent la propriété de la "totipotence cellulaire". En principe, chaque protoplaste individuel est capable de reformer une paroi cellulaire, et ensuite initier soit un cal à travers les divisions successives, ou un embryon, défini comme étant un embryon somatique. En effet, des facteurs tels que le génotype ou l'espèce manipulée, et l'état ontogénétique de l'explant source, exercent un effet puissant sur le potentiel de régénération des protoplastes [57,15,54].

#### 1.5.3.4. Source de protoplastes

Les feuilles représentent le matériel le plus souvent utilisé pour l'isolement de protoplastes [58]. Cependant, les suspensions cellulaires embryogènes sont devenues la source préférée chez plusieurs espèces, telles que le riz [92], le Bananier, où les suspensions cellulaires et/ou les cals embryogènes sont le matériel source préféré vu leur totipotence et la

récalcitrance des protoplastes du mésophylle foliaire [58,59]. Les suspensions cellulaires sont généralement initiées à partir de cals friables à croissance rapide. Cependant, l'inconvénient de leur utilisation c'est qu'elles accumulent des changements quantitatifs et qualitatifs durant leur culture conduisant à la variation somaclonale [60].

Les protoplastes peuvent être isolés à partir de grains du pollen, entourés par une exine et une intine [61]. Cependant, des efforts anticipés pour isoler les protoplastes à partir du pollen étaient soumis à des difficultés techniques dues à la résistance de l'exine aux enzymes ce qui limitait les quantités des protoplastes polliniques obtenus [52]. Ceci, a conduit BAJAJ et DAVEY (1974) *in* [61] à combiner la méthode enzymatique et mécanique pour obtenir, pour la première fois, des protoplastes polliniques. Depuis lors, les protoplastes polliniques ont été isolés à partir d'autres espèces angiospermes [52].

#### 1.5.3.5. Isolement des protoplastes

L'obtention de protoplastes, nécessite l'élimination de la paroi pecto-cellulosique avec la préservation de l'intégrité cellulaire [62]. TAKEBE et al [63] rapportaient que l'isolement de protoplastes à partir du parenchyme foliaire du Tabac, se fait en présence des pectinases libérant les cellules, suivi par un traitement à la cellulase pour l'élimination des parois. Depuis, l'emploi d'un mélange enzymatique réunissant les pectinases et les cellulases est de plus en plus appliqué [64].

Les enzymes utilisées sont extraites de divers champignons saprophytes tels que *Trichoderma veridae* et *Aspergillus niger* [53]. Cependant, les préparations commerciales d'enzymes renferment des impuretés, parfois toxiques (CHUPEAU et BOURGIN, 1980 *in* [3]), notamment d'autres enzymes (ribonucléases, protéases, lipases), des phénols et des sels résiduels des milieux de culture de l'organisme producteur [65]. La pureté des enzymes, est un facteur déterminant dans l'isolement des protoplastes pour éviter l'altération



de la cellule végétale en particulier le plasmalemma (BENGOCHEA et DODDS, 1986 *in* [3]). Une enzyme pure, maintient la viabilité des protoplastes, leur capacité de synthèse pariétale et la division cellulaire sur le milieu de culture approprié [66,67]. Les enzymes utilisées dans l'isolement de protoplastes sont de trois catégories : Cellulases, Hémicellulases et Pectinases.

La concentration enzymatique utilisée pour isoler les protoplastes est généralement comprise entre 0,2 à 15 % (LAINE et DUCREUX, 1987 *in* [3]). L'incubation des tissus dans la solution enzymatique, à pH compris entre 5,4 et 6, se fait sous obscurité ou à faible luminosité avec ou sans agitation (généralement 30 à 50 rpm) et une température allant de 25 à 30°C pendant un temps variant suivant l'espèce et le tissu (LAINE et DUCREUX (1987) *in* [3] ; [56]).

#### 1.5.3.6. Paramètres influençant le rendement en protoplastes

Plusieurs paramètres interviennent dans le processus d'isolement et influencent le rendement et la viabilité des protoplastes dont :

- Origine (âge et état physiologique) et conditions de prétraitement des tissus utilisés ;
- Composition de la solution enzymatique utilisée ;
- Conditions d'incubation (température, lumière, etc.) [68].

#### 1.5.3.7. Purification des protoplastes

Plusieurs techniques sont utilisées pour purifier les protoplastes dont :

##### 1.5.3.7.1. Purification par filtration

Elle consiste, selon BINDING et al (1978) *in* [3], à passer les protoplastes à travers des filtres métalliques (à pores variant de 30 à 100 µm. Elle est suivie par une série de centrifugation, généralement à 100 x g et pendant 3 à 10 mn, avec rinçage dans une solution appropriée de sels permettant de compenser la

perte ionique éventuelle lors de l'isolement et d'éliminer les traces d'enzymes [69].

#### 1.5.3.7.2. Purification par flottaison ou sédimentation

La purification par flottaison consiste à suspendre les protoplastes dans un milieu concentré en saccharose, qui est couvert à son tour par un milieu contenant du mannitol. Durant la centrifugation, les protoplastes viables se concentrent à l'interphase des deux milieux alors que les débris se concentrent dans le culot au fond du tube vu leur densité. Les protoplastes récupérés seront ensuite rincés deux à trois fois avant leur transfert sur milieu de culture [70,71,56].

Alors que la purification par sédimentation consiste à suspendre les protoplastes dans une solution de mannitol qu'on étale sur une solution de saccharose et faire une centrifugation pour que les débris cellulaires sédimentent dans le culot tout en récupérant les protoplastes à l'interphase [72].

Généralement un coussin de 21 % de saccharose est utilisé pour purifier les protoplastes. Une centrifugation à 100 x g accélère la formation du ménisque de protoplastes purifiés à la surface de la solution de saccharose [51].

#### 1.5.3.8. Contrôle de l'absence de la paroi cellulaire

Etant donné l'uniformité de la pression au tour des protoplastes, leur forme sphérique observée peut indiquer l'absence de la paroi cellulaire. Cependant, son absence ou présence peut être évaluée avec plusieurs méthodes qui se basent sur la propriété de quelques molécules, telles que le Calcofluor M2R, le Calcofluor White ou la Photine HV, qui fluorescent en se combinant avec la cellulose lorsqu'elles sont excitées sous U.V. [51,54].

### 1.5.3.9. Estimation de la viabilité des protoplastes

L'estimation de la viabilité est nécessaire pour évaluer l'efficacité du procédé d'isolement afin d'établir les conditions de la culture. Les méthodes d'évaluation de la viabilité, basées sur l'intégrité membranaire, peuvent être classées en deux groupes : celles qui colorent uniquement les cellules mortes, et celles où uniquement les cellules vivantes sont colorées [73].

#### 1.5.3.9.1. Méthode d'exclusion de colorants

Elle est basée sur l'aptitude du plasmalemme à bloquer l'entrée des colorants dans le cytoplasme. Le Bleu d'Evans, Phénosafranine, Bleu de méthylène, Bleu de Trypane et le rouge neutre sont utilisés. Ces composés rentrent à travers les membranes endommagées et colorent le contenu des cellules mortes qui vont être comptées sous microscope. Le Bleu de méthylène ( $C_{16}H_{18}ClN_3S$ ) est un composé organique, soluble dans l'eau et plus légèrement dans l'alcool, qui teint le collagène des tissus en bleu [51,74]. Cette méthode peut être mal interprétée au cas où ces cellules mortes perdent leurs cytoplasmes [75].

#### 1.5.3.9.2. Méthode d'enzymes membranaires

Elle est basée sur l'intégrité membranaire associée à l'activité des estérases. La Fluorescéine Diacétate (FDA) constitue le substrat que les estérases clivent en acétate et fluorescéine au cours de son passage à travers la membrane, et seule la fluorescéine devient fluorescente sous excitation avec la lumière bleue ou les U.V. et par conséquent ce sont les protoplastes viables qui fluorescent en vert [51]. D'autres substrats peuvent être utilisés, tels que les sels de 3-[4,5-diméthylthiazol-2-yl]-2,5-diphényle tétrazolium bromide (MTT) et chlorure de triphényle tétrazolium (TTC). Les sels de tétrazolium sont réduits par les cellules viables en un formazan insoluble dans l'eau de couleur rouge suite à l'action des déshydrogénases ou la chaîne mitochondriale de transport d'électron [74,75,73]. Les cellules colorées en noir ou incolores sont

considérées comme mortes [73]. Cependant, la réduction du TTC nécessite 6 à 20 h pour se produire, et il est difficile de visualiser sous microscope [75].

#### 1.5.3.10. Dénombrement des protoplastes

Le dénombrement des protoplastes se fait par observation microscopique sur une Cellule de comptage : Malassez, Nageotte, Hématocytomètre, etc. Trois à 5 dénombrements correspondant à un volume déterminé de suspension sont effectués et la valeur moyenne est retenue, afin d'obtenir la concentration moyenne en protoplastes par volume de milieu [74].

#### 1.5.3.11. Culture de protoplastes

La culture de protoplastes est influencée par plusieurs facteurs :

##### 1.5.3.11.1. Matériel végétal

Les protoplastes de différentes espèces et de différents tissus de la même espèce peuvent avoir des besoins nutritionnels différents [15].

##### 1.5.3.11.2. Densité de culture

Une densité élevée est nécessaire pour induire les premières divisions cellulaires. Généralement une densité de  $5 \times 10^4$  protoplastes/ml est utilisée, mais certaines espèces exigent une densité plus élevée (1 à  $5 \times 10^5$  protoplastes/ml pour le bananier et le manioc) pour obtenir un taux de division correct [51].

##### 1.5.3.11.3. Méthodes de culture de protoplastes

La culture des protoplastes reste l'étape la plus difficile de toutes les approches *in vitro* visant la régénération de plantes, particulièrement chez les plantes ligneuses pérennes, qui est un phénomène complexe, où les protoplastes nécessitent de passer par plusieurs étapes : néoformation de la

paroi cellulaire, dédifférenciation, activation du cycle cellulaire et prolifération cellulaire [76].

Typiquement, les protoplastes isolés commencent la régénération de la paroi cellulaire dans un temps réduit (souvent de quelques minutes) suivant leur introduction en culture. Cependant, ils requièrent une protection osmotique jusqu'à ce que leurs nouvelles parois primaires soient complètement régénérées pour contrecarrer la pression turgescence exercée par le cytoplasme [15]. Plusieurs milieux ont été basés sur les formulations du MS [77], B5 [78] et du KM [79], avec l'addition d'un agent osmotique, généralement un ose-alcool non métabolisable et non toxique, tel que le mannitol, ou dans certains cas plus soluble, le sorbitol [15]. Cependant, plusieurs modifications sont très souvent pratiquées parmi lesquelles on peut noter en particulier la concentration en ions ammonium, les macroéléments ou l'addition des composés organiques. Inversement, la concentration du  $\text{Ca}^{2+}$  doit être augmentée de 2 à 4 fois par rapport à celle normalement utilisée pour la culture de cellules [51]. De plus, une source de carbone, comme le saccharose [80] et la présence de vitamines et des régulateurs de croissance comme les auxines et les cytokinines dans le milieu de culture sont indispensables à l'initiation de la division et au développement des protoplastes jusqu'à la régénération de la plante. Plusieurs approches ont été développées pour la culture de protoplastes, qui sont, toutes, basées sur les milieux liquides ou semi-solides ou leur combinaison [15].

Le milieu semi-solide, généralement avec l'agarose, contenant les protoplastes peut être déposé en gouttes ou en couche. La suspension de protoplastes en couche fine liquide sur milieu semi-solide permet de stimuler la formation de colonies cellulaires, particulièrement quand un papier filtre est inclus entre le milieu liquide et le milieu semi-solide. Ce papier filtre peut être remplacé par une membrane filtre bactérienne (0,2  $\mu\text{m}$ ), ou bien avec une couche de cellophane ou une grille en nylon ; facilitant ainsi le transfert des cellules dérivant des protoplastes sur un nouveau milieu [15].

La culture sur milieu liquide ne permet pas la division des protoplastes, ceci est dû au fait que les protoplastes, sous ces conditions de culture, se sédimentent vers le fond des boîtes où l'accessibilité de l'air est probablement faible d'où la nécessité d'utilisation d'une couche peu profonde du milieu liquide. Puisque les agrégats de protoplastes sont cultivés sur milieu liquide, les cellules saines vont être exposées à des concentrations élevées de substances toxiques libérées par les cellules adjacentes mortes [81]. De plus, la culture dans ou sur le milieu solide est considérée plus avantageuse que dans le milieu liquide car la manipulation des cultures est facile en plus d'un meilleur suivi du développement des protoplastes isolés à des colonies cellulaires [82,83,54]. Pour un bon développement et afin d'éviter une photo-oxydation brutale des protoplastes, leur culture se fait dans l'obscurité pendant les premiers jours, puis elle sera exposée progressivement à la lumière [53,51].

#### 1.5.3.12. Intérêts des protoplastes

- **Études biologiques**

La technologie des protoplastes a permis de grands progrès dans la compréhension des événements fondamentaux de la formation de la paroi cellulaire, division cellulaire, prolifération, et l'acquisition ultérieure de compétence morphogénétique par les cellules [84]. De plus, ils fournissent un modèle excellent pour étudier la corrélation entre la composition de la paroi cellulaire et le comportement cellulaire *in vitro*, étant donné que les stades successifs de la synthèse et de la déposition de la paroi peuvent être tracés avec précision [85].

Les protoplastes sont devenus de plus en plus utilisés comme matériel expérimental dans des recherches biochimiques et physiologiques sur la membrane, développement végétal, biochimie, biologie cellulaire, morphologie, pathologie, génétique moléculaire [86,87,88], biomécaniques, réponses aux stress chez les plantes [69], perméabilité des ions et des solutés, photosynthèse, phytohormones, phytochrome, maintenance de la totipotence

cellulaire ainsi que l'assemblage des polymères et autres processus biochimiques [89,90,54].

- **Etudes phytopathologiques**

L'utilisation des protoplastes en virologie est plus intéressante que l'utilisation des plantes car ils peuvent être synchroniquement infectés par des virus, avec la possibilité d'entamer des recherches biochimiques et moléculaires, notamment, aux premiers stades de l'infection [69]. De même, DAVEY et al [15] rapportent l'utilité des protoplastes dans les études sur l'interaction hôte-pathogène : champignons, bactéries et même les virus. De plus, les protoplastes totipotents sont potentiellement précieux pour essayer les effets à long terme des facteurs chimiques (ex : produits agrochimiques, additifs alimentaires et pharmaceutiques) et physiques (radiation).

- **Recherche de nouvelles formes par manipulations génétiques**

L'intérêt des protoplastes réside dans la possibilité de faire pénétrer dans la cellule des molécules diverses (fragments d'ADN, gènes d'intérêt agronomique, etc.), des organites cellulaires (mitochondries et chloroplastes), voire des noyaux ou des organismes entiers (virus, bactéries...). C'est le cas des essais d'introduction des gènes responsables de la fixation d'azote [53]. De plus, ils sont utilisés pour la création de nouvelles formes par transformation génétique [91]. Ils constituent d'excellents outils pour l'amélioration des plantes par manipulation génétique (introgression d'ADN). Les plantes peuvent alors être régénérées *via* les protoplastes, ce qui permet de produire des plantes génétiquement modifiées [52].

- **Recherche de mutants**

Les protoplastes peuvent subir un traitement mutagène ou être mis en contact avec des substances toxiques, des antibiotiques, des acides aminés,

des inhibiteurs, etc. [53,91]. Ils fournissent un système cellulaire qui peut être manipulé facilement [15].

- **Recherche de nouvelles formes par fusion cellulaire**

Les protoplastes sont employés dans la recherche fondamentale et l'amélioration des plantes par l'utilisation des techniques variées basées sur leur capacité de fusionner complètement ou partiellement donnant naissance à des hybrides somatiques et / ou des cybrides. Cette fusion est possible entre les protoplastes même d'origines différentes (variétés, espèces ou genres différents) [53,92,91,52,54].

#### 1.5.3.13. Régénération de plantes à partir de protoplastes

La régénération de plantes entières à partir de protoplastes cultivés séparément ou fusionnés est un procédé entièrement maîtrisé chez plusieurs espèces herbacées telles que la pomme de terre [93,94], le cotonnier [95,58,96], le riz [97,92], l'ail [98], le seigle [99], le Gingembre [100], la luzerne [101], la betterave sucrière [102], l'Iris [103], le Pélargonium [104], la Menthe [105], l'Armoise de Juda et de l'Echinopse [106], la Gentiane [60], l'Arabidopsis [88] ainsi que chez les ligneuses telles que le Bananier [89,107,108], le Cannelier [109], le mûrier [110] et autres. De même, la régénération a été obtenue suite à la culture de protoplastes fusionnés de plusieurs espèces telles qu'entre le blé tendre et le rye gras [111], entre l'aubergine et *Solanum sisymbriifolium* [91], entre le colza et la bourse à pasteur [112].

Selon SMITH [70] la majorité des plantes régénérées à partir de protoplastes sont normales avec un degré de fertilité élevé et un nombre faible et variable (moins de 1 %) de plantes qui montrent des anomalies morphologiques, telles que le changement de couleur des fleurs, suite à une aneuploïdie et polyploïdie. De même, SHIBA et MII [113] rapportent qu'environ 80 % des plantes de tournesol régénérées *via* les protoplastes sont normales et fleurissent normalement sans changement du niveau de ploïdie. Cependant,



certaines anomalies sur des plantes régénérées à partir des protoplastes de la suspension cellulaire ont été enregistrées. Il s'agit notamment de ramifications importantes et une floraison précoce *in vitro* ou *in vivo*, tiges rabougries et feuilles en écailles avec une faible croissance racinaire rendant difficile leur acclimatation, et un niveau de ploïdie bas, ou des plantes à grande taille avec des feuilles épaisses et une double concentration d'ADN.

#### 1.5.3.14. Fusion de protoplastes

##### 1.5.3.14.1. Intérêt de la fusion des protoplastes (Hybridation somatique)

La fusion de protoplastes permet de surmonter les barrières d'incompatibilité sexuelle, qui constituent une limite majeure dans l'amélioration des plantes et le croisement des variétés cultivées avec des espèces sauvages pour introduire de nouveaux caractères, tels que la résistance aux maladies et ravageurs [114,109] ou tout simplement pour augmenter la variabilité génétique [54]. Cependant, la fusion de protoplastes nécessite la connaissance des gènes d'intérêts, particulièrement ceux liés aux mécanismes de résistance aux maladies [115,52].

##### 1.5.3.14.2. Facteurs influençant la fusion des protoplastes

La réussite de l'hybridation somatique exige de maîtriser plusieurs facteurs [51]:

- Le succès de l'isolement de protoplastes et de leur culture ;
- La régénération de plantes à partir des protoplastes ;
- Les techniques de fusion de protoplastes ;
- La sélection des structures hybrides ;
- La confirmation de la nature des structures hybrides obtenues.

### 1.5.3.14.3. Techniques de fusion des protoplastes

#### 1.5.3.14.3.1. Fusion mécanique

C'est une méthode utilisée pour la première fois par MICHEL en 1939, elle consiste à mettre en contact des protoplastes par compression de flux liquide dans une pipette à perfusion. Des fusions sporadiques ont été observées chez le Soja par exemple [116].

#### 1.5.3.14.3.2. Fusion chimique

Cette méthode utilise des agents chimiques, pour provoquer l'accolement des protoplastes par le contact membranaire, comme le calcium ou des substances non ionisées comme le polyéthylène glycol (PEG). Ce dernier, découvert en 1974 par KAO et MICHAYLUK et WALLIN et al induit la fusion cellulaire. C'est une substance non ionisée, provoquant l'accolement des protoplastes par la neutralisation des charges négatives présentes à la surface de la membrane conduisant alors à un contact membranaire intime, suivie de fusion de protoplastes qui se produit au cours du rinçage. Le taux de fusion est amélioré par l'addition d'ions de calcium. La fusion chimique par le PEG est une méthode simple et très utilisée pour son efficacité sans l'emploi d'un matériel sophistiqué. Le PEG induit des fusions cellulaires d'une manière non spécifique en plus de la formation de cellules multinucléées par fusion de plusieurs protoplastes [117,53]. D'autres produits chimiques sont utilisés pour provoquer la fusion des protoplastes comme les nitrates du sodium ( $\text{NaNO}_3$ ) ; cependant, le taux de fusion produit est très faible, de l'ordre de 0 à 5 % [64]. De plus, la présence de fortes concentrations de  $\text{Ca}^{+2}$  associées à un pH élevé (10,5) permet d'obtenir 25 % de fusion [51].

#### 1.5.3.14.3.3. Fusion électrique ou électrofusion

Méthode connue depuis les années 80. Son application a provoqué de hauts rendements en fusion de protoplastes [118,119]. Elle est préférée en terme de maintenance de la viabilité des protoplastes et de la réduction du dommage membranaire, déformation/rupture générale des protoplastes et la

fusion d'organites [15]. Elle donne un rendement de 20 % plus élevé que la fusion chimique par PEG qui donne moins de 1 % [56]. Cependant, DONOVAN et al [120] indiquent que cette technique donne des fréquences de fusion qui peuvent atteindre 10 fois plus que les techniques chimiques.

#### 1.5.3.14.3.4. Fusion électrochimique

OLIVARES-FUSTER et al [121] ont développé une nouvelle méthode de fusion de protoplastes qu'ils ont appelé "Fusion Électrochimique", basée sur l'induction de l'agrégation chimique des protoplastes, ensuite la fusion membranaire par des impulsions électriques (2000 à 3000 V). C'est une méthode fiable et reproductible qui combine les meilleures caractéristiques des deux méthodes chimiques et électriques, favorisant de ce fait la division cellulaire et des taux élevés d'embryogenèse.

#### 1.5.3.14.4. Produits de fusion de protoplastes

Lors de la fusion des protoplastes, le contenu cellulaire de 2 ou plusieurs protoplastes est mis en commun, pouvant aboutir à l'addition totale ou partielle des 3 génomes : nucléaire, chloroplastique "plastidome" et mitochondrial "chondriome". Il en résulte un accroissement du niveau de ploïdie de la nouvelle unité. L'addition totale ou partielle de deux noyaux, on parle d'hybride somatique ; s'il ne subsiste que l'un des noyaux parentaux associé à un cytoplasme recombinaison, il s'agit de cybrides [51]. La coloration vitale par l'acridine orange et l'observation en fluorescence permet de distinguer les hétérocaryons des homocaryons, le plus souvent difficile [117].

Pour le "chondriome", on peut trouver des populations contenant des structures recombinées ou l'absence de l'un des types. Pour le "plastidome", l'un des types parentaux est totalement éliminé. La recombinaison des génomes chloroplastiques est un événement rare [122,51]. GE et al [111] ont trouvé que les mitochondries et les chloroplastes des deux espèces (blé et rye gras) n'existent pas au même temps dans le même cytoplasme des cybrides. Selon eux ceci, il est peut être dû à la parenté phylogénétique éloignée entre les deux espèces.

#### 1.5.3.15. Protoplastes et palmier dattier

L'utilisation des protoplastes chez le palmier dattier peut constituer un point de départ pour obtenir des hybrides somatiques alliant la qualité dattière et la résistance au Bayoud [123]. GABR et TISSERAT [124] ont été les premiers à isoler les protoplastes des cals embryogènes de Deglet Nour. Ensuite MOUSSOUNI et SI-DEHBI [125] ont essayé l'isolement de protoplastes à partir des racines, cals et feuilles de deux cultivars du palmier dattier Deglet Nour et Takerboucht. ABED et al [123] ont isolé les protoplastes à partir de suspensions cellulaires de cals embryogènes chez les mêmes cultivars.

CHABANE [3] est arrivée à établir une suspension cellulaire à partir de cals embryogènes de Deglet Nour et Takerboucht ensuite réussir l'isolement de protoplastes à partir de plusieurs types de matériel végétal (cals nodulaires et friables, feuilles et suspensions cellulaires). La culture des protoplastes isolés et fusionnés des deux cultivars en question sur deux systèmes de culture (couches nourrices et milieu liquide) a permis d'obtenir des microcals ensuite des cals développant des plantules via l'embryogenèse somatique. Les plantules issues de la fusion de protoplastes présentent un niveau de ploïdie supérieur à celui des plantules issues de la culture des protoplastes des deux cultivars isolément.

De même, RIZKALLA et al [126] ont isolé et cultivé les protoplastes de feuilles de deux cultivars égyptiens du palmier dattier (Barhée et Zaghloul) tout en appliquant un stress salin par l'application du KCl et du NaCl, cependant sans aboutir à une régénération de plantules.

#### 1.5.4. Conformité variétale des régénérants par culture de tissus du palmier dattier

Les plantes dérivant de la culture de tissus *in vitro* sont soumises aux variations génétiques en général, et à la variation somaclonale en particulier ; induites surtout par le mode de propagation utilisé ainsi que les conditions de culture [1]. Cet auteur indique qu'il a observé moins de 0,1 % de variation chez les vitroplants issus par embryogenèse de la variété Barhée car les plants qui

dérivent des embryons somatiques sont moins susceptibles à la variation somatique comparés à ceux qui dérivent de l'organogenèse [46]. De même, SHABANA et al [127] indiquent qu'il n'y a pas de différence significative entre les dattes des palmiers issus de la culture *in vitro* et ceux issus des rejets; et ce pour les caractéristiques physico-chimiques. Cependant, les dattes des palmiers acclimatés présentent moins d'humidité que celles des palmiers issus de rejets. AL WASEL et al [128] indiquent qu'il y a quelques variations somaclonales chez les plants issus *in vitro* telles que le nanisme, croissance lente, anomalie morphologique, échec de fructification, des carpelles surnuméraires ; qui causent des pertes économiques considérables en plus du recourbement de la croissance apicale et une faible teneur en chlorophylle (albinisme).

#### 1.5.5. Méthodes de détection des variants

Etant donné que la détection des régénérants hors-types n'est possible qu'au stade juvénile, des marqueurs moléculaires décrivant l'arrangement interne et identifiant la variance basée soit sur la composition d'ADN ou sur les produits protéiques exprimés à partir de certaines régions d'ADN, en plus des analyses moléculaires communément utilisées, l'AFLP et RAPD doivent être développés pour éliminer les mutants et détecter précocement les variants somaclonaux [43].

Quoique la cytométrie en flux n'a pas été appliquée considérablement chez le dattier, celle conduite par FKI et al [129] ne montre aucune variabilité dans le niveau de ploïdie des plants du dattier régénérés par embryogenèse somatique. Alors que celle conduite par CHABANE [3] a montré une augmentation du niveau de ploïdie chez les plantules issues de la fusion de protoplastes de Deglet Nour et Takerboucht comme résultats de l'union des génomes des deux cultivars en question. Cette technique fournit une méthode pratique pour l'identification des cultivars du dattier et une détection précoce de la variation génétique, produite spontanément, par la détection des changements dans la taille du génome comme résultat d'altération dans le nombre de chromosome ou le niveau de ploïdie [43].

*MATÉRIELS ET MÉTHODES*

## CHAPITRE 2 MATÉRIEL ET MÉTHODES

Notre expérimentation a été réalisée au Laboratoire de Ressources Génétiques et Biotechnologies (L-RGB) de l'ENSA, EL-HARRACH, Alger.

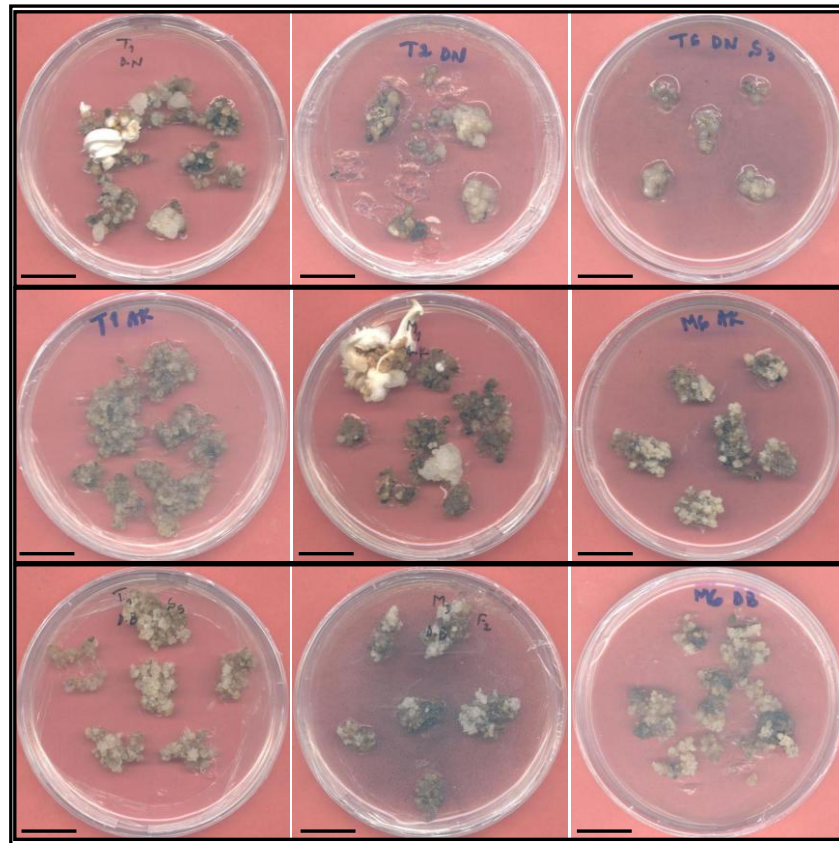
### 2.1. Matériel végétal

Notre expérimentation a été menée sur un matériel végétal constitué de cals de trois cultivars "Deglet Nour", "Akerbouch" et "Degla Beïda" (Voir fiche descriptive des trois cultivars en Appendice B) obtenus par BOUFIS [16] et DJILALI [17]. Ces cals, âgés de plus 3 ans, sont issus d'une culture de fragments de rejets des trois cultivars sur le milieu MS (1962) (Appendice C) simple (T) ou modifié (M), par l'ajout d'additifs minéraux ou additifs de TISSERAT [130], à pH ajusté entre 5,6 et 5,8. Ces deux milieux sont combinés avec différentes balances hormonales de 2,4-D et de BAP (Appendice C).

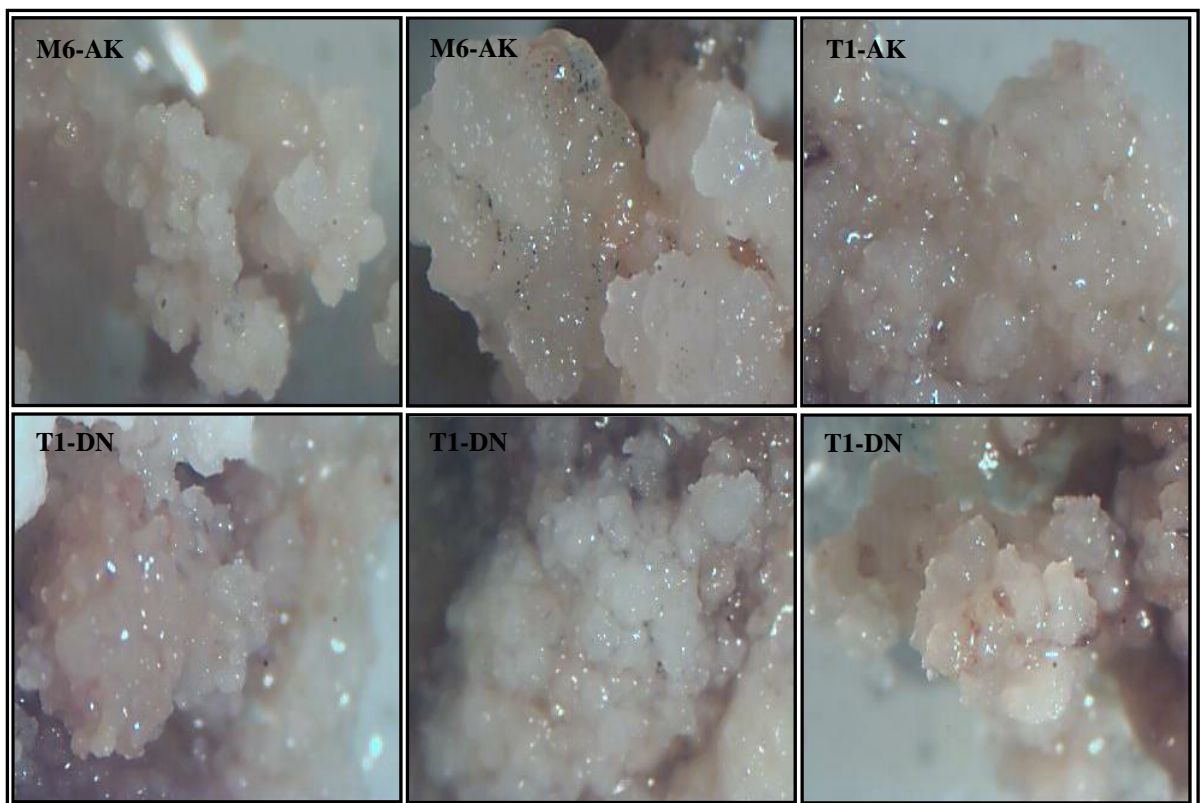
Les cals issus des différents milieux sont repiqués tous les 2 mois sur un milieu (T ou M) neuf afin d'éviter l'accumulation des polyphénols et permettre, ainsi, une bonne prolifération cellulaire. Les cals repiqués sont placés dans l'obscurité à une température de  $24^{\circ}\text{C} \pm 2$ . Les cals présentent différentes textures (friable, nodulaire, globulaire ou mixte) (Figure 2.1 et Figure 2.2).

### 2.2. Isolement des protoplastes

L'isolement des protoplastes a été initié à partir de cals nodulaires des trois cultivars (Figure 2.2). Le choix du cal se fait, en se basant, sur les travaux précédents [16,17] au sein du laboratoire ; ainsi que d'autres travaux [3] qui indiquent que les cals embryogènes, que ce soit pour le processus de l'embryogenèse somatique ou la régénération à partir de leurs protoplastes, sont de type nodulaire.



**Figure 2.1** : Cals des trois cultivars du palmier dattier utilisés pour l'isolement des protoplastes (Barre = 1,8 cm).

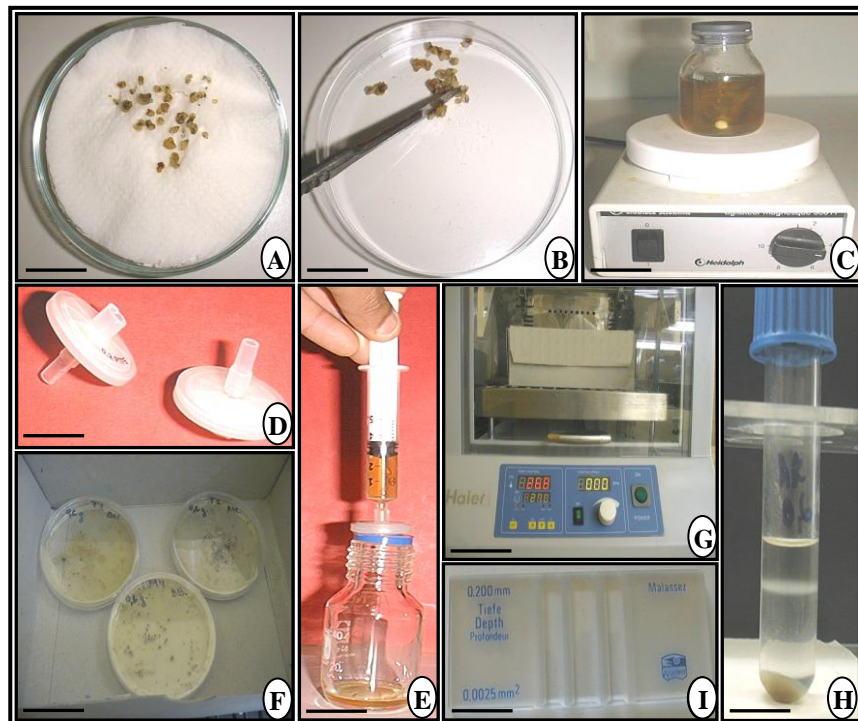


**Figure 2.2** : Texture des cals de Deglet Nour et Akerbouch utilisés pour l'isolement des protoplastes (G = x 45).



### 2.2.1. Macération enzymatique

Une masse d'environ 0,6 g de cals nodulaires (parties proliférantes uniquement) est utilisée pour isoler les protoplastes. Le cal est séché et débarrassé du milieu de culture sur du papier stérile sous conditions d'asepsie ensuite haché à l'aide d'un scalpel en morceaux de petite taille et mélangé avec 10 ml de la solution enzymatique (SE). Les solutions enzymatiques sont composées d'une cellulase et d'une pectinase. La cellulase utilisée est la Cellulase issue du *Trichoderma longibrachiatum*. Elle contient 0,61 unités/mg. Alors que la pectinase utilisée est une Macérozyme R10 issue du *Rhizopus* sp. Elle contient 0,54 unités/mg. Les solutions enzymatiques sont préalablement préparées et stérilisées par microfiltration à travers un filtre millipore de 0,2  $\mu\text{m}$ . Le mélange est incubé avec ou sans agitation dans des boîtes de pétri de 9 cm de diamètre sous obscurité totale et une température de 27°C (Figure 2.3 : de A à G).



**Figure 2.3** : Etapes de la macération enzymatique des cals du palmier dattier pour l'isolement des protoplastes.

**A** : Séchage des cals (Barre = 2,1 cm). **B** : Hachage des cals (Barre = 2,1 cm). **C** : Préparation de la SE (Barre = 2,3 cm). **D** : Filtres de stérilisation de la SE (Barre = 1,6 cm). **E** : Stérilisation de la SE (Barre = 2,8 cm). **F** : Type de mélange Cals-SE (Barre = 5,0 cm). **G** : Incubation des mélanges Cals-SE (Barre = 12,1 cm). **H** : Purification des protoplastes (Barre = 1,5 cm). **I** : Dénombrement des protoplastes (Cellule de Malassez) (Barre = 1,7 cm).

Afin d'optimiser l'isolement des protoplastes, l'effet de plusieurs facteurs a été étudié à savoir la solution enzymatique et la concentration des enzymes, la concentration du mannitol en plus de la durée et du mode de macération (Figure 2.5). Pour ce faire, l'optimisation de l'isolement de protoplastes est réalisée de la manière suivante :

#### 2.2.1.1. Effet de la solution enzymatique

Afin de déterminer la meilleure solution enzymatique ainsi que les meilleures concentrations enzymatiques, trois solutions enzymatiques combinées avec deux modes de macération (stationnaire ou 50 rpm) sont testées (Tableau 2.1). Les mélanges sont incubés dans des boîtes de pétri de 9 cm de diamètre sous obscurité totale et une température de 27°C pendant 16 h.

**Tableau 2.1** : Composition des solutions enzymatiques (SE) testées.

SE	SE N°1	SE N°2	SE N°3
<b>Composition</b>			
<b>Cellulase (%)</b>	1,5	1	<b>2</b>
<b>Macérozyme (%)</b>	1	0,2	<b>0,5</b>
<b>Milieu de la SE</b>	MS	MS	<b>MS</b>
<b>Mannitol</b>	0,5 M	0,5 M	<b>0,5 M</b>
<b>KCl (mM)</b>	204	204	<b>204</b>
<b>CaCl<sub>2</sub> (mM)</b>	67	67	<b>67</b>
<b>pH</b>	<b>5,6</b>	<b>5,6</b>	<b>5,6</b>

#### 2.2.1.2. Effet de la concentration du mannitol

Etant donné que l'importance de la concentration de l'agent osmotique dans la solution de macération enzymatique ; trois concentrations du mannitol (0,4, 0,5 et 0,6 M correspondant respectivement à 7,3, 9,1 et 10,9 g/l) combinées avec deux modes de macération (stationnaire et 50 rpm) sont testées (Tableau 2.2) avec la solution enzymatique SE N°1. De même, les mélanges sont incubés dans des boîtes de pétri de 9 cm de diamètre sous obscurité totale et une température de 27°C pendant 16 h.

**Tableau 2.2** : Concentrations du mannitol (M) testées.

Concentration	0,4 M	0,5 M	0,6 M
<b>Composition</b>			
<b>Cellulase (%)</b>	1,5	1,5	<b>1,5</b>
<b>Macérozyme (%)</b>	1	1	<b>1</b>
<b>Milieu de la SE</b>	MS	MS	<b>MS</b>
<b>KCl (mM)</b>	204	204	<b>204</b>
<b>CaCl<sub>2</sub> (mM)</b>	67	67	<b>67</b>
<b>pH</b>	<b>5,6</b>	<b>5,6</b>	<b>5,6</b>

### 2.2.1.3. Effet de la durée et du mode de macération

Dans le but de déterminer la meilleure durée de macération enzymatique ; différentes durées de macération ont été essayées (observations réalisées toutes les 2 heures pendant 24 heures). Ces durées de macération ont été combinées avec trois modes de macération (stationnaire sans agitation ou, avec agitation à 50 et 100 rpm) afin d'étudier l'effet de l'agitation sur l'isolement de protoplastes.

### 2.2.2. Purification des protoplastes

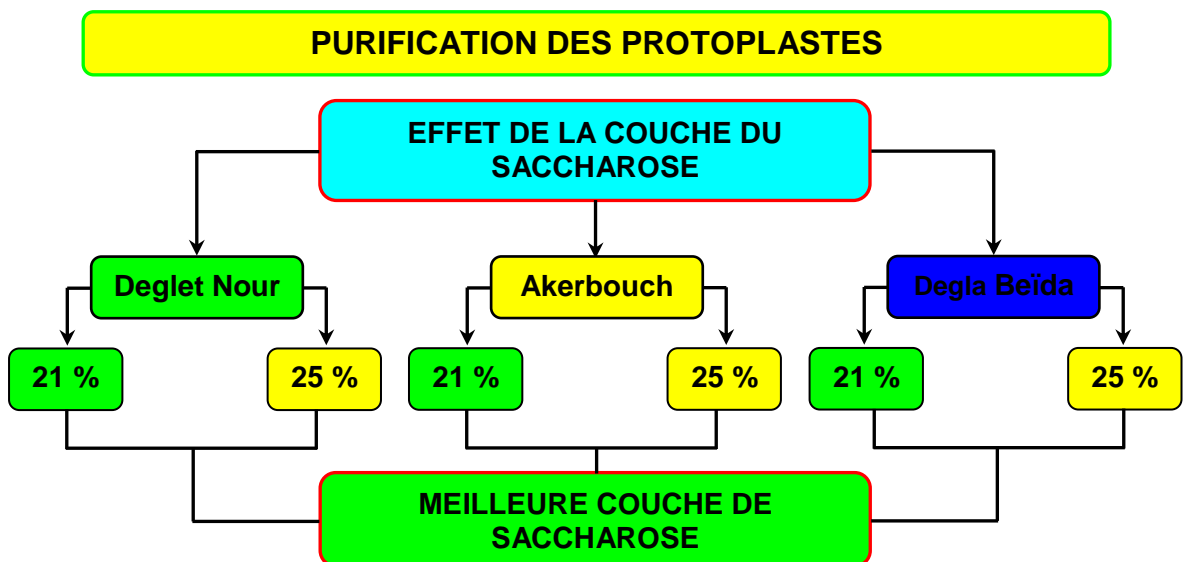
Afin d'éliminer les débris et les colonies cellulaires, le mélange enzymatique contenant les tissus digérés est filtré, sous conditions d'asepsie, à travers une double passoire dont le diamètre des pores est d'environ 500 µm séparées par une maille dont le diamètre des pores est d'environ 350 µm. Par la suite, les filtrats sont récupérés dans des tubes de 10 ml et centrifugés à 65 x g (l'équivalent de 860 rpm) pendant 5 mn à l'aide d'une centrifugeuse à rotor libre.

Après centrifugation, le surnageant est éliminé, ensuite on ajoute 1 ml de la solution de rinçage A (Tableau 2.3) au culot. Ce rinçage est répété deux fois pour éliminer toutes traces d'enzymes dans la suspension des protoplastes. Afin d'augmenter la viabilité des protoplastes et empêcher leur éclatement suite à l'effet des sels, un rinçage par une solution B (Tableau 2.3) dans la quelle le KCl est éliminé. Après rinçages, la suspension des protoplastes est suspendue dans 1 ml de la solution de rinçage B pour procéder à leur purification.

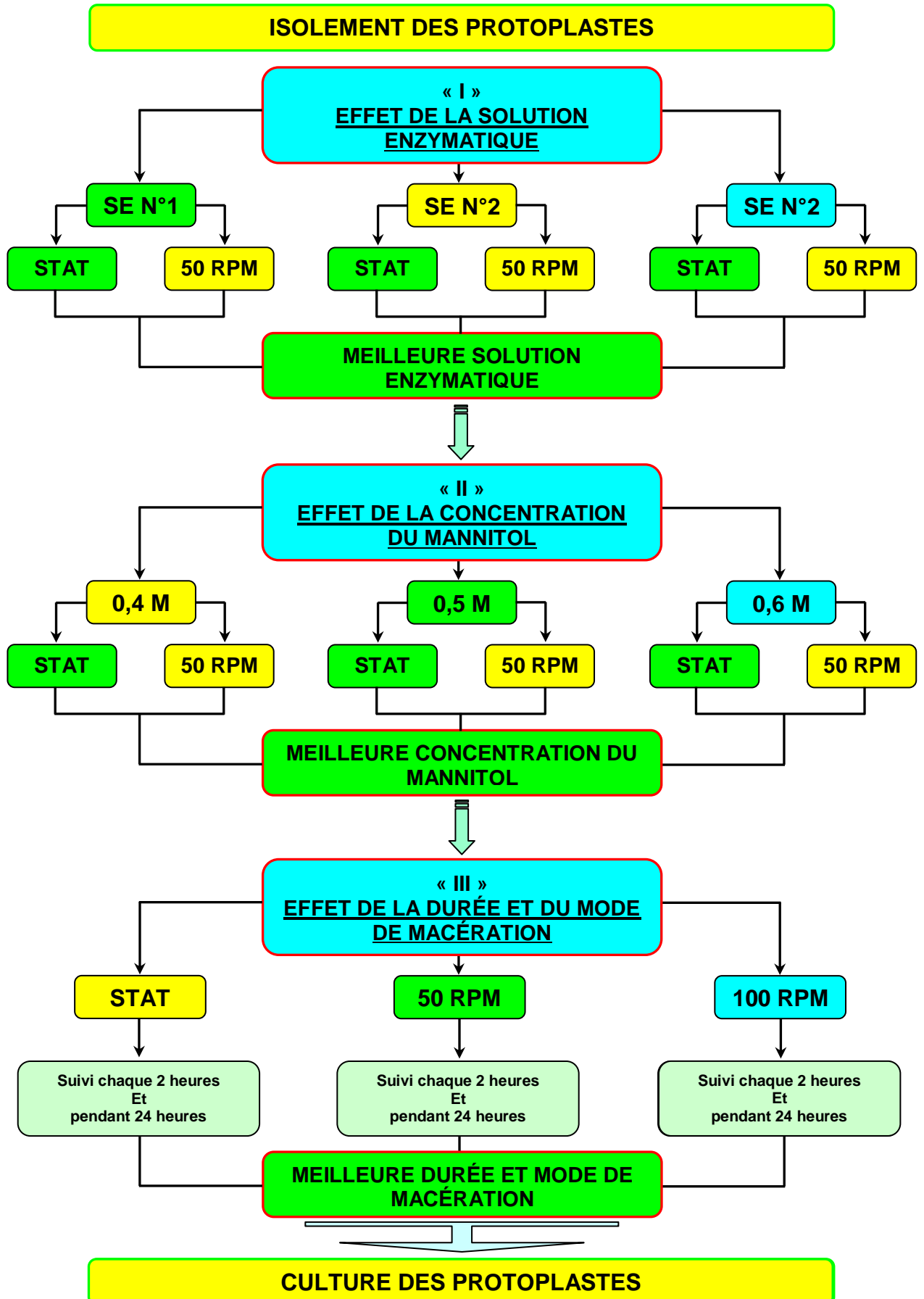
Les protoplastes sont purifiés suivant la méthode de sédimentation en comparant deux couches de saccharose (21 % et 25 %) (Figure 2.4), par étalement de la suspension des protoplastes sur 2 à 3 ml de la solution de la couche du saccharose, suivi d'une centrifugation à 65 x g pendant 5 mn pour récupérer les protoplastes à l'aide d'une pipette pasteur à l'interphase entre la couche de saccharose et le milieu de la suspension des protoplastes (Figure 2.3 : H). Les protoplastes récupérés sont resuspendus dans 1 ml de la solution de rinçage B et homogénéisés afin d'établir le dénombrement.

**Tableau 2.3 :** Composition des solutions de rinçages (A et B) et de la couche de saccharose pour la purification des protoplastes du palmier dattier.

Solution	Solution de Rinçage A	Solution de Rinçage B	Couche de Saccharose
Composition			
Milieu de la solution	MS	MS	MS
Mannitol (M)	0,5	0,5	0
Saccharose (%)	0	0	21 ou 25 %
KCl (mM)	204	0	0
CaCl <sub>2</sub> (mM)	67	67	0
pH	5,6	5,6	5,6



**Figure 2.4 :** Schéma résumant le protocole adopté pour la purification des protoplastes du palmier dattier.



**Figure 2.5 :** Schéma résumant le protocole adopté pour l'isolement des protoplastes du palmier dattier.

### 2.2.3. Dénombrement des protoplastes

Après purification et ajustement du volume de la suspension des protoplastes à 1 ml, un volume d'environ 100  $\mu$ l est prélevé et mélangé avec quelques gouttes d'une solution, de même composition que la solution de rinçage B, contenant 0,1 % de Bleu de Méthylène pour évaluer la viabilité des protoplastes. Les protoplastes qui présentent un cytoplasme coloré en bleu avec une forme non sphérique sont considérés comme morts, alors que ceux à cytoplasme non colorés ou colorés en jaune brillant avec une forme parfaitement sphérique et une périphérie de couleur bleue sont considérés comme des protoplastes vivants. Cette méthode d'estimation de la viabilité est dite "Méthode d'exclusion de colorants" basée sur l'aptitude de la membrane plasmique à bloquer l'entrée des colorants dans le cytoplasme. Ces colorants rentrent à travers les membranes endommagées et colorent le contenu des cellules mortes qui vont être comptées sous microscope [51,74]. Cette méthode peut être mal interprétée au cas où ces cellules mortes perdent leurs cytoplasmes [75].

Le dénombrement des protoplastes est réalisé à l'aide d'une cellule Malassez (Figure 2.3 : I) ayant une profondeur de 0,2 mm. A chaque fois 3 dénombrements (Nombre total de protoplastes et nombre de protoplastes viables dans 10 parallélépipèdes ayant 250 x 200 x 200  $\mu$ m de dimensions ou dans un volume de 0,01 mm<sup>3</sup> ou 0,01  $\mu$ l) sont effectués et les nombres moyens de protoplastes calculés permettent d'estimer le nombre moyen de protoplastes (totaux et viables) par ml de la suspension et ainsi le rendement en protoplastes par rapport à un gramme de la matière fraîche du matériel végétal utilisé. Le pourcentage de viabilité des protoplastes est exprimé par le rapport du nombre de protoplastes viables x 100 / nombre total de protoplastes.

Le diamètre des protoplastes, calculés lors d'un dénombrement, est mesuré à l'aide d'un micromètre oculaire.

### 2.3. Mise en culture des protoplastes

Les protoplastes isolés à partir des cals nodulaires des deux cultivars (Deglet Nour et Akerbouch) ont été cultivés séparément dans le but d'obtenir des microcals qui vont donner des cals par repiquage. Pour ce faire, plusieurs paramètres ont été pris afin de réaliser cette étape du travail :

#### 2.3.1. Isolement des protoplastes pour la culture

Pour cette étape, les protoplastes des deux cultivars (Deglet Nour et Akerbouch) ont été isolés par l'application de la SE N°1 contenant 0,5 et 0,6 M de mannitol respectivement sur les cals du cultivar Deglet Nour et Akerbouch. Les cals des deux cultivars ont été incubés séparément pendant 14 et 16 heures sous une agitation de 50 rpm respectivement pour Deglet Nour et Akerbouch. La purification des protoplastes libérés a été réalisée par sédimentation sur une couche de 25 et 21 % de saccharose respectivement pour les protoplastes du cultivar Deglet Nour et Akerbouch.

#### 2.3.2. Densité de culture ou densité d'étalement

Les protoplastes des deux cultivars en question ont été cultivés à une densité de culture ou d'étalement de  $9,5 \times 10^4$  protoplastes/ml.

#### 2.3.3. Culture sur milieu semi-solide

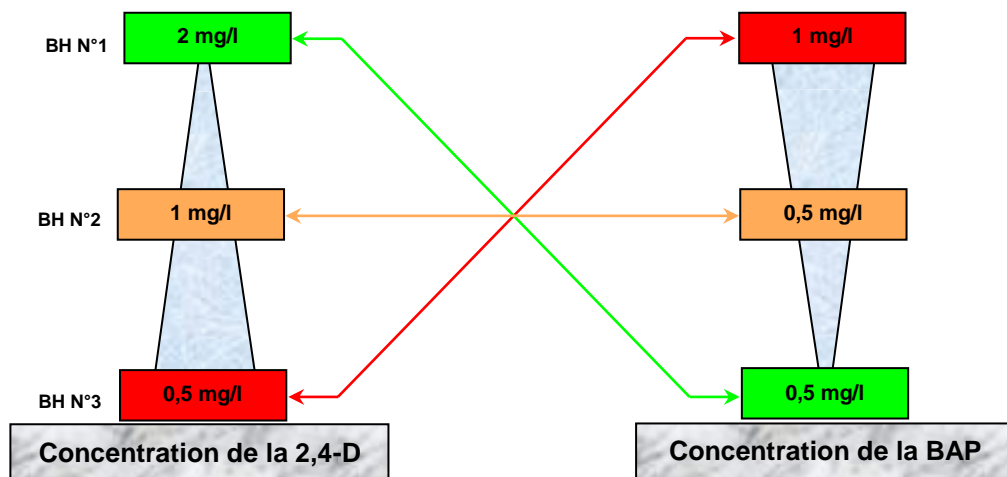
Après ajustement du nombre de protoplastes à la densité appropriée dans la solution de rinçage B, on étale 1 ml de la suspension liquide contenant les protoplastes sur 5 ml de milieu semi-solide dont la composition est indiquée dans le tableau 2.4.

Dans cette étape du travail, uniquement l'effet des régulateurs de croissance sur le développement des protoplastes a été étudié. Pour ce faire, trois balances hormonales à base de 2,4-D et de BAP ont été testées en

combinaison avec le milieu de culture semi-solide des protoplastes (Figure 2.6). Les cultures sont incubés en une température de  $24 \pm 2^\circ\text{C}$  sous obscurité totale durant toute la durée de culture.

**Tableau 2.4** : Composition des milieux semi-solides de culture des protoplastes du palmier dattier.

Balance Hormonale	BH N°1	BH N°2	BH N°3
Constituant			
<b>Milieu de base</b>	MS	MS	<b>MS</b>
<b>L-Glutamine (mg/l)</b>	100	100	<b>100</b>
<b>Saccharose (g/l)</b>	40	40	<b>40</b>
<b>Glucose (mg/l)</b>	72	72	<b>72</b>
<b>KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (mg/l)</b>	258,4	258,4	<b>258,4</b>
<b>Agarose (%)</b>	0,3	0,3	<b>0,3</b>
<b>2,4-D (mg/l)</b>	2	1	<b>0,5</b>
<b>BAP (mg/l)</b>	0,5	0,5	<b>1</b>
<b>Ph</b>	<b>5,7</b>	<b>5,7</b>	<b>5,7</b>



**Figure 2.6** : Schéma résumant le protocole adopté pour l'étude de l'effet de la balance hormonale sur la culture des protoplastes du palmier dattier.

#### 2.3.4. Addition de milieu frais

Après 3 semaines de la mise en culture des protoplastes, 1 ml du milieu de culture frais, de même composition que le milieu de culture semi-solide dont le saccharose et le glucose ont été remplacés par 0,25 M de mannitol en combinaison avec les trois différentes balances hormonales utilisées, a été additionné.



Après 1 mois de culture, 2 ml du milieu de culture frais, de même composition que le milieu de culture semi-solide contenant 0,125 M de mannitol en combinaison avec les trois différentes balances hormonales utilisées, ont été additionnés.

Après 1 mois et demi de culture, 2 ml du milieu de culture frais, de même composition que le milieu de culture semi-solide néanmoins sans mannitol en combinaison avec les trois différentes balances hormonales utilisées, ont été ajoutés.

### 2.3.5. Suivi du développement des protoplastes

Pendant toute la durée de la culture, le développement des protoplastes a été suivi à travers plusieurs paramètres concernant leur viabilité, leur forme ainsi que leur division et tout développement ultérieur.

#### 2.3.5.1. Estimation de la viabilité des protoplastes

L'estimation de la viabilité des protoplastes mis en culture est exprimée par le rapport "(Nombre de protoplastes de formes parfaitement sphérique x 100) / Nombre total de protoplastes mis en culture" ; c'est le "Taux de viabilité". Pour ce faire, un comptage du nombre total de protoplastes et du nombre de protoplastes viables se fait sur 10 champs d'observation (au grossissement x 40) choisis au hasard. Les observations concernant la viabilité des protoplastes ont été effectuées après 4 jours et 15 jours de la mise en culture tout en tenant compte de la viabilité initiale des protoplastes après leur purification.

Un protoplaste est considéré viable lorsqu'il montre soit une forme parfaitement sphérique avec une périphérie sans discontinuité ou bien une forme plus ou moins allongée, présentant une périphérie sans discontinuité.

### 2.3.5.2. Estimation de la régénération de la paroi cellulaire par les protoplastes

La reconstitution de la paroi cellulaire par les protoplastes mis en culture est confirmée par le changement de leur forme, en passant d'une forme arrondie et parfaitement sphérique à une forme plus ou moins allongée ou ovale. Un autre critère de régénération de la paroi cellulaire est la condensation de la périphérie des protoplastes, du fait que la membrane plasmique est moins épaisse (environ 10 nm ou  $10^{-2}$   $\mu\text{m}$ ) que la paroi cellulaire qui présente une épaisseur allant de 0,1 à 10  $\mu\text{m}$ .

L'estimation de la régénération de la paroi cellulaire est exprimée par le rapport "(Nombre de protoplastes de forme allongée x 100) / Nombre total de protoplastes mis en culture" ; c'est le "Taux d'allongement ou de régénération de la paroi cellulaire". Pour ce faire, un comptage du nombre total de protoplastes et du nombre de protoplastes allongés se fait sur 10 champs d'observation (au grossissement x 40) choisis au hasard. Les observations concernant la régénération de la paroi cellulaire par les protoplastes ont été effectuées après 4 jours et 15 jours de la mise en culture.

Un protoplaste est considéré à paroi régénérée lorsqu'il présente une forme plus ou moins allongée ou du moins non pas sphérique, cependant régulière avec une périphérie sans discontinuité. De plus, le temps nécessaire pour l'apparition du premier allongement a été noté afin de déterminer la durée nécessaire pour que les protoplastes mis en culture commencent à régénérer leur paroi cellulaire.

### 2.3.5.3. Estimation de la division cellulaire des protoplastes

Afin de déterminer le temps nécessaire pour que les protoplastes des deux cultivars entrent en division après régénération de leur paroi, des observations quotidiennes et régulières sont effectuées après la mise en culture des protoplastes, et pendant la première quinzaine de jours de la culture.

L'estimation de la division des cellules issues de protoplastes ayant régénérés leur paroi cellulaire est exprimée par le rapport "(Nombre de protoplastes divisés au moins une fois x 100) / Nombre total de protoplastes mis en culture". Ce paramètre est appelé "Taux de division" ou "Fréquence de division" ou "Efficience initiale de culture ou d'étalement". Pour ce faire, un comptage du nombre total de protoplastes et du nombre de protoplastes divisés se fait sur 10 champs d'observation (au grossissement x 40) choisis au hasard. Les observations concernant la division des cellules issues de protoplastes ont été effectuées après 15 jours de la mise en culture.

N.B. : Toutes les observations concernant les taux de viabilité, d'allongement et de division sont toujours effectuées sur les mêmes (10) champs d'observation.

#### 2.3.5.4. Formation des microcolonies

Les microcolonies (visible sous microscope uniquement) sont le résultat de plusieurs divisions successives aboutissant à la formation d'une colonie cellulaire formée d'au moins deux cellules. Ce paramètre est estimé après 1 mois de la mise en culture par un comptage du nombre de microcolonies observées dans les 10 champs d'observation (au grossissement x 40) choisis au hasard. Le comptage du nombre de microcolonies est concomitant avec le comptage du nombre de cellules composant chaque microcolonie ; ce qui permet d'obtenir le nombre moyen de cellules par microcolonie et par conséquent le nombre approximatif de divisions par protoplaste divisé.

#### 2.3.5.5. Formation des microcals

Un microcal (visible à l'œil nu ou avec une taille supérieure à 0,5 mm) est le résultat de plusieurs divisions donnant naissance à un amas cellulaire observable à l'œil nu. Ce paramètre est réalisé après 2 à 3 mois de la mise en culture par comptage du nombre de microcals observés par boîte de pétri. Ce paramètre est appelé "Taux de formation de microcals" ou "Fréquence de formation de microcals" ou "Efficience finale de culture ou d'étalement". En

d'autre terme, ce paramètre permet une estimation du nombre de protoplastes mis en culture ayant donnés des microcals.

#### 2.4. Analyse statistique et représentations graphiques

Tous les essais sont répétés au moins deux fois et ce sont les moyennes qui ont été représentées sur les graphiques et analysées statistiquement. L'analyse statistique (ANOVA/MANOVA) a été effectuée avec le logiciel STATISTICA version n°5. En cas d'effet significatif, elle est complétée par le test de la PPDS pour comparer les moyennes des traitements deux à deux. Les résultats obtenus sont, par la suite, représentés sous forme de graphiques grâce au logiciel EXCEL. Les résultats de l'analyse statistique (résultats de l'ANOVA/MANOVA et de la PPDS) sont directement présentés sur les graphiques. Les lettres sur les graphiques représentent les groupes homogènes. Les moyennes ayant la même lettre ne sont pas statistiquement différentes.

# RÉSULTATS EXPÉRIMENTAUX

## CHAPITRE 3 RÉSULTATS EXPÉRIMENTAUX

### 3.1. Isolement des protoplastes

Durant cette première étape de l'expérimentation, plusieurs facteurs (solution enzymatique, concentration du mannitol, durée et mode de macération (avec ou sans agitation)) ont été étudiés afin d'optimiser l'isolement des protoplastes à partir des cals nodulaires des trois cultivars (Deglet Nour, Akerbouch et Degla Beida).

#### 3.1.1. Effet de la solution enzymatique et du mode de macération

Afin d'obtenir un bon rendement en protoplastes viables avec une bonne viabilité, trois solutions enzymatiques combinées avec deux modes d'agitation (stationnaire ou agité à 50 rpm) en présence du mannitol à 0,5 M ont été testées sous macération à l'obscurité à 27°C et pendant 16 heures.

##### 3.1.1.1. Rendement en protoplastes totaux

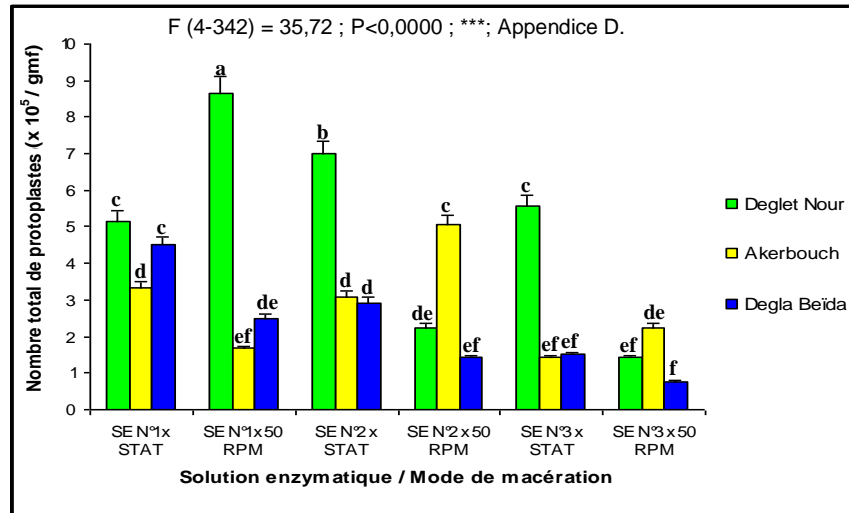
Les meilleurs nombres de protoplastes totaux isolés ( $8,67$  et  $7,0 \times 10^5$  protoplastes/gmf) sont obtenus avec le cultivar Deglet Nour avec, respectivement, la solution enzymatique N°1 (1,5 % Cellulase et 1 % Macérozyme) combinée avec une agitation de 50 rpm puis la solution enzymatique N°2 (2 % Cellulase et 0,5 % Macérozyme) combinée avec une macération stationnaire ; alors que le plus faible rendement ( $0,75 \times 10^5$  protoplastes/gmf) est obtenu avec le cultivar Degla Beïda avec la solution enzymatique N°3 (1 % Cellulase et 0,2 % Macérozyme) combinée avec une agitation de 50 rpm. Le cultivar Akerbouch présente des valeurs intermédiaires entre celles des deux autres cultivars (entre  $1,67$  et  $5,08 \times 10^5$  protoplastes/gmf) (Figure 3.1).

La solution enzymatique affecte d'une manière significative le nombre de protoplastes totaux isolés. Nous remarquons une diminution du nombre en protoplastes totaux de la SE N°1 à la SE N°3, car pour les cultivars Deglet Nour et Degla Beïda c'est la SE N°1 qui permet les meilleurs rendements en protoplastes totaux ensuite la SE N°2 et en dernier la SE N°3 qui donne les mauvais rendements. Cependant pour le cultivar Akerbouch c'est la SE N°2 qui permet d'obtenir le meilleur rendement en protoplastes totaux. De ce fait, on constate que la meilleure solution enzymatique pour les cultivars Deglet Nour et Degla Beïda est la SE N°1 alors que pour le cultivar Akerbouch c'est la SE N°2 qui s'est avérée la meilleure (Figure 3.1).

De même, le mode de macération affecte significativement le nombre de protoplastes totaux isolés, de telle sorte qu'il y a toujours une diminution de ce nombre lorsque la macération est réalisée sous conditions d'agitation de 50 rpm et ceci surtout pour Degla Beïda. Néanmoins, pour Deglet Nour et Akerbouch cette diminution est fortement dépendante de la solution enzymatique utilisée où une augmentation plus ou moins marquée a été enregistrée suivant les différentes solutions enzymatiques testées (Figure 3.1). De ce fait, la macération stationnaire se révèle plus efficace seulement pour Degla Beïda.

L'analyse de la variance à trois facteurs (Cultivar x Solution enzymatique x Mode de macération) indique un effet très hautement significatif de l'interaction (Cultivar x Solution enzymatique x Mode de macération) sur le nombre de protoplastes totaux isolés (Appendice D). Le test de la PPDS révèle 6 groupes, dont 3 groupes chevauchants (Figure 3.1).

De même, l'effet de chaque facteur seul ou combiné avec l'un des deux autres facteurs est très hautement significatif ; à l'exception de l'interaction (Solution enzymatique x Mode de macération) dont l'effet est hautement significatif (Appendice D).



**Figure 3.1 :** Effet de l'interaction (Solution enzymatique x Mode de macération) sur le nombre de protoplastes totaux chez les trois cultivars du palmier dattier.

### 3.1.1.2. Rendement en protoplastes viables

Les meilleurs nombres de protoplastes viables isolés ( $4,67$  et  $4,0 \times 10^5$  protoplastes/gmf) sont obtenus chez le cultivar Deglet Nour avec, respectivement, la solution enzymatique N°1 (1,5 % Cellulase et 1 % Macérozyme) combinée avec une agitation de 50 rpm (Figure 3.3 : A) et la solution enzymatique N°2 (2 % Cellulase et 0,5 % Macérozyme) combinée avec une macération stationnaire (Figure 3.3 : B) alors que les plus faibles rendements en protoplastes viables ( $0,33$  et  $0,16 \times 10^5$  protoplastes/gmf) sont obtenus chez le cultivar Degla Beïda avec, respectivement, la solution enzymatique N°3 (1 % Cellulase et 0,2 % Macérozyme) combinée avec une macération stationnaire et sous agitation de 50 rpm. Le cultivar Akerbouch présente des valeurs intermédiaires (entre  $0,5$  et  $1,42 \times 10^5$  protoplastes/gmf) entre celles des deux autres cultivars (Figure 3.2).

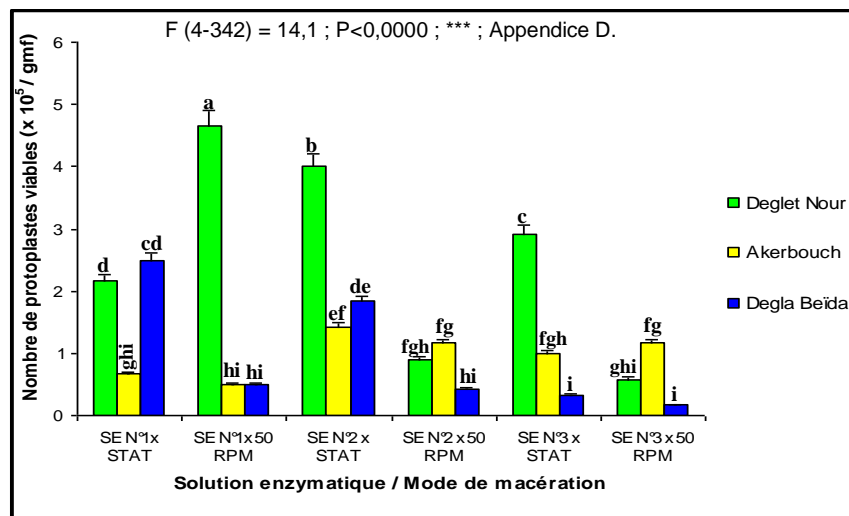
La solution enzymatique affecte d'une manière significative le nombre de protoplastes viables isolés. Nous remarquons une variation du rendement en protoplastes viables chez les cultivars Deglet Nour et Degla Beïda où c'est la SE N°1 qui permet les meilleurs rendements (Figure 3.3 : A et E) ensuite la SE N°2 (Figure 3.3 : B et F) et en dernier la SE N°3 qui donne les mauvais rendements. Cependant, pour le cultivar Akerbouch c'est la SE N°2 (Figure 3.3 : D) et 3 (Figure 3.3 : C) qui permettent d'obtenir les meilleurs rendements



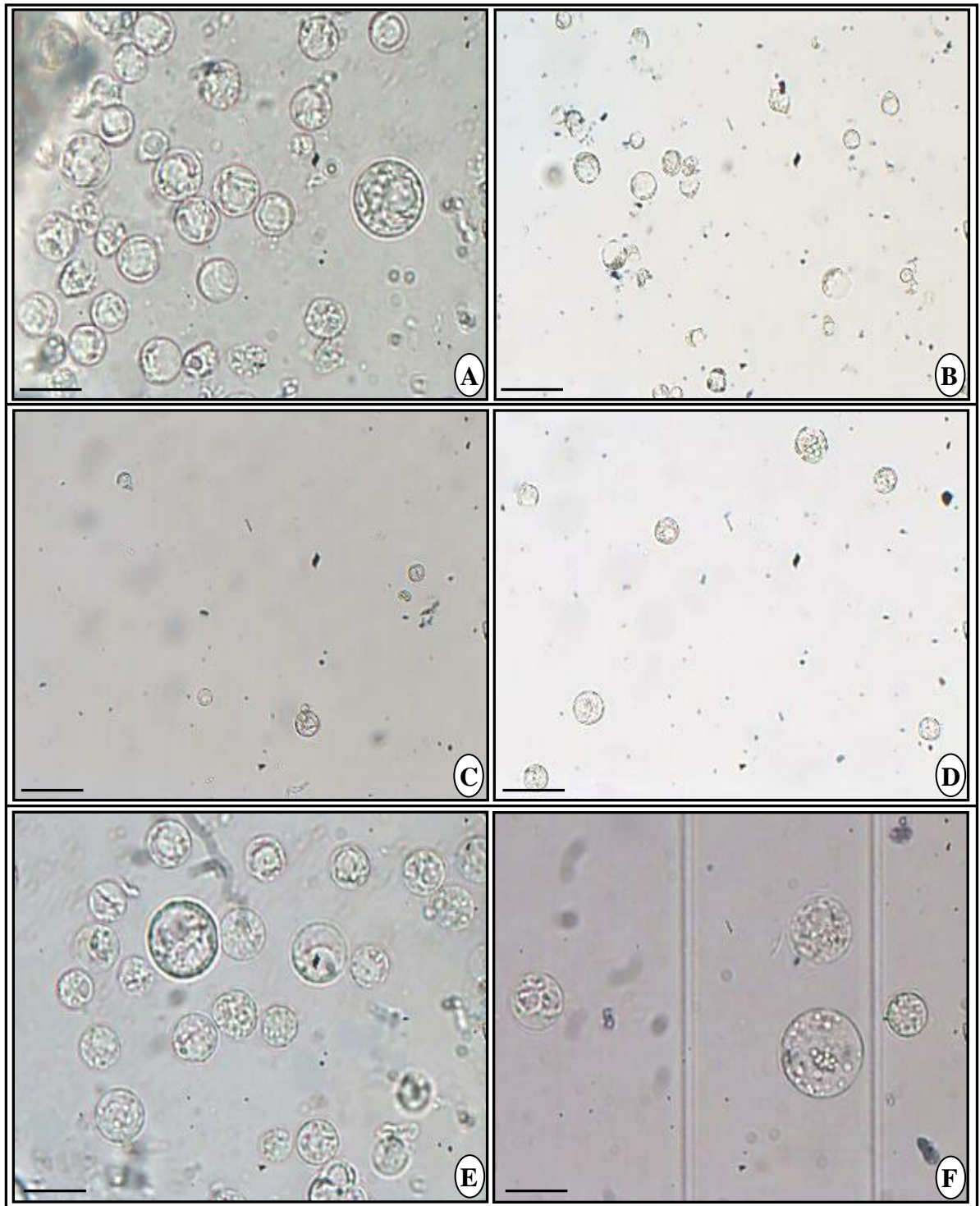
en protoplastes viables et en dernier lieu la SE N°1. De ce fait, on constate que la meilleure solution enzymatique pour les cultivars Deglet Nour et Degla Beïda est la SE N°1 alors que pour le cultivar Akerbouch c'est la SE N°2 qui s'est avérée la meilleure (Figure 3.2).

De même, le mode de macération affecte significativement le nombre de protoplastes viables isolés, de telle sorte qu'il y a toujours une diminution de ce nombre lorsque la macération est réalisée sous conditions d'agitation de 50 rpm (Figure 3.2). Néanmoins, cette diminution n'est pas vérifiée chez le cultivar Deglet Nour et Akerbouch avec, respectivement, la SE N°1 et la SE N°3 où on assiste, au contraire, à une augmentation marquée du nombre de protoplastes viables (Figure 3.2). De ce fait, on peut dire que le meilleur mode de macération est la macération stationnaire.

L'analyse de la variance à trois facteurs (Cultivar x Solution enzymatique x Mode de macération) indique un effet très hautement significatif de cette interaction (Cultivar x Solution enzymatique x Mode de macération) sur le nombre de protoplastes viables isolés (Appendice D). En effet, le test de la PPDS révèle 9 groupes, dont 7 groupes chevauchants (Figure 3.2). De même, l'effet de chaque facteur seul ou combiné avec l'un des deux autres facteurs est très hautement significatif (Appendice D).



**Figure 3.2 :** Effet de l'interaction (Solution enzymatique x Mode de macération) sur le nombre de protoplastes viables chez les trois cultivars du palmier dattier.



**Figure 3.3 :** Protoplastes fraîchement isolés à partir des cals nodulaires des trois cultivars de palmier dattier sous l'effet des différentes solutions enzymatiques testées.

**A :** DN-SE N°1-50 RPM (Barre = 17,2  $\mu\text{m}$ ). **B :** DN-SE N°2-STAT (Barre = 68,7  $\mu\text{m}$ ). **C :** AK-SE N°3-50 RPM (Barre = 68,7  $\mu\text{m}$ ). **D :** AK-SE N°2-STAT (Barre = 68,7  $\mu\text{m}$ ). **E :** DB-SE N°1-STAT (Barre = 17,2  $\mu\text{m}$ ). **F :** DB-SE N°2-STAT (Barre = 17,2  $\mu\text{m}$ ).

### 3.1.1.3. Taux de viabilité des protoplastes libérés

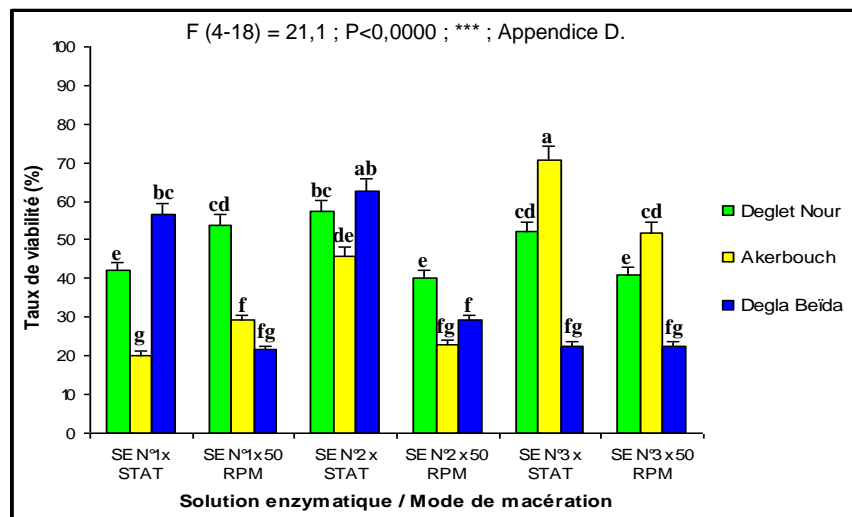
Le meilleur taux de viabilité (70,8 %) est obtenu chez le cultivar Akerbouch avec la solution enzymatique N°3 (1 % Cellulase et 0,2 % Macérozyme) sous une macération stationnaire, alors que le plus faible taux de viabilité (20,2 %) est obtenu chez le même cultivar Akerbouch avec la solution enzymatique N°1 (1,5 % Cellulase et 1 % Macérozyme) combinée avec une macération stationnaire. Par ailleurs le meilleur taux de viabilité (57,4 %) chez le cultivar Deglet Nour est obtenu avec la solution enzymatique N°2 (2 % Cellulase et 0,5 % Macérozyme) combinée avec une macération stationnaire. Cependant la mauvaise viabilité (40,2 %) chez ce cultivar est obtenue avec la SE N°2 sous 50 rpm d'agitation. D'autre part, le meilleur taux de viabilité (62,8 %) chez le cultivar Degla Beïda a été obtenu avec la SE N°2 sous macération stationnaire alors que le taux de viabilité faible chez ce cultivar (21,6 %) est obtenu avec la SE N°1 sous 50 rpm d'agitation (Figure 3.4).

La solution enzymatique affecte d'une manière significative le taux de viabilité des protoplastes isolés, cependant en dépendance directe avec le cultivar. Nous remarquons, ainsi, que pour le cultivar Deglet Nour le taux de viabilité ne varie pas beaucoup (entre 40,2 % et 57,4 %), alors que pour le cultivar Degla Beïda c'est la SE N°1 et 2 qui permettent d'obtenir les meilleurs taux de viabilité et la SE N°3 en dernier lieu. Cependant pour le cultivar Akerbouch, le taux de viabilité des protoplastes augmente nettement d'une solution enzymatique à une autre avec une meilleure viabilité avec la SE N°3. De ce fait, on constate que la meilleure solution enzymatique pour les cultivars Deglet Nour et Degla Beïda est la SE N°2 ensuite la SE N°1 alors que pour le cultivar Akerbouch c'est la SE N°3 qui est la meilleure (Figure 3.4).

De même, le mode de macération affecte significativement le taux de viabilité des protoplastes, de telle sorte qu'il y a toujours diminution du taux de viabilité des protoplastes lorsque la macération est réalisée sous conditions d'agitation de 50 rpm. A l'exception du cas de la SE N°1 pour Deglet Nour et Akerbouch où on assiste, au contraire, à une augmentation du taux de viabilité

des protoplastes (Figure 3.4). De ce fait, la macération stationnaire est meilleure que la macération sous conditions de 50 rpm d'agitation.

L'analyse de la variance à trois facteurs (Cultivar x Solution enzymatique x Mode de macération) indique un effet très hautement significatif de cette interaction (Cultivar x Solution enzymatique x Mode de macération) sur le taux de viabilité des protoplastes isolés (Appendice D). Le test de la PPDS révèle 7 groupes dont plusieurs sont chevauchants (Figure 3.4). De même, l'effet de chaque facteur seul ou combiné avec l'un des deux autres facteurs est très hautement significatif (Appendice D).



**Figure 3.4 :** Effet de l'interaction (Solution enzymatique x Mode de macération) sur le taux de viabilité des protoplastes chez les trois cultivars du palmier dattier.

### Récapitulatif

A travers cette première étape d'optimisation d'isolement des protoplastes à partir des cals nodulaires des trois cultivars du palmier dattier étudiés, on peut conclure que sous l'action d'une solution enzymatique contenant 0,5 M de mannitol (tableau 3.1) :

- ❖ L'isolement d'un grand nombre de protoplastes viables chez Deglet Nour et Degla Beïda nécessite une solution enzymatique (SE N°1), moyennement concentrée en Cellulase (1,5 %) et fortement concentrée en Macérozyme (1 %), respectivement, sous une agitation de 50 rpm et sous macération stationnaire ; alors que pour Akerbouch l'isolement nécessite une solution enzymatique (SE N°2), faiblement concentrée (1 % de Cellulase et 0,2 % de Macérozyme), sous conditions stationnaires ;
- ❖ Une solution enzymatique faiblement concentrée (SE N°2) est bénéfique pour avoir une bonne viabilité des protoplastes de Deglet Nour et Degla Beïda contrairement à Akerbouch qui nécessite plus de Cellulase (2 %) et une Macérozyme moyennement concentrée (0,5 %), et ce, sous conditions stationnaires ;
- ❖ La macération stationnaire est plus bénéfique pour la viabilité des protoplastes que la macération sous agitation (50 rpm), qui améliore, plus ou moins, le rendement en protoplastes chez le cultivar Deglet Nour sous l'action de la SE N°1.

**Tableau 3.1 :** Résumé des meilleurs résultats par cultivar (Rendements en protoplastes totaux, viables et taux de viabilité) obtenus avec les différentes solutions enzymatiques testées en présence de 0,5 M de mannitol.

<b>Cultivar</b>	<b>Paramètres</b>	<b>Rendement en protoplastes totaux (x 10<sup>5</sup> / gmf)</b>	<b>Rendement en protoplastes viables (x 10<sup>5</sup> / gmf)</b>	<b>Taux de viabilité (%)</b>
<b>Deglet Nour</b>		SE N°1 x 50 RPM (8,67)	SE N°1 x 50 RPM (4,67)	SE N°2 x STAT (57,4)
<b>Akerbouch</b>		SE N°2 x 50 RPM (5,08)	SE N°2 x STAT (1,42)	SE N°3 x STAT (70,8)
<b>Degla Beïda</b>		SE N°1 x STAT (4,50)	SE N°1 x STAT (2,50)	SE N°2 x STAT (62,8)

### 3.1.2. Effet de la concentration du mannitol et du mode de macération

Afin d'obtenir un bon rendement en protoplastes viables avec une bonne viabilité, trois concentrations de mannitol combinées avec deux modes de macération (stationnaire et agité à 50 rpm) ont été testées. La macération est réalisée dans l'obscurité à 27°C et pendant 16 heures avec une solution enzymatique composée de 1,5 % de Cellulase et 1 % de Macérozyme (meilleurs résultats obtenus précédemment).

#### 3.1.2.1. Rendement en protoplastes totaux

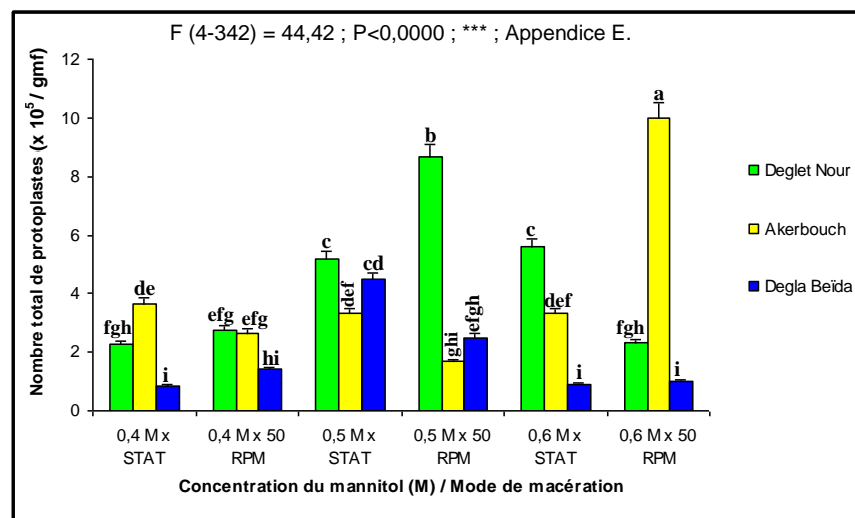
Les meilleurs nombres de protoplastes totaux isolés ( $10,0$  et  $8,67 \times 10^5$  protoplastes/gmf) sont obtenus, respectivement, chez le cultivar Akerbouch avec la concentration  $0,6$  M combinée avec une agitation de  $50$  rpm et chez le cultivar Deglet Nour avec la concentration  $0,5$  M combinée avec une macération sous  $50$  rpm d'agitation alors que le plus faible rendement ( $0,83 \times 10^5$  protoplastes/gmf) est obtenu chez le cultivar Degla Beïda avec la concentration  $0,4$  M sous une macération stationnaire (Figure 3.5).

Le mannitol affecte d'une manière significative le nombre de protoplastes totaux isolés. Nous remarquons que pour les cultivars Deglet Nour et Degla Beïda c'est la concentration  $0,5$  M qui permet les meilleurs rendements en protoplastes totaux ensuite la concentration  $0,6$  M pour Deglet Nour et  $0,4$  M pour Degla Beïda et en dernier les concentrations de  $0,4$  M et  $0,6$  M respectivement pour Deglet Nour et Degla Beïda qui donnent les plus faibles rendements. Cependant pour le cultivar Akerbouch c'est la concentration  $0,6$  M qui permet d'obtenir le meilleur rendement en protoplastes totaux ensuite les concentrations  $0,4$  et  $0,5$  M. De ce fait, on constate que la meilleure concentration du mannitol pour les cultivars Deglet Nour et Degla Beïda est de  $0,5$  M et de  $0,6$  M pour le cultivar Akerbouch (Figure 3.5).

De même, le mode de macération affecte significativement le nombre de protoplastes totaux isolés, de telle sorte qu'il y a une légère diminution ou

augmentation du nombre de protoplastes totaux lorsque la macération est réalisée sous conditions d'agitation de 50 rpm (Figure 3.5). Cependant, cette diminution ou augmentation est fortement dépendante de la concentration du mannitol et du cultivar, car pour le cultivar Deglet Nour avec la concentration de 0,4 et 0,5 M on assiste à une augmentation du nombre de protoplastes totaux isolés alors qu'une diminution a été enregistrée avec la concentration 0,6 M lorsque la macération passe du mode stationnaire à 50 rpm d'agitation. Néanmoins, pour le cultivar Degla Beïda, avec les trois concentrations de mannitol, ainsi que les concentrations 0,4 et 0,5 M pour le cultivar Akerbouch on assiste toujours à une diminution du nombre de protoplastes totaux isolés lorsqu'on fait varier le mode de macération du stationnaire à une macération sous 50 rpm d'agitation ; à l'exception de la concentration 0,6 M chez le cultivar Akerbouch où une augmentation importante a été observée (Figure 3.5). De ce fait, le meilleur mode de macération est la macération stationnaire.

L'analyse de la variance à trois facteurs (Cultivar x Concentration du mannitol x Mode de macération) indique un effet très hautement significatif de l'interaction (Cultivar x Concentration du mannitol x Mode de macération) sur le nombre de protoplastes totaux isolés (Appendice E). Le test de la PPDS révèle 9 groupes, dont 7 chevauchants (Figure 3.5). Cependant, uniquement l'effet du facteur mode de macération a été révélé non significatif (Appendice E).



**Figure 3.5 :** Effet de l'interaction (Concentration du mannitol x Mode de macération) sur le nombre de protoplastes totaux chez les trois cultivars du palmier dattier.

### 3.1.2.2. Rendement en protoplastes viables

Les meilleurs nombres de protoplastes viables isolés ( $4,92$  et  $4,67 \times 10^5$  protoplastes/gmf) sont obtenus, respectivement, chez le cultivar Akerbouch avec la concentration  $0,6$  M combinée avec une agitation de  $50$  rpm (Figure 3.7 : C et D) et chez le cultivar Deglet Nour avec la concentration  $0,5$  M combinée avec une macération sous  $50$  rpm d'agitation (Figure 3.7 : A) alors que les plus faibles rendements ( $0,16 \times 10^5$  protoplastes/gmf) sont obtenus chez le cultivar Degla Beïda avec la concentration  $0,6$  M sous une macération stationnaire et sous  $50$  rpm d'agitation (Figure 3.6).

Le mannitol affecte d'une manière significative le nombre de protoplastes viables isolés. Nous remarquons que pour les cultivars Deglet Nour et Degla Beïda c'est la concentration  $0,5$  M qui permet les meilleurs rendements en protoplastes viables (Figure 3.7 : A et F) ensuite la concentration  $0,6$  M pour Deglet Nour (Figure 3.7 : B) et  $0,4$  M pour Degla Beïda (Figure 3.7 : E) et en dernier la concentration de  $0,4$  M et  $0,6$  M respectivement pour Deglet Nour et Degla Beïda qui donnent les plus faibles rendements. Cependant, pour le cultivar Akerbouch c'est la concentration  $0,6$  M (Figure 3.7 : D) qui permet d'obtenir le meilleur rendement en protoplastes viables ensuite la concentration  $0,4$  M (Figure 3.7 : C) et en dernier lieu  $0,5$  M. De ce fait, on constate que la meilleure concentration de mannitol pour les cultivars Deglet Nour et Degla Beïda est de  $0,5$  M alors que pour le cultivar Akerbouch c'est la concentration  $0,6$  M qui s'est avérée la meilleure (Figure 3.6).

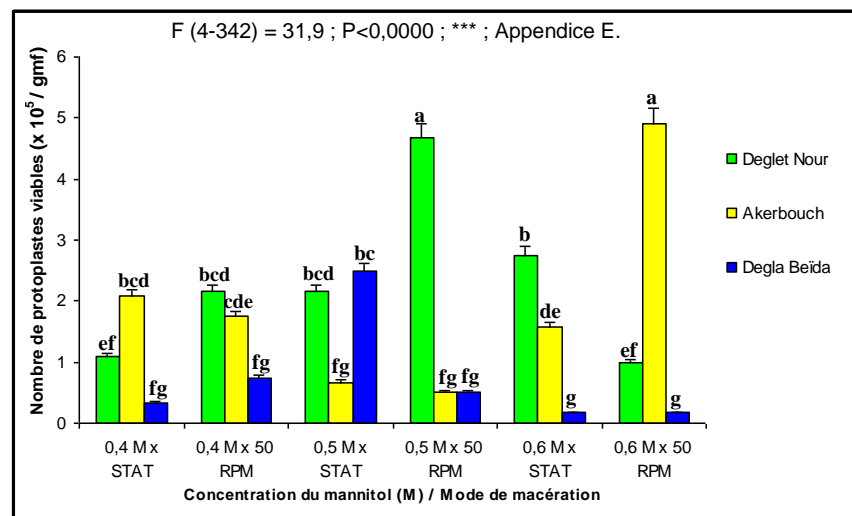
De même, le mode de macération affecte significativement le nombre de protoplastes viables isolés, de telle sorte qu'il y a une légère diminution ou augmentation du nombre de protoplastes viables lorsque la macération est réalisée sous conditions d'agitation de  $50$  rpm (Figure 3.6). Cependant, cette diminution ou augmentation est fortement dépendante de la concentration du mannitol et du cultivar, car pour le cultivar Deglet sous les concentrations de  $0,4$  et  $0,5$  M on assiste à une augmentation du nombre de protoplastes viables isolés alors qu'une diminution a été enregistrée avec la concentration  $0,6$  M lorsque la macération passe du mode stationnaire à  $50$  rpm d'agitation. De plus,



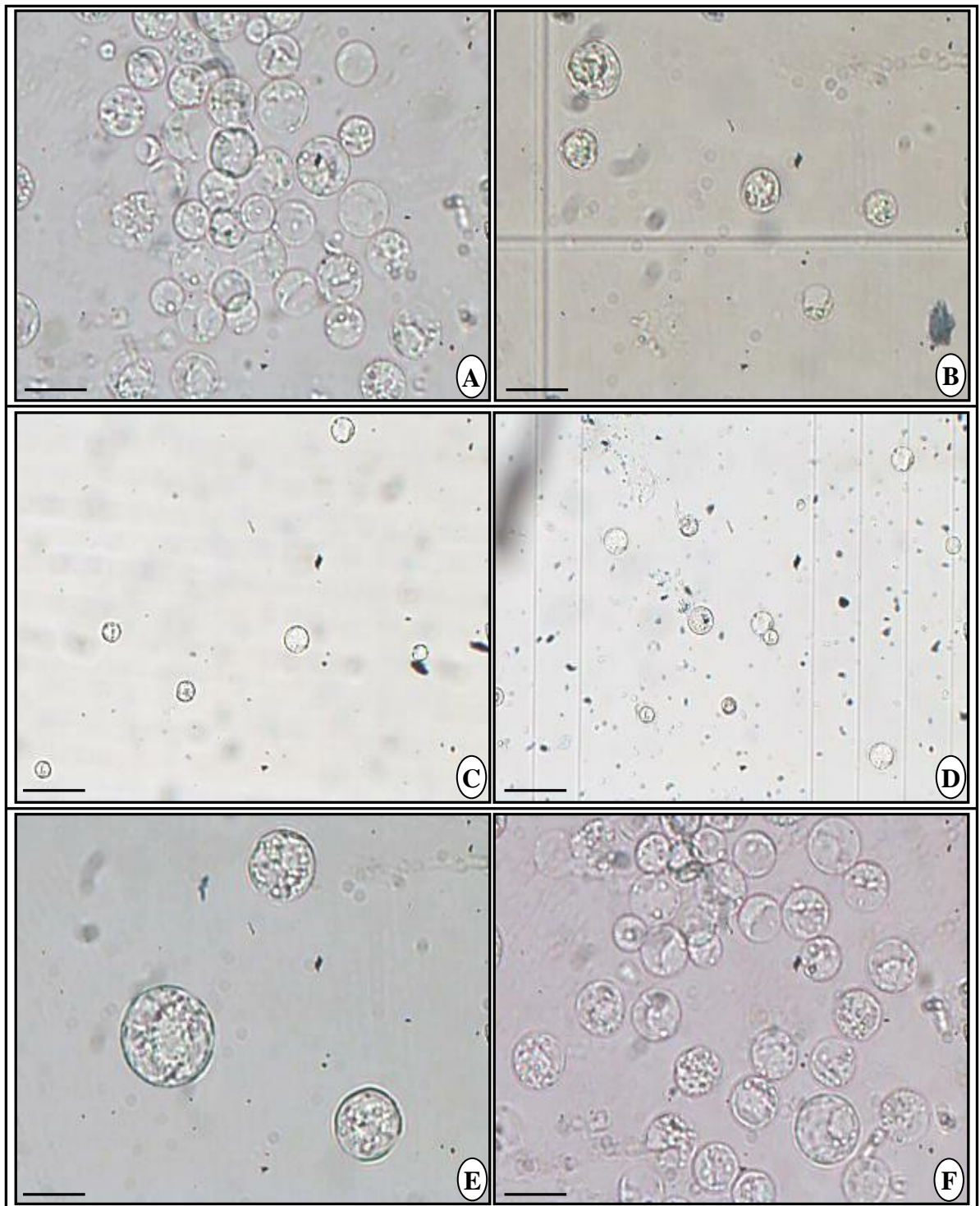
pour le cultivar Degla Beïda et Akerbouch avec, respectivement, 0,4 M et 0,6 M on assiste à une augmentation du nombre de protoplastes viables isolés lorsqu'on fait varier le mode de macération du stationnaire à une macération sous 50 rpm d'agitation. Toutefois, avec les autres concentrations le nombre de protoplastes viables isolés chez ces deux cultivars, une diminution a été enregistrée (Figure 3.6). De ce fait, le meilleur mode de macération est la macération sous une agitation de 50 rpm pour Deglet Nour et la macération stationnaire pour les deux autres cultivars.

L'analyse de la variance à trois facteurs (Cultivar x Concentration du mannitol x Mode de macération) indique un effet très hautement significatif de l'interaction (Cultivar x Concentration du mannitol x Mode de macération) sur le nombre de protoplastes viables isolés (Appendice E). Le test de la PPDS révèle 7 groupes, dont 6 chevauchants (Figure 3.6).

L'effet de la concentration du mannitol est hautement significatif alors que celui du mode de macération est significatif. Cependant, l'effet de toutes les interactions entre facteurs est très hautement significatif ; à l'exception de l'interaction (Concentration du mannitol x Mode de macération) dont l'effet est non significatif (Appendice E).



**Figure 3.6** : Effet de l'interaction (Concentration du mannitol x Mode de macération) sur le nombre de protoplastes viables chez les trois cultivars du palmier dattier.



**Figure 3.7** : Protoplastes fraîchement isolés à partir des cals nodulaires des trois cultivars de palmier dattier sous l'effet des différentes concentrations de mannitol testées.

**A** : DN-0,5 M-50 RPM (Barre = 17,2  $\mu\text{m}$ ).      **B** : DN-0,6 M-STAT (Barre = 68,7  $\mu\text{m}$ ). **C** : AK-0,4 M-STAT (Barre = 68,7  $\mu\text{m}$ ). **D** : AK-0,6 M-50 RPM (Barre = 68,7  $\mu\text{m}$ ). **E** : DB-0,4 M-50 RPM (Barre = 17,2  $\mu\text{m}$ ). **F** : DB-0,5 M-STAT (Barre = 17,2  $\mu\text{m}$ ).

### 3.1.2.3. Taux de viabilité des protoplastes libérés

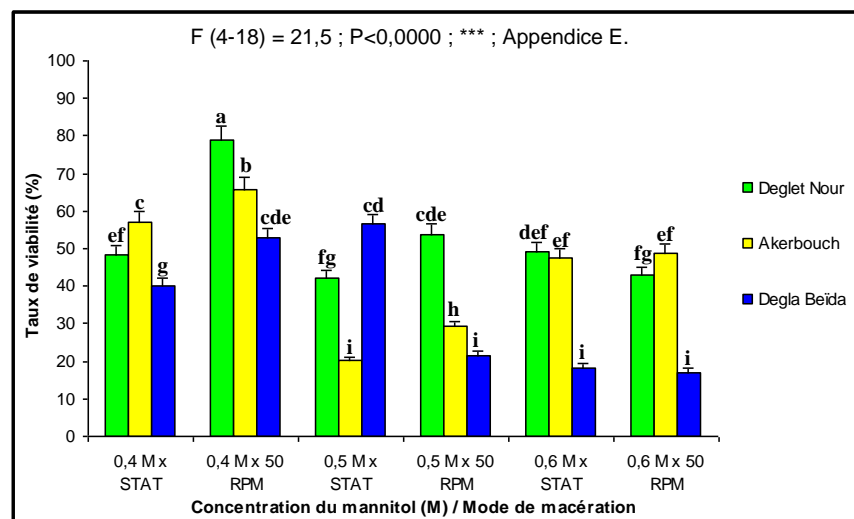
Les meilleurs taux de viabilité (78,9 et 65,6 %) sont obtenus, respectivement, chez le cultivar Deglet Nour et Akerbouch avec la concentration 0,4 M sous 50 rpm d'agitation. De même, les meilleurs taux de viabilité chez le cultivar Degla Beïda (57,1 et 56,5 %) sont obtenus, respectivement, avec la concentration 0,4 M sous 50 rpm d'agitation et avec la concentration 0,5 M sous une macération stationnaire. Alors que le plus faible taux de viabilité (17,1 %) est obtenu chez le cultivar Degla Beïda avec la concentration de 0,6 M sous 50 rpm d'agitation (Figure 3.8).

Chez le cultivar Deglet Nour la concentration du mannitol dans la solution enzymatique n'influence pas beaucoup sur le taux de viabilité car celle-ci varie entre 42 et 53,8 % avec une valeur maximale avec la combinaison 0,4 M de mannitol et 50 rpm d'agitation. De même, les meilleurs taux de viabilité chez le cultivar Degla Beïda sont obtenus avec la concentration 0,4 M (40 et 52,8 %) quel que soit le mode de macération ainsi que 0,5 M sous macération stationnaire (56,5 %) ; alors qu'avec 0,5 M sous 50 rpm d'agitation (21,6 %) ainsi que 0,6 M combinée avec les deux modes de macération les taux de viabilité sont les plus faibles (18,3 et 17,1 %). En effet, chez Akerbouch les meilleurs taux de viabilité sont obtenus avec les concentrations 0,4 et 0,6 M quel que soit le mode de macération utilisé ; alors que les faibles taux de viabilité sont obtenus avec 0,5 M quelle que soit la combinaison (Figure 3.8).

Le mannitol affecte d'une manière significative le taux de viabilité des protoplastes isolés, cependant en dépendance directe avec le cultivar. Nous remarquons que pour le cultivar Deglet Nour et Degla Beïda les meilleurs taux de viabilité sont obtenus avec 0,4 M ensuite 0,5 M et en dernier 0,6 M ; ce qui indique l'existence d'une corrélation négative entre la concentration du mannitol et la viabilité des protoplastes de ces deux cultivars. Cependant, ce n'est pas le cas pour Akerbouch dont la meilleure viabilité a été enregistrée avec 0,4 M et 0,6 M alors que 0,5 M permet d'obtenir les faibles taux de viabilité. De ce fait, on constate que la meilleure concentration de mannitol pour les trois cultivars en question est 0,4 M ensuite 0,5 M et en dernier 0,6 M (Figure 3.8).

De même, le mode de macération affecte nettement le taux de viabilité des protoplastes, de telle sorte qu'il y a augmentation du taux de viabilité des protoplastes lorsque la macération est réalisée sous conditions d'agitation de 50 rpm. Cependant, cette augmentation n'est pas vérifiée chez le cultivar Deglet Nour avec 0,6 M et chez Degla Beïda avec 0,5 M et 0,6 M où on a enregistré, au contraire, une diminution du taux de viabilité des protoplastes. De ce fait, la macération à 50 rpm est meilleure que la macération stationnaire pour Deglet Nour et Akerbouch et le contraire est juste pour le cas de Degla Beïda (Figure 3.8).

L'analyse de la variance à trois facteurs (Cultivar x Concentration du mannitol x Mode de macération) indique un effet très hautement significatif de l'interaction (Cultivar x Concentration du mannitol x Mode de macération) sur le taux de viabilité des protoplastes isolés (Appendice E). Le test de la PPDS révèle 9 groupes, dont 5 chevauchants (Figure 3.8). De même, l'effet de chaque facteur seul ou combiné avec l'un des deux autres facteurs est très hautement significatif ; à l'exception du mode de macération dont l'effet est hautement significatif (Appendice E).



**Figure 3.8 :** Effet de l'interaction (Concentration du mannitol x Mode de macération) sur le taux de viabilité des protoplastes chez les trois cultivars du palmier dattier.

## Récapitulatif

A travers cette deuxième étape d'optimisation d'isolement des protoplastes à partir des cals nodulaires des trois cultivars du palmier dattier. Sous l'action d'une solution enzymatique composée de 1,5 % de Cellulase et 1 % de Macérozyme on peut conclure ce qui suit quant à l'effet du mannitol (tableau 3.2) :

- ❖ L'isolement d'un grand nombre de protoplastes viables chez Deglet Nour et Degla Beïda nécessite une concentration moyenne en mannitol (0,5 M), respectivement, sous 50 rpm d'agitation et sous conditions stationnaires ; alors que pour Akerbouch une forte concentration en agent osmotique (0,6 M) sous 50 rpm d'agitation est requise ;
- ❖ Une faible concentration en mannitol (0,4 M) sous conditions de 50 rpm d'agitation est bénéfique pour avoir une bonne viabilité des protoplastes chez Deglet Nour et Akerbouch contrairement à Degla Beïda qui nécessite une concentration moyenne en agent osmotique (0,5 M) sous conditions stationnaires ;
- ❖ La macération stationnaire est plus bénéfique pour avoir plus de protoplastes viables que la macération sous agitation (50 rpm) chez Degla Beïda et contrairement pour les cultivars Deglet Nour et Akerbouch.

**Tableau 3.2 :** Résumé des meilleurs résultats par cultivar (Rendements en protoplastes totaux, viables et taux de viabilité) obtenus avec les différentes concentrations du mannitol testées en présence de 1,5 % de Cellulase et 1 % de Macérozyme.

<b>Cultivar</b>	<b>Paramètres</b>	<b>Rendement en protoplastes totaux (x 10<sup>5</sup> / gmf)</b>	<b>Rendement en protoplastes viables (x 10<sup>5</sup> / gmf)</b>	<b>Taux de viabilité (%)</b>
<b>Deglet Nour</b>		0,5 M x 50 RPM (8,67)	0,5 M x 50 RPM (4,67)	0,4 M x 50 RPM (78,9)
<b>Akerbouch</b>		0,6 M x 50 RPM (10,00)	0,6 M x 50 RPM (4,92)	0,4 M x 50 RPM (65,6)
<b>Degla Beïda</b>		0,5 M x STAT (4,50)	0,5 M x STAT (2,50)	0,5 M x STAT (56,5)

### 3.1.3. Effet de la durée et du mode de macération

Dans le but de trouver la meilleure durée de macération permettant d'obtenir plus de protoplastes viables, nous avons suivi l'évolution du rendement en protoplastes (totaux et viables) pendant 24 heures en effectuant un comptage tous les 2 heures de macération ; ce qui nous a permis de dresser des courbes d'évolution des paramètres d'isolement (Nombre total de protoplastes, Nombre de protoplastes viables et Taux de viabilité). De plus, comme nous avons remarqué que le mode de macération (stationnaire et 50 rpm) affecte le rendement et la viabilité des protoplastes isolés lorsqu'on fixe la solution enzymatique et on fait varier la concentration du mannitol ; nous avons procédé à augmenter la vitesse d'agitation à 100 rpm afin de vérifier l'effet de l'agitation sur l'isolement des protoplastes. La macération est réalisée dans l'obscurité à 27°C avec une solution enzymatique composée de 1,5 % de Cellulase et 1 % de Macérozyme contenant 0,5 M de mannitol.

#### 3.1.3.1. Chez le cultivar Deglet Nour

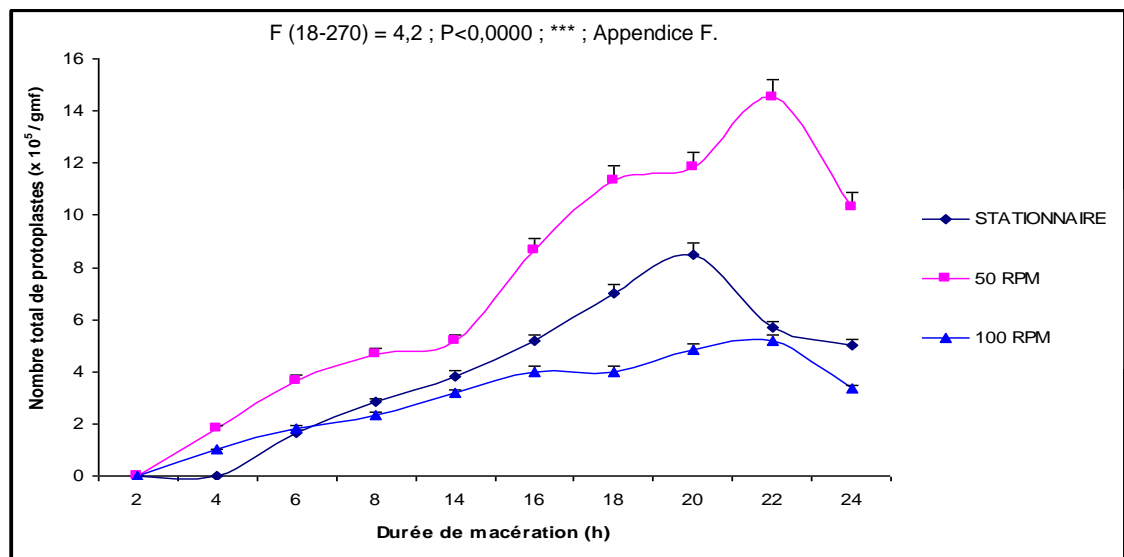
##### 3.1.3.1.1. Rendement en protoplastes totaux

Le nombre de protoplastes totaux chez ce cultivar augmente avec la durée de macération pour atteindre un maximum aux environs de 20 à 22 heures suivant le mode de macération utilisé ensuite un déclin est enregistré. La libération des protoplastes commence dès les premières heures de macération (juste après 2 heures) lorsque la macération est réalisée sous agitation de 50 ou 100 rpm ; alors qu'elle ne commence qu'après 4 heures lorsque la macération est réalisée en condition stationnaire (Figure 3.9). De ce fait, on peut déduire que l'agitation pendant la macération accélère la libération de protoplastes.

L'agitation pendant la macération affecte d'une manière significative le rendement en protoplastes totaux ; de telle sorte que la macération sous 50 rpm d'agitation permet d'obtenir le plus grand nombre ( $1,45 \times 10^6$  protoplastes/gmf) après 22 heures de macération, ensuite c'est la macération

stationnaire qui permet l'obtention de rendements intermédiaires ( $8,5 \times 10^5$  protoplastes/gmf après 20 heures de macération) contrairement à la macération sous 100 rpm d'agitation, où l'effet devient inverse, en donnant les plus faibles rendements en protoplastes totaux avec  $5,17 \times 10^5$  protoplastes/gmf après 22 heures de macération (Figure 3.9).

L'analyse de la variance à deux facteurs (Mode de macération et durée de macération) indique un effet très hautement significatif de cette interaction sur le nombre de protoplastes totaux. De même, l'effet de chaque facteur est très hautement significatif (Appendice F).



**Figure 3.9 :** Effet de la durée et du mode de macération sur le nombre de protoplastes totaux chez le cultivar Deglet Nour.

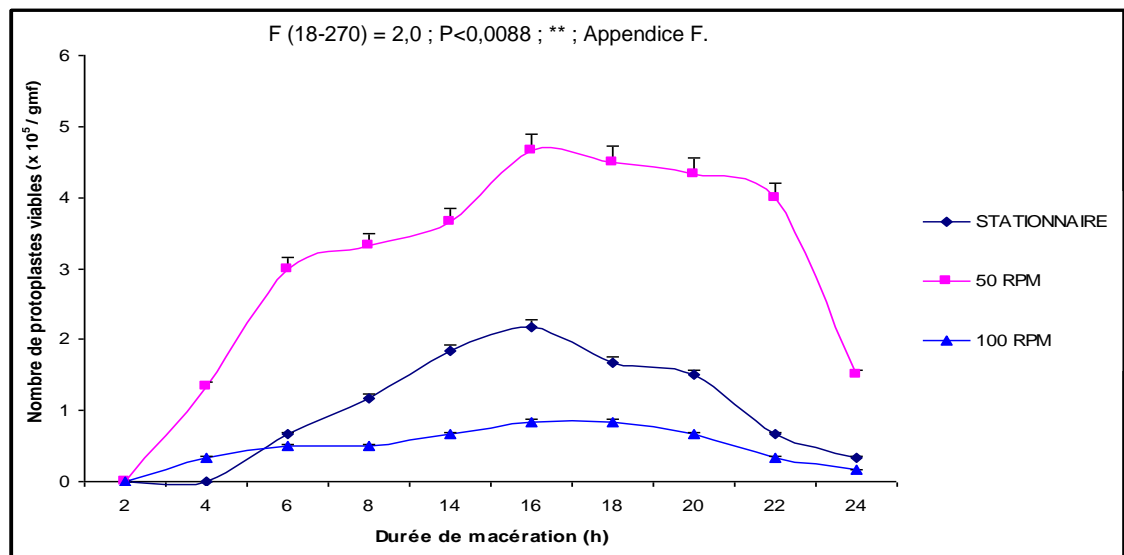
### 3.1.3.1.2. Rendement en protoplastes viables

Le nombre de protoplastes viables augmente avec la durée de macération pour atteindre son maximum après 16 heures et ce quel que soit le mode de macération utilisé (Figure 3.10). De plus, on observe une sorte de palier entre 4 et 22 heures lorsque la macération est réalisée sous conditions de 50 ou 100 rpm d'agitation pour atteindre un maximum de  $4,67 \times 10^5$  protoplastes/gmf et  $8,33 \times 10^4$  protoplastes/gmf respectivement pour 50 et 100 rpm d'agitation, alors qu'une augmentation rapide a été enregistrée avec la macération stationnaire avec un maximum après 16 heures de macération

( $2,17 \times 10^5$  protoplastes/gmf) ensuite un déclin lent a été enregistré (Figure 3.10). En effet, la libération des protoplastes viables évolue de la même manière que celle des protoplastes totaux.

L'agitation pendant la macération affecte d'une manière significative le rendement en protoplastes viables ; de telle sorte que la macération sous 50 rpm d'agitation permet d'obtenir le plus grand nombre ( $4,67 \times 10^5$  protoplastes/gmf) après 16 heures de macération, ensuite c'est la macération stationnaire qui permet l'obtention de rendements intermédiaires ( $2,17 \times 10^5$  protoplastes/gmf après 16 heures de macération) contrairement à la macération sous 100 rpm d'agitation qui donne les plus faibles rendements en protoplastes viables avec un meilleur résultat ( $8,33 \times 10^4$  protoplastes/gmf) après 16 à 18 heures de macération (Figure 3.10).

L'analyse de la variance à deux facteurs (Mode de macération et durée de macération) indique un effet hautement significatif de cette interaction sur le nombre de protoplastes viables. Alors que l'effet de chaque facteur est très hautement significatif (Appendice F).



**Figure 3.10** : Effet de la durée et du mode de macération sur le nombre de protoplastes viables chez le cultivar Deglet Nour.

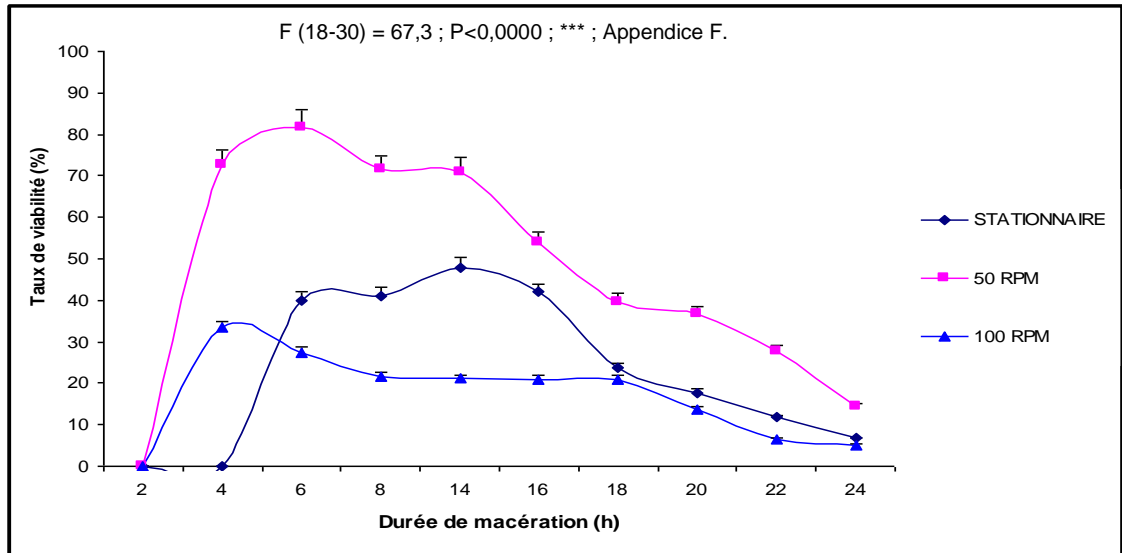


### 3.1.3.1.3. Taux de viabilité des protoplastes libérés

La viabilité des protoplastes libérés augmente d'une manière rapide avec la durée de macération pour atteindre sa valeur maximale (47,8 %) après 14 heures sous conditions stationnaires créant, ainsi, une sorte de palier entre 6 et 16 heures suivi d'une diminution lente atteignant un minimum de 6,7 % après 24 heures de macération. Cependant, elle atteint sa meilleure valeur maximale (81,8 %) après 6 heures sous 50 rpm d'agitation suivi d'une diminution étalée jusqu'à son minimum (14,5 %) après 24 heures de macération. De même, sous 100 rpm d'agitation, le taux de viabilité maximum (33,3 %) a été enregistré tout à fait au début de macération (4 heures) suivi d'un palier (entre 27 et 20 %) s'étalant entre 6 à 18 heures pour diminuer vers la plus faible valeur (5 %) après 24 heures de macération (Figure 3.11).

L'agitation pendant la macération affecte d'une manière significative le taux de viabilité des protoplastes ; de telle sorte que la macération après 6 heures sous 50 rpm d'agitation permet d'obtenir la meilleure viabilité (81,8 %), ensuite c'est la macération stationnaire qui permet l'obtention des taux de viabilité intermédiaires (47,8 % après 14 heures de macération) contrairement à la macération sous 100 rpm d'agitation qui donne les plus faibles taux de viabilité avec un meilleur résultat (33,3 %) obtenu après 4 heures de macération (Figure 3.11).

L'analyse de la variance à deux facteurs (Mode de macération et durée de macération) indique un effet très hautement significatif de cette interaction sur la viabilité des protoplastes isolés. De même, l'effet de chaque facteur est très hautement significatif (Appendice F).



**Figure 3.11** : Effet de la durée et du mode de macération sur le taux de viabilité des protoplastes chez le cultivar Deglet Nour.

### 3.1.3.2. Chez le cultivar Akerbouch

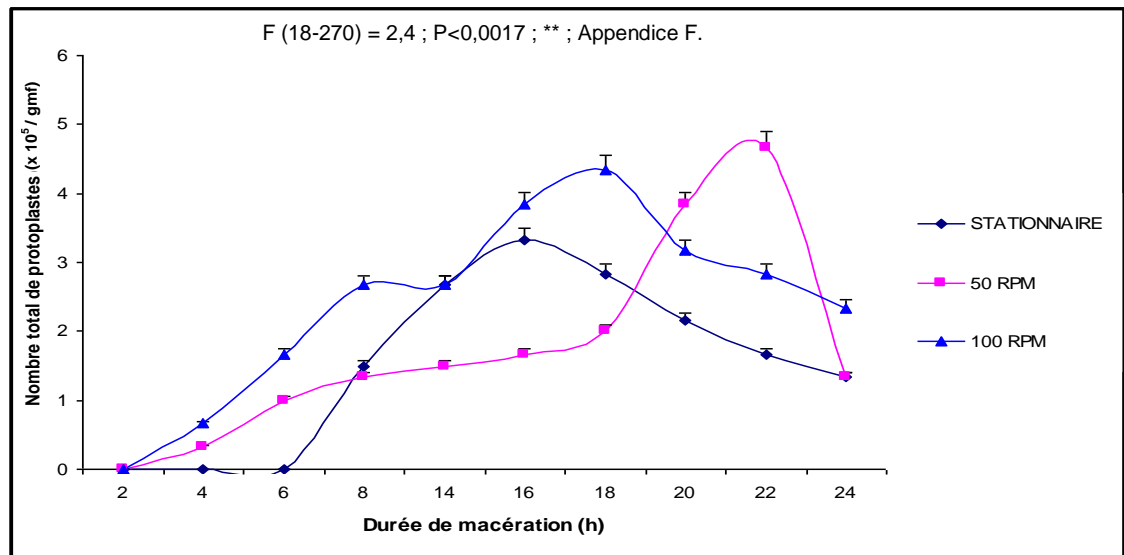
#### 3.1.3.2.1. Rendement en protoplastes totaux

Le nombre de protoplastes totaux chez ce cultivar augmente avec la durée de macération pour atteindre un maximum aux environs de 16 à 22 heures suivant le mode de macération utilisé ensuite un déclin a été enregistré. De plus, la libération de protoplastes commence dès les premières heures de macération (juste après 2 heures) lorsque la macération est réalisée sous agitation de 50 ou 100 rpm ; alors qu'elle ne commence qu'après 6 heures lorsque la macération est réalisée en conditions stationnaires. De ce fait, on peut déduire que l'agitation pendant la macération accélère la libération de protoplastes (Figure 3.12).

L'agitation pendant la macération affecte d'une manière significative le rendement en protoplastes totaux ; de telle sorte que la macération sous 50 rpm d'agitation permet d'obtenir le plus grand nombre ( $4,67 \times 10^5$  protoplastes/gmf) après 22 heures de macération, ensuite c'est la macération sous 100 rpm qui permet l'obtention de rendements intermédiaires ( $4,33 \times 10^5$  protoplastes/gmf après 18 heures de macération) contrairement à la macération stationnaire qui donne les plus faibles rendements en protoplastes totaux avec

un meilleur résultat ( $3,33 \times 10^5$  protoplastes/gmf) après 16 heures de macération (Figure 3.12). De ce fait, on remarque que la durée optimale varie en fonction du mode de macération ; de telle sorte qu'avec une macération stationnaire la durée est réduite alors qu'elle augmente avec la macération sous conditions d'agitation.

L'analyse de la variance à deux facteurs (Mode de macération et durée de macération) indique un effet hautement significatif de cette interaction sur le nombre de protoplastes totaux. Cependant, l'effet de chaque facteur est très hautement significatif (Appendice F).



**Figure 3.12** : Effet de la durée et du mode de macération sur le nombre de protoplastes totaux chez le cultivar Akerbouch.

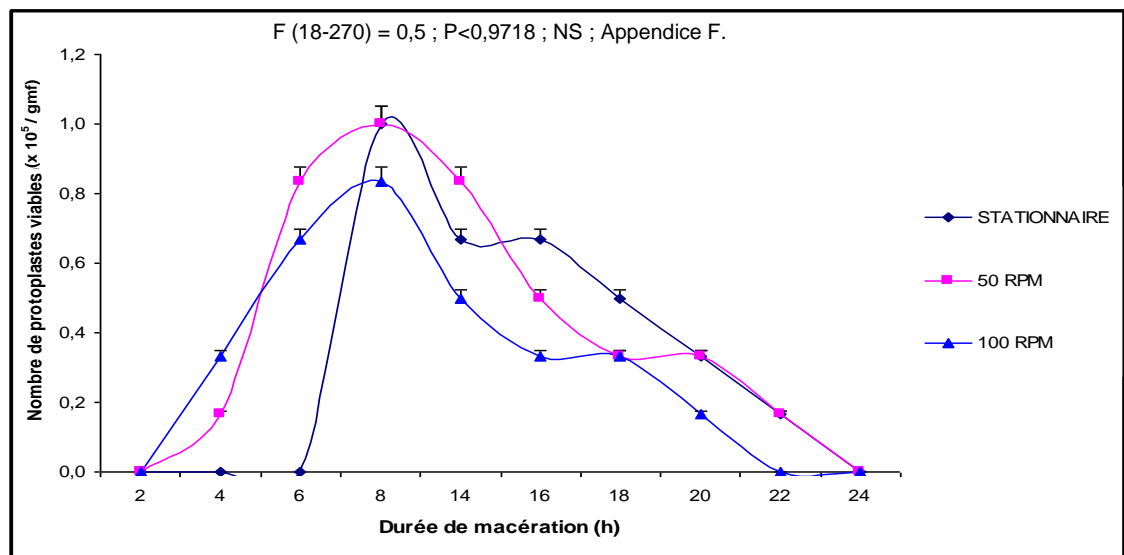
### 3.1.3.2.2. Rendement en protoplastes viables

Le nombre de protoplastes viables augmente avec la durée de macération pour atteindre son maximum après 8 heures de macération ( $1,00 \times 10^5$  protoplastes/gmf pour la macération stationnaire ou 50 rpm d'agitation et  $8,33 \times 10^4$  protoplastes/gmf sous 100 rpm) quel que soit le mode de macération utilisé. Ce nombre maximum est suivi d'une chute du rendement en protoplastes viables plus rapide dans le cas de macération sous agitation de 50 ou 100 rpm pour s'annuler après 22 heures de macération sous 100 rpm d'agitation alors qu'il s'annule après 24 heures de macération sous conditions

stationnaires ou 50 rpm d'agitation. En effet, la libération de protoplastes viables évolue de la même manière que celle des protoplastes totaux (Figure 3.13).

Néanmoins, l'agitation pendant la macération n'affecte pas beaucoup le rendement en protoplastes viables ; car la macération stationnaire ou sous 50 rpm d'agitation permettent d'obtenir le même nombre ( $1,00 \times 10^5$  protoplastes/gmf) après 8 heures de macération, contrairement à la macération sous 100 rpm d'agitation qui donne les plus faibles rendements en protoplastes viables avec un meilleur résultat ( $8,33 \times 10^4$  protoplastes/gmf) après 8 heures de macération (Figure 3.13).

L'analyse de la variance à deux facteurs (Mode de macération et durée de macération) indique l'absence d'effet de cette interaction sur le nombre de protoplastes viables. Cependant, l'effet de la durée de macération seul est très hautement significatif contrairement au mode de macération dont l'effet sur ce paramètre n'est pas significatif (Appendice F).



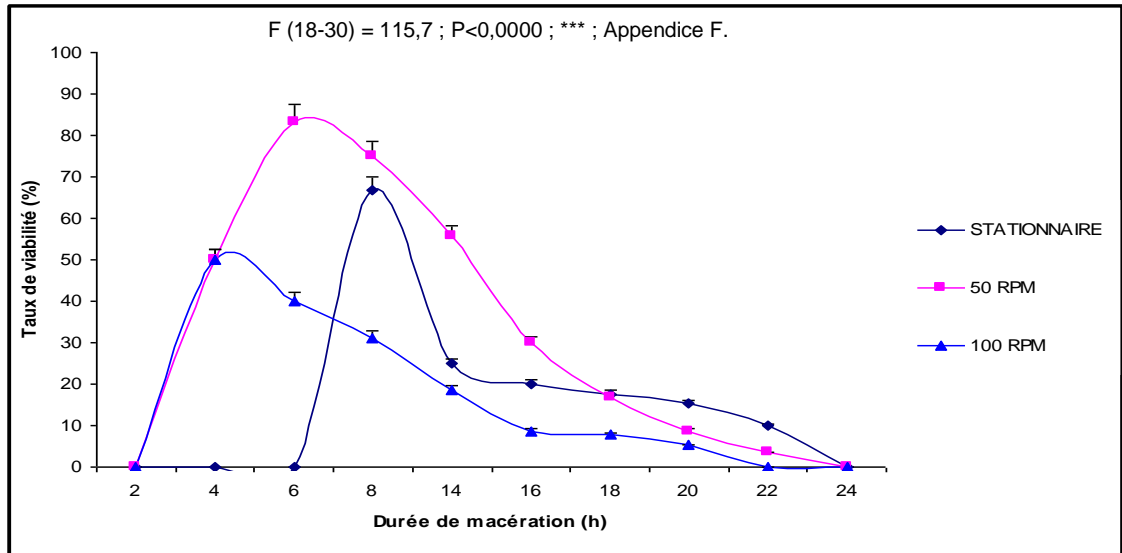
**Figure 3.13** : Effet de la durée et du mode de macération sur le nombre de protoplastes viables chez le cultivar Akerbouch.

### 3.1.3.2.3. Taux de viabilité des protoplastes libérés

La viabilité des protoplastes libérés augmente d'une manière rapide avec la durée de macération pour atteindre sa valeur maximale (66,7 %) après 8 heures de macération lorsque la macération est réalisée sous conditions stationnaires suivie d'une diminution brusque et rapide pour créer, ensuite, une sorte de palier entre 14 et 22 heures pour s'annuler après 24 heures de macération. Cependant, elle atteint sa meilleure valeur maximale (83,3 %) après 6 heures sous 50 rpm d'agitation suivi d'une diminution étalée avec des taux plus élevés sous conditions stationnaires pour s'annuler après 24 heures de macération. De même, sous 100 rpm d'agitation, le taux de viabilité maximum (50,0 %) a été enregistré tout à fait au début de macération (4 heures) suivi d'une diminution plus ou moins rapide de 6 à 16 heures pour se stabiliser entre 5 et 8 % de 16 à 20 heures de macération et s'annuler après 24 heures (Figure 3.14).

L'agitation pendant la macération affecte également d'une manière significative le taux de viabilité des protoplastes ; de telle sorte que la macération sous 50 rpm d'agitation permet d'obtenir la meilleure viabilité (83,3 %) après 6 heures de macération, ensuite c'est la macération stationnaire qui permet l'obtention des taux de viabilité intermédiaires (66,7 % après 8 heures de macération) contrairement à la macération sous 100 rpm d'agitation qui donne les plus faibles taux de viabilité avec un meilleur résultat (50,0 %) après 4 heures de macération (Figure 3.14).

L'analyse de la variance à deux facteurs (Mode de macération et durée de macération) indique un effet très hautement significatif de cette interaction sur la viabilité des protoplastes isolés. De même, l'effet de chaque facteur est très hautement significatif (Appendice F).



**Figure 3.14** : Effet de la durée et du mode de macération sur le taux de viabilité des protoplastes chez le cultivar Akerbouch.

### 3.1.3.3. Chez le cultivar Degla Beïda

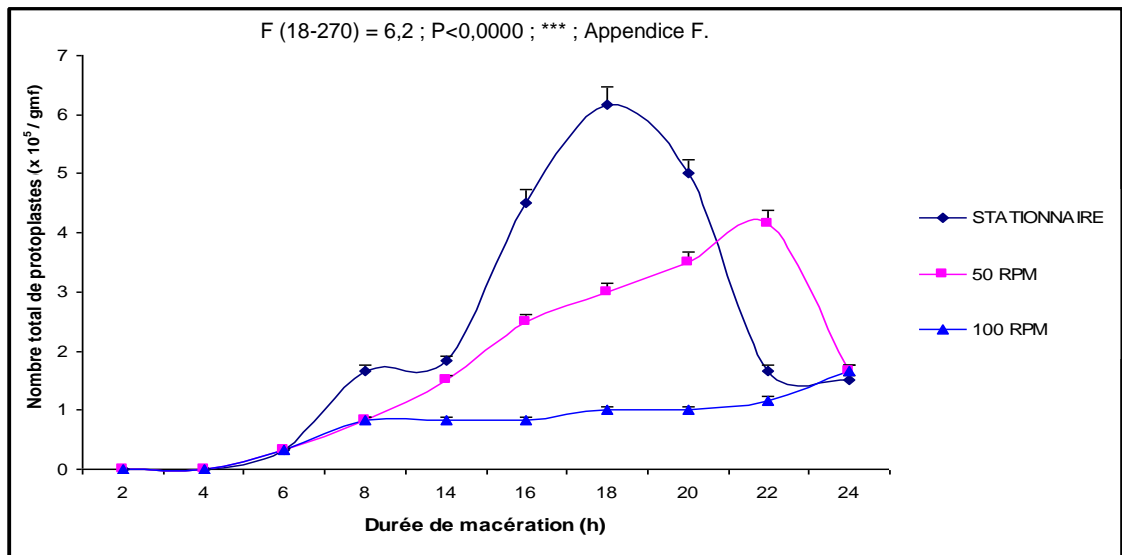
#### 3.1.3.3.1. Rendement en protoplastes totaux

Le nombre de protoplastes totaux libérés chez ce cultivar augmente avec la durée de macération pour atteindre un maximum aux environs de 18 à 22 heures suivant le mode de macération utilisé ensuite un déclin a été enregistré. Cependant, contrairement aux deux autres cultivars, la libération de protoplastes ne commence pas dès les premières heures de macération ; au contraire, elle ne commence qu'après plus de 6 heures quel que soit le mode de macération utilisé. De ce fait, on peut déduire que l'agitation pendant la macération n'accélère pas la libération de protoplastes chez Degla Beïda (Figure 3.15).

L'agitation pendant la macération affecte également d'une manière significative le rendement en protoplastes totaux ; de telle sorte que la macération stationnaire permet d'obtenir le plus grand nombre ( $6,17 \times 10^5$  protoplastes/gmf) après 18 heures, ensuite c'est la macération sous 50 rpm d'agitation qui permet l'obtention de rendements intermédiaires ( $4,17 \times 10^5$  protoplastes/gmf après 22 heures) contrairement à la macération sous 100 rpm d'agitation qui donne les plus faibles rendements en protoplastes totaux plus ou

moins stables entre 8 et 22 heures (entre  $0,8$  et  $1 \times 10^5$  protoplastes/gmf) avec un meilleur résultat ( $1,67 \times 10^5$  protoplastes/gmf) après 24 heures de macération sans marquer une diminution après cette durée de macération à l'inverse des deux autres modes de macération où une diminution a été observée après avoir atteint le maximum (Figure 3.15).

L'analyse de la variance à deux facteurs (Mode de macération et durée de macération) indique un effet très hautement significatif de cette interaction sur le nombre de protoplastes totaux. De même, l'effet de chaque facteur est très hautement significatif (Appendice F).



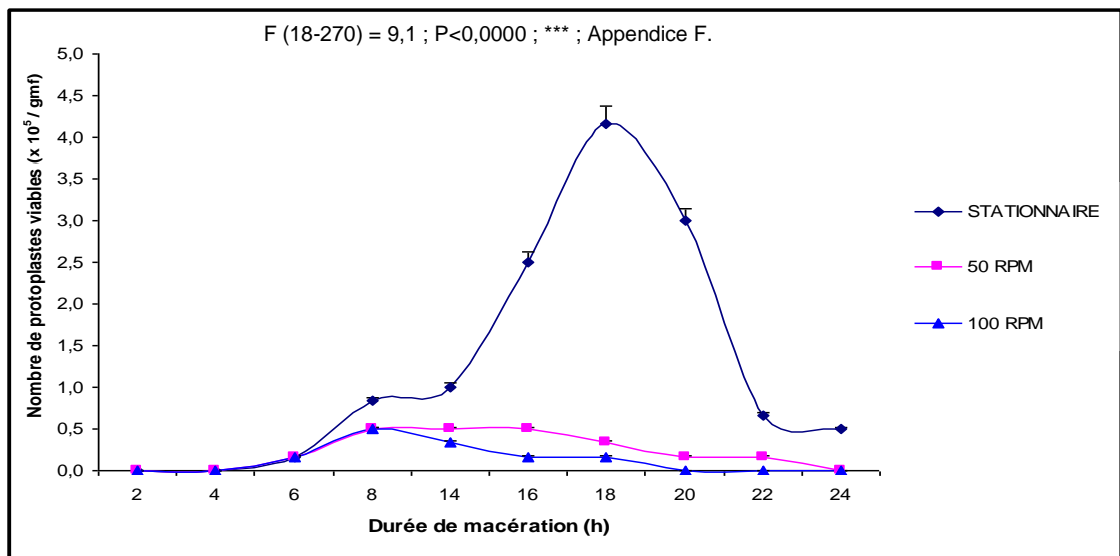
**Figure 3.15** : Effet de la durée et du mode de macération sur le nombre de protoplastes totaux chez le cultivar Degla Beïda.

### 3.1.3.3.2. Rendement en protoplastes viables

Le nombre de protoplastes viables augmente avec la durée de macération pour atteindre son maximum après 8 à 18 heures suivant le mode de macération utilisé. De plus, on observe une sorte de palier entre 8 et 22 heures lorsque la macération est réalisée sous conditions de 50 ou 100 rpm d'agitation avec un maximum de  $5,00 \times 10^4$  protoplastes/gmf après 8 heures de macération, alors qu'une augmentation rapide a été enregistrée avec la macération stationnaire avec un maximum après 18 heures ( $4,17 \times 10^5$  protoplastes/gmf) ensuite un déclin rapide a été enregistré pour se stabiliser

entre 22 et 24 heures. En effet, la libération de protoplastes viables évolue de la même manière que celle des protoplastes totaux (Figure 3.16). De plus, l'agitation pendant la macération affecte également d'une manière significative le rendement en protoplastes viables ; de telle sorte que la macération stationnaire permet d'obtenir le plus grand nombre ( $4,17 \times 10^5$  protoplastes/gmf) après 18 heures de macération, ensuite c'est la macération sous 50 et 100 rpm qui permettent l'obtention de rendements faibles ( $5,0 \times 10^4$  protoplastes/gmf entre 8 et 16 heures) (Figure 3.16).

L'analyse de la variance à deux facteurs (Mode de macération et durée de macération) indique un effet très hautement significatif de l'interaction sur le nombre de protoplastes viables avec un effet très hautement significatif de chaque facteur (Appendice F).



**Figure 3.16 :** Effet de la durée et du mode de macération sur le nombre de protoplastes viables chez le cultivar Degla Beïda.

### 3.1.3.3.3. Taux de viabilité des protoplastes libérés

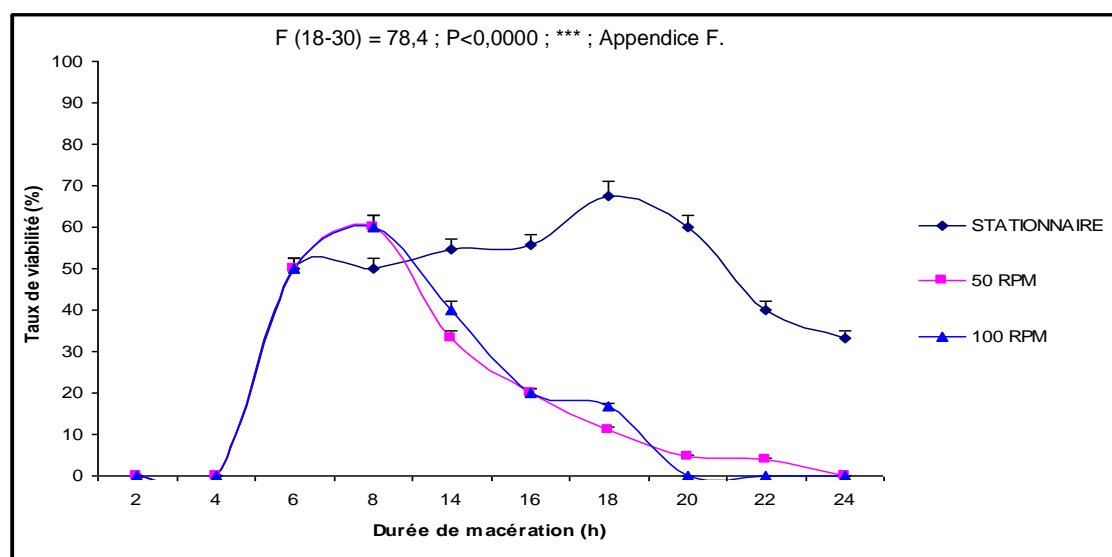
La viabilité des protoplastes libérés augmente rapidement avec la durée de macération sous conditions stationnaires créant, ainsi, un palier entre 6 et 16 heures suivi d'une légère augmentation atteignant un maximum (67,6 %) après 18 heures suivi d'une diminution lente pour atteindre un minimum de 33,3 % après 24 heures ; cependant, la viabilité atteint sa meilleure valeur maximale



(60,0 %) après 8 heures sous 50 et 100 rpm d'agitation suivi d'une diminution étalée jusqu'à son annulation après 20 et 24 heures respectivement sous 100 et 50 rpm d'agitation (Figure 3.17).

De même, l'agitation affecte d'une manière significative le taux de viabilité des protoplastes libérés ; de telle sorte que la macération stationnaire permet d'obtenir la meilleure viabilité (67,6 %) après 18 heures de macération, ensuite c'est la macération sous agitation qui résulte à des faibles taux de viabilité (Figure 3.17).

L'analyse de la variance à deux facteurs (Mode de macération et durée de macération) indique un effet très hautement significatif de cette interaction sur la viabilité des protoplastes isolés. De même, l'effet de chaque facteur est très hautement significatif (Appendice F).



**Figure 3.17** : Effet de la durée et du mode de macération sur le taux de viabilité des protoplastes chez le cultivar Degla Beïda.

### Récapitulatif

A travers cette troisième étape d'optimisation d'isolement des protoplastes à partir des cals nodulaires des trois cultivars du palmier dattier, on peut conclure (tableau 3.3) que sous ces conditions de macération optimales (1,5 % de Cellulase et 1 % de Macérozyme et 0,5 M de mannitol) :

- ❖ L'isolement d'un grand nombre de protoplastes viables chez Deglet Nour et Degla Beïda nécessite une durée plus ou moins longue (16 à 18 H de macération), respectivement, sous agitation de 50 rpm et macération stationnaire alors que cette durée est plus réduite (8 H de macération) pour Akerbouch quel que soit le mode de macération ;
- ❖ Une courte durée de macération (6 H) sous 50 rpm d'agitation est bénéfique pour avoir une bonne viabilité des protoplastes chez Deglet Nour et Akerbouch contrairement à Degla Beïda qui nécessite une durée de macération plus ou moins longue (18 H) sous conditions stationnaires ;
- ❖ La macération stationnaire est plus bénéfique pour avoir plus de protoplastes viables que la macération sous agitation (50 rpm) chez Degla Beïda alors qu'une faible agitation de 50 rpm est bénéfique pour les cultivars Deglet Nour et Akerbouch.

**Tableau 3.3 :** Résumé des meilleurs résultats par cultivar (Rendements en protoplastes totaux, viables et taux de viabilité) obtenus avec les différents modes et durées de macération testées en conditions de macération optimales.

<b>Cultivar</b>	<b>Paramètres</b>	<b>Rendement en protoplastes totaux (x 10<sup>5</sup> / gmf)</b>	<b>Rendement en protoplastes viables (x 10<sup>5</sup> / gmf)</b>	<b>Taux de viabilité (%)</b>
<b>Deglet Nour</b>		22 H x 50 RPM (14,5)	16 H x 50 RPM (4,67)	6 H x 50 RPM (81,8)
<b>Akerbouch</b>		22 H x 50 RPM (4,67)	8 H x STAT et 50 RPM (1,00)	6 H x 50 RPM (83,3)
<b>Degla Beïda</b>		18 H x STAT (6,17)	18 H x STAT (4,17)	18 H x STAT (67,6)

### 3.1.4. Conclusion partielle

A travers cette première étape du travail (Isolement des protoplastes à partir de cals nodulaires des trois cultivars du palmier dattier) nous pouvons conclure :

❖ Chez Deglet Nour, un bon rendement en protoplastes viables a été obtenu sous l'action de la solution enzymatique (SE N°1) contenant 0,5 M de mannitol ( $4,67 \times 10^5$  protoplastes / gmf), moyennement concentrée en Cellulase (1,5 %) et fortement concentrée en Macérozyme (1 %), après 16 heures de macération sous agitation (50 rpm). De même, la meilleure viabilité a été obtenue sous l'action de la solution enzymatique SE N°1 contenant 0,5 M sous 50 rpm d'agitation néanmoins après 6 heures de macération (81,8 %) ;

❖ Chez Akerbouch, un bon rendement en protoplastes viables a été obtenu sous l'action de la solution enzymatique (SE N°1) contenant 0,6 M de mannitol ( $4,92 \times 10^5$  protoplastes / gmf), moyennement concentrée en Cellulase (1,5 %) et fortement concentrée en Macérozyme (1 %), après 16 heures de macération sous agitation (50 rpm). De même, la meilleure viabilité a été obtenue sous l'action de la solution enzymatique (SE N°1) sous 50 rpm d'agitation néanmoins contenant 0,5 M de mannitol et après 6 heures de macération (83,3 %) ;

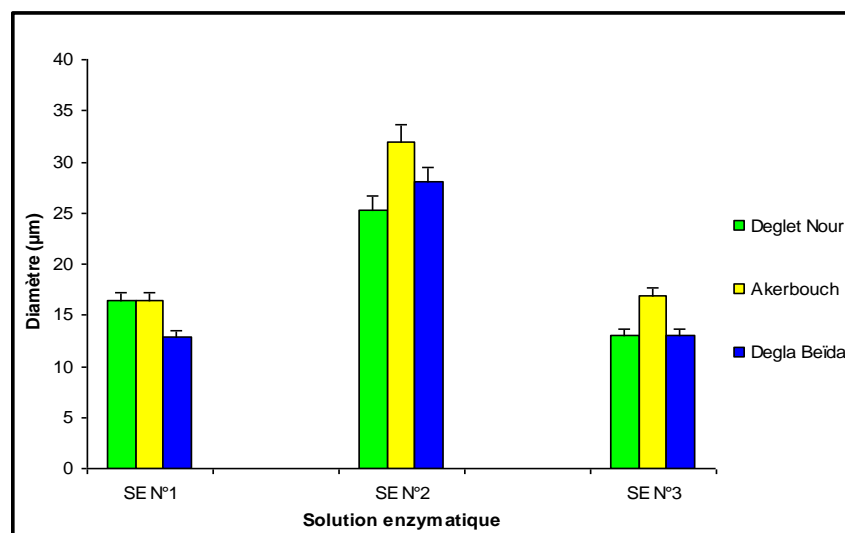
❖ Chez Degla Beïda, un bon rendement en protoplastes viables avec une bonne viabilité ont été obtenus sous l'action de la solution enzymatique (SE N°1) contenant 0,5 M de mannitol ( $4,17 \times 10^5$  protoplastes / gmf avec 67,6 %), moyennement concentrée en Cellulase (1,5 %) et fortement concentrée en Macérozyme (1 %), en conditions stationnaires après 18 heures de macération.

❖ La macération stationnaire est plus bénéfique pour l'isolement des protoplastes. Néanmoins, une faible agitation de 50 rpm peut améliorer le rendement en protoplastes viables isolés.

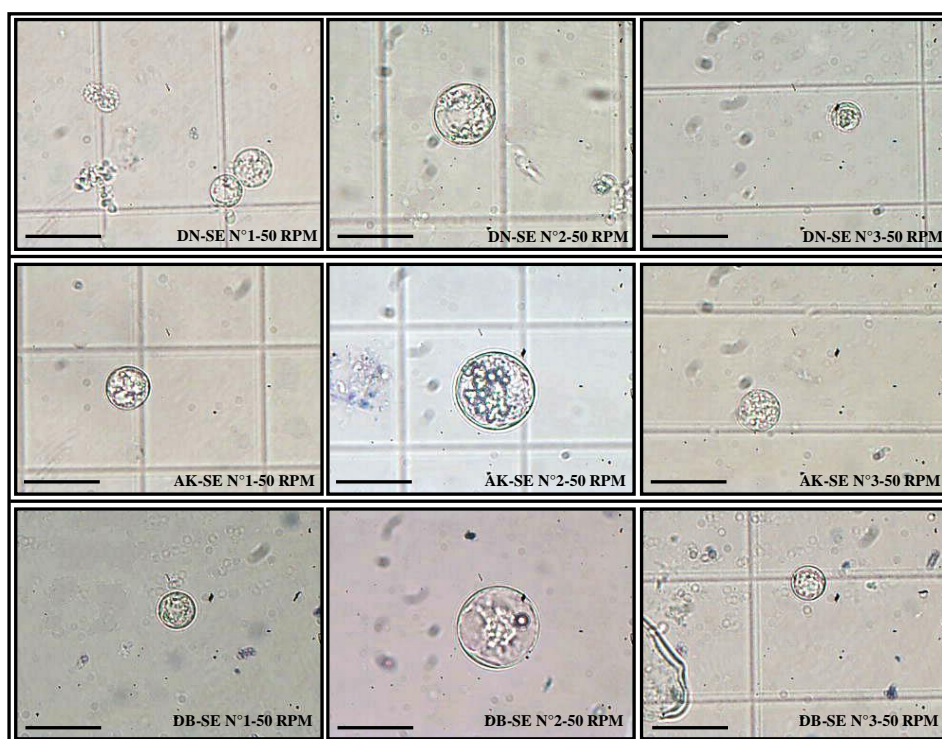
### 3.1.5. Diamètres des protoplastes libérés

#### 3.1.5.1. Effet de la solution enzymatique

Le diamètre moyen des protoplastes chez le palmier dattier diffère d'un cultivar à un autre. Cependant, il varie aussi en fonction d'autres facteurs parmi lesquels la source des protoplastes qui apparaît comme étant la principale source de cette variation de taille. Néanmoins, en présence de 0,5 M de mannitol, on a remarqué que la taille moyenne des protoplastes libérés varie aussi en fonction de la solution enzymatique testée. C'est la solution enzymatique N°2 (1 % de Cellulase et 0,2 % de Macérozyme) qui permet d'isoler des protoplastes de grande taille (25, 32 et 28  $\mu\text{m}$  respectivement pour Deglet Nour, Akerbouch et Degla Beïda) ensuite c'est la SE N°1 (1,5 % de Cellulase et 1 % de Macérozyme) pour Deglet Nour (16  $\mu\text{m}$ ) et la SE N°3 (2 % de Cellulase et 0,5 % de Macérozyme) pour Akerbouch (17  $\mu\text{m}$ ) et Degla Beïda (14  $\mu\text{m}$ ) qui donnent les protoplastes de taille intermédiaires et en dernier la SE N°3 pour Deglet Nour (13  $\mu\text{m}$ ) et la SE N°1 pour Akerbouch (16  $\mu\text{m}$ ) et Degla Beïda (~13  $\mu\text{m}$ ) qui donnent les protoplastes de petite taille (Figure 3.18). De plus, sous l'action de la SE N°1 contenant 0,5 M de mannitol et 50 rpm d'agitation pendant 16 h de macération ; les trois cultivars étudiés montrent des protoplastes à intervalles de taille différentes allant de 10 à 24  $\mu\text{m}$  pour Deglet Nour ; 10 à 27  $\mu\text{m}$  pour Akerbouch et entre 10 et 21  $\mu\text{m}$  pour Degla Beïda (Figure 3.19). La SE N°2 semble donc être la meilleure solution de macération pour l'isolement de protoplastes de qualité (bon diamètre).



**Figure 3.18** : Effet de la solution enzymatique sur le diamètre ( $\mu\text{m}$ ) des protoplastes libérés chez les trois cultivars du palmier dattier sous agitation à 50 rpm.



**Figure 3.19** : Les différents diamètres des protoplastes isolés à partir des cals nodulaires des trois cultivars du palmier dattier sous l'effet des différentes solutions enzymatiques testées (Barre = 31,2  $\mu\text{m}$ ).

### 3.1.5.2. Effet de la durée et du mode de macération

Sous l'action de la SE N°1, le diamètre des protoplastes libérés augmente suivant la durée de macération. Cependant, la durée nécessaire pour avoir des protoplastes de grande taille est fortement influencée par le mode de macération car des protoplastes de grande taille n'ont pas été observés qu'après plus de 23 et 16 heures sous macération stationnaire et après 18 et plus de 16 heures sous 50 rpm d'agitation et après moins de 16 et 14 heures sous 100 rpm d'agitation, respectivement, chez Deglet Nour et Akerbouch.

Au contraire, chez Degla Beïda, le diamètre des protoplastes libérés diminue suivant la durée de macération. La durée nécessaire pour que le diamètre des protoplastes diminue est fortement influencée par le mode de macération car des protoplastes de petite taille n'ont pas été observés qu'après plus de 22 heures sous macération stationnaire et après moins de 16 heures sous 50 et 100 rpm d'agitation. L'agitation fait éclater les protoplastes notamment ceux de grand diamètre, c'est la raison pour laquelle à partir d'un certain de macération, nous n'observons que les protoplastes de petit diamètre.

### 3.1.5.3. Conclusion

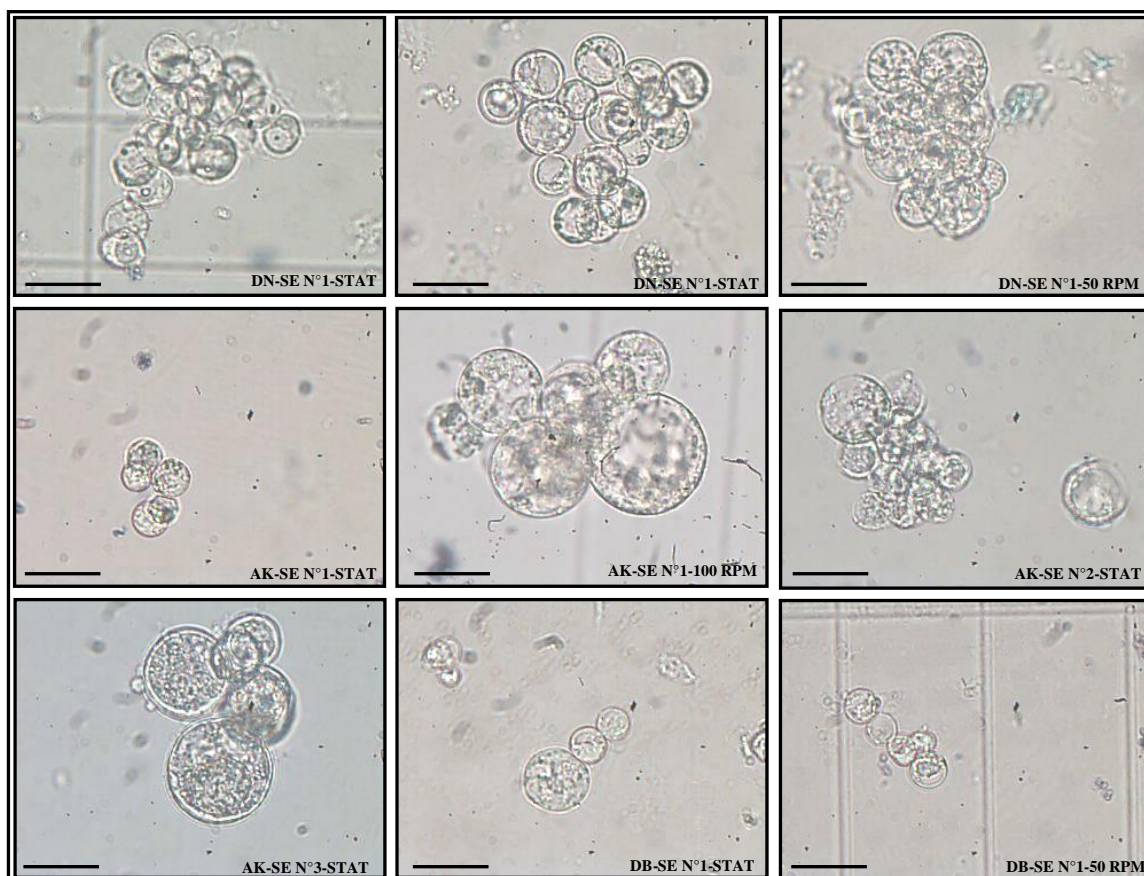
La SE N°2, faiblement concentrée en enzymes, contenant 0,5 M de mannitol sous 50 rpm d'agitation permet, pour les trois cultivars du palmier dattier, l'obtention de protoplastes de grand diamètre.

### 3.1.6. Agglutination des protoplastes libérés

Avec la SE N°1 et sous macération stationnaire, l'agglutination des protoplastes a été observée après 6 heures, 15 heures et 23 heures respectivement chez Deglet Nour, Degla Beïda et Akerbouch. Alors que sous conditions d'agitation cette agglutination n'a été observée qu'après 14 ou 16 heures de macération (sous 50 rpm d'agitation) ou pas du tout observée sous 100 rpm d'agitation dans le cas de Deglet Nour et Degla Beïda et après 17 heures de macération (50 et 100 rpm) chez Akerbouch. De plus, le nombre de protoplastes agglutinés est important sous macération stationnaire que sous agitation. Néanmoins, les protoplastes agglutinés sous conditions stationnaires demeurent à membranes bien délimitées contrairement à ceux agglutinés sous conditions d'agitation où des sortes de fusions spontanées ont été observées.

De même, sous l'effet de la SE N°2, l'agglutination chez Deglet Nour et Akerbouch a été observée sous les deux modes de macération (stationnaire et 50 rpm) avec un nombre moins important en protoplastes par rapport à la SE N°1 en plus de formes de fusions spontanées sous macération stationnaire. Cependant, avec la SE N°3, l'agglutination des protoplastes est presque absente quel que soit le mode de macération chez Deglet Nour et elle n'a été observée que sous conditions de macération stationnaire avec un nombre de protoplastes moins important chez Akerbouch. Cependant, sous l'action de la SE N°2 et 3, aucune agglutination n'a été observée chez les protoplastes de Degla Beïda.

De ce fait, on peut dire que l'agglutination des protoplastes est directement liée à la concentration de la Cellulase dans la solution enzymatique, car avec une concentration élevée (2 %) l'agglutination est presque absente alors qu'avec une concentration moins élevée (1 et 1,5 %) l'agglutination a été beaucoup plus marquée. Néanmoins, l'agglutination est beaucoup plus importante chez les protoplastes de Deglet Nour que chez Akerbouch (Figure 3.20).



**Figure 3.20 :** Agglutination des protoplastes des trois cultivars du palmier dattier suite à l'action des différentes solutions enzymatiques testées (Barre = 25,6  $\mu\text{m}$ ).

### 3.2. Purification des protoplastes

Afin d'optimiser la purification des protoplastes isolés à partir des cals nodulaires des trois cultivars (Deglet Nour, Akerbouch et Degla Beïda), nous avons adopté la méthode de purification par sédimentation qui consiste à suspendre les protoplastes dans une solution de mannitol qu'on dépose sur une couche de saccharose en solution et faire une centrifugation pour que les débris cellulaires sédimentent dans le culot tout en récupérant les protoplastes à l'interphase entre la couche de mannitol et celle de saccharose [72].



### 3.2.1. Effet de la couche de saccharose

Pour ce faire, nous avons essayé deux concentrations de saccharose (21 et 25 %) comme couche de purification combinée avec une centrifugation (centrifugeuse à rotor libre) pendant 5 mn à 65 x g (environ 860 rpm).

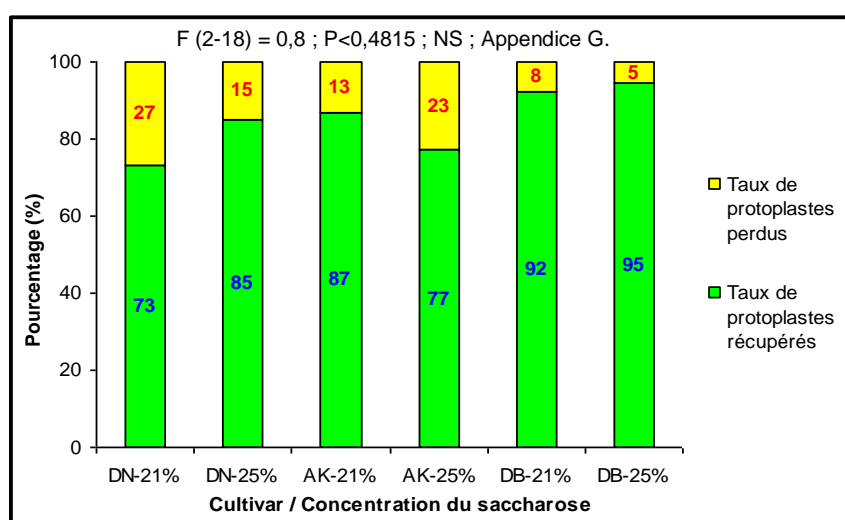
Afin d'estimer le taux de récupération ainsi que le taux de perte, nous avons dénombré, respectivement, le nombre de protoplastes viables récupérés dans la solution purifiée et ceux perdus dans la solution contenant les débris cellulaires. On a remarqué un comportement différent entre les trois cultivars en question vis-à-vis de la purification par sédimentation ; car c'est avec le cultivar Degla Beïda que les meilleurs taux de récupération et, par conséquent, les faibles taux de perte ont été enregistrés, suivie par le cultivar Akerbouch et en dernier Deglet Nour. Nos résultats indiquent que c'est la couche de 25 % de saccharose qui permet une meilleure récupération (85 et 95 %) par rapport à la couche contenant 21 % de saccharose (73 et 92 %) et ce, respectivement, pour les cultivars Deglet Nour et Degla Beïda et, par conséquent, c'est avec une concentration de 25 % que la perte des protoplastes est minimale (15 et 5 %) qu'avec 21 % (27 et 8 %) et ce, respectivement, pour les cultivars Deglet Nour et Degla Beïda. Cependant, pour Akerbouch c'est la concentration 21 % de saccharose qui permet une meilleure récupération (87 %) avec une faible perte (13 %) par rapport à la couche contenant 25 % de saccharose qui permet 77 % de récupération contre 23 % de perte (Figure 3.21).

Malgré les différences entre les taux de récupération en protoplastes purifiés chez les trois cultivars ; l'analyse statistique ne révèle aucun effet significatif de la concentration du saccharose sur les taux de récupération en protoplastes purifiés (Appendice G).

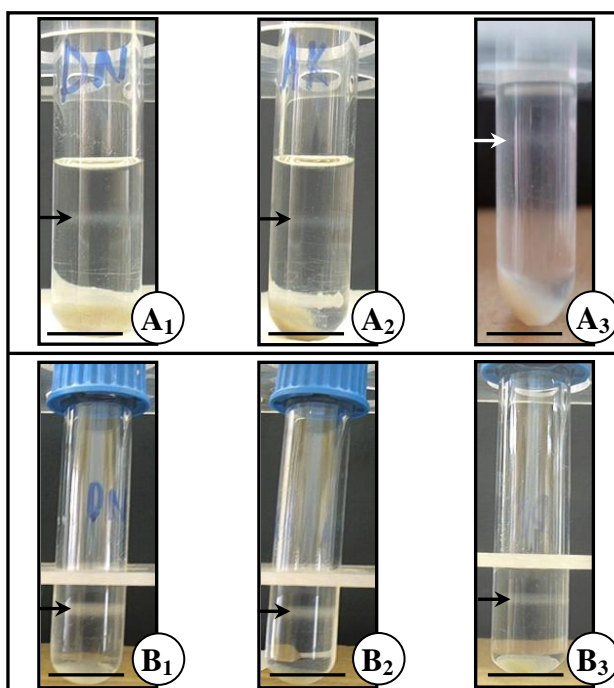
De plus, une caractéristique concernant la formation du ménisque au niveau de l'interphase (entre la couche de saccharose et celle de la suspension des protoplastes) a été observée. C'est avec la concentration de 25 % de saccharose que le ménisque se forme correctement (Figure 3.22 : Groupe B ;

Figure 3.23 : A, C et E) alors qu'avec 21 % de saccharose ce dernier est diffus dans la couche inférieure de saccharose ce qui rend la récupération des protoplastes plus difficile (Figure 3.22 : Groupe A ; Figure 3.23 : B, D et F).

Par ailleurs, la majorité des protoplastes perdus après récupération sont de petit à moyen diamètre (Figure 3.24 : A, B, C et D), avec une minorité de grand diamètre (Figure 3.24 : A). Dans certains cas, les protoplastes perdus apparaissent agglutinés, plus ou moins fusionnés (Figure 3.24 : E) ou encore entourés d'une sorte de halo indiquant une dégradation incomplète de la paroi cellulaire (Figure 3.24 : F).



**Figure 3.21** : Effet de la concentration du saccharose (21 ou 25 %) dans la couche de purification sur le taux de récupération et le taux de perte des protoplastes chez les trois cultivars du palmier dattier.



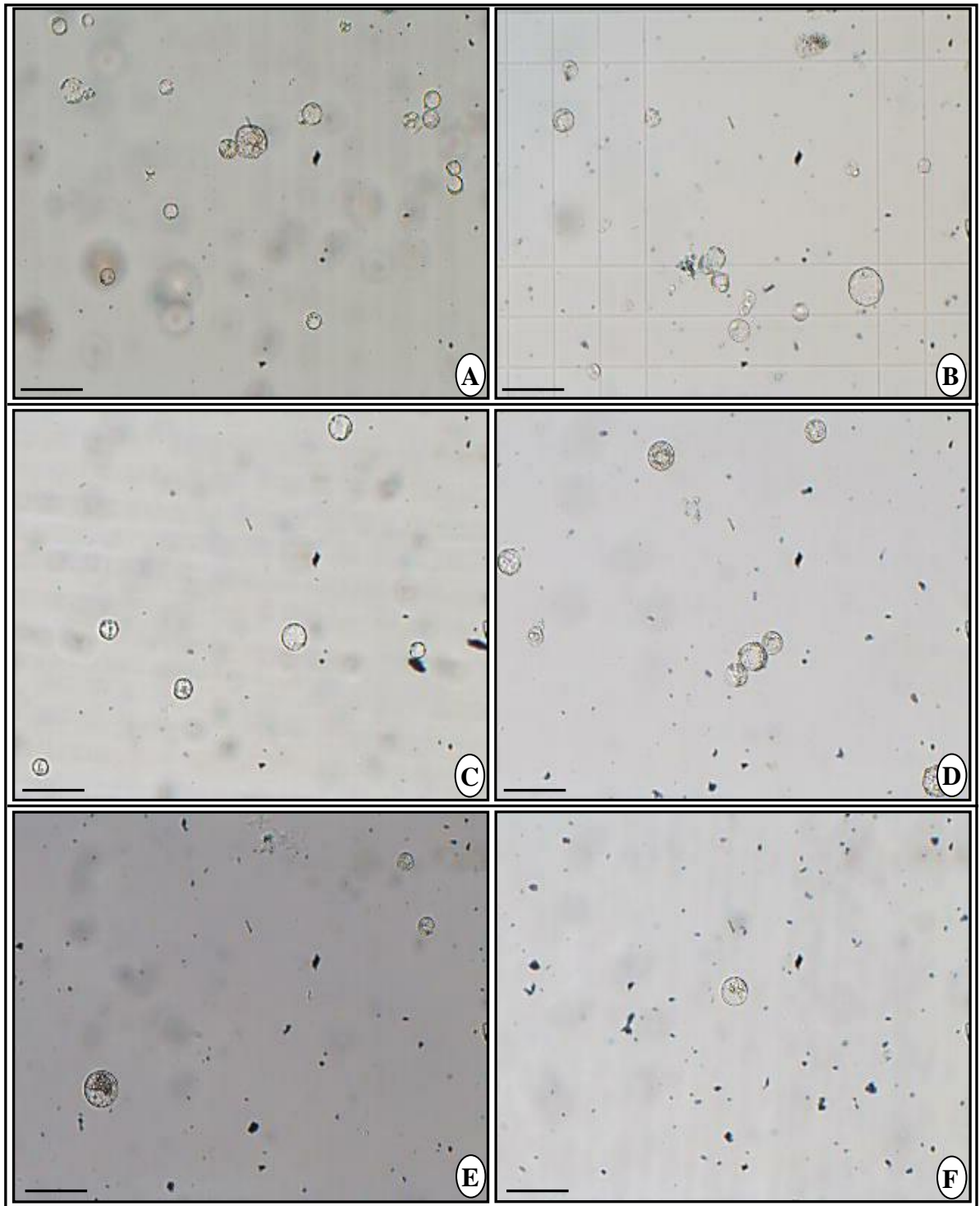
**Figure 3.22 :** Comparaison entre la purification des protoplastes des trois cultivars du palmier dattier par sédimentation sur couche de 21 ou 25 % de saccharose. Les flèches indiquent l'interphase où les protoplastes purifiés sont concentrés.

**Groupe A :** Purification avec 21 % de saccharose :

**A<sub>1</sub>** : DN-21 % (Barre = 1,2 cm). **A<sub>2</sub>** : AK-21 % (Barre = 1,3 cm). **A<sub>3</sub>** : DB-21 % (Barre = 1,3 cm).

**Groupe B :** Purification avec 25 % de saccharose :

**B<sub>1</sub>** : DN-25 % (Barre = 1,5 cm). **B<sub>2</sub>** : AK-25 % (Barre = 1,5 cm). **B<sub>3</sub>** : DB-25 % (Barre = 1,5 cm).



**Figure 3.23** : Protoplastes fraîchement isolés et purifiés à partir des cals nodulaires des trois cultivars de palmier dattier avec deux couches de saccharose (21 et 25 %).

**A** : DN-25 % (Barre = 68,7  $\mu\text{m}$ ).

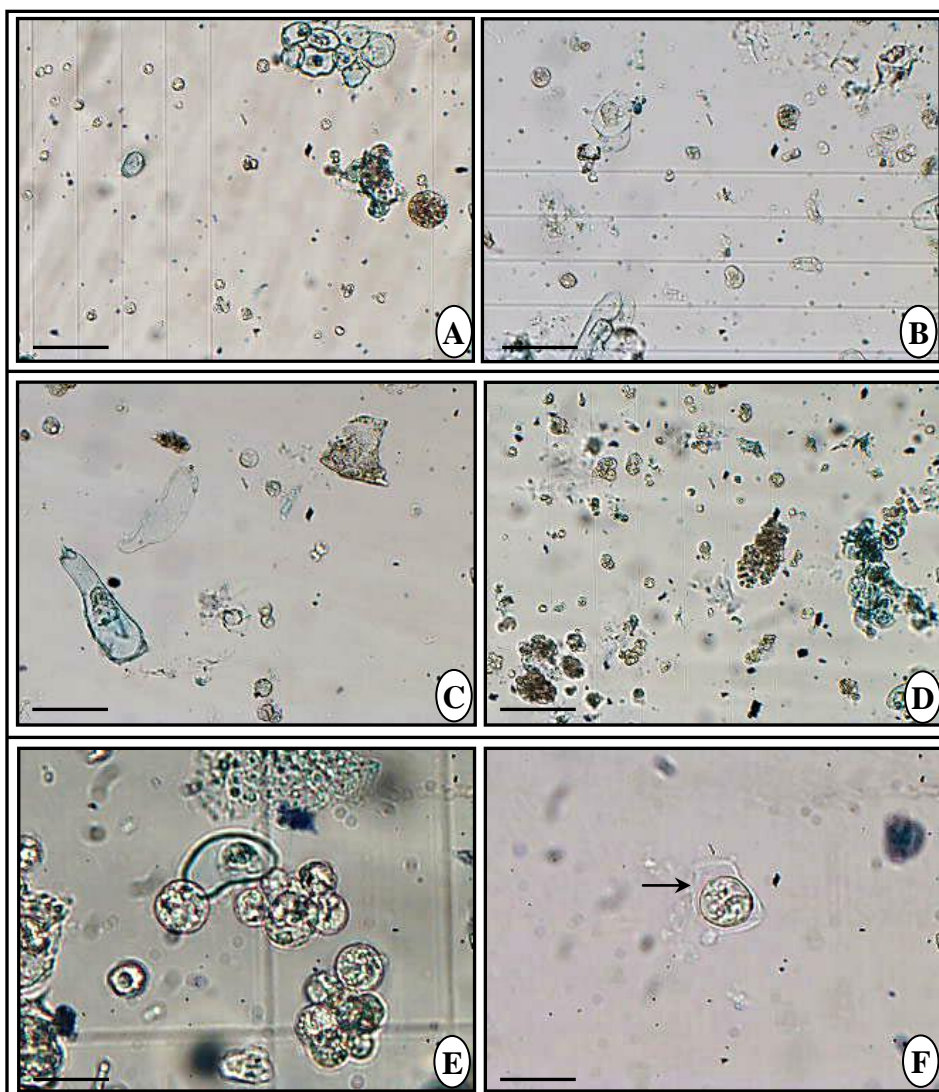
**B** : DN-21 % (Barre = 68,7  $\mu\text{m}$ ).

**C** : AK-25 % (Barre = 68,7  $\mu\text{m}$ ).

**D** : AK-21 % (Barre = 68,7  $\mu\text{m}$ ).

**E** : DB-25 % (Barre = 68,7  $\mu\text{m}$ ).

**F** : DB-21 % (Barre = 68,7  $\mu\text{m}$ ).



**Figure 3.24 :** États des protoplastes perdus chez les trois cultivars de palmier dattier lors de la purification par sédimentation sur couche de 21 ou 25 % de saccharose.

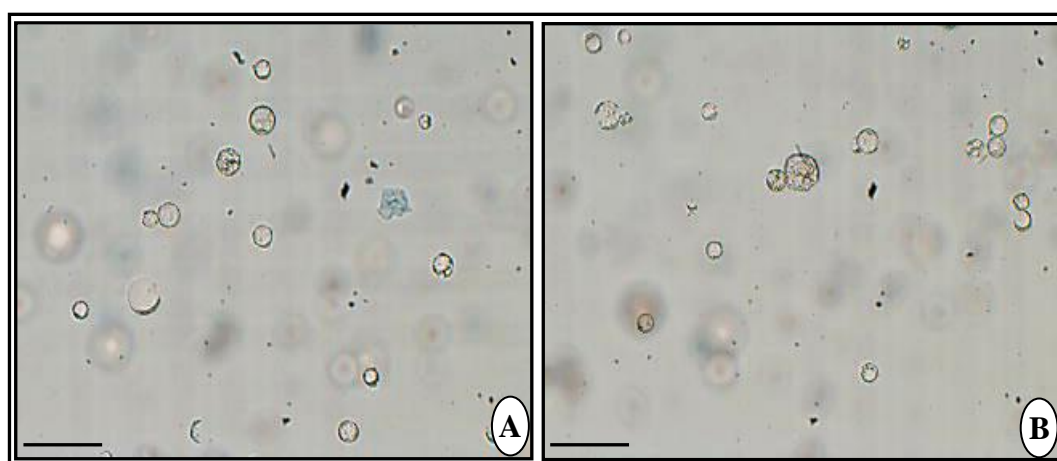
**A :** DN-21 % (Barre = 90,9  $\mu\text{m}$ ). **B :** DN-25 % (Barre = 83,3  $\mu\text{m}$ ). **C :** AK-21 % (Barre = 83,3  $\mu\text{m}$ ). **D :** AK-25 % (Barre = 100  $\mu\text{m}$ ). **E :** Protoplastes agglutinés perdus AK-25 % (Barre = 20,8  $\mu\text{m}$ ). **F :** DB-25 % ( $\rightarrow$  Noter la présence d'un halo au tour du protoplaste) (Barre = 21,4  $\mu\text{m}$ ).

### 3.2.2. Conclusion

La couche de saccharose de 25 % permet une bonne purification des protoplastes de Deglet Nour et Degla Beïda. Elle empêche, une perte importante en protoplastes, contrairement au cultivar Akerbouch où le saccharose concentré à 21 % est largement suffisant pour obtenir une bonne purification des protoplastes.

### 3.3. Culture des protoplastes

Durant cette deuxième étape du travail, nous avons essayé la culture des protoplastes de deux cultivars (Deglet Nour et Akerbouch) (Figure 3.25) indépendamment les uns des autres sur le milieu semi-solide ; dont uniquement la balance hormonale a été varié afin d'optimiser la régénération de la paroi ensuite l'entrée en mitoses des cellules qui en dérivent pour obtenir des microcals évoluant vers des cals. Pour ce faire, plusieurs paramètres (taux de viabilité, d'allongement, de bourgeonnement et de division) ont été suivis pendant la durée de la culture. Pour rappel, les balances hormonales testées sont BH N°1 (2 mg/l de 2,4-D et 0,5 mg/l de BAP), BH N°2 (1 mg/l de 2,4-D et 0,5 mg/l de BAP) et la BH N°3 (0,5 mg/l de 2,4-D et 1 mg/l de BAP) sur un milieu contenant 0,3 % d'agarose.



**Figure 3.25** : Les protoplastes à mettre en culture et fraîchement isolés des cals des deux cultivars du palmier dattier (**A** : Deglet Nour ; **B** : Akerbouch) (Barre = 30,7  $\mu$ m).

#### 3.3.1. Taux de viabilité

La viabilité des protoplastes isolés à partir des cals des deux cultivars a été d'environ 72 % chez Deglet Nour et d'environ 47 % chez Akerbouch juste après la purification. Cependant, ce taux tend à diminuer chez les deux cultivars avec la durée de la culture. Néanmoins, cette diminution dépend du cultivar et de la balance hormonale (Figure 3.26).

En terme du cultivar, ce sont les protoplastes de Akerbouch qui ont montré une faible viabilité, aussi bien après 4 qu'après 15 jours de culture, par rapport à ceux de Deglet Nour. Cependant, si on prend en considération le taux de viabilité initiale on remarque que ce sont les protoplastes de Deglet Nour qui présentent une diminution rapide de 72 à 24,9 et à 25,1 % respectivement avec la balance hormonale BH N°2 et BH N°3 après 4 jours de culture ce qui représente une diminution de près de 65 % (Figure 3.26).

La balance hormonale influence également d'une manière significative cette diminution de viabilité des protoplastes suivant le cultivar.

Chez Deglet Nour, ce sont les protoplastes cultivés sur la BH N°3 qui ont montré une forte diminution de viabilité de 72 à 25,1 % après 4 jours et à 18,2 % après 15 jours ; ce qui indique, respectivement, une diminution de 65,0 et 74,6 % par rapport à la viabilité initiale. Ensuite ce sont les protoplastes cultivés sur la BH N°2 qui ont montré une diminution plus ou moins rapide de 72 à 24,9 % après 4 jours et à 22,1 % après 15 jours ; ce qui indique, respectivement, une diminution de 65,3 et 69,1 % par rapport à la viabilité initiale. Les meilleurs taux de viabilité ont été enregistré avec la BH N°1 où la viabilité a été de 48,3 et 46,4 % respectivement après 4 et 15 jours ce qui correspond à une diminution uniquement de 32,6 et 35,4 % par rapport à la viabilité initiale (Figure 3.26).

De même, chez le cultivar Akerbouch, ce sont toujours les protoplastes cultivés sur la BH N°3 qui ont montré une forte diminution de viabilité de 47 à 16,6 % après 4 jours et à 5,8 % après 15 jours ; ce qui indique, respectivement, une diminution de 64,5 et 87,5 % par rapport à la viabilité initiale. Les protoplastes cultivés sur la BH N°2 ont montré une diminution plus ou moins rapide de 47 à 19,2 % après 4 jours et à 10,6 % après 15 jours ; ce qui indique, respectivement, une diminution de 58,9 et 77,4 % par rapport à la viabilité initiale. Comme pour Deglet Nour, les meilleurs taux de viabilité ont été enregistrés avec la BH N°1 où la viabilité a été de 25,1 et 20,0 % respectivement après 4 et 15 jours ce qui représente une diminution de 46,3 et 57,2 % par rapport à la viabilité initiale (Figure 3.26).

L'analyse de la variance à deux facteurs (Cultivar x Balance hormonale) après 4 jours de culture indique un effet hautement significatif de cette interaction sur le taux de viabilité des protoplastes des deux cultivars. De même, la différence entre les deux cultivars ainsi que entre les balances hormonales testées est très hautement significative (Appendice H). Le test de la PPDS révèle 3 groupes, dont 2 chevauchants, composés de :

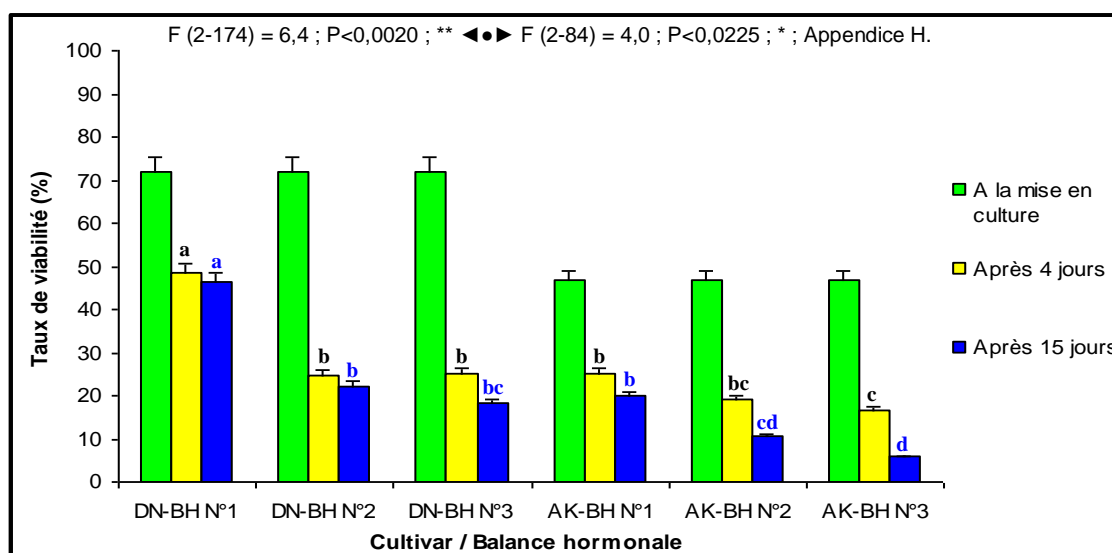
- **Groupe « a »** : DN x BH N°1 ;
- **Groupe « b »** : DN x BH N°3 ; DN x BH N°2 et AK x BH N°1 ;
- **Groupe « bc »** : AK x BH N°2.
- **Groupe « c »** : AK x BH N°3.

De même, l'analyse de la variance à deux facteurs (Cultivar x Balance hormonale) après 15 jours de culture indique un effet significatif de cette interaction sur le taux de viabilité des protoplastes des deux cultivars. Les effets du cultivar et de la balance hormonale sont très hautement significatifs (Appendice H). Le test de la PPDS révèle 4 groupes, dont 3 chevauchants, composés de :

- **Groupe « a »** : DN x BH N°1 ;
- **Groupe « b »** : DN x BH N°2 et AK x BH N°1 ;
- **Groupe « bc »** : DN x BH N°3 ;
- **Groupe « cd »** : AK x BH N°2.
- **Groupe « d »** : AK x BH N°3.

La diminution de la viabilité des protoplastes juste après la mise en culture s'accompagne dans certains cas d'éclatements cellulaires avec ou sans écoulement cytoplasmique (Figure 3.27 : A et L) suite à la rupture de la membrane plasmique de la partie gonflée et transparente (bourgeonnement) (Figure 3.27 : D, G et I) sous l'action de l'osmolarité du milieu suite à une forte turgescence des protoplastes (Figure 3.27 : C, J, K et M), et ce, malgré que d'autres protoplastes paraissent en état de plasmolyse qui ne peut être expliqué que par leurs faibles diamètres (Figure 3.27 : H et O).

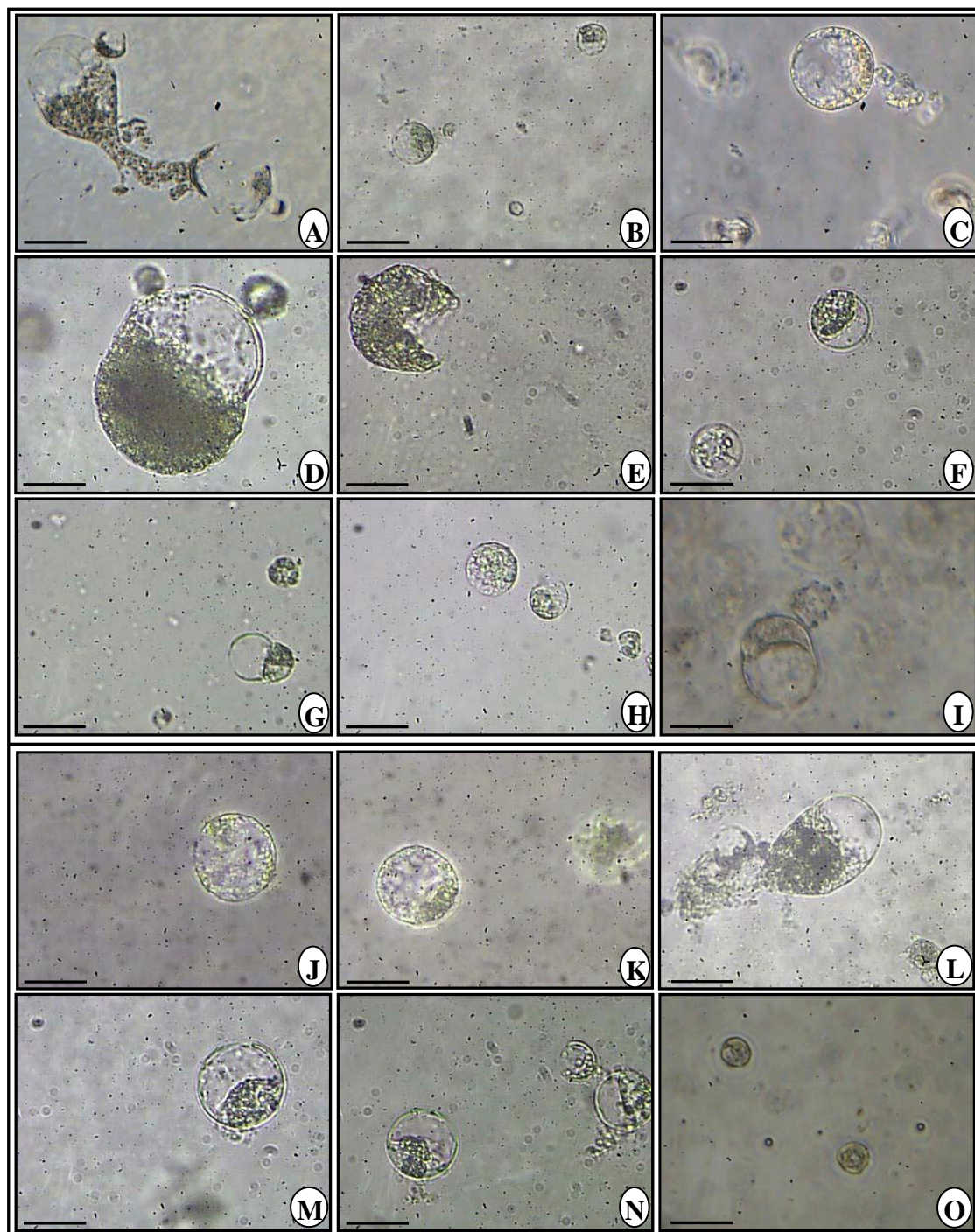




**Figure 3.26 :** Effet de la balance hormonale du milieu de culture sur l'évolution du taux de viabilité des protoplastes mis en culture (%) chez les deux cultivars du palmier dattier.

Généralement les protoplastes qui demeurent viables sont ceux inclus dans le milieu de culture. Toutefois, ils ont une forme plus ou moins sphérique avec un allongement (Figure 3.27 : B, F et N). De plus, certains protoplastes éclatés gardent leurs formes de départ à cause de leur inclusion dans le milieu de culture (Figure 3.27 : E).

Dans d'autres cas, certains protoplastes se trouvant les uns à proximité des autres fusionnent pour former des structures géantes. Néanmoins, chez le cultivar AK et avec les trois balances hormonales testées, les protoplastes qui demeurent viables sont généralement ceux qui ont régénérés leurs parois cellulaires.



**Figure 3.27** : Effet de la balance hormonale du milieu de culture sur la viabilité des protoplastes de deux cultivars de palmier dattier mis en culture.

**A** : DN-BH N°1-24H (Barre = 10,8  $\mu$ m). **B** : DN-BH N°1-72H (Barre = 36,0  $\mu$ m). **C** : DN-BH N°1-4 Jours (Barre = 10,8  $\mu$ m). **D** : DN-BH N°1-6 Jours (Barre = 10,8  $\mu$ m). **E** : DN-BH N°1-10 Jours (Barre = 10,8  $\mu$ m). **F** : DN-BH N°2-24H (Barre = 10,8  $\mu$ m). **G** : DN-BH N°2-6 Jours (Barre = 36,0  $\mu$ m). **H** : DN-BH N°2-14 Jours (Barre = 36,0  $\mu$ m). **I** : DN-BH N°3-15 Jours (Barre = 10,8  $\mu$ m). **J** : AK-BH N°1-72H (Barre = 10,8  $\mu$ m). **K** : AK-BH N°1-72H (Barre = 10,8  $\mu$ m). **L** : AK-BH N°1-5 Jours (Barre = 10,8  $\mu$ m). **M** : AK-BH N°2-24H (Barre = 10,8  $\mu$ m). **N** : AK-BH N°2-24H (Barre = 10,8  $\mu$ m). **O** : AK-BH N°3-24H (Barre = 36,0  $\mu$ m).

### 3.3.2. Taux d'allongement et de bourgeonnement

L'allongement et le changement de la forme des protoplastes mis en culture sont des caractères qui permettent d'évaluer la régénération de la paroi cellulaire ; du fait que la reconstitution de la paroi cellulaire est accompagnée, le plus souvent et selon la bibliographie, avec ces changements morphologiques. Nous avons dénombré le taux d'allongement et / ou de changement de forme chez les protoplastes mis en culture des deux cultivars après 4 et 15 jours de culture. Nos résultats indiquent une influence significative de la balance hormonale sur le taux d'allongement des protoplastes mis en culture.

En terme du cultivar, ce sont les protoplastes de Deglet Nour qui ont montré plus d'allongement, aussi bien après 4 jours (16 à 39 %) qu'après 15 jours de culture (16 à 44 %), par rapport à ceux de Akerbouch (7 à 21 % et entre 5 à 18 % respectivement après 4 et 15 jours) (Figure 3.28). Cependant, cet allongement est fortement influencé par la balance hormonale.

Chez Deglet Nour, ce sont les protoplastes cultivés sur la BH N°1 qui ont montré un taux d'allongement plus ou moins élevé de 39,3 % après 4 jours et 43,6 % après 15 jours ; ce qui indique une augmentation de 10,9 % par rapport à l'allongement initial après 4 jours de culture. Ensuite ce sont les protoplastes cultivés sur la BH N°2 qui ont montré un allongement légèrement faible de 17,9 % après 4 jours et de 22,1 % après 15 jours ; ce qui indique une augmentation de 24 % par rapport à l'allongement initial. Les faibles taux d'allongement ont été enregistrés avec la BH N°3 où les taux d'allongement n'ont été que de 15,8 et 15,7 % respectivement après 4 et 15 jours ce qui représente, à l'inverse des deux premières balances, une diminution de 0,3 % par rapport à l'allongement initial. Ceci serait dû à la forte mortalité des protoplastes mis en culture en présence de cette balance (Figure 3.28).

De même, chez le cultivar Akerbouch, c'est toujours la BH N°1 qui a montré des taux d'allongement plus ou moins élevés de 20,8 % après 4 jours et de 18 % après 15 jours ; ce qui indique une diminution de 13,7 % par rapport à

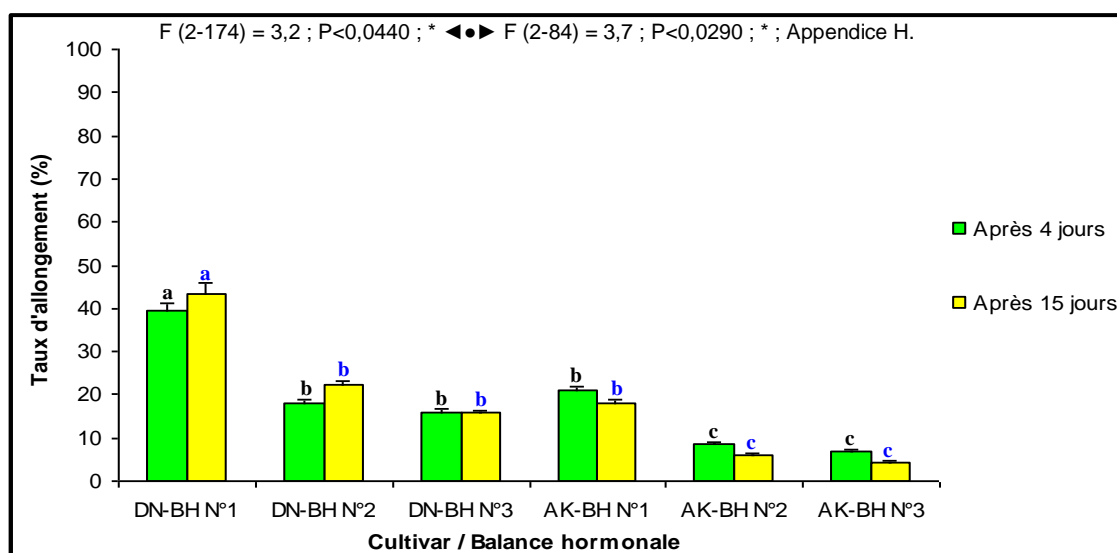
l'allongement initial. Ensuite ce sont les protoplastes cultivés sur la BH N°2 qui ont montré un allongement faible de 8,4 % après 4 jours et de 6,2 % après 15 jours ; ce qui indique une diminution de 26,4 % par rapport à l'allongement initial. Les plus faibles taux d'allongement ont été enregistrés avec la BH N°3 où l'allongement a été de 6,8 et 4,5 % respectivement après 4 et 15 jours ce qui représente une diminution de 34,2 % par rapport à l'allongement initial. Ces diminutions du taux d'allongement chez les protoplastes du cultivar Akerbouch sont dues à la forte diminution du taux de viabilité des protoplastes entre 4 et 15 jours de culture (Figure 3.28).

L'analyse de la variance à deux facteurs (Cultivar x Balance hormonale) après 4 jours de culture indique un effet significatif de cette interaction sur le taux d'allongement des protoplastes des deux cultivars. Cependant, la différence entre les deux cultivars ainsi que les balances hormonales testées est très hautement significative (Appendice H). Le test de la PPDS révèle 3 groupes homogènes composés de :

- **Groupe « a »** : DN x BH N°1 ;
- **Groupe « b »** : AK x BH N°1 ; DN x BH N°2 et DN x BH N°3 ;
- **Groupe « c »** : AK x BH N°2 et AK x BH N°3.

De même, l'analyse de la variance à deux facteurs (Cultivar x Balance hormonale) après 15 jours de culture indique un effet significatif de cette interaction sur le taux d'allongement des protoplastes des deux cultivars. La différence entre les deux cultivars ainsi que les balances hormonales testées est très hautement significative (Appendice H). Le test de la PPDS révèle 3 groupes homogènes composés de :

- **Groupe « a »** : DN x BH N°1 ;
- **Groupe « b »** : AK x BH N°1 ; DN x BH N°2 et DN x BH N°3 ;
- **Groupe « c »** : AK x BH N°2 et AK x BH N°3.



**Figure 3.28 :** Effet de la balance hormonale du milieu de culture sur l'évolution du taux d'allongement des protoplastes mis en culture (%) chez les deux cultivars du palmier dattier.

Les protoplastes des deux cultivars, mis en culture sur la BH N°1 commencent à s'allonger juste après leur introduction (après 24 heures) (Figure 3.29 : A, B et K) sur le milieu de culture avec une condensation du cytoplasme vers un seul côté alors que l'autre côté demeure transparent (Figure 3.29 : E, H, I et L) en plus de l'épaississement de la périphérie cellulaire (Figure 3.29 : C et D). Néanmoins, l'allongement des protoplastes de DN et d'AK mis en culture sur la BH N°2 et BH N°3 n'a été observé qu'après 48 h de la mise en culture. Toutefois, malgré ceci la majorité des protoplastes mis en culture demeurent sous forme sphérique après 48 h de la mise en culture.

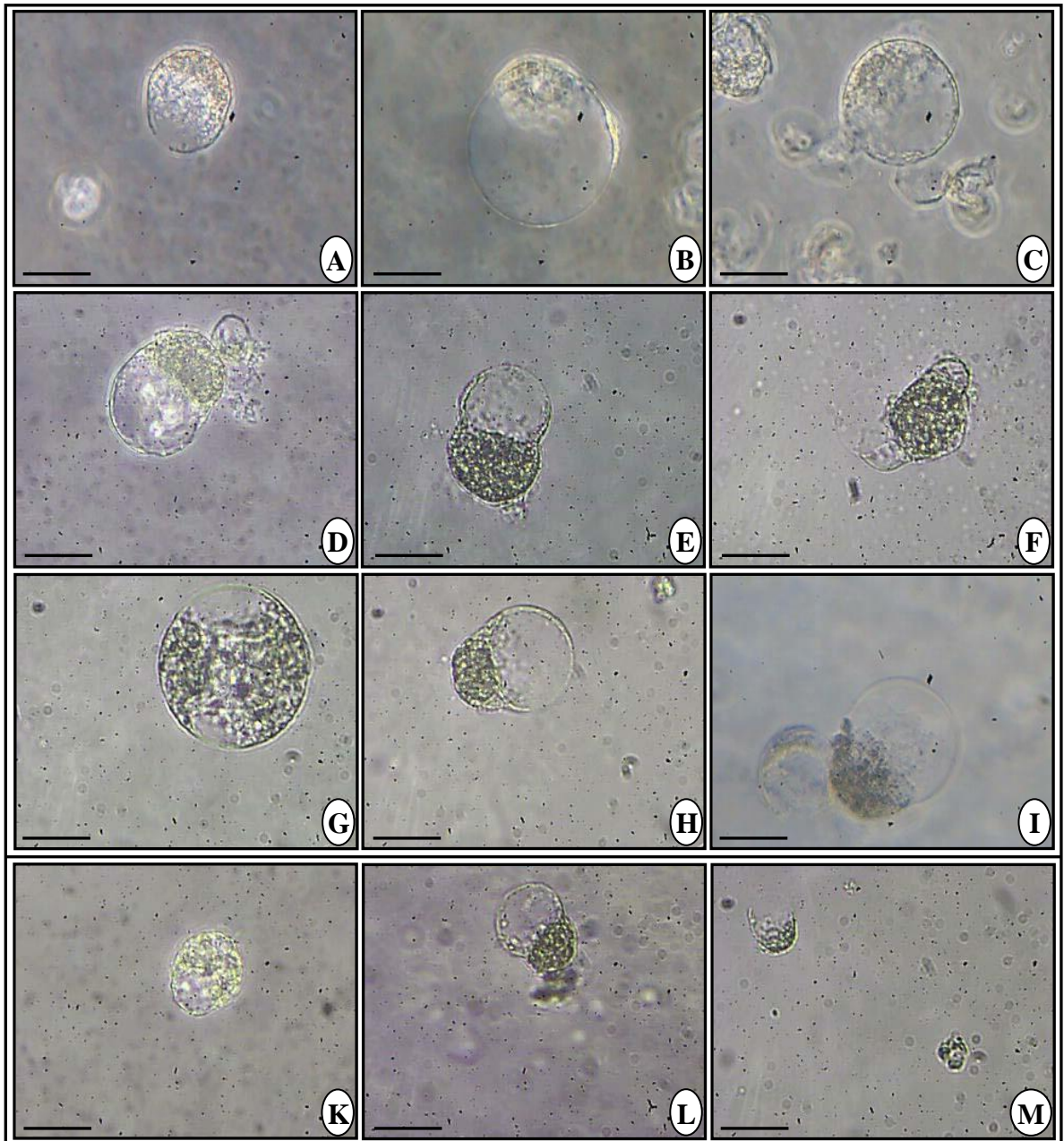
L'allongement cellulaire se traduit généralement par la formation d'un ou de plusieurs bourgeons transparents (Figure 3.29 : D, E, F, H, I, L et M) qui sont, le plus souvent, vides. D'une manière générale, l'expansion ou l'allongement cellulaire des protoplastes est plus marqué chez les protoplastes à grands diamètres que chez les protoplastes à petits diamètres.

L'apparition de ces phénomènes d'allongement cellulaire et de condensation du cytoplasme a été observée dès les premiers jours de la culture

et demeurent jusqu'à plus d'un mois de culture, et ce, malgré la régénération des parois après 8 jours de culture, chez la majorité des protoplastes. Vu les périphéries plus denses et plus épaisses que celles des protoplastes fraîchement isolés et leurs formes plus ou moins allongées, nous considérons que ceux-ci ont complètement formé leur paroi. Néanmoins, il y a toujours des protoplastes qui présentent une forme parfaitement sphérique même après plus d'un mois de culture. Les protoplastes qui gardent leur forme sphérique sont ceux inclus dans le milieu de culture ou au fond des boîtes de pétri. L'inclusion dans l'agarose serait à l'origine du maintien de la forme sphérique des protoplastes même après la régénération de leur paroi. De plus, ces protoplastes inclus dans le milieu de culture demeurent, le plus souvent, viables en dépit d'une certaine plasmolyse qui les caractérise.

On a remarqué que la régénération de la paroi cellulaire des protoplastes mis en culture se fait d'une manière discontinue car la périphérie des protoplastes présente des plages denses et d'autres épaisses (Figure 3.29 : B, G, H et M).





**Figure 3.29** : Effet de la balance hormonale du milieu de culture sur l'allongement des protoplastes des deux cultivars du palmier dattier mis en culture (Barre = 10,0  $\mu\text{m}$ ).

**A** : DN-BH N°1-24H.      **B** : DN-BH N°1-24H.    **C** : DN-BH N°1-4 Jours. **D** : DN-BH N°1-4 Jours. **E** : DN-BH N°1-6 Jours. **F** : DN- BH N°1-10 Jours. **G** : DN-BH N°2-24H. **H** : DN-BH N°2-10 Jours. **I** : DN-BH N°2-14 Jours. **J** : DN-BH N°3-24H. **K** : AK-BH N°1-72H. **L** : AK-BH N°1-5 Jours. **M** : AK-BH N°2-9 Jours.

### 3.3.3. Taux de division

L'entrée en activité mitotique des cellules qui dérivent des protoplastes mis en culture se produit, le plus souvent, après l'achèvement total de la régénération de la paroi cellulaire. Pour cela, nous avons estimé le taux de division (ou fréquence de division ou efficacité initiale de culture) après 15 jours de culture. Nos résultats indiquent une influence significative de la balance hormonale sur le taux d'entrée en mitose.

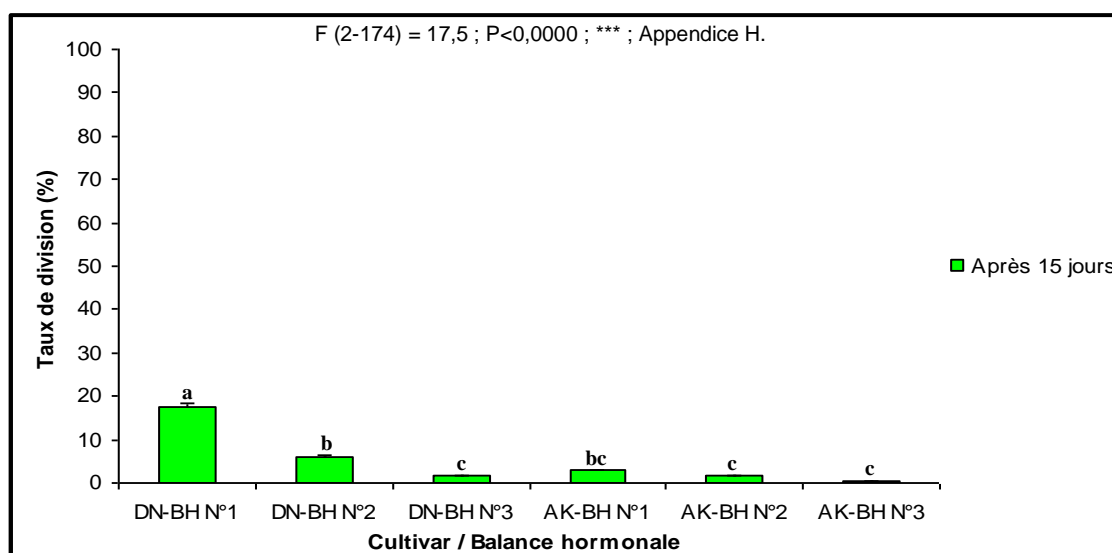
En terme du cultivar, ce sont les protoplastes de Deglet Nour qui ont montré plus de division (1 à 17 %) par rapport à ceux de Akerbouch (0 à 3 %) (Figure 3.30). Cependant, le taux de divisions est fortement influencé par la balance hormonale.

Chez Deglet Nour, ce sont les protoplastes cultivés sur la BH N°1 qui ont montré le meilleur taux de division (17,5 %) obtenu sous ces conditions de culture. Ensuite ce sont les protoplastes cultivés sur la BH N°2 et BH N°3 qui ont montré un taux de division plus faible avec, respectivement, 5,9 et 1,6 % après 15 jours de la mise en culture (Figure 3.30). De même, chez le cultivar Akerbouch, c'est toujours la BH N°1 qui a montré le meilleur taux de division (2,8 %). Ensuite ce sont les protoplastes cultivés sur la BH N°2 et BH N°3 qui ont montré les taux de divisions les plus faibles avec, respectivement, 1,5 et 0,5 % (Figure 3.30).

L'analyse de la variance à deux facteurs (Cultivar x Balance hormonale) après 15 jours de culture indique un effet très hautement significatif de cette interaction sur le taux de division des protoplastes des deux cultivars. De même, la différence entre les deux cultivars ainsi qu'entre les trois balances hormonales testées est très hautement significative (Appendice H). Le test de la PPDS révèle 3 groupes homogènes, dont 2 chevauchants, composés de :

- **Groupe « a »** : DN x BH N°1 ;
- **Groupe « b »** : DN x BH N°2 ;
- **Groupe « bc »** : AK x BH N°1 ;
- **Groupe « c »** : DN x BH N°3, AK x BH N°2 et AK x BH N°3.

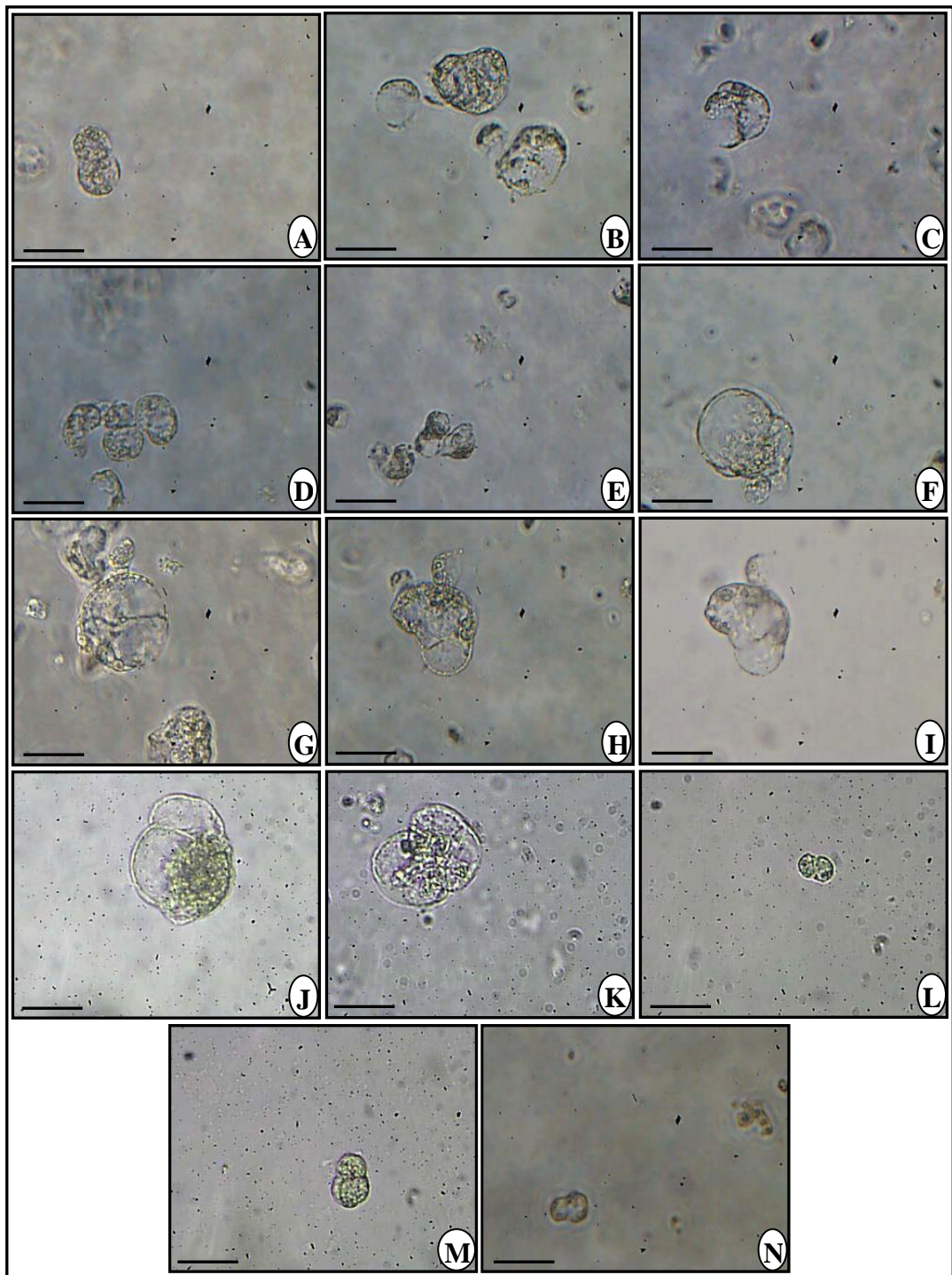




**Figure 3.30** : Effet de la balance hormonale du milieu de culture sur le taux de division des protoplastes mis en culture (%) chez les deux cultivars du palmier dattier.

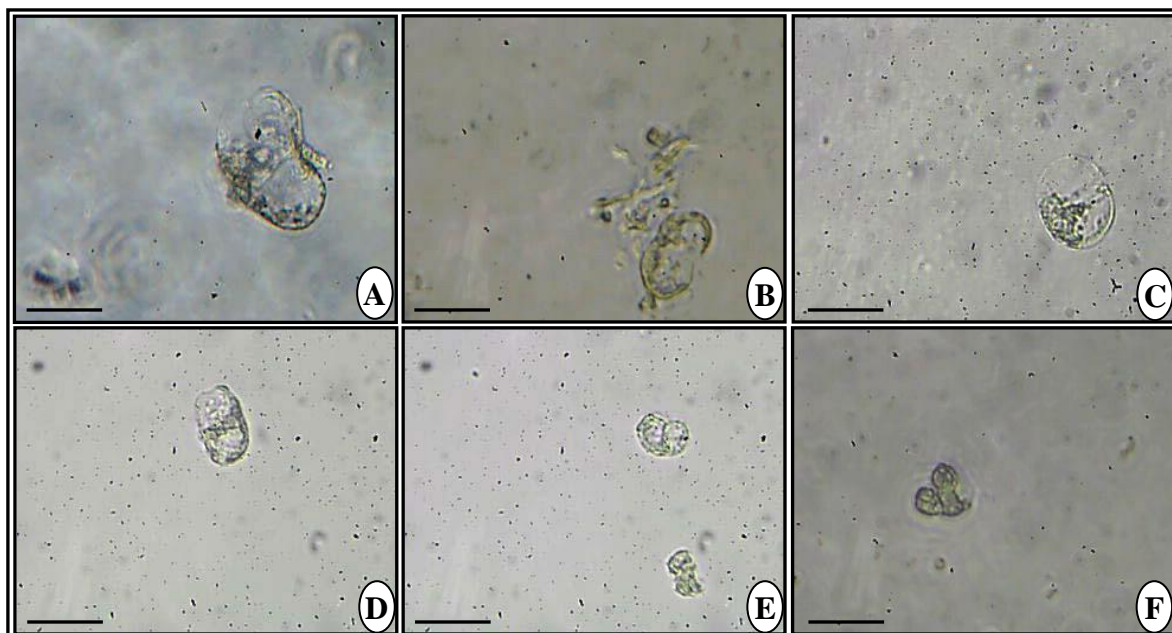
Sur la BH N°1, les premières divisions se sont produites après 48 et 72 h de la mise en culture respectivement pour DN (Figure 3.31 : de A à G) et AK (Figure 3.32 : de A à C). Alors que les premières divisions cellulaires sur la BH N°2 et BH N°3 n'ont été observées qu'après plus de 4 jours de la mise en culture et ce pour les deux cultivars (Figure 3.31 : de K à N ; Figure 3.32 : de D à F). Ensuite, pour DN, la fréquence des divisions cellulaires a augmenté avec l'apparition des divisions secondaires après 3 jours sur la BH N°1 aboutissant à la formation de microcolonies de 3 à 5 cellules (Figure 3.31 : H et I). Or, pour les autres combinaisons, les divisions secondaires n'ont été observées qu'après plus de 10 jours de la mise en culture aboutissant, aussi à la formation des premières microcolonies de 3 à 4 cellules (Tableau 3.4).

Malgré que la majorité des divisions cellulaires aboutissent à des cellules de même taille, certaines d'entre elles donnent aussi naissance à des cellules de différentes tailles (Figure 3.31 : M et N). De plus, la majorité des divisions résultent de cellules ayant une bonne distribution du cytoplasme de part et d'autre du sillon de division cellulaire (Figure 3.31 : A, C, D, E, G, L et M ; Figure 3.32 : de A à E), et d'une manière générale, ce sont surtout les protoplastes qui présentent un diamètre plus ou moins petit qui donnent des cellules mitotiquement plus actives que ceux qui présentent de grands diamètres.



**Figure 3.31** : Effet de la balance hormonale du milieu de culture sur l'activité mitotique des cellules issues des protoplastes mis en culture du cultivar Deglet Nour.

**A** : DN-BH N°1-48H (Barre = 10,0  $\mu\text{m}$ ). **B** : DN-BH N°1-48H (Barre = 10,0  $\mu\text{m}$ ).  
**C** : DN-BH N°1-72H (Barre = 10,0  $\mu\text{m}$ ). **D** : DN-BH N°1-72H (Barre = 10,0  $\mu\text{m}$ ).  
**E** : DN-BH N°1-72H (Barre = 67,2  $\mu\text{m}$ ). **F** : DN- BH N°1-72H (Barre = 10,0  $\mu\text{m}$ ).  
**G** : DN-BH N°1-4 Jours (Barre = 10,0  $\mu\text{m}$ ). **H** : DN-BH N°1-4 Jours (Barre = 10,0  $\mu\text{m}$ ).  
**I** : DN-BH N°1-4 Jours (Barre = 10,0  $\mu\text{m}$ ). **J** : DN-BH N°1-5 Jours (Barre = 10,0  $\mu\text{m}$ ).  
**K** : DN-BH N°2-4 Jours (Barre = 10,0  $\mu\text{m}$ ). **L** : DN-BH N°2-10 Jours (Barre = 67,2  $\mu\text{m}$ ).  
**M** : DN-BH N°2-14 Jours (Barre = 67,2  $\mu\text{m}$ ). **N** : DN-BH N°3-4 Jours (Barre = 67,2  $\mu\text{m}$ ).



**Figure 3.32** : Effet de la balance hormonale du milieu de culture sur l'activité mitotique des cellules issues des protoplastes mis en culture du cultivar Akerbouch.

**A** : AK-BH N°1-72H (Barre = 10,0  $\mu\text{m}$ ). **B** : AK-BH N°1-72H (Barre = 10,0  $\mu\text{m}$ ).  
**C** : AK-BH N°1-5 Jours (Barre = 10,0  $\mu\text{m}$ ). **D** : AK-BH N°2-4 Jours (Barre = 10,0  $\mu\text{m}$ ).  
**E** : AK-BH N°2-4 Jours (Barre = 67,2  $\mu\text{m}$ ). **F** : AK- BH N°3-4 Jours (Barre = 67,2  $\mu\text{m}$ ).

**Tableau 3.4** : Durées relatives à l'apparition de la première division et de la première microcolonie à partir de la culture des protoplastes de deux cultivars du palmier dattier sur les différentes balances hormonales.

Cultivar	Balance hormonale	Apparition de la première division (Jours)	Apparition de la première microcolonie (Jours)
Deglet Nour	BH N°1	2	> 3
	BH N°2	> 4	> 8
	BH N°3	> 4	> 10
Akerbouch	BH N°1	3	> 10
	BH N°2	> 4	> 15
	BH N°3	> 4	> 15

### 3.3.4. Formation des microcolonies et des microcals

Les microcolonies formées d'au moins deux cellules qui ne sont visibles que sous microscope, sont le résultat de plusieurs divisions successives. Cependant, les microcals sont d'une plus grande taille et sont visibles à l'œil nu.

Chez le cultivar DN, les premières microcolonies de 3 à 5 cellules ont été observées sur la BH N°1 après plus de 3 jours de culture (Figure 3.33 : A). Néanmoins, après 12 à 15 jours de culture on a observé des microcolonies de plusieurs cellules de forme sphérique (Figure 3.33 : B, C et D). Les premières microcolonies de 3 à 4 cellules n'ont été observée sur la BH N°2 et BH N°3, qu'après plus de 8 et 10 jours de culture respectivement (Figure 3.33 : I et K).

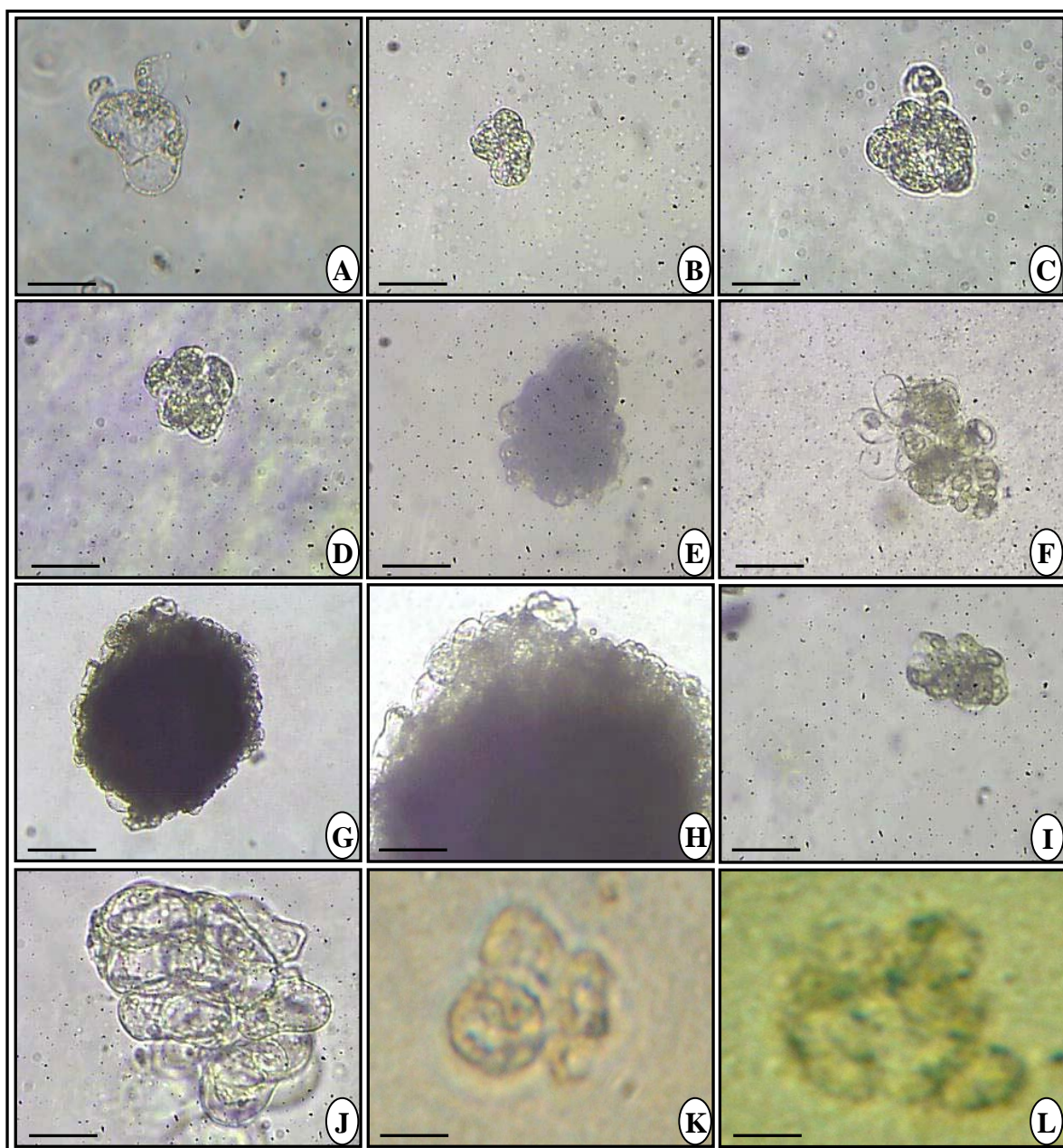
Le nombre de divisions rapporté aux protoplastes après un mois de culture n'est pas élevé vu le faible nombre de cellules qui constituent les microcolonies (Figure 3.33 : J et L). Cependant, les microcolonies observées au-delà de 40 jours de culture sont constituées d'un plus grand nombre de cellules fortement agrégées (Figure 3.33 : E et F). Après plus de 2 mois de culture (74 jours) les microcolonies sur la BH N°1 et BH N°2 évoluent vers des microcals visibles à l'œil nu (Figure 3.33 : G et H). Certaines microcolonies sont constituées de différents types de cellules soit à cytoplasme dense vers le centre (Figure 3.33 : F) soit avec un cytoplasme bien réparti dans l'espace intracellulaire (Figure 3.33 : J).

Chez le cultivar AK, les premières microcolonies de 3 à 4 cellules en moyen n'ont été observées sur la BH N°1 qu'après plus de 10 jours de la mise en culture (Figure 3.34 : A et B). En fait, il y a eu formation de deux types de microcolonies : celles constituées de cellules avec un cytoplasme dense (Figure 3.34 : C, E, F et I) et celles constituées de cellules avec un cytoplasme condensé dans la zone centrale (Figure 3.34 : D, J et L). De plus, certaines microcolonies sont caractérisées par un nombre faible de cellules (Figure 3.34 : D, J et L) alors que d'autres par un grand nombre de cellules (Figure 3.34 : C, E, F et I). Toutefois, certaines microcolonies sont d'un aspect plus ou moins

dispersé car elles contiennent une zone intérieure presque transparente ou avec très peu de cellules ou bien constituées de cellules à cytoplasme moins dense ce qui donne à la microcolonie l'aspect d'un anneau (Figure 3.36 : E). D'autres part, certaines microcolonies présentent une structure élancée ou allongée avec des cellules périphériques qui ont une tendance à se détacher (Figure 3.34 : E).

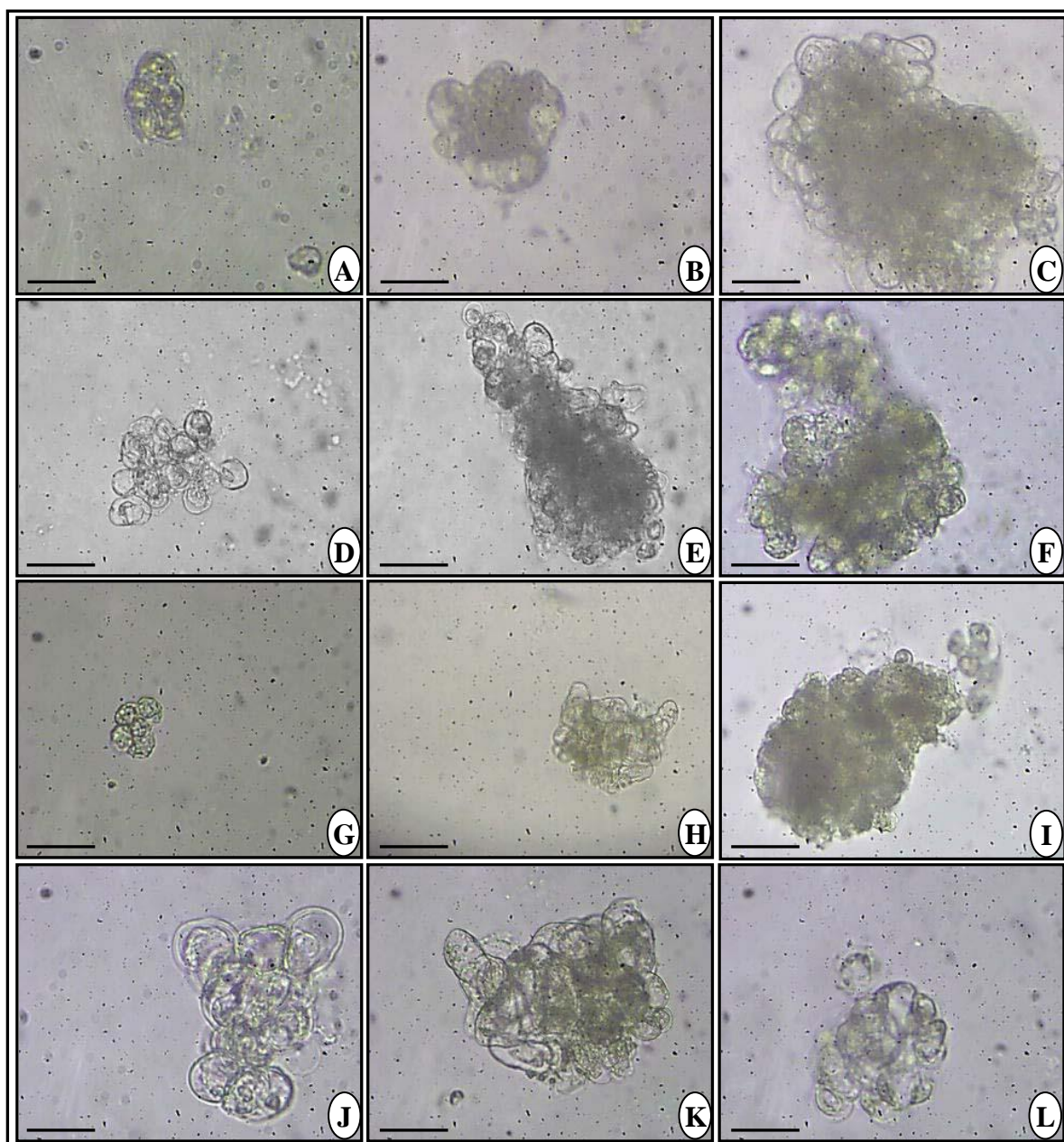
Généralement, ce sont les cellules de la périphérie de la microcolonie qui présentent un cytoplasme clair et peu dense ; ces cellules ont une tendance à se détacher de la microcolonie à laquelle elles appartiennent (Figure 3.34 : E et K). Néanmoins, les microcolonies qui se sont développées au fond des boîtes ou incluses dans le milieu de culture présentent des cellules à cytoplasme dense sans cellules qui tendent à se détacher (Figure 3.34 : F et I). Après plus de 2 mois de culture l'évolution de ces microcolonies aboutit à la formation de microcals visibles à l'œil nu. En présence de la BH N°2 et BH N°3 les premières microcolonies n'ont été observées qu'après plus de 15 jours de culture (Figure 3.34 : G et H). D'une manière générale, ce sont les microcolonies du cultivar DN qui contiennent plus de cellules que celles du cultivar AK.





**Figure 3.33** : Effet de la balance hormonale du milieu de culture sur l'activité mitotique des cellules et la formation de microcolonies à partir des protoplastes du cultivar Deglet Nour.

**A** : DN-BH N°1-4 Jours (Barre = 10,0  $\mu\text{m}$ ).      **B** : DN-BH N°1-12 Jours (Barre = 67,2  $\mu\text{m}$ ).      **C** : DN-BH N°1-12 Jours (Barre = 67,2  $\mu\text{m}$ ).      **D** : DN-BH N°1-15 Jours (Barre = 67,2  $\mu\text{m}$ ).      **E** : DN-BH N°1-39 Jours (Barre = 128,3  $\mu\text{m}$ ).      **F** : DN-BH N°1-41 Jours (Barre = 128,3  $\mu\text{m}$ ).      **G** : DN-BH N°1-74 Jours (Barre = 128,3  $\mu\text{m}$ ).      **H** : DN-BH N°1-74 Jours (Détail de **G**) (Barre = 67,2  $\mu\text{m}$ ).      **I** : DN-BH N°2-14 Jours (Barre = 67,2  $\mu\text{m}$ ).      **J** : DN-BH N°2-25 Jours (Barre = 10,0  $\mu\text{m}$ ).      **K** : DN-BH N°3-15 Jours (Barre = 10,0  $\mu\text{m}$ ).      **L** : DN-BH N°3-30 Jours (Barre = 10,0  $\mu\text{m}$ ).



**Figure 3.34** : Effet de la balance hormonale du milieu de culture sur l'activité mitotique des cellules et la formation de microcolonies à partir des protoplastes du cultivar Akerbouch.

**A** : AK-BH N°1-12 Jours (Barre = 67,2  $\mu\text{m}$ ). **B** : AK-BH N°1-15 Jours (Barre = 67,2  $\mu\text{m}$ ). **C** : AK-BH N°1-39 Jours (Barre = 67,2  $\mu\text{m}$ ). **D** : AK-BH N°1-41 Jours (Barre = 128,3  $\mu\text{m}$ ). **E** : AK-BH N°1-41 Jours (Barre = 67,2  $\mu\text{m}$ ). **F** : AK-BH N°1-41 Jours (Barre = 67,2  $\mu\text{m}$ ). **G** : AK-BH N°2-14 Jours (Barre = 67,2  $\mu\text{m}$ ). **H** : AK-BH N°2-14 Jours (Barre = 128,3  $\mu\text{m}$ ). **I** : AK-BH N°2-21 Jours (Barre = 67,2  $\mu\text{m}$ ). **J** : AK-BH N°2-21 Jours (Barre = 67,2  $\mu\text{m}$ ). **K** : AK-BH N°2-21 Jours (Barre = 67,2  $\mu\text{m}$ ). **L** : AK-BH N°2-21 Jours (Barre = 67,2  $\mu\text{m}$ ).

### 3.3.5. Taille et structure des microcolonies et des microcals

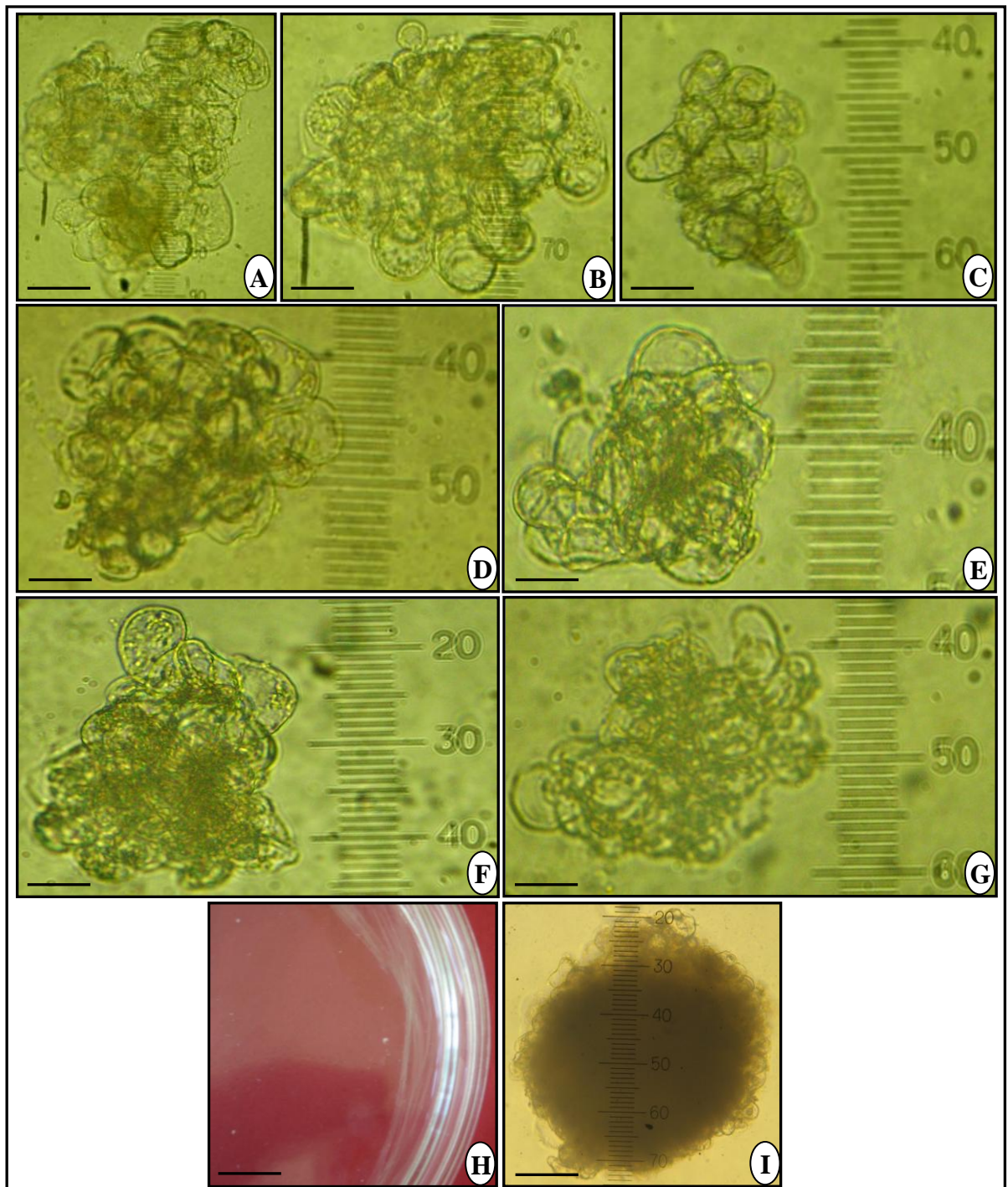
Après plus de deux mois de culture, les microcolonies évoluent en microcals visibles à l'œil nu. Néanmoins, d'autres montrent une petite taille vu le faible nombre de cellules qui les constituent. A ce stade, ce sont les cellules issues de protoplastes de DN et AK cultivés sur la BH N°1 qui donnent plus de microcolonies que ceux cultivés sur la BH N°2. De même, chez DN ce sont les microcolonies développées sur la BH N°1 qui sont constituées d'un plus grand nombre de cellules (Figure 3.35 : A, B, C, D et I) ce qui explique, leur diamètre moyen plus élevé que celui des microcolonies développées sur la BH N°2 (Figure 3.35 : de E à G) (Tableau 3.5). Cependant, chez AK ce sont les microcolonies développées sur la BH N°2 qui présentent plus de cellules et un grand diamètre (Figure 3.36 : de G à I) que celles développées sur la BH N°1 (Figure 3.36 : de A à F ; J et K). Sur la BH N°3, la totalité des cellules issues de protoplastes pendant les premiers 15 jours n'ont pas persisté suite à l'addition du milieu de culture neuf. Elles finissent généralement par éclater.

D'une manière générale, les microcolonies qui proviennent des protoplastes de DN présentent une structure plus ou moins compacte que celles provenant des protoplastes de AK dont les cellules présentent un cytoplasme faiblement dense. De plus, ce sont les microcolonies de DN cultivées en présence de la BH N°1 qui ont abouti à la formation de microcals visibles à l'œil nu (Figure 3.35 : H). Leur diamètre est supérieur à 0,5 mm (Figure 3.35 : I).

**Tableau 3.5 :** Nombre moyen, diamètre moyen et nombre moyen de cellules des microcolonies développées sur les différentes balances hormonales à partir des protoplastes de deux cultivars du palmier dattier (DN et AK).

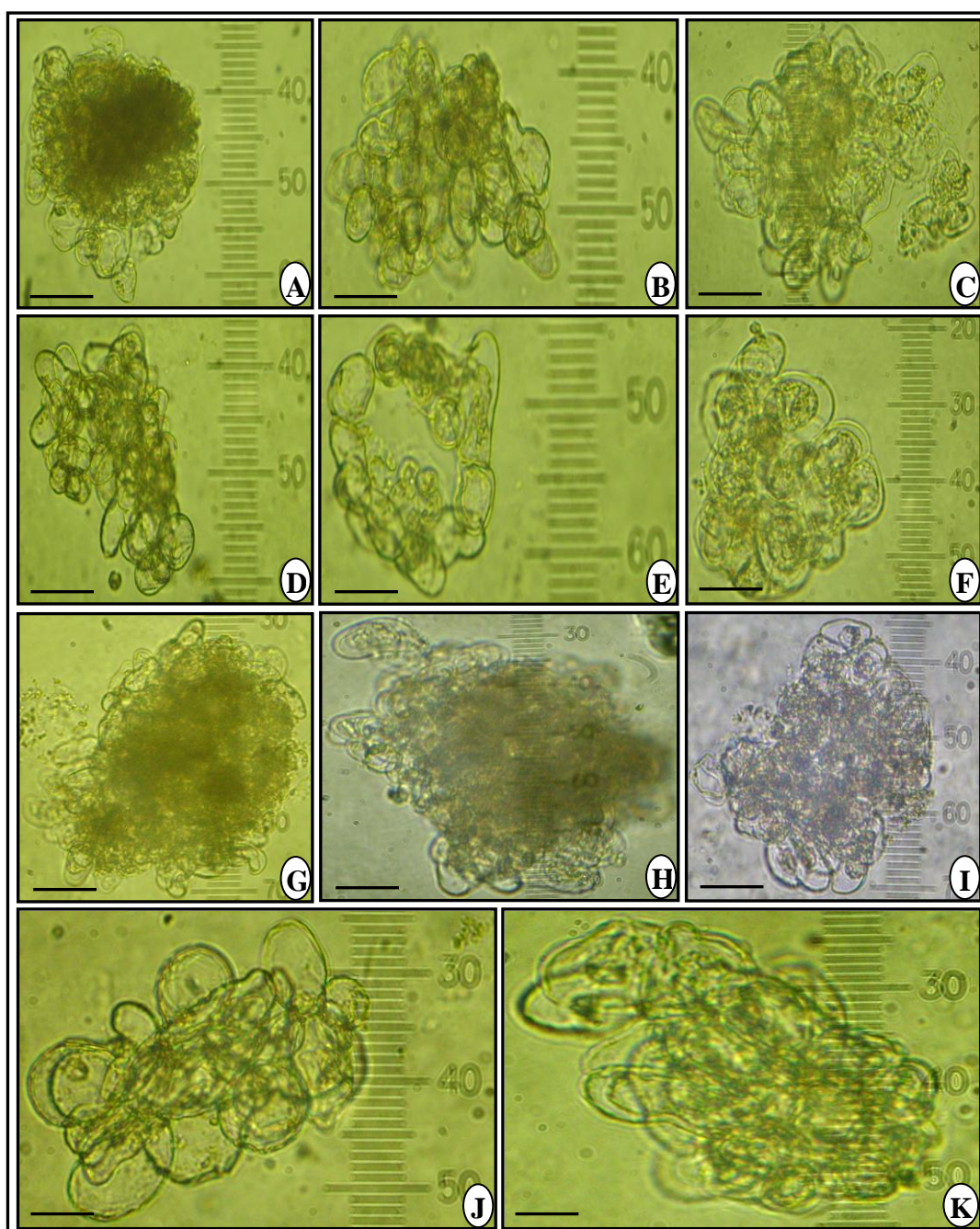
Cultivar	Balance hormonale	Nombre moyen de microcolonies / boîte	Diamètre moyen des microcolonies (mm)	Nombre moyen de cellules / microcolonie
Deglet Nour	BH N°1	10	0,2	31
	BH N°2	5	0,1	20
	BH N°3	0	0	0
Akerbouch	BH N°1	9	0,1	27
	BH N°2	7	0,2	32
	BH N°3	0	0	0





**Figure 3.35** : Effet de la balance hormonale du milieu de culture sur la formation de microcolonies et de microcalls à partir des protoplastes du cultivar Deglet Nour.

**A** : DN-BH N°1-74 Jours (Barre = 31,7  $\mu\text{m}$ ). **B** : DN-BH N°1-74 Jours (Barre = 22,4  $\mu\text{m}$ ). **C** : DN-BH N°1-74 Jours (Barre = 30,4  $\mu\text{m}$ ). **D** : DN-BH N°1-74 Jours (Barre = 12,2  $\mu\text{m}$ ). **E** : DN-BH N°2-74 Jours (Barre = 20,8  $\mu\text{m}$ ). **F** : DN-BH N°2-74 Jours (Barre = 30,3  $\mu\text{m}$ ). **G** : DN- BH N°2-74 Jours (Barre = 29,7  $\mu\text{m}$ ). **H** : DN-BH N°1-74 Jours (Barre = 1,4 cm). **I** : DN-BH N°1-74 Jours (Barre = 94,8  $\mu\text{m}$ ).



**Figure 3.36** : Effet de la balance hormonale du milieu de culture sur la formation de microcolonies et de microcalls à partir des protoplastes mis en culture du cultivar Akerbouch.

**A** : AK-BH N°1-74 Jours (Barre = 43,8  $\mu\text{m}$ ). **B** : AK-BH N°1-74 Jours (Barre = 34,4  $\mu\text{m}$ ). **C** : AK-BH N°1-74 Jours (Barre = 32,4  $\mu\text{m}$ ). **D** : AK-BH N°1-74 Jours (Barre = 40,5  $\mu\text{m}$ ). **E** : AK-BH N°1-74 Jours (Barre = 28,6  $\mu\text{m}$ ). **F** : AK-BH N°1-74 Jours (Barre = 24,7  $\mu\text{m}$ ). **G** : AK-BH N°2-74 Jours (Barre = 37,1  $\mu\text{m}$ ). **H** : AK-BH N°2-74 Jours (Barre = 29,6  $\mu\text{m}$ ). **I** : AK-BH N°2-74 Jours (Barre = 46,0  $\mu\text{m}$ ). **J** : AK-BH N°2-74 Jours (Barre = 15,4  $\mu\text{m}$ ). **K** : AK-BH N°2-74 Jours (Barre = 15,8  $\mu\text{m}$ ).

### 3.3.6. Conclusion partielle

A travers cette deuxième étape du travail (Culture des protoplastes isolés à partir des cals nodulaires de deux cultivars du palmier dattier) nous pouvons conclure :

❖ Chez Deglet Nour, une bonne maintenance de la viabilité des protoplastes mis en culture (46,4 % après 15 jours de la mise en culture) ainsi qu'un bon allongement (43,6 %) et une bonne division (17,5 %) ont été obtenus sur un milieu de culture contenant plus de 2,4-D (2 mg/l) que de BAP (0,5 mg/l). Néanmoins, une balance hormonale contenant moins de 2,4-D (1 mg/l) et moins de BAP (0,5 mg/l) aboutit à une diminution plus ou moins forte (22,1 %) de la viabilité des protoplastes et, par conséquent, une faible régénération de la paroi (22,1 %) et une faible fréquence de division (5,9 %). De plus, la viabilité des protoplastes mis en culture sur un milieu avec une très faible teneur en 2,4-D (0,5 mg/l) et une forte teneur en BAP (1 mg/l) diminue fortement (18,2 %) et, par conséquent, les plus faibles taux d'allongement (15,7 %) et de division (1,6 %).

❖ Alors que chez Akerbouch, la viabilité des protoplastes mis en culture diminue fortement (20,0 % après 15 jours de la mise en culture) accompagnée d'un faible taux d'allongement (18 %) et une faible fréquence de division (2,8 %) et ce sur un milieu de culture contenant plus de 2,4-D (2 mg/l) que de BAP (0,5 mg/l). De plus, une balance hormonale contenant moins de 2,4-D (1 mg/l) et moins de BAP (0,5 mg/l) aboutit à une forte diminution de la viabilité des protoplastes (10,6 %) et, par conséquent, une très faible régénération de la paroi (6,2 %) et très une faible fréquence de division (1,5 %). Or, la forte diminution de viabilité des protoplastes mis en culture (5,8 %) a été obtenue sur un milieu avec une très faible teneur en 2,4-D (0,5 mg/l) et une forte teneur en BAP (1 mg/l) ce qui a induit, directement, les plus faibles taux d'allongement (4,5 %) et de division (0,5 %) des protoplastes.



❖ Une balance hormonale contenant 2 mg/l de 2,4-D et 0,5 mg/l de BAP a permis une régénération rapide de la paroi cellulaire qui s'est traduit par une entrée en division rapide des protoplastes (après 2 à 3 jours de la mise en culture) aboutissant, après plusieurs divisions successives, à la formation de plusieurs microcolonies de taille plus ou moins grande. Alors que sur les deux autres balances hormonales testées l'entrée en division ne s'est traduite qu'après plus de 4 jours de la mise en culture avec une faible formation de microcolonies de taille réduite sur la BH N°2 et nulle sur la BH N°3.

### 3.4. Conclusion générale des résultats obtenus

A travers cette expérimentation consistant à l'isolement des protoplastes à partir des cals nodulaires des trois cultivars du palmier dattier tout en essayant de les purifiés afin de les cultivés nous pouvons conclure ce qui suit :

#### ❖ Isolement des protoplastes

L'obtention d'un bon rendement en protoplastes viables à partir des cals nodulaires du cultivar Deglet Nour et Degla Beïda (respectivement 4,67 et 4,17 x 10<sup>5</sup> protoplastes / gmf) nécessite l'application d'une solution enzymatique (SE N°1), moyennement concentrée en Cellulase (1,5 %) et fortement concentrée en Macérozyme (1 %), sous une concentration de 0,5 M de mannitol et pendant 16 heures de macération, respectivement, sous conditions d'agitation (50 rpm) et stationnaires. Néanmoins, l'obtention de protoplastes présentant une bonne viabilité chez Deglet Nour (78,9 %) requiert la présence de 0,4 M de mannitol sous 50 rpm d'agitation contrairement à Degla Beïda qui nécessite la présence de 0,5 M de mannitol dans la solution enzymatique pour avoir une bonne viabilité (56,5 %). Toutefois, chez le cultivar Akerbouch, un bon rendement en protoplastes viables (4,92 x 10<sup>5</sup> protoplastes / gmf) a été obtenu sous l'action de la même solution enzymatique (SE N°1) mais en présence de 0,6 M de mannitol pendant 16 heures de macération sous 50 rpm d'agitation. De même, une bonne viabilité (65,6 %) nécessite 0,4 M de mannitol sous agitation à 50 rpm.

#### ❖ Purification des protoplastes

Une bonne purification des protoplastes libérés à partir des cals nodulaires de Deglet Nour et de Degla Beïda peut être obtenue avec une couche de 25 % de saccharose, qui permet de diminuer les pertes en protoplastes ; alors que pour le cultivar Akerbouch, une couche de 21 % de saccharose suffit pour purifier et minimiser par conséquent la perte en protoplastes.

### ❖ Culture des protoplastes

La culture des protoplastes de deux cultivars du palmier dattier (Deglet Nour et Akerbouch) sur un milieu de culture contenant 0,3 % d'agarose et une balance hormonale composée de 2 mg/l de 2,4-D et 0,5 mg/l de BAP permet une bonne maintenance de la viabilité des protoplastes mis en culture (respectivement 46,4 et 20 % après 15 jours de la mise en culture) ainsi qu'un bon allongement (43,6 et 18 %) et une bonne division (17,5 et 2,8 %). Néanmoins, une balance hormonale contenant moins de 2,4-D (1 mg/l) et moins de BAP (0,5 mg/l) aboutit à une diminution plus ou moins forte (22,1 et 10,6 %) de la viabilité des protoplastes et, par conséquent, une faible régénération de la paroi (22,1 et 6,2 %) et une très faible fréquence de division (5,9 et 1,5 %). De plus, la viabilité des protoplastes mis en culture sur un milieu avec une très faible teneur en 2,4-D (0,5 mg/l) et une forte teneur en BAP (1 mg/l) diminue fortement (18,2 et 5,8 %) et, par conséquent, les plus faibles taux d'allongement (15,7 et 4,5 %) et de division (1,6 et 0,5 %).

La BH N°1 (2 mg/l de 2,4-D et 0,5 mg/l de BAP) a permis une régénération rapide de la paroi cellulaire des protoplastes ce qui s'est traduit par une entrée en division précoce (après 2 à 3 jours de la mise en culture) aboutissant, après plusieurs divisions successives, à la formation de plusieurs microcolonies de taille plus ou moins grande. Alors que sur les deux autres balances hormonales testées l'entrée en division ne s'est traduite qu'après plus de 4 jours de la mise en culture avec une faible formation de microcolonies de taille réduite.

*DISCUSSION DES RÉSULTATS*  
*EXPÉRIMENTAUX*

## **CHAPITRE 4**

### **DISCUSSION DES RÉSULTAS EXPÉRIMENTAUX**

#### 4.1. Isolement des protoplastes

Durant cette première étape de l'expérimentation, l'effet de plusieurs facteurs (solution enzymatique, concentration du mannitol, durée et mode de macération) a été étudié afin d'optimiser l'isolement d'un grand nombre de protoplastes viables à partir des cals nodulaires des trois cultivars (Deglet Nour, Akerbouch et Degla Beïda) du palmier dattier.

##### 4.1.1. Effet de la solution enzymatique

Le rendement en protoplastes est significativement influencé par la composition de la solution enzymatique. Une formule enzymatique efficace doit être capable de libérer les protoplastes avec une efficacité élevée sans compromettre leur viabilité [99,83]. Nos résultats indiquent que la solution enzymatique influence fortement le nombre et la viabilité des protoplastes libérés. La SE N°1 moyennement concentrée, composée de 1,5 % de Cellulase et 1 % de Macérozyme, permet, sous agitation à 50 rpm, d'isoler  $8,67 \times 10^5$  protoplastes/gmf dont  $4,67 \times 10^5$  protoplastes/gmf sont viables, soit 53,3 % de viabilité, chez DN alors que chez DB elle permet, sous une incubation stationnaire, d'isoler  $4,50 \times 10^5$  protoplastes/gmf dont  $2,50 \times 10^5$  protoplastes/gmf sont viables, soit 56,5 % de viabilité. Cependant, chez AK c'est la SE N°2 faiblement concentrée, composée de 1 % de Cellulase et 0,2 % de Macérozyme, sous conditions stationnaires qui favorise l'isolement de  $3,08 \times 10^5$  protoplastes/gmf dont  $1,42 \times 10^5$  protoplastes/gmf sont viables, soit 45,9 % de viabilité.

Une solution enzymatique composée de 1 % de Cellulase Onozuka R-10, 0,2 % de Macérozyme R10 a permis selon GABR et TISSERAT [124]



d'avoir, après 24 heures d'incubation sous obscurité et sans agitation, un rendement de  $1,70 \times 10^5$  protoplastes/ml à partir des cals du palmier dattier (DN). Nos résultats sont supérieurs :  $4,00 \times 10^5$  protoplastes/gmf ( $2,40 \times 10^5$  protoplastes/ml viables) avec la SE N°2 sans agitation et  $0,89 \times 10^5$  protoplastes/gmf ( $0,6 \times 10^5$  protoplastes/ml viables) avec l'agitation à 50 rpm. La différence serait en relation avec le matériel végétal utilisé. En effet, CHABANE [3] a trouvé qu'une solution enzymatique contenant 1,5 % de Cellulase RS, 0,15 % de Pectolyase et 0,2 % d'Hémicellulase est la combinaison la plus efficace pour isoler les protoplastes à partir des cals et feuilles de deux cultivars de palmier dattier (DN et TK) dont les meilleurs rendements obtenus sont avec les cals nodulaires de DN avec  $5,6 \times 10^5$  protoplastes/gmf et  $4,95 \times 10^5$  protoplastes/gmf chez TK ; et  $3,9 \times 10^5$  protoplastes/gmf pour DN et  $3,25 \times 10^5$  protoplastes/gmf pour TK en utilisant les cals friables. Ces rendements sont nettement supérieurs aux nôtres ; ceci serait dû à la présence de l'Hémicellulase dans la solution enzymatique utilisée, par CHABANE [3] et qui est susceptible d'améliorer les rendements.

Selon ZHU et al [131] le rendement en protoplastes à partir des cals d'*Echinacea* augmente avec l'élévation de la concentration en Cellulase jusqu'à 2 %. Avec 2,5 % l'effet inverse est observé en plus d'un effet néfaste sur l'intégrité membranaire. Nos résultats corroborent ces résultats, car nous avons constaté que le rendement en protoplastes viables chez le cultivar DN et DB augmente avec la concentration de la Cellulase dans la solution enzymatique, il chute ensuite lorsque celle-ci dépasse 1,5 % (meilleure concentration). Cependant, la concentration de 1 % s'est avérée la meilleure pour AK ( $1,42 \times 10^5$  protoplastes/gmf). Par ailleurs, la viabilité des protoplastes isolés à partir des cals des trois cultivars diminue avec l'augmentation de la concentration des enzymes dans la solution de macération ce qui est confirmé par ZHUN et al [132] indiquant que le rendement en protoplastes à partir des cals du peuplier augmente, généralement, avec l'augmentation de la concentration des enzymes, mais un excès d'enzymes cause une diminution de la viabilité des protoplastes isolés [95].

Nos résultats vont également dans le même sens que ceux de EHSANPOUR et JONES [94] qui indiquent que les fortes concentrations enzymatiques permettent de libérer plus de protoplastes chez la pomme de terre mais avec un taux de viabilité faible ; suggérant, ainsi, un effet de toxicité enzymatique. En effet, HOU et JIA [133] ont trouvé que lorsque la concentration de la Cellulase diminue à 1 % ou augmente à 3 % le rendement et la viabilité des protoplastes des cals friables d'*Astragalus* diminuent. Ces résultats concordent nettement avec les nôtres pour DN et DB pour qui les meilleurs résultats sont obtenus avec 1,5 % de Cellulase. Dans ce même contexte, MAJEWSKA-SAWKA et al [134] indiquent que les solutions enzymatiques peuvent être classées en deux groupes : celles à forte activité causant une libération rapide des protoplastes mais aussi des dommages membranaires fréquents ; contrairement à celles agissant lentement, produisant des rendements faibles avec préservation des membranes plasmiques.

#### 4.1.2. Effet du type et pureté des enzymes utilisées

L'activité enzymatique a été rapportée comme étant un des facteurs déterminant de l'obtention des protoplastes. Les auteurs se limitent à citer l'origine ou les valeurs théoriques indiquées par les fournisseurs [68].

Les Cellulases contiennent divers composés agissant en synergie pour transformer la cellulose en sucres solubles par hydrolyse des liaisons  $\beta$ , 1-4 glycosidiques [68,135]. Ces auteurs ont trouvé que la Cellulase RS dérivant de *Trichoderma reesei* (mutant de *Trichoderma viride*) est meilleure que la Cellulase R10 produite par *Trichoderma viride* pour l'isolement de protoplastes du prunier. Ceci est du fait que la Cellulase RS contient 6,6 unités/mg, alors que la Cellulase R10 contient 1,3 unités/mg dont chaque unité enzymatique cellulasique représente la quantité d'enzyme qui libère 1  $\mu$ M de glucose à partir de cellulose dans 1 h de temps à pH 5,0 à 37°C [87]. De même, AZAD et al [136] indiquent que l'isolement des protoplastes des espèces ligneuses incluent la Cellulase RS plutôt que la Cellulase R10, vu son importante activité cellulasique.

Dans le cas du palmier dattier, GABR et TISSERAT [124], en comparant l'effet de plusieurs types de Cellulases sur l'isolement des protoplastes des cals de DN, ont trouvé que la Cellulase Onozuka R10 montre le même effet que la Cellulysine et la Driselase. Dans notre cas nous avons utilisé la Cellulase, issue du *Trichoderma longibrachiatum*, contenant 0,61 unités/mg ce qui indique une activité enzymatique beaucoup plus faible par rapport à la Cellulase R10 ou RS. CHABANE [3] a obtenu ses meilleurs rendements en protoplastes du palmier dattier avec l'utilisation de la Cellulase RS dans la solution enzymatique.

COMMUN et al [76] ont observé que le remplacement de la Cellulase RS par la Cellulase Fluka provoque une forte accumulation d'une phytoalexine "résvérol" qui peut contribuer à la perte de la viabilité des protoplastes. LYON et MAYO [137] indiquent que la "Rishitine", qui est une phytoalexine, affecte directement ou indirectement la perméabilité de la membrane plasmique des protoplastes du tabac en causant une perte presque immédiate et continue des ions à partir des protoplastes ; phénomène qui se traduit par une diminution de leur viabilité après 24 h d'incubation.

Dans notre cas, la Cellulase utilisée est produite par le laboratoire Fluka, ce qui amène à penser qu'elle a induit la synthèse de phytoalexines lors de l'isolement des protoplastes des cals du palmier dattier. De plus, les phytoalexines sont des métabolites assez répandus dans les tissus du palmier dattier cultivés *in vitro* [14].

MEHRI-KAMOUN et al [68,136] indiquent que la Pectolyase Y23 (enzyme hautement purifiée d'*Aspergillus japonicus*) est beaucoup plus intéressante que la Macérozyme R10 (isolée de *Rhizopus* sp.) pour l'isolement des protoplastes du prunier. Dans notre cas, nous avons utilisé la Macérozyme R10 comme pectinase, contenant 0,54 unités/mg ce qui indique une activité enzymatique beaucoup plus faible par rapport à la Pectolyase Y23. Les meilleurs résultats obtenus par CHABANE [3] sont certainement dus à l'utilisation de la Pectolyase Y23 comme pectinase. Malgré que MEHRI-KAMOUN et al [68,62] indiquent que l'isolement des protoplastes à partir des

cals ne nécessite pas des préparations enzymatiques présentant des activités spécifiques élevées (Cellulase RS et Pectolyase Y23).

Par ailleurs, la pureté des enzymes est un facteur important à prendre en compte dans l'isolement des protoplastes ; car selon MEHRI-KAMOUN et al [136] les préparations enzymatiques commerciales possèdent des activités secondaires permettant la lyse complète de la paroi cellulaire, en plus de certaines impuretés parfois toxiques. Ces activités secondaires et impuretés peuvent influencer l'obtention des protoplastes. D'où la nécessité, parfois, de les purifiées ou de les dessalées afin d'augmenter le rendement et surtout la viabilité des protoplastes isolés. C'est la raison pour laquelle, ZHU et al [131] chauffent la solution enzymatique contenant la Cellulase, l'Hémicellulase et la Pectinase à 55°C pour inactiver les protéases néfastes et améliorer la solubilité des enzymes.

#### 4.1.3. Effet de la concentration de l'agent osmotique (mannitol) pendant la macération

La concentration de l'agent osmotique dans la solution d'isolement des protoplastes varie en fonction de l'espèce et particulièrement la source des protoplastes. Pour les feuilles, cals et suspension cellulaire du palmier dattier CHABANE [3] a utilisé une concentration de 0,5 M de mannitol, alors que RIZKALLA et al [126] ont utilisé le saccharose à 0,4 M comme agent osmotique. Cependant, GABR et TISSERAT [124] ont trouvé que la meilleure concentration de l'agent osmotique pour les cals du palmier dattier (DN) est de 0,35 M de saccharose permettant d'obtenir  $1,7 \times 10^5$  protoplastes/ml.

De même, dans notre cas, la concentration du mannitol dans la solution enzymatique influence fortement le nombre et la viabilité des protoplastes libérés. Une concentration moyenne de 0,5 M a permis, sous 50 rpm d'agitation, d'isoler  $4,67 \times 10^5$  protoplastes/gmf viables, avec 53,3 % de viabilité, chez DN alors que chez DB elle a permis, sous incubation stationnaire, d'isoler  $2,50 \times 10^5$  protoplastes/gmf viables, avec 56,5 % de viabilité.

Cependant, chez AK c'est la concentration la plus élevée parmi celles testées (0,6 M) sous 50 rpm d'agitation qui a permis l'isolement de  $4,92 \times 10^5$  protoplastes/gmf viables, représentant 48,8 % de viabilité. Donc, on peut dire que l'isolement de protoplastes à partir de cals du palmier dattier nécessite une concentration d'agent osmotique dans la solution de macération plus ou moins élevée (supérieure à 0,5 M) ; confirmant ainsi le choix et les résultats des auteurs précédents.

Selon ZHU et al [131] une concentration faible en mannitol mène à la réduction du rendement en protoplastes à partir des cals d'*Echinacea*, alors qu'une concentration élevée provoque un rétrécissement des protoplastes et, par conséquent, la diminution du nombre de protoplastes isolés. De même, ZHUN et al [132] ont trouvé que le rendement en protoplastes des cals de peuplier augmente avec l'augmentation de la concentration du sorbitol.

Ces résultats corroborent avec les nôtres car nous avons remarqué que le rendement en protoplastes viables, chez DN et DB, augmente avec l'élévation de la concentration du mannitol dans la solution de macération de 0,4 à 0,5 M ( $4,67$  et  $2,50 \times 10^5$  protoplastes/gmf pour DN et DB avec 0,5 M de mannitol) ensuite l'effet inverse est observé avec 0,6 M de mannitol. Avec AK, le rendement a été meilleur avec une concentration plus élevée (avec 0,6 M on a  $4,92 \times 10^5$  protoplastes/gmf).

Plusieurs auteurs ont trouvé que la meilleure viabilité et le meilleur rendement en protoplastes ne sont pas toujours donnés par la même concentration de l'agent osmotique. C'est le cas, par exemple, pour GUO et al [100] qui ont trouvé que le meilleur rendement en protoplastes de la suspension cellulaire du Ginger est obtenu avec 11 % de mannitol alors que la meilleure viabilité est obtenue avec 9 % de mannitol. Nos résultats concordent avec ceux-ci car les meilleurs taux de viabilité (78,9 et 65,6 %), chez DN et AK, ont été obtenus avec une concentration de 0,4 M de mannitol sous 50 rpm d'agitation qui a donné au contraire les mauvais rendements en protoplastes viables ( $1,08$  à  $2,17 \times 10^5$  et  $1,75$  à  $2,08 \times 10^5$  protoplastes/gmf). Toutefois, pour DB c'est

sous la concentration de 0,5 M en conditions stationnaires que le meilleur rendement et la meilleure viabilité ( $2,50 \times 10^5$  protoplastes/gmf et 56,5 %) ont été obtenus.

#### 4.1.4. Effet de la durée de macération

Selon AOYAGI [83] une durée d'incubation optimale est nécessaire pour un meilleur isolement des protoplastes. En effet, une durée courte aboutit à un faible rendement en protoplastes alors qu'une durée longue conduit à une diminution de la viabilité des protoplastes qui en résultent.

Chez le palmier dattier, et selon GABR et TISSERAT [124] une longue durée d'incubation peut avoir des effets néfastes sur la qualité des protoplastes isolés comme les fusions spontanées, aboutissant à la formation de structures protoplastiques géantes. De même, CHABANE et al [6] ont remarqué une diminution du rendement et de la viabilité des protoplastes des cals nodulaires des deux cultivars du palmier dattier (DN et TK) lorsque la durée d'incubation passe de 12 à 20 h. RIZKALLA et al [126] ont remarqué une diminution du rendement et de la viabilité des protoplastes foliaires de deux autres cultivars de palmier dattier (Barhée et Zaghloul) après 2 jours d'incubation.

Ces résultats ne corroborent pas avec ceux obtenus lors de notre expérimentation, car nous avons obtenu, sous conditions d'incubation stationnaire, les meilleurs rendements en protoplastes viables avec des durée plus ou moins longues de 16 h chez DN ( $2,17 \times 10^5$  protoplastes/gmf) et de 18 h chez DB ( $4,17 \times 10^5$  protoplastes/gmf) qui sont accompagnés des meilleures viabilités (47,8 % après 14 h pour DN et 67,6 % après 18 h pour DB). Néanmoins, pour AK le meilleur rendement et viabilité des protoplastes ont été obtenus après une courte durée de 8 h d'incubation ( $1,00 \times 10^5$  protoplastes/gmf et 66,7 %). Cette différence ne peut être attribuée qu'à la composition de la solution enzymatique utilisée et / ou à la nature histologique des cals source de protoplastes. Cependant, et d'une manière générale le rendement en protoplastes isolés augmente suivant la durée d'incubation alors

que leur viabilité diminue en avançant dans l'incubation de telle sorte que les meilleurs rendements sont obtenus après des durées plus ou moins longues alors que les meilleurs taux de viabilité sont obtenus après des durées plus ou moins courtes. Ceci est confirmé par LUO et JIA [138] et HOU et JIA [133] qui ont trouvé que le rendement en protoplastes à partir des cals d'*Astragalus* augmente avec une longue durée de macération alors que la viabilité a une tendance à diminuer.

La durée d'incubation varie en fonction du génotype au sein de la même espèce. Car CHABANE et al [6] ont trouvé que le meilleur temps d'incubation des cals des deux cultivars du palmier dattier (DN et TK) est de 12 h, alors que RIZKALLA et al [126] ont trouvé qu'une incubation pendant 2 jours est nécessaire pour avoir un bon rendement pour deux autres cultivars (Barhée et Zaghloul) de palmier dattier.

Dans notre cas la durée optimale a été de 16 à 18 h pour DN et DB alors qu'elle n'a été que de 8 h pour AK. Cette différence nous l'attribuons à la texture des cals qui diffère d'un cultivar à un autre ; du fait que les cals nodulaires de AK présentent une légère friabilité contrairement aux cals de DN et DB qui présentent, au contraire, une texture plus ou moins compacte avec une faible friabilité.

#### 4.1.5. Effet du mode de macération et de l'agitation pendant la macération enzymatique

Selon KIM et al [139] la libération des protoplastes à partir des cals nécessite une agitation moyenne allant de 20 à 60 rpm suivant l'espèce. Néanmoins, SINHA et al [140] et GEORGE [141] indiquent que l'importance de l'agitation vis-à-vis de l'isolement des protoplastes apparaît à la fin de l'incubation où elle permet la libération des protoplastes à partir des tissus digérés.

Toutefois, pour le palmier dattier, GABR et TISSERAT [124] indiquent que le meilleur rendement en protoplastes à partir des cals de DN a été obtenu sous incubation statique et non pas sous agitation (50 rpm et plus). De plus, ils indiquent que l'augmentation de l'agitation diminue les rendements en protoplastes et aboutit à des protoplastes de diamètre proportionnellement petit. Pour ceci, CHABANE et al [6] ont isolé les protoplastes de deux cultivars (TK et DN) du palmier dattier à partir des cals (friables et nodulaires) sous incubation stationnaire.

Ces résultats corroborent, en partie, avec les nôtres car nous avons noté un effet bénéfique de l'incubation sous agitation sur la vitesse de libération des protoplastes à partir des cals. Cet effet bénéfique peut être attribué au détachement, par action mécanique, des agrégats cellulaires facilitant, ainsi, l'action des enzymes de dégradation des parois cellulaires. Néanmoins, l'agitation provoque, à l'exception de l'agitation sous 50 rpm pour DN, une diminution du nombre de protoplastes viables par rapport à l'incubation stationnaire.

#### 4.1.6. Diamètres des protoplastes libérés

Le diamètre des protoplastes varie, non seulement d'une espèce à une autre, mais aussi suivant le génotype, tissu source, type et concentration des enzymes et de l'agent osmotique utilisés lors de leur isolement. C'est le cas chez le palmier dattier, car CHABANE [3] a trouvé que la taille des protoplastes du cultivar DN, sous 0,5 M de mannitol, varie entre 12 et 35  $\mu\text{m}$  alors qu'elle est entre 8 et 20  $\mu\text{m}$  chez le cultivar TK.

Ces résultats corroborent en partie avec les nôtres, où le diamètre des protoplastes, sous 0,5 M de mannitol, varie entre 13 et 25  $\mu\text{m}$  pour DN, entre 17 et 32  $\mu\text{m}$  pour AK et entre 13 et 28  $\mu\text{m}$  pour DB. Ce qui indique que c'est le cultivar AK qui présente des protoplastes de grande taille (24  $\mu\text{m}$ ) ensuite DN (21  $\mu\text{m}$ ) et en dernier DB (16  $\mu\text{m}$ ).



Ceci est peut être dû à une différence dans la texture des cals utilisés lors de notre expérimentation et ceux utilisés par CHABANE [3]. Car, les cals de DN et DB sont à texture nodulaire plus ou moins compacte alors qu'elle est plus ou moins friable chez AK. En fait, ZAID [1] et SANÉ et al [44] indiquent que la portion friable des cals est composée d'un grand nombre de cellules non méristématiques fortement vacuolisées avec un diamètre variant de 20 à 40  $\mu\text{m}$ . Ce tissu entoure généralement l'agrégat cellulaire composé de cellules à cytoplasme dense avec peu de vacuoles et un diamètre allant de 8 à 20  $\mu\text{m}$ . Leurs observations concordent avec ce que nous avons remarqué car les protoplastes de petite taille sont le plus souvent à cytoplasme dense alors que ceux à cytoplasme moins dense sont généralement à diamètre plus ou moins important. De plus, dans notre cas, c'est la solution enzymatique moins concentrée (SE N°2) qui a permis l'isolement de protoplastes à grand diamètre alors que les petits diamètres ont été obtenus avec des solutions enzymatiques plus concentrées (SE N°1 et SE N°3). Ceci est peut être dû au fait que les faibles concentrations enzymatiques de la SE N°2 n'ont pas pu accéder la zone interne des cals abritant les cellules méristématiques à petit diamètre en libérant uniquement les protoplastes des cellules périphériques à grand diamètre de la zone externe. Cependant, les solutions enzymatiques concentrées (SE N°1 et SE N°3) ont permis la libération de protoplastes de petit diamètre car elles ont pu acquérir les cellules de la zone interne des cals et libérer ainsi leurs protoplastes.

#### 4.1.7. Agglutination des protoplastes

L'agglutination cellulaire est observée, le plus souvent, chez les cellules animales. Cependant, elle a été observée chez les cellules végétales à l'état protoplastique. Plusieurs suggestions sont données pour expliquer ce phénomène. Parmi celles-ci, les lectines, qui sont des glycoprotéines spéciales produites par les plantes pour la défense contre les herbivores et les pathogènes, reconnaissent certains résidus glucidiques aux quels elles peuvent se lier en provoquant l'agglutination cellulaire. Plusieurs types de lectines ont été décrits chez les plantes, dont la majorité appartient au type  $\beta$  agglutinant [144].

Dans notre cas, l'agglutination a été observée beaucoup plus sous incubation stationnaire que sous 50 ou 100 rpm d'agitation. Ceci serait dû au fait que l'agitation permet l'augmentation de l'aération, la réduction de la polarité végétale, la distribution uniforme des nutriments et la dilution des exsudats toxiques [141]. De plus, sous conditions stationnaires les protoplastes restent à périphéries plus ou moins bien délimitées alors que sous 50 ou 100 rpm d'agitation des fusions ont été enregistrées. Ces fusions peuvent être expliquées par une dilution de la pression osmotique par l'agitation durant la macération car RENE [117] indique qu'en présence d'une faible pression osmotique dans le milieu, les protoplastes en cours de formation peuvent fusionner et il apparaît des cellules multinucléées.

#### 4.2. Purification des protoplastes

La concentration du saccharose dans la couche de purification des protoplastes varie, non seulement en fonction de l'espèce, mais beaucoup plus en fonction du tissu source de protoplastes (cals, feuilles, suspensions et autres). Généralement un coussin de 20 à 21 % de saccharose est le plus utilisé. Avec une centrifugation de 75 et 100 x g pendant 5 à 8 mn on accélère la formation du ménisque de protoplastes purifiés à la surface de la solution du saccharose [72,51,142].

Dans notre cas c'est la concentration de 25 % de saccharose qui nous a permis une bonne purification des protoplastes pour DN et DB, avec une bonne formation du ménisque des protoplastes. Toutefois, c'est la couche à 21 % qui s'est avérée bénéfique pour AK. Ceci peut être expliqué par la forte densité des protoplastes de DN et DB ce qui a nécessité plus de saccharose que dans le cas de AK qui a présenté, au contraire, des protoplastes à cytoplasme moins dense. De plus, cette densité du cytoplasme est liée aussi à la texture des cals utilisés comme source de protoplastes ; car ceux de DN et DB présentent une texture compacte alors que ceux de AK sont à texture plus ou moins friable. Cependant, la purification des protoplastes des cals de certaines espèces comme l'*Astragalus* nécessitant un coussin à faible concentration de

saccharose de 16 % [138,133] et 14 % pour les protoplastes des cals d'*Alstroemeria* [139]. Néanmoins, pour les protoplastes du palmier dattier, CHABANE et al [6] et RIZKALLA et al [126] ont utilisé la purification par filtration à travers des filtres.

De même, UMOH [143] a trouvé que la purification des protoplastes du sorgho par filtration permet moins de pertes que la purification par sédimentation sur un coussin de 20 % de saccharose. Il a eu 34 à 38 % de récupération de protoplastes avec la sédimentation sur saccharose. Il a suggéré que ces taux faibles de récupération sont dus au fait que les protoplastes sédimentent avec les débris lors de la centrifugation. Dans notre cas, nous avons eu des taux de récupération plus élevés (85 et 95 % chez DN et DB) avec 25 % de saccharose qu'avec 21 % (73 et 92 % chez DN et DB). Alors qu'avec AK c'est 21 % qui a permis moins de perte (13 %) que 25 % de saccharose (23 %). Cela peut être expliqué par la sédimentation des protoplastes de DN et DB avec 21 % de saccharose vu leur forte densité.

### 4.3. Culture des protoplastes

Durant cette deuxième étape du travail, nous avons essayé la culture des protoplastes de deux cultivars seulement (Deglet Nour et Akerbouch) sur des milieux de culture semi-solide contenant 0,3 % d'agarose. Seule, la balance hormonale a fait l'objet de variation, et ce, afin d'optimiser la régénération de la paroi ensuite l'entrée en division des cellules qui en dérivent pour obtenir des microcolonies et des microcals évoluant vers des cals. Pour ce faire, plusieurs paramètres (taux de viabilité, d'allongement et de division ainsi que la formation de microcolonies) ont été suivis pendant la durée de la culture.

#### 4.3.1. Viabilité des protoplastes pendant la culture

La viabilité initiale des protoplastes diminue avec la durée de culture [145]. Vu l'extrême sensibilité des protoplastes au choc osmotique et autres

perturbations physiques durant leur culture [146]. Cette diminution de la viabilité des protoplastes a été signalée par plusieurs auteurs.

CHABANE [3] indique que la viabilité des protoplastes du palmier dattier (DN et TK) après la mise en culture diminue également avec la durée de culture, la source des protoplastes, le système de culture et le génotype. Elle a trouvé que ce sont les protoplastes de DN qui ont montré un taux de viabilité plus élevé par rapport à ceux de TK après 10 jours de culture. Ses résultats rejoignent parfaitement les nôtres, car nous avons noté une forte diminution de la viabilité des protoplastes de AK que de DN, néanmoins suivant la balance hormonale appliquée. De même, CHABANE [3] indique que ce sont les protoplastes isolés de la suspension cellulaire qui ont montré une meilleure maintenance de la viabilité par rapport à ceux isolés des cals et des feuilles chez les deux cultivars.

WATANABE et al [147] ont remarqué un gonflement, une forte vacuolisation et, dans certains cas, une perte de l'intégrité membranaire chez les protoplastes du navet après deux jours de leur mise en culture ; ce qui se traduit par une diminution de la viabilité. Ces phénomènes sont, selon MORGAN et DREW [148] les symptômes de l'apoptose ou de la mort cellulaire programmée (PCD), similaire à celle observée chez les cellules animales avec peu de différences morphologiques, qui se produit en réponse aux signaux environnementaux.

Dans notre cas, nous avons remarqué une augmentation de la taille et une forte tendance au bourgeonnement et au gonflement chez les protoplastes mis en culture ; aboutissant à la formation de bourgeons transparents caractérisés par une grande vacuole en plus d'une forte condensation du cytoplasme vers un seul côté. Ces bourgeons, le plus souvent, subissent la lyse aboutissant à l'écoulement cytoplasmique. De ce fait, on peut dire que les protoplastes mis en culture sur un tel milieu de culture sont fortement soumis à l'apoptose cellulaire.

MATTOO et HANDA [149] indiquent que les auxines et les cytokinines induisent la biosynthèse de l'éthylène, impliqué dans la mort cellulaire, même à des niveaux faibles. Néanmoins, cette induction semble être liée à la présence de la lumière sous laquelle l'induction s'intensifie. Alors que BEYL [150] et GABA [151] indiquent que le 2,4-D n'induit la formation d'éthylène qu'à des niveaux élevés. Toutefois, sous nos conditions de culture, sous obscurité et faibles niveaux de régulateurs de croissance, on pense plutôt que c'est l'effet d'une accumulation de composés néfastes qui a conduit à la diminution de la viabilité des protoplastes. Car, selon HORINE et RUESINK [146] la lyse des protoplastes peut se produire suite à l'accumulation de certains produits toxiques du métabolisme ou suite à une forte turgescence osmotique. Pour ceci, le calcium est utilisé pour maintenir l'intégrité de la membrane plasmique des protoplastes [51,56]. De plus, la synthèse de la cellulose dépend directement de la présence d'une certaine quantité du calcium dans le milieu de culture [152].

Dans notre cas, nous avons étalé les protoplastes suspendus dans une solution contenant 67 mM de  $\text{CaCl}_2$  sur un milieu MS modifié et contenant 370 mg/l de  $\text{CaCl}_2$ . En effet, la forte diminution de la viabilité des protoplastes peut être due au fait que la concentration du calcium a été faible par rapport aux autres types de milieux de culture des protoplastes où la concentration du calcium est, le plus souvent, doublée pour maintenir l'intégrité de la membrane plasmique des protoplastes mis en culture.

#### 4.3.2. Régénération de la paroi cellulaire des protoplastes

Dans notre travail, la balance hormonale influence fortement l'allongement ou l'élongation cellulaire ; de telle sorte que c'est la BH N°1 contenant la plus grande concentration du 2,4-D (9  $\mu\text{M}$  ou 2 mg/l) qui induit plus d'élongation des protoplastes mis en culture (43,6 et 18 % respectivement pour DN et AK). Ceci est dû selon TAIZ et ZEIGER [153] au fait que les auxines et les cytokinines favorisent l'expansion cellulaire en augmentant l'extensibilité mécanique de la paroi cellulaire. Les auxines possèdent des sites récepteurs

sur la membrane plasmique et la paroi cellulaire pour induire l'élongation cellulaire suite à une augmentation de la perméabilité membranaire, probablement à l'eau.

Selon SMITH [70] ce sont surtout les auxines qui induisent plus l'élongation de la paroi cellulaire en promouvant sa synthèse. Elles induisent la synthèse de certaines enzymes telles que la cellulose synthase, la polygalacturonase, et la glucane synthase impliquées dans l'extensibilité de la paroi cellulaire ; tout en régulant leurs activités [70,144,153,141]. Nos résultats rejoignent ces observations, car nous avons obtenu les meilleurs taux d'allongement ou d'élongation sur les BH N°1 contenant plus de 2,4-D et moins de BAP que les deux autres balances. Néanmoins, selon MACHAKOVA et al [154] les effets des auxines synthétiques, telles que la 2,4-D, semble être en relation directe avec le niveau de l'auxine naturelle endogène l'AIA.

Les protoplastes mis en culture sur un milieu adéquat initient la synthèse d'une nouvelle paroi quelques heures après leur introduction [70]. Alors que RUESINK [155] et DAVEY et al [15] indiquent que les protoplastes commencent à régénérer leurs parois quelques minutes après l'isolement.

Pour le palmier dattier, CHABANE [3] indique que la régénération de la paroi cellulaire chez les protoplastes a été observée 3 jours après la mise en culture avec une forme ovale. Après 4 jours de la mise en culture, elle a eu un meilleur taux de régénération de la paroi cellulaire chez les protoplastes de DN que chez ceux d'AK. Néanmoins, nos résultats indiquent que la régénération de la paroi chez les protoplastes du palmier dattier commence 24 h après la mise en culture, vu le début d'allongement et de changement de forme qui est corrélée avec la reformation de la paroi cellulaire. Comme nous avons juste estimé le taux de régénération de la paroi à travers l'allongement des protoplastes, nous pouvons dire que nos résultats corroborent en partie avec ceux de CHABANE [3], car ce sont les protoplastes de DN qui ont montré plus d'allongement que ce soit après 4 jours (16 à 39 %) ou 15 jours de culture (16 à 44 %), par rapport à ceux de AK (7 à 21 % et entre 5 à 18 % respectivement

après 4 et 15 jours). Ainsi, on estime que ce sont les protoplastes de DN qui ont régénéré leurs parois plus rapidement que ceux d'AK.

Plusieurs auteurs mentionnent que la perte de la forme sphérique des protoplastes, le bourgeonnement ainsi que l'élongation cellulaire et l'augmentation du volume cellulaire pendant les premiers jours de culture sont corrélées avec la régénération de la paroi cellulaire. BENMOUSSA et al [156] ont remarqué que les protoplastes des cals de l'Asperge changent de forme en développant des bourgeons dans les 24 h qui suivent la mise en culture. Ce changement de forme est accompagné d'une augmentation du volume avec régénération incomplète de la paroi cellulaire. Il est peut être dû à une perturbation de l'orientation des microfibrilles cellulosiques et celle des microtubules qui déterminent l'orientation et la forme cellulaire [144,153].

CHABANE [3] indique qu'elle a observé, parallèlement aux protoplastes qui régénèrent leur paroi puis entrent en division, d'autres qui montrent une croissance importante du volume cellulaire en formant des bourgeonnements "unidirectionnels" ou "bidirectionnels" qui ne contiennent pas de noyau. Nos résultats rejoignent en partie ces observations, car nous avons noté la formation de bourgeons transparents dans un, deux ou plusieurs sens, et ce, avec toutes les balances hormonales testées.

Pour certains auteurs la formation de ces bourgeons est peut être due à la composition de la paroi cellulaire nouvellement formée, car selon HANKE et NORTHCOTE [157], SMITH [70], DICKISON [158] et MAJEWSKA-SAWKA et MÜNSTER [85] la paroi cellulaire primaire régénérée est amorphe et pauvre en cellulose d'où sa plasticité aux premiers stades de régénération de la paroi. Néanmoins, on pense que ce bourgeonnement chez les protoplastes mis en culture n'est que le résultat de l'augmentation du nombre et / ou du volume des vacuoles, suite à une faible osmolarité du milieu de culture, en plus d'une paroi incomplètement formée ; car YU et al [159] et SUN et al [95,58] indiquent que les protoplastes bourgeonnés contiennent, généralement, plus de vacuoles.

Les taux d'allongement faibles enregistrés durant la culture des protoplastes du palmier dattier sur les trois balances hormonales testées sous-entendent une faible régénération de la paroi cellulaire qui peut être attribuée aussi à la récalcitrance de l'espèce en elle-même ; malgré que ses causes demeurent inconnues [147]. Selon certains auteurs ; elle peut être l'effet à long terme du stress durant l'isolement de protoplastes [76,15] ; du fait que les protéines membranaires peuvent être facilement séparées suite à un rinçage avec une solution salée [70]. De plus, certains enzymes d'isolement des protoplastes possèdent une activité protéolytique sur des protéines situées ou rentrant dans la composition du plasmalemmes – ce sont des structures hexagonales contenant la cellulose synthase – et qui sont nécessaires pour la synthèse de la nouvelle paroi cellulaire [146].

Durant le développement des protoplastes mis en culture, nous avons remarqué que certains protoplastes présentent des endroits où la périphérie est dense alors que d'autres endroits demeurent avec une membrane transparente. Ceci serait dû au fait que la régénération de la paroi cellulaire se fait d'une manière fragmentaire et elle se renouvelle par édification à partir de plusieurs endroits ou foyers. Cette édification est liée directement à l'âge du tissu source de protoplastes. Si le protoplaste provient d'un tissu relativement jeune, le nombre de foyers est élevé tandis que dans le cas d'un tissu âgé, le nombre de foyers est beaucoup plus restreint [160]. De même, SMITH [70] indique que les composantes de la nouvelle paroi des protoplastes sont distribuées sporadiquement sur la surface de la membrane plasmique.

#### 4.3.3. Activité mitotique

Dans notre travail nous avons noté un effet significatif de la balance hormonale sur la division mitotique des cellules dérivant des protoplastes. Ce sont les protoplastes mis en culture sur la BH N°1 (2 mg/l de 2,4-D et 0,5 mg/l de BAP) qui forment des cellules caractérisées par une plus grande activité mitotique soient 17,5 et 2,8 %, respectivement, pour DN et AK, alors que les



protoplastes cultivés sur la BH N°2 ou BH N°3 n'ont pas montré plus de 5,9 % de division.

L'activité mitotique est affectée par la combinaison et la concentration des régulateurs de croissance (auxines et cytokinines) durant la culture [161]. Plusieurs auxines et cytokinines sont utilisées pour la culture des protoplastes, cependant, la 2,4-D et la BAP présentent une large prédominance d'utilisation dans cette étape du processus.

Les régulateurs de croissance sont impliqués dans la division cellulaire de telle sorte que les auxines affectent la réplication de l'ADN, par l'activation des gènes responsables de cette étape, et les cytokinines contrôlent les événements de la mitose par l'induction de la synthèse d'ADN, l'augmentation du taux de synthèse d'ARN, la stimulation de la protéosynthèse et la participation dans le contrôle du cycle cellulaire [70,114,153,150,151,154]. De ce fait, les auxines sont considérées comme des inducteurs du cycle cellulaire alors que les cytokinines en sont, peut être, des promoteurs [162].

Nos résultats ne corroborent pas avec ces indications ci-dessus car nous avons observé qu'en présence de 2 mg/l de 2,4-D et 0,5 mg/l de BAP l'entrée en division se fait après 2 à 3 jours de la mise en culture suivant le cultivar. Néanmoins, sous une BH N°2 ou BH N°3 contenant moins de 2,4-D et plus de BAP l'entrée en division ne s'est fait qu'après plus de 4 jours de la mise en culture. Cette différence est encore plus marquée lorsqu'il s'agit des divisions secondaires pour la formation des premières microcolonies observées après moins de 3 jours pour DN sous la BH N°1 alors que pour les autres combinaisons après plus de 8 jours de la mise en culture. Ainsi, nous pouvons supposer que les cytokinines n'ont pas un grand effet sur l'entrée en division des protoplastes.

Le rapport auxine / cytokinine est très important dans le développement des protoplastes. Dans le cas des protoplastes isolés à partir de cals de plusieurs espèces (asperge, Astragalus, etc.), ce rapport est, le plus souvent, supérieur à 1 [138,133]. Dans notre cas, le rapport est supérieur à 1 dans la BH

N°1 et BH N°2 ce qui explique, en partie, les meilleurs résultats obtenus avec ces deux balances alors qu'il est inférieur à 1 pour la BH N°3 ayant donné les plus mauvais résultats de divisions. GABR et TISSERAT [124] ont cultivé les protoplastes des cals de DN sur un milieu MS contenant 0,6 mg/l d'ANA, 0,01 mg/l de 2,4-D, 0,1 mg/l de BAP. Quant à CHABANE et al [6] ils ont cultivé les protoplastes des cals de DN et TK sur un milieu liquide contenant 2 mg/l de 2,4-D et 14,76  $\mu$ M d'AIP.

#### 4.3.4. Comportement des deux cultivars en culture

Le cultivar du palmier dattier a une grande influence sur la capacité de régénération d'une nouvelle paroi cellulaire et l'entrée en division ainsi que la formation de microcolonies. Le cultivar DN a montré une plus grande viabilité et plus d'allongement et de division cellulaire que le cultivar AK, et ce, quelle que soit la balance hormonale testée. Nos résultats corroborent parfaitement ceux de CHABANE [3] qui a trouvé que le cultivar DN présente une meilleure viabilité (plus de 60 %) et régénération de la paroi (25 à 54 %) que le cultivar TK (plus de 45 % pour la viabilité et 14 à 38 % pour la régénération). De même, c'est le cultivar DN qui a montré un taux de division plus élevé (20 à 30 %) que celui du cultivar TK (7 à 15 %) ; et par conséquent, c'est le cultivar DN qui a formé plus de microcals (14.000 microcals/boite de pétri) après 2 à 3 mois que le cultivar TK (9.000 microcals/boite de pétri).

De même, RIZKALLA et al [126] ont trouvé une différence significative entre deux autres cultivars du palmier dattier (Barhée et Zaghloul) en ce qui concerne la formation de microcals de telle sorte que le cultivar Barhée a formé 25.000 microcals/boite de pétri alors que le cultivar Zaghloul a formé 23.000 microcals/boite de pétri.

Nos résultats sont beaucoup plus faibles que ceux obtenus par ces auteurs, car le meilleur taux de viabilité enregistré après 15 jours de la mise en culture a été de 46,4 et 20 % respectivement pour DN et AK sur la BH °1. De même, les meilleurs taux d'allongement obtenus sont 43,6 et 18 % respectivement pour DN et AK sur la BH N°2. De plus, les meilleurs taux de division chez les deux cultivars (17,5 et 2,8 %) ont été obtenus sur la BH N°1.

Pour le nombre moyen de microcolonies par boîte de pétri, nos meilleurs résultats oscillent entre 0 et 10 microcolonies par boîte après plus de 2 mois de culture. Nos résultats sont peut être dus à la faible densité de culture qui a été de  $9,5 \times 10^4$  protoplastes/ml alors qu'elle a été de  $10^6$  protoplastes/ml dans le cas de CHABANE [3]. Ceci serait dû au fait que les différents génotypes de la même espèce ont probablement des besoins nutritionnels et hormonaux différents [163].

Dans notre travail, nous avons observé les premières divisions chez DN après 2 à 4 jours de la mise en culture, et après 3 à 4 jours pour le cultivar AK. De plus, la deuxième division a été observée après 3 à 8 jours ou plus de 10 jours chez DN et après 10 à 15 jours pour le cultivar AK. Nos résultats rejoignent en partie ceux de CHABANE [3] qui indique l'observation de la première division cellulaire chez les protoplastes de DN après 7 jours de la mise en culture alors que la deuxième a été observée après 15 jours. Cette différence peut être attribuée soit au système de culture, à l'âge ou à la texture des cals utilisés comme source des protoplastes. Les protoplastes isolés à partir des cals de plusieurs espèces se divisent durant les premiers jours de culture. L'entrée en division est de 24 h pour les protoplastes de la betterave [102], 3 à 4 jours pour l'asperge [156], 4 jours pour le cotonnier [58] et de 3 à 7 jours pour l'Astragalus [138,133]. Cependant, la deuxième division est généralement observée durant la première dizaine de jours de culture [138,133].

GABR et TISSERAT [124] indiquent que les colonies cellulaires de DN commencent à se former 2 semaines après la mise en culture et qu'elles peuvent être distinguées sans faire appel au microscope à la fin de la 3<sup>ème</sup> semaine de culture. Cependant, la production de cals n'est pas fréquente et reste à clarifier par d'autres expérimentations. Ceci rejoint parfaitement nos résultats car nous avons observés les microcolonies d'au moins 2 cellules en moyenne après 15 jours de la mise en culture alors que les microcals n'ont été observés qu'après plus de 2 mois de culture. De plus, nos résultats corroborent avec ceux de CHABANE [3] qui a observé les microcals visibles à l'œil nu après 2 à 3 mois de la mise en culture.

CONCLUSION

## CONCLUSION

Dans ce travail, on a montré que l'isolement des protoplastes à partir des cals de trois cultivars de palmier dattier est fortement influencé par les conditions appliquées durant l'incubation des cals en présence des enzymes ; de telle sorte qu'une incubation avec une solution enzymatique contenant 1,5 % de Cellulase et 1 % de Macérozyme avec une concentration de 0,5 M de mannitol sous conditions stationnaires ou une faible agitation de 50 rpm pendant plus de 16 h permet l'isolement d'un plus grand nombre de protoplastes présentant une viabilité acceptable. De plus, une purification sur un coussin de 21 ou 25 % de saccharose est efficace pour éliminer les débris cellulaires résultants de la macération enzymatique des tissus des cals sources des protoplastes.

Pour la culture des protoplastes du palmier dattier, l'étalement des protoplastes sur un milieu semi-solidifié avec 0,3 % d'agarose et contenant une balance hormonale composée de 2 mg/l de 2,4-D et 0,5 mg/l de BAP permet d'avoir un bon maintien de la viabilité des protoplastes qui régénèrent assez rapidement leurs parois cellulaires pour rentrer rapidement en division en donnant après plus de 2 mois de culture des microcals visibles à l'œil nu.

A travers nos résultats nous pouvons conclure que l'isolement des protoplastes du palmier peut être réalisé directement à partir des cals comme source sans faire appel à l'élaboration d'une suspension cellulaire pendant une longue durée. De plus, cet isolement peut être réalisé sans faire incorporer des enzymes hautement purifiées comme c'est le cas de la Pectolyase Y23. Néanmoins, l'utilisation de la suspension cellulaire par une combinaison enzymatique contenant la Pectolyase Y23 ou autres enzymes ont permis d'obtenir de bons résultats par des travaux antérieurs. De plus, l'obtention de microcals à partir des protoplastes des cals du palmier dattier peut être

achevée sans faire appel à des techniques beaucoup plus compliquées qu'un simple milieu semi-solide, malgré que ces procédures ont montré un grand intérêt dans le processus de régénération protoplastes- plante chez le palmier dattier.

Au terme de ce travail, quelques recommandations peuvent être apportées afin d'optimiser l'application de cette technologie dans la régénération de plantules à partir de protoplastes chez le dattier.

Concernant l'isolement des protoplastes :

- ❖ Orientation des études futures vers le développement rapide de cultures de cals embryogènes pour les utiliser comme source d'isolement de protoplastes et de régénération cellulaire ;
- ❖ Addition de certaines enzymes possédant une forte activité enzymatique telles que la Pectolyase Y23 qui améliore les rendements en protoplastes ;
- ❖ Étude de l'effet d'autres facteurs tels que la lumière et la température d'incubation sur l'isolement des protoplastes du palmier dattier à partir des cals ou autres sources.

Concernant la culture des protoplastes :

- ❖ Essayer la culture des protoplastes par d'autres méthodes telles que la culture sur une couche fine d'alginate qui permet un transfert facile sur le milieu liquide frais pour éviter la libération et l'accumulation des substances toxiques ;
- ❖ Rajouter d'autres sucres (xylose, arabinose, galactose, mannose, rhamnose, etc.), qui rentrent dans la composition des polysaccharides de la paroi cellulaire primaire, au milieu de culture des protoplastes.

L'efficacité de la méthode de fusion et de régénération de protoplastes utilisée pour l'obtention des structures hybrides somatiques, associée à la maîtrise de la technique de multiplication notamment à travers l'organogenèse et l'embryogenèse somatique, ouvre sans doute de nouvelles perspectives pour l'intégration de ces techniques dans les programmes de sélection du palmier dattier en complément des méthodes conventionnelles ou classiques.

# *APPENDICES*

**APPENDICE A**  
**LISTE DES SYMBOLES**

<b>*</b>	: effet significatif ;
<b>**</b>	: effet hautement significatif ;
<b>***</b>	: effet très hautement significatif ;
<b>2,4 D</b>	: 2,4-DichlorophénoxyAcétique acid.
<b>ANOVA/MANOVA</b>	: Analyse de la variance (simple, multiple) ;
<b>ADN</b>	: Acide Désoxyribonucléique ;
<b>AIA</b>	: Acide 3-Indolacétique ;
<b>AK</b>	: Cultivar Akerbouch ;
<b>ANA</b>	: Acide Naphtalène Acétique ;
<b>BAP</b>	: 6-benzyl-aminopurine ;
<b>BH</b>	: Balance Hormonale ;
<b>B5</b>	: Milieu de culture de GAMBORG et <i>al.</i> (1968) ;
<b>cm</b>	: Centimètre ;
<b>CM</b>	: Carré moyen ;
<b>DB</b>	: Cultivar Degla Beïda ;
<b>DN</b>	: Cultivar Deglet Nour ;
<b>FDA</b>	: Fluorescéine Diacétate ;
<b>g</b>	: grammes ;
<b>g</b>	: unité de vitesse de centrifugation ;
<b>G</b>	: Grossissement ;
<b>GA3</b>	: acide gibbérellique 3 ;
<b>GH</b>	: Groupe homogène ;
<b>gmf</b>	: grammes de matière fraîche ;
<b>h ou H</b>	: heure ;
<b>ha</b>	: hectares ;
<b>Kg</b>	: Kilogrammes ;
<b>KM</b>	: KAO et MICHAYLUK (1975) ;
<b>l</b>	: litre ;



<b>L-RGB</b>	: Laboratoire des Ressources Génétiques et Biotechnologies ;
<b>m</b>	: mètre ;
<b>M</b>	: Mole ;
<b>MADR</b>	: Ministère de l'Agriculture et du Développement Rural ;
<b>ml</b>	: millilitre ;
<b>mm</b>	: millimètre ;
<b>mM</b>	: millimole ;
<b>mn</b>	: minutes ;
<b>MS (1962)</b>	: Milieu de culture de MURASHIGE et SKOOG (1962) ;
<b>µl</b>	: microlitre ;
<b>µm</b>	: micromètre ;
<b>n</b>	: nombre chromosomique ;
<b>N</b>	: Normalité ;
<b>NS</b>	: non significatif ;
<b>n°</b>	: numéro ;
<b>N°</b>	: numéro ;
<b>P</b>	: probabilité ;
<b>PEG</b>	: Polyéthylène Glycol ;
<b>PPDS</b>	: Plus Petite Différence Significative ;
<b>rpm</b>	: Round Per Minute (Tours par minute) ;
<b>s</b>	: seconde ;
<b>S</b>	: semaine ;
<b>SCE</b>	: Somme des Carrés des Ecart ;
<b>SE</b>	: Solution Enzymatique ;
<b>STAT</b>	: Stationnaire ;
<b>t</b>	: tonnes ;
<b>T</b>	: traitement ;
<b>TK</b>	: Cultivar Takerboucht ;
<b>U.V</b>	: Eclairage Ultra Violet ;
<b>V</b>	: Volts ;
<b>%</b>	: pourcentage ;
<b>°</b>	: Degré ;
<b>°C</b>	: Degré Celsius.

## APPENDICE B

### FICHE DESCRIPTIVE DU CULTIVAR "DEGLET NOUR"

"دقلة نور"

Deglet Nour signifie doigts de la lumière. C'est le cultivar le plus abondant des cultivars des oasis du sud-est. Abondant dans les Aurès, Ziban, Oued Righ, Souf, Ouargla et dans le Mzab. Fréquent à Metlili et à El-Méniaa. Rare au Tidikelt, Touat et au Tassili. Sa date maturité est entre Août et Septembre au Mzab, Metlili, El-Méniaa, Tidikelt et Tassili et entre Octobre et Novembre ailleurs ; pour avoir une récolte aux environs de Septembre et Novembre.

La dattes de Deglet Nour est consommée fraîche ou conservées dans des sacs ou dans des cagettes, parfois écrasée ou pilée. L'appréciation de ses dattes est excellente. Sa digestibilité est froide en général, mais chaude à Metlili, Mzab et dans le Souf. Elle possède une grande importance économique.

Le cultivar Deglet Nour est désormais sensible au Bayoud avec une capacité à rejeter qui demeure moyenne à importante [5].



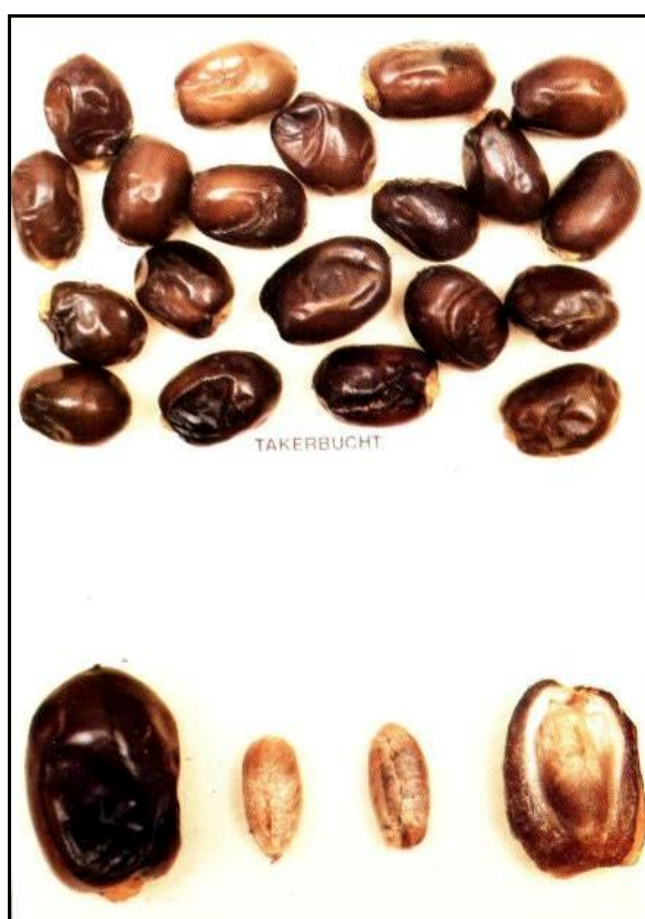
## FICHE DESCRIPTIVE DU CULTIVAR "AKERBOUCH" OU "TAKERBOUCHT"

"تقربوشت"

C'est un cultivar abondant au Tidikelt. Fréquent au Touat et au Gourara. Peu fréquent dans le Saoura et rare dans le Mzab. Sa date maturité est entre Septembre et Octobre ; pour avoir une récolte aux environs de Novembre et Décembre.

La datte de Takerboucht est consommée fraîche ou conservées dans des sacs, parfois écrasée ou pilée. L'appréciation de ses dattes est excellente au Tidikelt et bonne ailleurs. Sa digestibilité est chaude. Elle possède une importance économique plus ou moins faible. Selon le fruit il y a Takerboucht Safra y Lbayda.

Le cultivar Takerboucht est résistant au Bayoud avec une importante capacité à rejeter [5].



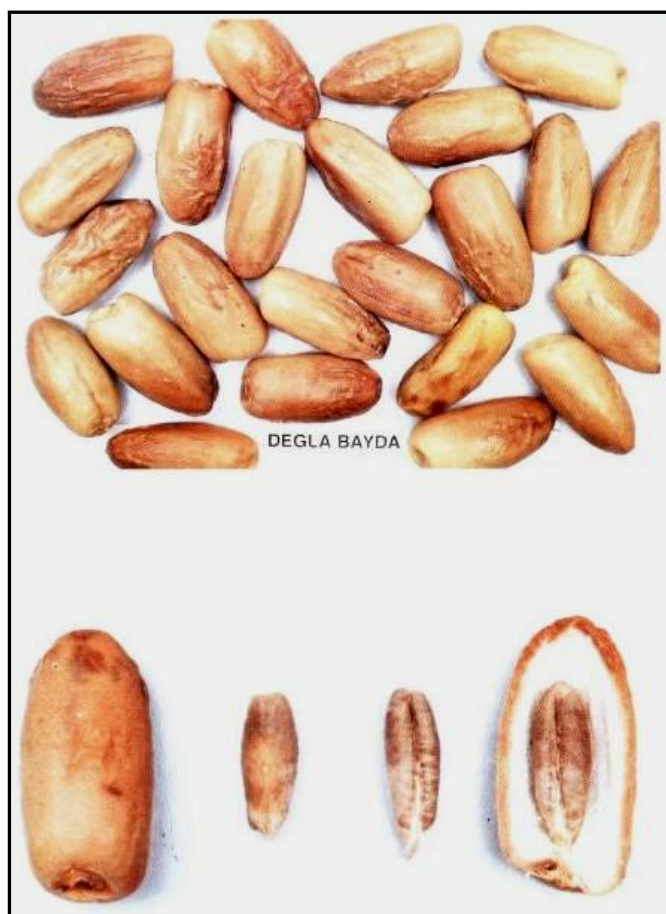
## FICHE DESCRIPTIVE DU CULTIVAR "DEGLA BAÏDA" :

"دقلة بيضاء"

C'est un cultivar fréquent au Ziban, Souf, Oued Righ et El-Méniaa. Peu fréquent au Mzab, Ouargla et aux Aurès, alors qu'il est rare ailleurs. Sa date de maturité est en Août au Mzab et Souf, Septembre à Metlili et Octobre ailleurs ; pour avoir une récolte aux environs d'Octobre et Novembre.

La datte de Degla Beïda est consommée fraîche ou conservées dans des sacs et parfois pilée. L'appréciation de ses dattes est variable selon la population consommatrice. Sa digestibilité est froide à El-Méniaa, Oued Righ, Souf et aux Aurès alors qu'elle est chaude ailleurs. Elle possède une commercialisation plus ou moins importante.

La résistance du cultivar Degla Beïda vis-à-vis du Bayoud demeure inconnue avec une capacité à rejeter moyenne à importante [5].



## APPENDICE C

## MILIEUX DE CULTURE ET BALANCE HORMONALES

**Tableau C.1 :** Composition du milieu de base MURASHIGE et SKOOG (1962) en plus des divers additifs.

Eléments	Composition chimique	Concentration en mg/l
<b>Macroéléments</b>	NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	<b>1650</b>
	K NO <sub>3</sub>	<b>1900</b>
	Mg SO <sub>4</sub> , 7H <sub>2</sub> O	<b>440</b>
	Ca Cl <sub>2</sub> , 2H <sub>2</sub> O	<b>370</b>
	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	<b>170</b>
<b>Microéléments</b>	H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	<b>6,20</b>
	Mn SO <sub>4</sub> , 4H <sub>2</sub> O	<b>22,30</b>
	Zn SO <sub>4</sub> , 4H <sub>2</sub> O	<b>8,60</b>
	KI	<b>0,83</b>
	Na <sub>2</sub> 2Mo O <sub>4</sub> , 2H <sub>2</sub> O	<b>0,25</b>
	Cu SO <sub>4</sub> , 5H <sub>2</sub> O	<b>0,025</b>
	Ca Cl <sub>2</sub> , 6 H <sub>2</sub> O	<b>0,025</b>
<b>Fer (Fe-EDTA)</b>	Fe SO <sub>4</sub> , 7H <sub>2</sub> O	<b>27,85</b>
	Na <sub>2</sub> EDTA	<b>37,25</b>
<b>Vitamines</b>	Glycine	<b>2,00</b>
	Acide nicotinique	<b>0,50</b>
	Pyridoxine HCl	<b>0,50</b>
	Thiamine HCl	<b>0,10</b>
<b>Additifs minéraux</b> (Additifs de TISSERAT (1979)).	NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	<b>350</b>
	Na <sub>2</sub> H <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	<b>170</b>
	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	<b>100</b>
<b>Additifs organiques</b>	L-Glutamine	<b>100</b>
	Adénine sulfate	<b>40</b>
<b>Divers</b>	<b>Sucre</b>	<b>45.000</b>
	<b>Agar</b>	<b>7.000</b>
	<b>Charbon actif</b>	<b>0 à 3.000</b>
	<b>Myo-inositol</b>	<b>100</b>

**Tableau C.2 :** Balances hormonales des milieux de maintenance des cals.

Traitement	0	1	2	3	4	5	6*
<b>2,4-D (mg/l)</b>	0	1	5	10	50	100	5
<b>BAP (mg/l)</b>	0	1	1	1	1	1	5
<b>Rapport 2,4-D / BAP</b>	0	1	5	10	50	100	1
<b>Charbon actif</b> (30 mg de CA pour 1 mg/l de 2,4-D)	0	30	150	300	1500	3000	150

\* Balance hormonale / témoin bibliographique (EL HADRAMI, 1995).

## APPENDICE D

## I. EFFET DE LA SOLUTION ENZYMATIQUE ET DU MODE DE MACÉRATION

## 1. Rendement en protoplastes totaux

Tableau de l'analyse de la variance (Interaction Cultivar x Solution enzymatique x Mode de macération)

Source de variation	SCE	Ddl	CM	F	Probabilité	Signification
A : Cultivar	189,4	2	94,7	82,7	0,0000	***
B : Solution enzymatique	105,6	2	52,8	46,1	0,0000	***
C : Mode de macération	27,2	1	27,2	23,8	0,0000	***
A x B	59,7	4	14,9	13,0	0,0000	***
A x C	28,1	2	14,1	12,3	0,0000	***
B x C	12,0	2	6,0	5,3	0,0057	**
A x B x C	163,6	4	40,9	35,7	0,0000	***
Résiduelle	391,6	342	1,1			
Total	977,2	359				

Test de la PPDS (Interaction Cultivar x Solution enzymatique x Mode de macération)

Combinaison	Nombre de protoplastes totaux (x 10 <sup>5</sup> )	Groupes homogènes
DN x SE N°1 x 50 RPM	8,67	A
DN x SE N°2 x STAT	7,00	B
DN x SE N°3 x STAT	5,58	C
DN x SE N°1 x STAT	5,17	C
AK x SE N°2 x 50 RPM	5,08	C
DB x SE N°1 x STAT	4,50	C
AK x SE N°1 x STAT	3,33	D
AK x SE N°2 x STAT	3,08	D
DB x SE N°2 x STAT	2,92	D
DB x SE N°1 x 50 RPM	2,50	DE
AK x SE N°3 x 50 RPM	2,25	DE
DN x SE N°2 x 50 RPM	2,24	DE
AK x SE N°1 x 50 RPM	1,67	EF
DB x SE N°3 x STAT	1,50	EF
DN x SE N°3 x 50 RPM	1,42	EF
AK x SE N°3 x STAT	1,42	EF
DB x SE N°2 x 50 RPM	1,42	EF
DB x SE N°3 x 50 RPM	0,75	F

## 2. Rendement en protoplastes viables

**Tableau de l'analyse de la variance** (Interaction Cultivar x Solution enzymatique x Mode de macération)

Source de variation	SCE	Ddl	CM	F	Probabilité	Signification
A : Cultivar	72,2	2	36,1	91,8	0,0000	***
B : Solution enzymatique	15,3	2	7,6	19,4	0,0000	***
C : Mode de macération	17,8	1	17,8	45,2	0,0000	***
A x B	20,5	4	5,1	13,0	0,0000	***
A x C	7,3	2	3,7	9,3	0,0001	***
B x C	15,0	2	7,5	19,1	0,0000	***
A x B x C	56,5	4	14,1	35,9	0,0000	***
Résiduelle	134,6	342	0,4			
Total	339,2	359				

**Test de la PPDS** (Interaction Cultivar x Solution enzymatique x Mode de macération)

Combinaison	Nombre de protoplastes viables (x 10 <sup>5</sup> )	Groupes homogènes
DN x SE N°1 x 50 RPM	4,67	A
DN x SE N°2 x STAT	4,00	B
DN x SE N°3 x STAT	2,92	C
DB x SE N°1 x STAT	2,50	CD
DN x SE N°1 x STAT	2,17	D
DB x SE N°2 x STAT	1,83	DE
AK x SE N°2 x STAT	1,42	EF
AK x SE N°2 x 50 RPM	1,17	FG
AK x SE N°3 x 50 RPM	1,17	FG
AK x SE N°3 x STAT	1,00	FGH
DN x SE N°2 x 50 RPM	0,896	FGH
AK x SE N°1 x STAT	0,667	GHI
DN x SE N°3 x 50 RPM	0,583	GHI
AK x SE N°1 x 50 RPM	0,50	HI
DB x SE N°1 x 50 RPM	0,50	HI
DB x SE N°2 x 50 RPM	0,417	HI
DB x SE N°3 x STAT	0,333	I
DB x SE N°3 x 50 RPM	0,167	I

### 3. Taux de viabilité des protoplastes

**Tableau de l'analyse de la variance** (Interaction Cultivar x Solution enzymatique x Mode de macération)

Source de variation	SCE	Ddl	CM	F	Probabilité	Signification
<b>A : Cultivar</b>	888,5	2	444,3	30,4	0,0000	***
<b>B : Solution enzymatique</b>	302,2	2	151,1	10,3	0,0010	***
<b>C : Mode de macération</b>	1534,0	1	1534,0	104,8	0,0000	***
<b>A x B</b>	3812,8	4	953,2	65,1	0,0000	***
<b>A x C</b>	490,4	2	245,2	16,8	0,0001	***
<b>B x C</b>	617,7	2	308,9	21,1	0,0000	***
<b>A x B x C</b>	1235,6	4	308,9	21,1	0,0000	***
<b>Résiduelle</b>	263,5	18	14,6			
<b>Total</b>	9144,8	35				

**Test de la PPDS** (Interaction Cultivar x Solution enzymatique x Mode de macération)

Combinaison	Taux de viabilité (%)	Groupes homogènes
<b>AK x SE N°3 x STAT</b>	70,8	<b>A</b>
<b>DB x SE N°2 x STAT</b>	62,8	<b>AB</b>
<b>DN x SE N°2 x STAT</b>	57,4	<b>BC</b>
<b>DB x SE N°1 x STAT</b>	56,5	<b>BC</b>
<b>DN x SE N°1 x 50 RPM</b>	53,8	<b>CD</b>
<b>DN x SE N°3 x STAT</b>	52,2	<b>CD</b>
<b>AK x SE N°3 x 50 RPM</b>	51,9	<b>CD</b>
<b>AK x SE N°2 x STAT</b>	45,9	<b>DE</b>
<b>DN x SE N°1 x STAT</b>	42,0	<b>E</b>
<b>DN x SE N°3 x 50 RPM</b>	41,0	<b>E</b>
<b>DN x SE N°2 x 50 RPM</b>	40,2	<b>E</b>
<b>AK x SE N°1 x 50 RPM</b>	29,2	<b>F</b>
<b>DB x SE N°2 x 50 RPM</b>	29,2	<b>F</b>
<b>AK x SE N°2 x 50 RPM</b>	23,0	<b>FG</b>
<b>DB x SE N°3 x STAT</b>	22,5	<b>FG</b>
<b>DB x SE N°3 x 50 RPM</b>	22,5	<b>FG</b>
<b>DB x SE N°1 x 50 RPM</b>	21,6	<b>FG</b>
<b>AK x SE N°1 x STAT</b>	20,2	<b>G</b>



## APPENDICE E

## II. EFFET DE LA CONCENTRATION DU MANNITOL ET DU MODE DE MACÉRATION

### 1. Rendement en protoplastes totaux

**Tableau de l'analyse de la variance** (Interaction Cultivar x Concentration du mannitol x Mode de macération)

Source de variation	SCE	Ddl	CM	F	Probabilité	Signification
A : Cultivar	171,8	2	85,9	63,5	0,0000	***
B : Concentration du mannitol	99,6	2	49,8	36,8	0,0000	***
C : Mode de macération	4,7	1	4,7	3,5	0,0640	NS
A x B	248,7	4	62,2	46,0	0,0000	***
A x C	17,3	2	8,7	6,4	0,0018	**
B x C	10,1	2	5,0	3,7	0,0251	*
A x B x C	240,2	4	60,0	44,4	0,0000	***
Résiduelle	462,4	342	1,4			
Total	1254,7	359				

**Test de la PPDS** (Interaction Cultivar x Concentration du mannitol x Mode de macération)

Combinaison	Nombre de protoplastes totaux (x 10 <sup>5</sup> )	Groupes homogènes
AK x 0,6 M x 50 RPM	10,0	A
DN x 0,5 M x 50 RPM	8,67	B
DN x 0,6 M x STAT	5,58	C
DN x 0,5 M x STAT	5,17	C
DB x 0,5 M x STAT	4,50	CD
AK x 0,4 M x STAT	3,67	DE
AK x 0,5 M x STAT	3,33	DEF
AK x 0,6 M x STAT	3,33	DEF
DN x 0,4 M x 50 RPM	2,75	EFG
AK x 0,4 M x 50 RPM	2,67	EFG
DB x 0,5 M x 50 RPM	2,50	EFGH
DN x 0,6 M x 50 RPM	2,33	FGH
DN x 0,4 M x STAT	2,25	FGH
AK x 0,5 M x 50 RPM	1,67	GHI
DB x 0,4 M x 50 RPM	1,42	HI
DB x 0,6 M x 50 RPM	1,00	I
DB x 0,6 M x STAT	0,917	I
DB x 0,4 M x STAT	0,833	I

## 2. Rendement en protoplastes viables

**Tableau de l'analyse de la variance** (Interaction Cultivar x Concentration du mannitol x Mode de macération)

Source de variation	SCE	Ddl	CM	F	Probabilité	Signification
<b>A : Cultivar</b>	57,7	2	28,9	48,7	0,0000	***
<b>B : Concentration du mannitol</b>	5,6	2	2,8	4,7	0,0094	**
<b>C : Mode de macération</b>	3,8	1	3,8	6,4	0,0118	*
<b>A x B</b>	86,3	4	21,6	36,4	0,0000	***
<b>A x C</b>	12,9	2	6,4	10,9	0,0000	***
<b>B x C</b>	1,0	2	0,5	0,8	0,4415	NS
<b>A x B x C</b>	75,6	4	18,9	31,9	0,0000	***
<b>Résiduelle</b>	202,9	342	0,6			
<b>Total</b>	445,8	359				

**Test de la PPDS** (Interaction Cultivar x Concentration du mannitol x Mode de macération)

Combinaison	Nombre de protoplastes viables (x 10 <sup>5</sup> )	Groupes homogènes
<b>AK x 0,6 M x 50 RPM</b>	4,92	<b>A</b>
<b>DN x 0,5 M x 50 RPM</b>	4,67	<b>A</b>
<b>DN x 0,6 M x STAT</b>	2,75	<b>B</b>
<b>DB x 0,5 M x STAT</b>	2,50	<b>BC</b>
<b>DN x 0,4 M x 50 RPM</b>	2,17	<b>BCD</b>
<b>DN x 0,5 M x STAT</b>	2,17	<b>BCD</b>
<b>AK x 0,4 M x STAT</b>	2,08	<b>BCD</b>
<b>AK x 0,4 M x 50 RPM</b>	1,75	<b>CDE</b>
<b>AK x 0,6 M x STAT</b>	1,58	<b>DE</b>
<b>DN x 0,4 M x STAT</b>	1,08	<b>EF</b>
<b>DN x 0,6 M x 50 RPM</b>	1,00	<b>EF</b>
<b>DB x 0,4 M x 50 RPM</b>	0,750	<b>FG</b>
<b>AK x 0,5 M x STAT</b>	0,667	<b>FG</b>
<b>AK x 0,5 M x 50 RPM</b>	0,500	<b>FG</b>
<b>DB x 0,5 M x 50 RPM</b>	0,500	<b>FG</b>
<b>DB x 0,4 M x STAT</b>	0,333	<b>FG</b>
<b>DB x 0,6 M x STAT</b>	0,167	<b>G</b>
<b>DB x 0,6 M x 50 RPM</b>	0,167	<b>G</b>

### 3. Taux de viabilité des protoplastes

**Tableau de l'analyse de la variance** (Interaction Cultivar x Concentration du mannitol x Mode de macération)

Source de variation	SCE	Ddl	CM	F	Probabilité	Signification
<b>A : Cultivar</b>	2008,5	2	1004,3	82,4	0,0000	***
<b>B : Concentration du mannitol</b>	3200,2	2	1600,1	131,2	0,0000	***
<b>C : Mode de macération</b>	110,3	1	110,3	9,0	0,0076	**
<b>A x B</b>	2126,8	4	531,7	43,6	0,0000	***
<b>A x C</b>	626,2	2	313,1	25,7	0,0000	***
<b>B x C</b>	890,2	2	445,1	36,5	0,0000	***
<b>A x B x C</b>	1049,2	4	262,3	21,5	0,0000	***
<b>Résiduelle</b>	219,5	18	12,2			
<b>Total</b>	10230,8	35				

**Test de la PPDS** (Interaction Cultivar x Concentration du mannitol x Mode de macération)

Combinaison	Taux de viabilité (%)	Groupes homogènes
<b>DN x 0,4 M x 50 RPM</b>	78,9	<b>A</b>
<b>AK x 0,4 M x 50 RPM</b>	65,6	<b>B</b>
<b>AK x 0,4 M x STAT</b>	57,1	<b>C</b>
<b>DB x 0,5 M x STAT</b>	56,5	<b>CD</b>
<b>DN x 0,5 M x 50 RPM</b>	53,8	<b>CDE</b>
<b>DB x 0,4 M x 50 RPM</b>	52,8	<b>CDE</b>
<b>DN x 0,6 M x STAT</b>	49,3	<b>DEF</b>
<b>AK x 0,6 M x 50 RPM</b>	48,8	<b>EF</b>
<b>DN x 0,4 M x STAT</b>	48,3	<b>EF</b>
<b>AK x 0,6 M x STAT</b>	47,5	<b>EF</b>
<b>DN x 0,6 M x 50 RPM</b>	42,9	<b>FG</b>
<b>DN x 0,5 M x STAT</b>	42,0	<b>FG</b>
<b>DB x 0,4 M x STAT</b>	40,0	<b>G</b>
<b>AK x 0,5 M x 50 RPM</b>	29,2	<b>H</b>
<b>DB x 0,5 M x 50 RPM</b>	21,6	<b>I</b>
<b>AK x 0,5 M x STAT</b>	20,2	<b>I</b>
<b>DB x 0,6 M x STAT</b>	18,3	<b>I</b>
<b>DB x 0,6 M x 50 RPM</b>	17,1	<b>I</b>

## APPENDICE F

## III. EFFET DE LA DUREE DE MACÉRATION ET DU MODE DE MACÉRATION

## 1. CHEZ DEGLET NOUR

## 1.1. Rendement en protoplastes totaux

Effet de l'interaction Mode de macération x Durée de macération

Tableau de l'analyse de la variance (Interaction Mode de macération x Durée de macération)

Source de variation	SCE	Ddl	CM	F	Probabilité	Signification
A : Mode de macération	352,5	2	176,3	65,9	0,0000	***
B : Durée de macération	896,4	9	99,6	37,3	0,0000	***
A x B	204,1	18	11,3	4,2	0,0000	***
Résiduelle	722,0	270	2,7			
Total	2175,0	299				

Test de la PPDS (Interaction Mode de macération x Durée de macération)

Combinaison	Nombre de protoplastes totaux (x 10 <sup>5</sup> )	Groupes homogènes
50 RPM x 22H	15,0	A
50 RPM x 20H	12,0	B
50 RPM x 18H	11,0	B
50 RPM x 24H	10,0	B
50 RPM x 16H	8,7	C
STAT x 20H	8,5	C
STAT x 18H	7,0	CD
STAT x 22H	5,7	DE
STAT x 16H	5,2	DEF
50 RPM x 14H	5,2	DEF
100 RPM x 22H	5,2	DEF
STAT x 24H	5,0	EF
100 RPM x 20H	4,8	EF
50 RPM x 8H	4,7	EFG
100 RPM x 16H	4,0	EFGH
100 RPM x 18H	4,0	EFGH
STAT x 14H	3,8	EFGH
50 RPM x 6H	3,7	EFGH
100 RPM x 24H	3,3	EFGHI
100 RPM x 14H	3,2	FGHI
STAT x 8H	2,8	FGHI
100 RPM x 8H	2,3	GHIJ
50 RPM x 4H	1,8	HIJ
100 RPM x 6H	1,8	HIJ
STAT x 6H	1,7	HIJ
100 RPM x 4H	1,0	IJ
STAT x 2H	0,0	J
STAT x 4H	0,0	J
50 RPM x 2H	0,0	J
100 RPM x 2H	0,0	J

## 1.2. Rendement en protoplastes viables

### Effet de l'interaction Mode de macération x Durée de macération

**Tableau de l'analyse de la variance** (Interaction Mode de macération x Durée de macération)

Source de variation	SCE	Ddl	CM	F	Probabilité	Signification
<b>A : Mode de macération</b>	130,8	2	65,4	72,8	0,0000	***
<b>B : Durée de macération</b>	69,8	9	7,8	8,6	0,0000	***
<b>A x B</b>	32,8	18	1,8	2,0	0,0088	**
Résiduelle	242,7	270	0,9			
<b>Total</b>	476,2	299				

**Test de la PPDS** (Interaction Mode de macération x Durée de macération)

Combinaison	Nombre de protoplastes viables (x 10 <sup>5</sup> )	Groupes homogènes
50 RPM x 16H	4,7	A
50 RPM x 18H	4,5	A
50 RPM x 20H	4,3	A
50 RPM x 22H	4,0	A
50 RPM x 14H	3,7	A
50 RPM x 8H	3,3	A
50 RPM x 6H	3,0	B
STAT x 16H	2,2	BC
STAT x 14H	1,8	BC
STAT x 18H	1,7	BC
STAT x 20H	1,5	C
50 RPM x 24H	1,5	C
50 RPM x 4H	1,3	CD
STAT x 8H	1,2	CD
100 RPM x 16H	0,83	CD
100 RPM x 18H	0,83	CD
STAT x 6H	0,67	CD
STAT x 22H	0,67	CD
100 RPM x 14H	0,67	CD
100 RPM x 20H	0,67	CD
100 RPM x 6H	0,50	CD
100 RPM x 8H	0,50	CD
STAT x 24H	0,33	CD
100 RPM x 4H	0,33	CD
100 RPM x 22H	0,33	CD
100 RPM x 24H	0,17	CD
STAT x 2H	0,0	D
STAT x 4H	0,0	D
50 RPM x 2H	0,0	D
100 RPM x 2H	0,0	D

### 1.3. Taux de viabilité des protoplastes

#### Effet de l'interaction Mode de macération x Durée de macération

**Tableau de l'analyse de la variance** (Interaction Mode de macération x Durée de macération)

Source de variation	SCE	Ddl	CM	F	Probabilité	Signification
<b>A : Mode de macération</b>	10152,9	2	5076,5	976,2	0,0000	***
<b>B : Durée de macération</b>	15471,7	9	1719,1	330,6	0,0000	***
<b>A x B</b>	6303,1	18	350,2	67,3	0,0000	***
Résiduelle	156,0	30	5,2			
<b>Total</b>	<b>32083,7</b>	<b>59</b>				

**Test de la PPDS** (Interaction Mode de macération x Durée de macération)

Combinaison	Taux de viabilité (%)	Groupes homogènes
50 RPM x 6H	81,8	A
50 RPM x 4H	72,7	B
50 RPM x 8H	71,4	B
50 RPM x 14H	71,0	B
50 RPM x 16H	53,8	C
STAT x 14H	47,8	D
STAT x 16H	41,9	E
STAT x 8H	41,2	E
STAT x 6H	40,0	E
50 RPM x 18H	39,7	E
50 RPM x 20H	36,6	F
100 RPM x 4H	33,3	G
50 RPM x 22H	27,6	H
100 RPM x 6H	27,3	H
STAT x 18H	23,8	I
100 RPM x 8H	21,4	IJ
100 RPM x 14H	21,1	J
100 RPM x 16H	20,8	J
100 RPM x 18H	20,8	J
STAT x 20H	17,6	K
50 RPM x 24H	14,5	L
100 RPM x 20H	13,8	LM
STAT x 22H	11,8	M
STAT x 24H	6,7	N
100 RPM x 22H	6,5	N
100 RPM x 24H	5,0	N
STAT x 2H	0,0	O
STAT x 4H	0,0	O
50 RPM x 2H	0,0	O
100 RPM x 2H	0,0	O

## 2. CHEZ AKERBOUCH

### 2.1. Rendement en protoplastes totaux

#### Effet de l'interaction Mode de macération x Durée de macération

**Tableau de l'analyse de la variance** (Interaction Mode de macération x Durée de macération)

Source de variation	SCE	Ddl	CM	F	Probabilité	Signification
A : Mode de macération	14,6	2	7,3	7,5	0,0007	***
B : Durée de macération	133,7	9	14,9	15,2	0,0000	***
A x B	41,6	18	2,3	2,4	0,0017	**
Résiduelle	263,6	270	1,0			
Total	453,5	299				

**Test de la PPDS** (Interaction Mode de macération x Durée de macération)

Combinaison	Nombre de protoplastes totaux (x 10 <sup>5</sup> )	Groupes homogènes
50 RPM x 22H	4,7	A
100 RPM x 18H	4,3	AB
50 RPM x 20H	3,8	ABC
100 RPM x 16H	3,8	ABC
STAT x 16H	3,3	ABCD
100 RPM x 20H	3,2	BCD
STAT x 18H	2,8	CDE
100 RPM x 22H	2,8	CDE
STAT x 14H	2,7	CDEF
100 RPM x 8H	2,7	CDEF
100 RPM x 14H	2,7	CDEF
100 RPM x 24H	2,3	DEFG
STAT x 20H	2,2	DEFG
50 RPM x 18H	2,0	DEFGH
STAT x 22H	1,7	EFGHI
50 RPM x 16H	1,7	EFGHI
100 RPM x 6H	1,7	EFGHI
STAT x 8H	1,5	EFGHI
50 RPM x 14H	1,5	EFGHI
STAT x 24H	1,3	FGHIJ
50 RPM x 8H	1,3	FGHIJ
50 RPM x 24H	1,3	FGHIJ
50 RPM x 6H	1,0	GHIJ
100 RPM x 4H	0,67	HIJ
50 RPM x 4H	0,33	IJ
STAT x 2H	0,0	J
STAT x 4H	0,0	J
STAT x 6H	0,0	J
50 RPM x 2H	0,0	J
100 RPM x 2H	0,0	J

## 2.2. Rendement en protoplastes viables

### Effet de l'interaction Mode de macération x Durée de macération

**Tableau de l'analyse de la variance** (Interaction Mode de macération x Durée de macération)

Source de variation	SCE	Ddl	CM	F	Probabilité	Signification
<b>A : Mode de macération</b>	0,2	2	0,1	0,4	0,6598	NS
<b>B : Durée de macération</b>	9,1	9	1,0	4,1	0,0001	***
<b>A x B</b>	2,1	18	0,1	0,5	0,9718	NS
<b>Résiduelle</b>	67,0	270	0,2			
<b>Total</b>	78,3	299				

**Test de la PPDS** (Interaction Mode de macération x Durée de macération)

Combinaison	Nombre de protoplastes viables (x 10 <sup>5</sup> )	Groupes homogènes
STAT x 8H	1,0	A
50 RPM x 8H	1,0	A
50 RPM x 6H0,	0,83	AB
50 RPM x 14H	0,83	AB
100 RPM x 8H	0,83	AB
STAT x 14H	0,67	ABC
STAT x 16H	0,67	ABC
100 RPM x 6H	0,67	ABC
STAT x 18H	0,50	ABC
50 RPM x 16H	0,50	ABC
100 RPM x 14H	0,50	ABC
STAT x 20H	0,33	ABC
50 RPM x 18H	0,33	ABC
50 RPM x 20H	0,33	ABC
100 RPM x 4H	0,33	ABC
100 RPM x 16H	0,33	ABC
100 RPM x 18H	0,33	ABC
STAT x 22H	0,17	BC
50 RPM x 4H	0,17	BC
50 RPM x 22H	0,17	BC
100 RPM x 20H	0,17	BC
STAT x 2H	0,0	C
STAT x 4H	0,0	C
STAT x 6H	0,0	C
STAT x 24H	0,0	C
50 RPM x 2H	0,0	C
50 RPM x 24H	0,0	C
100 RPM x 2H	0,0	C
100 RPM x 22H	0,0	C
100 RPM x 24H	0,0	C



### 2.3. Taux de viabilité des protoplastes

#### Effet de l'interaction Mode de macération x Durée de macération

**Tableau de l'analyse de la variance** (Interaction Mode de macération x Durée de macération)

Source de variation	SCE	Ddl	CM	F	Probabilité	Signification
A : Mode de macération	3656,9	2	1828,5	342,8	0,0000	***
B : Durée de macération	20224,6	9	2247,2	421,4	0,0000	***
A x B	11108,4	18	617,1	115,7	0,0000	***
Résiduelle	160,0	30	5,3			
Total	35149,9	59				

**Test de la PPDS** (Interaction Mode de macération x Durée de macération)

Combinaison	Taux de viabilité (%)	Groupes homogènes
50 RPM x 6H	83,3	A
50 RPM x 8H	75,0	B
STAT x 8H	66,7	C
50 RPM x 14H	55,6	D
50 RPM x 4H	50,0	E
100 RPM x 4H	50,0	E
100 RPM x 6H	40,0	F
100 RPM x 8H	31,3	G
50 RPM x 16H	30,0	G
STAT x 14H	25,0	H
STAT x 16H	20,0	I
100 RPM x 14H	18,8	IJ
STAT x 18H	17,6	IJK
50 RPM x 18H	16,7	JK
STAT x 20H	15,4	K
STAT x 22H	10,0	L
50 RPM x 20H	8,7	L
100 RPM x 16H	8,7	L
100 RPM x 18H	7,7	LM
100 RPM x 20H	5,3	MN
50 RPM x 22H	3,6	N
STAT x 2H	0,0	O
STAT x 4H	0,0	O
STAT x 6H	0,0	O
STAT x 24H	0,0	O
50 RPM x 2H	0,0	O
50 RPM x 24H	0,0	O
100 RPM x 2H	0,0	O
100 RPM x 22H	0,0	O
100 RPM x 24H	0,0	O

### 3. CHEZ DEGLA BEÏDA

#### 3.1. Rendement en protoplastes totaux

##### Effet de l'interaction Mode de macération x Durée de macération

**Tableau de l'analyse de la variance** (Interaction Mode de macération x Durée de macération)

Source de variation	SCE	Ddl	CM	F	Probabilité	Signification
A : Mode de macération	41,8	2	20,9	27,9	0,0000	***
B : Durée de macération	153,6	9	17,1	22,8	0,0000	***
A x B	82,9	18	4,6	6,2	0,0000	***
Résiduelle	202,1	270	0,7			
Total	480,4	299				

**Test de la PPDS** (Interaction Mode de macération x Durée de macération)

Combinaison	Nombre de protoplastes totaux (x 10 <sup>5</sup> )	Groupes homogènes
STAT x 18H	6,2	A
STAT x 20H	5,0	AB
STAT x 16H	4,5	B
50 RPM x 22H	4,2	BC
50 RPM x 20H	3,5	BCD
50 RPM x 18H	3,0	CDE
50 RPM x 16H	2,5	DEF
STAT x 14H	1,8	EF
STAT x 8H	1,7	F
STAT x 22H	1,7	F
50 RPM x 24H	1,7	F
100 RPM x 24H	1,7	F
STAT x 24H	1,5	FG
50 RPM x 14H	1,5	FG
100 RPM x 22H	1,2	FGH
100 RPM x 18H	1,0	FGH
100 RPM x 20H	1,0	FGH
50 RPM x 8H	0,8	FGH
100 RPM x 8H	0,8	FGH
100 RPM x 14H	0,83	FGH
100 RPM x 16H	0,83	FGH
STAT x 6H	0,33	GH
50 RPM x 6H	0,33	GH
100 RPM x 6H	0,33	GH
STAT x 2H	0,0	H
STAT x 4H	0,0	H
50 RPM x 2H	0,0	H
50 RPM x 4H	0,0	H
100 RPM x 2H	0,0	H
100 RPM x 4H	0,0	H

### 3.2. Rendement en protoplastes viables

#### Effet de l'interaction Mode de macération x Durée de macération

**Tableau de l'analyse de la variance** (Interaction Mode de macération x Durée de macération)

Source de variation	SCE	Ddl	CM	F	Probabilité	Signification
<b>A : Mode de macération</b>	29,2	2	14,6	56,4	0,0000	***
<b>B : Durée de macération</b>	27,0	9	3,0	11,6	0,0000	***
<b>A x B</b>	42,2	18	2,3	9,1	0,0000	***
Résiduelle	69,9	270	0,3			
<b>Total</b>	168,3	299				

**Test de la PPDS** (Interaction Mode de macération x Durée de macération)

Combinaison	Nombre de protoplastes viables (x 10 <sup>5</sup> )	Groupes homogènes
STAT x 18H	4,2	A
STAT x 20H	3,0	B
STAT x 16H	2,5	B
STAT x 14H	1,0	C
STAT x 8H	0,83	CD
STAT x 22H	0,67	CDE
STAT x 24H	0,50	CDE
50 RPM x 8H	0,50	CDE
50 RPM x 14H	0,50	CDE
50 RPM x 16H	0,50	CDE
100 RPM x 8H	0,50	CDE
50 RPM x 18H	0,33	CDE
100 RPM x 14H	0,33	CDE
STAT x 6H	0,17	DE
50 RPM x 6H	0,17	DE
50 RPM x 20H	0,17	DE
50 RPM x 22H	0,17	DE
100 RPM x 6H	0,17	DE
100 RPM x 16H	0,17	DE
100 RPM x 18H	0,17	DE
STAT x 2H	0,0	E
STAT x 4H	0,0	E
50 RPM x 2H	0,0	E
50 RPM x 4H	0,0	E
50 RPM x 24H	0,0	E
100 RPM x 2H	0,0	E
100 RPM x 4H	0,0	E
100 RPM x 20H	0,0	E
100 RPM x 22H	0,0	E
100 RPM x 24H	0,0	E

### 3.3. Taux de viabilité des protoplastes

#### Effet de l'interaction Mode de macération x Durée de macération

**Tableau de l'analyse de la variance** (Interaction Mode de macération x Durée de macération)

Source de variation	SCE	Ddl	CM	F	Probabilité	Signification
<b>A : Mode de macération</b>	6872,1	2	3436,1	669,4	0,0000	***
<b>B : Durée de macération</b>	21542,4	9	2393,6	466,3	0,0000	***
<b>A x B</b>	7245,2	18	402,5	78,4	0,0000	***
Résiduelle	154,0	30	5,1			
<b>Total</b>	<b>35813,7</b>	<b>59</b>				

**Test de la PPDS** (Interaction Mode de macération x Durée de macération)

Combinaison	Taux de viabilité (%)	Groupes homogènes
STAT x 18H	67,6	A
STAT x 20H	60,0	B
50 RPM x 8H	60,0	B
100 RPM x 8H	60,0	B
STAT x 16H	55,6	C
STAT x 14H	54,5	C
STAT x 6H	50,0	D
STAT x 8H	50,0	D
50 RPM x 6H	50,0	D
100 RPM x 6H	50,0	D
STAT x 22H	40,0	E
100 RPM x 14H	40,0	E
STAT x 24H	33,3	F
50 RPM x 14H	33,3	F
50 RPM x 16H	20,0	G
100 RPM x 16H	20,0	G
100 RPM x 18H	16,7	H
50 RPM x 18H	11,1	I
50 RPM x 20H	4,8	J
50 RPM x 22H	4,0	J
STAT x 2H	0,0	K
STAT x 4H	0,0	K
50 RPM x 2H	0,0	K
50 RPM x 4H	0,0	K
50 RPM x 24H	0,0	K
100 RPM x 2H	0,0	K
100 RPM x 4H	0,0	K
100 RPM x 20H	0,0	K
100 RPM x 22H	0,0	K
100 RPM x 24H	0,0	K

## APPENDICE G

### EFFET DE LA CONCENTRATION DU SACCHAROSE DANS LA COUCHE DE PURIFICATION

#### 1. Taux de récupération

**Tableau de l'analyse de la variance** (Interaction Cultivar x Concentration du saccharose)

Source de variation	SCE	Ddl	CM	F	Probabilité	Signification
A : Cultivar	925,8	2	462,9	1,6	0,2388	NS
B : Concentration du saccharose	15,0	1	15,0	0,1	0,8248	NS
A x B	454,1	2	227,0	0,8	0,4815	NS
Résiduelle	5367,8	18	298,2			
Total	6762,6	23				

#### 1. Taux de perte

**Tableau de l'analyse de la variance** (Interaction Cultivar x Concentration du saccharose)

Source de variation	SCE	Ddl	CM	F	Probabilité	Signification
A : Cultivar	925,8	2	462,9	1,6	0,2388	NS
B : Concentration du saccharose	15,0	1	15,0	0,1	0,8248	NS
A x B	454,1	2	227,0	0,8	0,4815	NS
Résiduelle	5367,8	18	298,2			
Total	6762,6	23				

## APPENDICE H

## EFFET DE LA BALANCE HORMONALE

## 1. Taux de viabilité

« Après 4 jours »

Tableau de l'analyse de la variance (Interaction Cultivar x Balance hormonale)

Source de variation	SCE	Ddl	CM	F	Probabilité	Signification
A : Cultivar	7006,3	1	7006,3	32,8	0,0000	***
B : Balance hormonale	9375,0	2	4687,5	22,0	0,0000	***
A x B	2741,5	2	1370,8	6,4	0,0020	**
Résiduelle	37125,7	174	213,4			
Total	56248,5	179				

Test de la PPDS (Interaction Cultivar x Balance hormonale)

Combinaison	Taux de viabilité (%)	Groupes homogènes
DN-BH N°1	48,34	A
DN-BH N°3	25,12	B
AK-BH N°1	25,12	B
DN-BH N°2	24,86	B
AK-BH N°2	19,20	BC
AK-BH N°3	16,62	C

« Après 15 jours »

Tableau de l'analyse de la variance (Interaction Cultivar x Balance hormonale)

Source de variation	SCE	Ddl	CM	F	Probabilité	Signification
A : Cultivar	6283,4	1	6283,4	47,8	0,0000	***
B : Balance hormonale	7510,0	2	3755,0	28,6	0,0000	***
A x B	1043,6	2	521,8	4,0	0,0225	*
Résiduelle	11039,5	84	131,4			
Total	25876,5	89				

Test de la PPDS (Interaction Cultivar x Balance hormonale)

Combinaison	Taux de viabilité (%)	Groupes homogènes
DN-BH N°1	46,36	A
DN-BH N°2	22,13	B
AK-BH N°1	20,02	B
DN-BH N°3	18,23	BC
AK-BH N°2	10,55	CD
AK-BH N°3	5,85	D

## 2. Taux d'allongement

« Après 4 jours »

**Tableau de l'analyse de la variance** (Interaction Cultivar x Balance hormonale)

Source de variation	SCE	Ddl	CM	F	Probabilité	Signification
<b>A : Cultivar</b>	6832,7	1	6832,7	48,9	0,0000	***
<b>B : Balance hormonale</b>	12740,7	2	6370,4	45,6	0,0000	***
<b>A x B</b>	888,6	2	444,3	3,2	0,0440	*
<b>Résiduelle</b>	24303,0	174	139,7			
<b>Total</b>	44765,0	179				

**Test de la PPDS** (Interaction Cultivar x Balance hormonale)

Combinaison	Taux d'allongement (%)	Groupes homogènes
<b>DN-BH N°1</b>	39,29	<b>A</b>
<b>AK-BH N°1</b>	20,83	<b>B</b>
<b>DN-BH N°2</b>	17,85	<b>B</b>
<b>DN-BH N°3</b>	15,78	<b>B</b>
<b>AK-BH N°2</b>	8,43	<b>C</b>
<b>AK-BH N°3</b>	6,84	<b>C</b>

« Après 15 jours »

**Tableau de l'analyse de la variance** (Interaction Cultivar x Balance hormonale)

Source de variation	SCE	Ddl	CM	F	Probabilité	Signification
<b>A : Cultivar</b>	6881,9	1	6881,9	63,6	0,0000	***
<b>B : Balance hormonale</b>	7208,6	2	3604,3	33,3	0,0000	***
<b>A x B</b>	800,0	2	400,0	3,7	0,0290	*
<b>Résiduelle</b>	9092,4	84	108,2			
<b>Total</b>	23982,9	89				

**Test de la PPDS** (Interaction Cultivar x Balance hormonale)

Combinaison	Taux d'allongement (%)	Groupes homogènes
<b>DN-BH N°1</b>	43,55	<b>A</b>
<b>AK-BH N°1</b>	22,13	<b>B</b>
<b>DN-BH N°2</b>	17,98	<b>B</b>
<b>DN-BH N°3</b>	15,73	<b>B</b>
<b>AK-BH N°2</b>	6,21	<b>C</b>
<b>AK-BH N°3</b>	4,50	<b>C</b>

### 3. Taux de division

« Après 15 jours »

**Tableau de l'analyse de la variance** (Interaction Cultivar x Balance hormonale)

Source de variation	SCE	Ddl	CM	F	Probabilité	Signification
<b>A : Cultivar</b>	1040,4	1	1040,4	46,6	0,0000	***
<b>B : Balance hormonale</b>	1318,2	2	659,1	29,5	0,0000	***
<b>A x B</b>	782,6	2	391,3	17,5	0,0000	***
<b>Résiduelle</b>	1874,8	84	22,3			
<b>Total</b>	5016,0	89				

**Test de la PPDS** (Interaction Cultivar x Balance hormonale)

Combinaison	Taux de division (%)	Groupes homogènes
<b>DN-BH N°1</b>	17,54	<b>A</b>
<b>DN-BH N°2</b>	5,91	<b>B</b>
<b>AK-BH N°1</b>	2,82	<b>BC</b>
<b>DN-BH N°3</b>	1,63	<b>C</b>
<b>AK-BH N°2</b>	1,56	<b>C</b>
<b>AK-BH N°3</b>	0,51	<b>C</b>



# RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

## RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. Zaid, A., Date palm cultivation : FAO plant production and protection paper Bulletin n° 156, Rev. 1, Ed. FAO, Italie, 2002. 318 p.
2. Sedra, M.H., Lashermes, P., Trouslot, P., Combes, M.C. et Hamon S., Identification and genetic diversity analysis of date palm (*Phoenix dactylifera* L.) varieties from Morocco using RAPD markers. *Euphytica*, 1998, n° 103, pp : 75–82.
3. Chabane D., Amélioration du palmier dattier *Phoenix dactylifera* L. par fusion de protoplastes de deux cultivars Deglet Nour sensible et Takerboucht résistant au Bayoud. Thèse Doct. Etat. 109 p. USTHB. 2007.
4. Benkhalifa, A., Diversity of date palm (*Phoenix dactylifera* L.) in the Algerian oases. In Rhouma, A., Rapport de synthèse de l'atelier "Diversité génétique dans les oasis". Ed. CIHEAM-IAMZ, Zaragoza (ESP), n° 28, 1996, 5p. pp : 159-160.
5. Hannachi, S., Benkhalifa, A., Khitri, D. et Brac de la Perriere, R.A., Inventaire variétal de la palmeraie algérienne. Ed. Ministère de l'agriculture et de la pêche, Ministère de l'enseignement supérieur et de la recherche scientifique et CDARS-URZA, Algérie, 1998. 225 p.
6. Chabane, D., Assani, A., Bouguedoura, N., Haïcour, R. et Ducreux, G., Induction of callus formation from difficile date palm protoplasts by means of nurse culture. *C.R. Biologies*, 2007, n° 330, pp : 392-401.
7. El Hadrami, A., El Idrissi-Tourane, A., El Hassni, M., Daayf, F. et El Hadrami, I., Toxin-based *in vitro* selection and its potential application to date palm for resistance to the Bayoud *Fusarium* wilt. *C.R. Biologies*, 2005, n° 328, pp : 732-744.
8. Baaziz, M. et Bendiab, K., Les palmeraies du Maghreb. Quelle amélioration génétique dans un contexte d'érosion de la diversité génétique de *Phoenix dactylifera* L.?, In Biotechnologies végétales et gestion durable des résistance face à des stress biotiques et abiotiques, Actes des 6<sup>èmes</sup> Journées Scientifiques du Réseau Biotechnologies Végétales/Amélioration des plantes et sécurité alimentaire de l'AUF. Agrocampus Rennes (Université de Rennes), du 30 juin au 3 juillet 2008, 216 p. pp : 21.

9. Djennane, A., Constat de situation dans des zones Sud des oasis algériennes. Option Méditerranéennes CIHEAM-IAMM, 1990, n° 11, pp : 29-40.
10. El Hadrami, I., El Jaafari, S. et Daayf, F., Les biotechnologies végétales : intégration chez le palmier dattier (*Phoenix dactylifera* L.), pivot de l'agriculture oasienne. Cas du Maroc., In Biotechnologies, Amélioration des plantes et sécurité alimentaires, Actes des 6<sup>èmes</sup> Journées Scientifiques du Réseau Biotechnologies Végétales AUPELF-UREF. Centre universitaire d'Orsay, du 30 juin au 3 juillet 1997, 571 p. pp : 23-27.
11. Sedra, M.H., Le palmier dattier base de la mise en valeur des oasis au Maroc, techniques phoénicoles et création d'oasis. Ed. INRAM, Rabat (Maroc), 2003. 254p.
12. Bouguedoura, N., Les biotechnologies dans la lutte contre le Bayoud du palmier dattier (*Phoenix dactylifera* L.). In Proceeding du Colloque International sur les Biotechnologies : Quelle biotechnologie pour les pays du sud ? Biotech World 2007. Oran-Algérie, du 24-25 Novembre 2007, 571 p. pp : 95-96.
13. Bounaga, N. et Djerbi, M., Pathologie du palmier dattier. Option Méditerranéennes CIHEAM-IAMM, 1990, Série A, n° 11, pp : 127-132.
14. El Hassni, M., El Hadrami, A., Daayf, F., Cherif, M., Ait Barka, E., El Hadrami, I., Biological control of Bayoud disease in date palm: Selection of microorganisms inhibiting the causal agent and inducing defense reactions. Environmental and Experimental Botany, 2007, n° 59, pp : 224–234.
15. Davey, M.R., Anthony, P., Power, J.B. et Lowe, K.C., Plant protoplasts: status and biotechnological perspectives. Biotechnology Advances. 2005, n° 23, pp : 131-171.
16. Boufis, N., Régénération par embryogenèse somatique de vitroplants de palmier dattier (variété Degla Beïda) en vue de la résistance contre le Bayoud. Thèse Magister en sciences agronomiques. INA, Alger. 96 p. 2008.
17. Djillali, Z., Régénération par embryogenèse somatique de vitroplants de palmier dattier (cultivars Deglet Nour et Akerbouch) en vue de la résistance contre le Bayoud. Thèse Magister en sciences agronomiques. INA, Alger. 98 p. 2008.
18. Peyron, G., Cultiver le palmier dattier, Ed. CIRAD, France, 2000. 110 p.
19. Munier, P., Le palmier dattier, Ed. G.P. Maisonneuve et Laros, Paris, 1973. 209 p.

- 20.** Ben Abdallah, A., La phoeniciculture. Option Méditerranéennes CIHEAM-IAMM, 1990, Série A, n° 11, pp : 105-120.
- 21.** Morton, J.F., Date (*Phoenix dactylifera* L.). Fruits of warm climates, Miami. 1987, pp : 5-11.
- 22.** Loutfi, K. et El Hadrami, I., *Phoenix dactylifera* L. Date palm. In Litz, R.E., Biotechnology in agriculture series, n° 29. Biotechnology of fruit and nut crops. Ed. CABI Publishing, USA, 723 p. 2005, pp : 144-156
- 23.** Bennaceur, M., Benkhalifa, A., Chevallier, M.H. et Bouguedoura, N., Diversité au sein des cultivars de palmier dattier (*Phoenix dactylifera* L.) à l'aide des marqueurs microsatellites du cocotier (*Cocos nucifera* L.) et du palmier à huile (*Elaeis guineensis* Jacq.). In Proceeding du Colloque International sur les Biotechnologies : Quelle biotechnologie pour les pays du sud ? Biotech World 2007. Oran-Algérie, du 24-25 Novembre 2007, 571 p. pp : 332-335.
- 24.** Benkhalifa, A., Bennaceur, M., Chevallier, M.H. et Riveill, N., Structure de la diversité génétique du palmier dattier (*Phoenix dactylifera* L.), In Actes du séminaire international sur l'amélioration des productions végétales – APV 2005, Alger (Algérie), du 5 au 7 décembre 2005, 319 p. pp : 299.
- 25.** El Modafar, C., Tantaoui, A. et El Boustani, E., Changes in cell wall bound phenolic compounds and lignin in roots of date palm cultivars in susceptibility to *Fusarium oxysporum* f.sp. *albedinis*. J. Phytopathology. 2000, n° 148, pp : 405-411.
- 26.** Soliman, S.S., Ali, B.A. et Ahmed, M.M.M., Genetic comparisons of Egyptian date palm cultivars (*Phoenix dactylifera* L.) by RAPD-PCR. African Journal of Biotechnology. 2003, Vol 2, n° 4, pp : 86-87.
- 27.** Dutuit, P., Pourrat, Y. et Dodeman, V.L., Stratégie d'implantation d'un système d'espèces adaptées aux conditions d'aridité du pourtour méditerranéen. L'amélioration des plantes pour l'adaptation aux milieux arides. Ed. AUPELF-UREF. John Libbey. Eurotext. Paris, 1991. pp : 65-73.
- 28.** Ministère de l'Agriculture et du Développement Rural., Statistiques agricoles, 2007, série B.
- 29.** Bendahou, A., Dufresne, A., Kaddami, H. et Habibi, Y., Isolation and structural characterization of hemicelluloses from palm of *Phoenix dactylifera* L. Carbohydrate Polymers. 2007, n° 68, pp : 601–608.

- 30.** Saaidi, M., Amélioration génétique du palmier dattier. Critères de sélection, techniques et résultats. Option Méditerranéennes CIHEAM-IAMM, 1990, Série A, n° 11, les systèmes agricoles oasiens, pp : 133-154.
- 31.** Soliman, S.S., Behavior Studies of Zaghloul Date Palm Cultivar under Aswan environment. Journal of Applied Sciences Research. 2006, n° 2, V. 3, pp : 184-191.
- 32.** Medjekal, S., Rachedi, K., Arhab, R., Rira, M. et Bousseboua, H., Etude de la fermentation *in vitro* des sous produits de l'agronomie saharienne par le microbiote ruminal de caprins. In Proceeding du Colloque International sur les Biotechnologies : Quelle biotechnologie pour les pays du sud ? Biotech World 2007. Oran-Algérie, du 24-25 Novembre 2007, 571 p. pp : 187-189.
- 33.** Ferry, M., 1996 – La crise du secteur phoéniciicole dans les pays méditerranéens. Quelles recherches pour y répondre? Option Méditerranéennes CIHEAM-IAMM, 1996, n° 28, pp : 129-156.
- 34.** Food and Agriculture Organization Statistics., Statistiques agricoles de l'Organisation Mondiale des Nations Unis pour l'Agriculture et l'Alimentation. 2007.
- 35.** Fernandez, D., Lourd, M., Ouinten, M., Tantaoui, A. et Geige, J.P., Le Bayoud du palmier dattier. Phytoma. La Défense des végétaux. 1995, n° 469, pp : 36-39.
- 36.** Bouguedoura, N., Rapport de synthèse de l'atelier "Fusariose du Palmier dattier/Maladie de la feuille cassante". Options Méditerranéennes CIHEAM-IAMZ. 1996, n° 28, pp : 217-218.
- 37.** Qacif, N., Bendiab, K. et Baaziz, M., Variabilité des endopeptidases chez le palmier dattier. Caractérisation des lots de plants issus de croisements. Congrès International de Biochimie, Marrakech, Maroc, du 3 au 6 mai 2004, pp : 74-76.
- 38.** El modafar, C. et El Boustani, E., Relationship between cell wall susceptibility to cellulases and pectinases of *Fusarium oxysporum* and susceptibility of date palm cultivars. Biologia Plantarum. 2000, V. 43, n° 4, pp : 571-576.
- 39.** Bouizgarne, B., Brault, M., Pennarun, A.M., Rona, J.P., Ouhdouch, Y., El Hadrami, I. et Bouteau, F., Electrophysiological responses to fusaric acid of root

hairs from seedlings of date palm – susceptible and – resistant to *Fusarium oxysporum* f. sp. *albedinis*. J. Phytopathology. 2004, n° 152, pp : 321-324.

**40.** Djerbi, M., Biotechnologies du palmier dattier (*Phoenix dactylifera* L.) : voie de propagation des clones résistants au Bayoud et de haute qualité dattière. Options méditerranéennes CIHEAM-IAMZ. 1991, Série Séminaires, n° 14, pp : 31-38.

**41.** Saadi, I., Namsi, A., Ben Mahamoud, O., Takrouni, M.L., Zouba, A., Bové, J.M. et Duran-Vila, N., First report of “maladie des feuilles cassantes” (brittle leaf disease) of date palm in Algeria. Plant Pathology. 2006, n° 55, pp : 572.

**42.** Ben Abdallah, A. et Lepoivre, P., Analyse des potentialités androgénétiques du pollen de palmier dattier., In Biotechnologies, Amélioration des plantes et sécurité alimentaires, Actes des 6<sup>èmes</sup> Journées Scientifiques du Réseau Biotechnologies Végétales AUPELF.UREF. Centre universitaire d’Orsay, du 30 juin au 3 juillet 1997, 571 p. pp : 531-532.

**43.** Al Khayri, J.M., Date palm *Phoenix dactylifera* L. micropropagation, In Jain, S.M. et Häggman, H., Protocols for micropropagation of woody trees and fruits. Ed. Springer, 2007. pp : 509-526..

**44.** Sané, D., Aberlenc-Bertossi, F., Gassama-Dia, Y.K., Sagna, M., Trousslot, M.F., Duval Y. et Borgel, A., Histological analyse of Callogenesis and Somatic Embryogenesis from Cell Suspensions of Date Palm (*Phoenix dactylifera*). Annals of Botany. 2006, n° 98, pp : 301-308.

**45.** Sané, D., Aberlenc-Bertossi, F., Gueye, B., Daher, A., Sagna, M., Duval, Y., Tregear, J. et Borgel, A., Etude des conditions d’amélioration de la qualité des embryons somatiques obtenus à partir de suspensions cellulaires embryogènes chez le palmier dattier (*Phoenix dactylifera* L.). In Biotechnologies végétales et gestion durable des résistance face à des stress biotiques et abiotiques, Actes des 6<sup>èmes</sup> Journées Scientifiques du Réseau Biotechnologies Végétales/Amélioration des plantes et sécurité alimentaire de l’AUF. Agrocampus Rennes (Université de Rennes), du 30 juin au 3 juillet 2008, 216 p. pp : 176.

**46.** Sghaier, B., Bahloul, M., Gargouri, B.R. et Drira, N., Development of zygotic and somatic embryos of *Phoenix dactylifera* L. cv. Deglet Nour: Comparative study. Scientia Horticulturae. 2007, n° 116, pp : 169-175.

- 47.** Chaïbi, N., Ben Abdellah, A., Harzallah, H. et Lepoivre, P., Potentialités androgénétiques du palmier dattier *Phoenix dactylifera* L. et culture *in vitro* d'anthers. *Biotechnol. Agron. Soc. Environ.* 2002, V. 6, n° 4, pp : 201-207.
- 48.** Demarly, Y., Les biotechnologies végétales appliquées à la production végétale : Situation actuelle et perspectives. *Options méditerranéennes.* 1991, Série séminaires, n° 14, pp : 23-30.
- 49.** Khelafi, H., Abed, F., Amara, B., Kermiche, A. et Djellal, L., Evaluation de la résistance de quelques mutants de la variété Deglet Nour de palmier dattier vis-à-vis du *Fusarium oxysporum* f.sp *albedinis* , In Actes du séminaire international sur l'amélioration des productions végétales – APV 2005, Alger (Algérie), du 5 au 7 décembre 2005, 319 p. pp : 298.
- 50.** Fki, L., Bouaziz, N., Panis, B. et Drira, N., La technique de congélation en gouttes des masses proembryogènes : un moyen efficace pour la conservation des ressources génétiques phoénicoles, In *Biotechnologies végétales et gestion durable des résistance face à des stress biotiques et abiotiques*, Actes des 6<sup>èmes</sup> Journées Scientifiques du Réseau Biotechnologies Végétales/Amélioration des plantes et sécurité alimentaire de l'AUF. Agrocampus Rennes (Université de Rennes), du 30 juin au 3 juillet 2008, 216 p. pp : 16.
- 51.** Sihachakr, D., Protoplastes : Isolement, culture, régénération au polyéthylène glycol, In Haïcour, A., *Biotechnologies végétales ; techniques de laboratoire.* Ed. Lavoisier Tec & Doc, Paris. 2002, 305 p. pp : 177-199.
- 52.** Kefeng, F., Lingyun, Z. et Jinxing, L., A rapid, efficient method for the mass production of pollen protoplasts from *Pinus bungeana* Zucc. ex Endl. and *Picea wilsonii* Mast. *Flora.* 2006, n° 201, pp : 74–80.
- 53.** Auge, R. et Boccon-Gibod, J., la culture *in vitro* et ses applications horticoles. Ed. J.B BAILLIÈRE, Paris, 1989, 225 p.
- 54.** Haïcour, R., Assani, A., Matsumoto, K., Guedira, A., Banana protoplasts. In *Banana improvement.* Ed. FAO, Corporate Document Repository, 2007.
- 55.** Vreeburg, R.A.M. et Fry, S.C., Reactive oxygen species in cell walls, In Smirnoff, N., *Antioxidants and reactive oxygen species in plants.* Ed. Blackwell Publishing Ltd, United Kingdom, 2005, 302 p. pp : 215-249.

- 56.** Veilleux, R.E., Compton, M.E. et Saunders, J.A., Use of protoplasts for plant improvement, In Trigiano, R.N. et Gray, D.J., Plant development and biotechnology. Ed. CRC Press, USA. 2005, 358 p. pp : 213-224.
- 57.** Power, J.B. et Davey, M.R., Protoplasts of higher and lower plants, In Pollard, J.W. et Walker, J.M., Methods in molecular biology, V. 6 : Plant cell and tissue culture. Ed. The Humana Press, USA. 1990, 588 p. pp : 237-260.
- 58.** Sun, Y., Zhang, X., Huang, C., Nie, Y. et Guo, X., Plant regeneration via somatic embryogenesis from protoplasts of six explants in Coker 201 (*Gossypium hirsutum*). Plant Cell, Tissue and Organ Culture. 2005 b, n° 82, pp : 309-315.
- 59.** Assani, A., Haïcour, R., Wenzel, G., Foroughi-Wehr, B., Bakry, F., Côte, F.X., Ducreux, G., Ambroise, A. et Grapin, A., Influence of donor material and genotype on protoplast regeneration in banana and plantain cultivars (*Musa* spp.). Plant Science. 2002, n° 162, pp : 355-362.
- 60.** Fiuk, A. et Rybczyński, J.J., The effect of several factors on somatic embryogenesis and plant regeneration in protoplasts cultures of *Gentiana kurroo* (Royle). Plant Cell Tiss Organ Cult. 2007, n° 91, pp : 263-271.
- 61.** Sun, M., Kieft, H., Zhou, C. et Van Lammeren, A., A co-culture system leads to the formation of microcalli derived from microspore protoplasts of *Brassica napus* L. cv. Topas. Protoplasma. 1999, n° 208, pp : 265-274.
- 62.** Mehri-Kamoun, R., Effet de la Pectolyase Y23 et de la Cellulase RS sur le rendement en protoplastes viables de *Prunus cerasus* L. "Montmorency". Biotechnol. Agron. Soc. Environ. 2001, V. 5, n° 2, pp : 99-104.
- 63.** Takebe, I., Otsuki, Y. et Aoki, S., Isolation of tobacco mesophyll cells in intact and active state. Plant Cell Physiol. 1968, V. 9, n° 1, pp : 115-124.
- 64.** Power, J.B. et Cocking, E.C., Isolation of leaf protoplasts : macromolecular uptake and growth substance response. J. Exp. Bot. 1970, n° 21, pp : 64-70.
- 65.** Takebe, I., Labib, G. et Melchers, G., Regeneration of whole plants from isolated mesophyll protoplasts of tobacco. Naturwissenschaften. 1971, n° 58, pp : 318-320.
- 66.** Imbrie-Milligan, C. et HODGES, T.K., Microcallus formation from maize protoplasts prepared from embryogenic callus. Planta. 1986, n° 168, pp : 395-401.



- 67.** Shea, E.M., Gibeaut, D.M. et Carpitan, C., Structural analysis of the cell walls regenerated by carrot protoplasts. *Planta*. 1989, V. 179, n° 3, pp : 293-308.
- 68.** Mehri-Kamoun, R., Lepoivre, P. et Boxus, P., Isolement de protoplastes à partir de mésophylle, de cals de feuilles et de cals de racines de *Prunus cerasus* L., var. « Montmorency ». *Quel avenir pour l'amélioration des plantes?*. Ed. AUPELF-UREF. John Libbey Eurotext, Paris. 1994, pp : 321-329.
- 69.** Cocking, E.C., Plant protoplasts. *In Vitro Cell. Dev. Biol.-Plant*. 2000, n° 36, pp : 77-82.
- 70.** Smith, H., The molecular biology of plant cells Botanical monographs, V. 4. Ed. University of California Press, USA, 1977, 496 p.
- 71.** Ochatt, S.J., Escandon, A.S. et Martinez, A.J., Isolation culture and plant regeneration from protoplasts of shrubby *Oxalis* species from South America. *J Exp Bot*. 1989, n° 40, pp : 493-496.
- 72.** Fellner, M. et Lebeda, A., Callus induction and protoplast isolation from tissues of *Cucumis sativus* L. and *C. melo* L. seedlings. *Biologia Plantarum*. 1998, V. 41, n° 1, pp : 11-24.
- 73.** Fernandez-Da Silva, R. et Menédez-Yuffá, A., Viability in protoplasts and cell suspensions of *Coffea arabica* cv. Catimaor. *Electronic Journal of Biotechnology*. 2006, V. 9, n° 5, issue of October, pp : 593-597.
- 74.** Castro-Concha, L.A., Escobedo, R.M. et Miranda-Ham, M.D.L., Measurement of cell viability in *in vitro* cultures, In Loyola-Vargas, V.M. et Vázquez-Flota, F., *Methods in molecular biology*, V. 318: Plant cell culture protocols, 2<sup>ème</sup> Edition. Ed. The Humana Press, USA. 2006, 393 p. pp : 71-76.
- 75.** Duncan, D.R. et Widholm, J.M., Measurements of viability suitable for plant tissue culture, In Pollard, J.W. et Walker, J.M., – *Methods in molecular biology*, V. 6: Plant cell and tissue culture. Ed. The Humana Press, USA. 1990, 588 p. pp : 29-37.
- 76.** Commun, K., Mauro, M.C., Chupeau, Y., Boulay, M., Burrus, M. et Jeandet, P., Phytoalexin production in grapevine protoplasts during isolation and culture. *Plant Physiology and Biochemistry*. 2003, n° 41, pp : 317-323.
- 77.** Murashige, T. et Skoog, F., A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant*. 1962, n° 15, pp : 473-497.

- 78.**Gamborg, O.L., Miller, R.A. et Ojima, K., Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells. *Exp Cell Res.* 1968, V. 50, Issue 1, pp : 151-158.
- 79.**Kao, K.N. et Michayluk, M., Nutritional requirements for growth of *Vicia hajastona* cells and protoplasts at very low population densities in liquid media. *Planta.* 1975, n° 126, pp : 105-110.
- 80.**Uchimiya, H. et Murashige, T., Influence of the nutrient medium on the recovery of dividing cells from tobacco protoplasts. *Plant Physiol.* 1976, n° 57, pp : 424-429.
- 81.**Duquenne, B., Eeckhaut, T., Werbrouck, S. et Huylenbroeck, J.V., Effect of enzyme concentrations on protoplast isolation and protoplast culture of *Spathiphyllum* and *Anthurium*. *Plant Cell Tiss Organ Cult.* 2007, n° 91, pp : 165-173.
- 82.**Winkelmann, T., Specht, J. et Serek, M., Efficient plant regeneration from protoplasts isolated from embryogenic suspension cultures of *Cyclamen persicum* Mill. *Plant Cell Tiss Organ Cult.* 2006, n° 86, pp : 337-347.
- 83.**Aoyagi, H., Development of a quantitative method for determination of the optimal conditions for protoplast isolation from cultured plant cells. *Biotechnol Lett.* 2006, n° 28, pp : 1687–1694.
- 84.**Pati, P.K., Sharma, M. et Ahuja, P.S., Extra thin alginate film: an efficient technique for protoplasts culture. *Protoplasma.* 2005, n° 226, pp : 217-221.
- 85.**Majewska-Sawka, A. et Münster, A., Cell wall antigens in mesophyll cells and mesophyll derived protoplasts of sugar beet: possible implication in protoplasts recalcitrance? *Plant Cell Rep.* 2003, n° 21, pp : 946-954.
- 86.**Schmidt, R. et Poole, R.J., Isolation of protoplasts and vacuoles from storage tissue of red beet. *Plant Physiol.* 1980, n° 66, pp : 25-28.
- 87.**D'onofrio, C., Morini, S. et Vitagliano, C., Isolation of protoplasts from *in vitro* grown quince BA29 leaves. *In Vitro Cell. Dev. Biol.-Plant.* 1999, n° 35, pp : 421-423.
- 88.**Dovzhenko, A., Dal Bosco, C., Meurer, J. et Koop, H.U., Efficient regeneration from cotyledon protoplasts in *Arabidopsis thaliana*. *Protoplasma.* 2003, n° 222, pp : 107-111.
- 89.**Assani, A., Haïcour, R., Wenzel, G., Côte, F.X., Bakry, F., Foroughi-Wehr, B., Ducreux, G., Aguillar, M.E. et Grapin, A., Plant regeneration from protoplasts

of dessert banana cv. Grande Naine (*Musa* spp., Cavendish sub-group AAA) via somatic embryogenesis. *Plant Cell Rep.* 2001, n° 20, pp : 482-488.

**90.** Zhou, J., Wang, B. et Zhu, L., Conditioned culture for protoplasts isolated from chrysanthemum: An efficient approach. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces.* 2005, n° 45, pp : 113-119.

**91.** Collonnier, C., Fock, I., Daunay, M.C., Servaes, A., Vedel, F., Siljak-Yakovlev, S., Souvannavong, V. et Sihachakr, D., Somatic hybrids between *Solanum melongena* and *S. sisymbriifolium*, as a useful source of resistance against bacterial and fungal wilts. *Plant science.* 2003, n° 164, pp : 849-861.

**92.** Tang, K., Zhao, E., Hu, Q., Yao, J. et Wu, A., A simple and efficient procedure to improve plant regeneration from protoplasts isolated from long-term cell-suspension cultures of indica rice. *In Vitro Cell. Dev. Biol.-Plant.* 2000b, n° 36, pp : 362-365.

**93.** Szczerbakowa, A., Borkowska, M. et Wielgat, B., Plant regeneration from the protoplasts of *Solanum tuberosum*, *S. nigrum* and *S. bulbocastanum*. *Acta Physiologiae Plantarum.* 2000, V. 22, n° 1, pp : 3-10.

**94.** Ehsanpour, A.A. et Jones, G.K., Plant regeneration from mesophyll protoplasts of potato (*Solanum tuberosum* L.) cultivar Delaware using Silver ThioSulfate (STS). *J. Sci.I.R. Iran.* 2001, V. 12, n° 2, pp : 103-110.

**95.** Sun, Y., Zhang, X., Huang, C., Nie, Y. et Guo, X., Factors influencing *in vitro* regeneration from protoplasts of wild cotton (*G. klotzschianum* A) and RAPD analysis of regenerated plantlets. *Plant Growth Regulation.* 2005a, n° 46, pp : 79-86.

**96.** Yang, X., Guo, X., Zhang, X., Nie, Y. et Jin, S., Plant regeneration from *Gossypium davidsonii* protoplasts *via* somatic embryogenesis. *BIOLOGIA PLANTARUM.* 2007, n°3, V. 51, pp : 533-537.

**97.** Tang, K., Sun, X., An, D., Power, J.B., Cocking, E.C. et Davey, M.R., Plant regeneration from protoplasts of a commercial Asian long-grain javanica rice. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture.* 2000a, n° 60, pp : 79-82.

**98.** Hasegawa, H., Sato, M. et Suzuki, M., Efficient plant regeneration from protoplasts isolated from long-term, shoot primordia-derived calluses of garlic (*Allium sativum*). *Journal of Plant Physiology.* 2002, n° 159, pp : 449-452.

**99.** Ma, R., Guo, Y.D. et Pulli, S., Somatic embryogenesis and fertile green plant regeneration from suspension cell-derived protoplasts of rye (*Secale cereale* L.). *Plant Cell Reports.* 2003, n° 22, pp : 320-327.

- 100.** Guo, Y., Bai, J. et Zhang, Z., Plant regeneration from embryogenic suspension-derived protoplasts of ginger (*Zingiber officinale* Rosc.). *Plant Cell Tiss Organ Cult.* 2007, n° 89, pp : 151-157.
- 101.** Monteiro, M., Appezzato-Da-Glória., Valarini, M.J., De Oliveira, C.A. et Vieira, M.L.C., Plant regeneration from protoplasts of alfalfa (*Medicago sativa*) via somatic embryogenesis. *Scientia Agricola.* 2003, V. 60, n° 4, pp : 683-689.
- 102.** Dovzhenko, A. et Koop, H.U., Sugarbeet (*Beta vulgaris* L.): shoot regeneration from callus and callus protoplasts. *Planta*2003, n° 217, pp : 374-381.
- 103.** Hida, A., Shimizu, K., Nagata, R., Yabuya, T. et Adachi, T., Plant regeneration from protoplasts of *Iris hollandica* Hort. *Euphytica.* 1999, n° 105, pp : 99-102.
- 104.** Nassour, M. et Dorion, N., Plant regeneration from protoplasts of micropropagated *Pelargonium x hortorum* 'Alain': effect of some environmental and medium factors on protoplast system efficiency. *Plant Science.* 2002, n° 163, pp : 169-176.
- 105.** Jullien, F., Diemer, F., Colson, M. et Faure, O., An optimising protocol for protoplast regeneration of three peppermint cultivars (*Mentha x piperita*). *Plant Cell, Tissue and Organ Culture.* 1998, n° 54, pp : 153-159.
- 106.** Pan, Z.G., Liu, C.Z., Murch, S.J., El-Demerdash, M. et Saxena, P.K., Plant regeneration from mesophyll protoplasts of the Egyptian medicinal plants *Artemisia judaica* L. and *Echinops spinosissimus* Turra. *Plant Science.* 2003, n°165, pp : 681-687.
- 107.** Assani, A., Chabane, D., Foroughi-Wehr, B. et Wenzel, G., An improved protocol for microcallus production and whole plant regeneration from recalcitrant banana protoplasts (*Musa* spp.). *Plant Cell, Tissue and Organ Culture.* 2006, n° 85, pp : 257-264.
- 108.** Xiao, W., Huang, X-L., Huang, X., Chen, Y-P., Dai, X-M. et Zhao, J-T., Plant regeneration from protoplasts of *Musa accuminata* cv. Mas (AA) via somatic embryogenesis. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture.* 2007, n° 90, pp : 191-200.
- 109.** Du, L. et Bao, M., Plant regeneration from protoplasts isolated from embryogenic suspension cultured cells of *Cinnamomum camphora* L. *Plant Cell Rep.* 2005, n° 24, pp : 462-467.

- 110.** Pavan, U., Rao, K.V., Kiranmayee, K., Sree, T.J. et Sadanandam, A., Plant regeneration of mulberry (*Morus indica*) from mesophyll-derived protoplasts. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. 2005, n° 82, pp : 289-293.
- 111.** Ge, T.M., Lin, X.H., Qin, F.L., Yu, S.W. et Yu, Y.J., Protoplasts electrofusion between common wheat (*Triticum aestivum* L.) and Italian ryegrass (*Lolium multiflorum* Lam.) and regeneration of mature cybrids. *In Vitro Cell. Dev. Biol.-Plant*. 2006, n° 42, pp : 179-187.
- 112.** Sigareva, M.A. et Earle, E.D., Regeneration of plants from protoplasts of *Capsella bursa-pastoris* and somatic hybridization with rapid cycling *Brassica oleracea*. *Plant Cell Reports*. 1999, n° 18, pp : 412-417.
- 113.** Shiba, T. et Mii, M., plant regeneration from mesophyll and cell suspension derived protoplasts of *Dianthus acicularis* and characterization of regenerated plants. *In Vitro Cell. Dev. Biol.-Plant*. 2005, n° 41, pp : 794–800.
- 114.** Gamborg, O.L., Plant tissue culture. Biotechnology. Milestones. *In Vitro Cell. Dev. Biol.-Plant*. 2002, n° 38, pp : 84-92.
- 115.** Matsumoto, K., Vilarinhos, A.D. et Oka, S., Somatic hybridization by electrofusion of banana protoplasts. *Euphytica*. 2002, n° 125, pp : 317-324.
- 116.** Dhir, S.K., Dhir, S., Sturtevant, A.P. et Widholm, J.M., Regeneration of transformed shoots from electroporated soybean (*Glycine max* (L.) Merr.) protoplasts. *Plant Cell Reports*. 1991, n° 10, pp : 97-101.
- 117.** Rene, S., Biotechnologie. Ed. technique et documentation (Lavoisier), 2<sup>ème</sup> édition, Paris (France). 1984, 662p.
- 118.** Sencia, M., Takeda, J., Abe, S. et Nakamura, T., Induction of cell fusion of plant protoplasts by electrical stimulation. *Plant Physiol*. 1979, V. 20, n° 7, pp : 1441-1443.
- 119.** Zimmermann, U., Scheurich, P., Pilwat, G. et Benz, R., Cells with manipulated functions : new perspectives for cell biology, medicine and technology. *Angew Chem Int Ed Engl*. 1981, V. 20, Issue 4, pp : 325-344.
- 120.** Donovan, A., Isaac, S. et Collin, H.A., Electrofusion of plant cells, In Pollard, J.W. et Walker, J.M., *Methods in molecular biology*, V. 6 : Plant cell and tissue culture. Ed. The Humana Press, USA. 1990, 588 p. pp : 373-380.
- 121.** Olivares-Fuster, O., Duran-Vila, N. et Navarro, L., Electrochemical protoplasts fusion in citrus. *Plant Cell Rep*. 2005, n° 24, pp : 112-119.

- 122.** Chen, K., Wildman, S.G. et Smith, H.H., Chloroplast DNA distribution in parasexual hybrids as shown by polypeptide composition of fraction I protein. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1977, V. 74, n° 11, pp : 5109-5112.
- 123.** Abed, F., Yatta, D., Khelafi, H., Yakhou, M.S., Amara, M. et Djelleli, L., Optimisation de la technique d'obtention des suspensions cellulaires et de protoplastes en vue d'une hybridation somatique chez le palmier dattier (*Phoenix dactylifera* L.). In Abed, F., conférence régionale : Mutagenèse Induite et Biotechnologies d'Appui pour la protection de palmier dattier contre le Bayoud, Alger. 2006. pp : 43-44.
- 124.** Gabr, M.F. et Tisserat, B., Parameters involved in the isolation, culture, cell wall regeneration and callus formation from palm and carrot protoplasts. The date palm journal. Ed. F.A.O. 1984, V. 3, n° 2, pp : 359-365.
- 125.** Moussouni, S. et Si-Dehbi, F., Essai d'isolement de protoplastes chez le palmier dattier (*Phoenix dactylifera* L.) : cultivar Deglet Nour et cultivar Takerboucht. Thèse DES, USTHB, Alger. 54 p : 2003.
- 126.** Rizkalla, A.A., Badr-Elden, A.M. et Nower, A.A., Protoplast Isolation, Salt Stress and Callus Formation of Two Date Palm Genotypes. Journal of Applied Sciences Research. 2007, V. 3, n° 10, pp : 1186-1194.
- 127.** Shabana, H.R., Al Shiraqui, R.M.K., Mansoor, M.L. et Al Safadi, W.M., Comparison between date palm fruits produced from tissue culture and offshoot plants (HILALI cultivar). Ed. Ministry of Agriculture and Fisheries, Dubai UAE. 1996, 5 p.
- 128.** Al Wasel, A., Motawei, M.I. et Khalifah, N., RAPD and ISSR primers revealed the polymorphism among *in vitro*-derived date palm trees of Barhee cultivar. In Proceeding du International Symposium on Biotechnology, Sfax-Tunisie, du 4-5 May 2008, 732 p. pp : 509.
- 129.** Fki, L., Masmoudi, R., Drira, N. et Rival, A., An optimised protocol for plant regeneration from embryogenic suspension cultures of date palm, *Phoenix dactylifera* L., cv. Deglet Nour. Plant Cell Rep. 2003, n° 21, pp : 517-524.
- 130.** Tisserat, B., Propagation of date palm (*Phoenix dactylifera* L.) *in vitro*. Journal of Experimental Botany. 1979, V. 30, n° 6, pp : 1275-1283.
- 131.** Zhu, L., Wang, B., Zhou, J., Chen, L., Dai, C. et Duan, C., Protoplast isolation of callus in *Echinacea angustifolia*. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces. 2005, n° 44, pp : 1-5.

- 132.** Zhun, G., Dai, S.X., Chen, S.L., Shen, X. et Wang, R.G., Isolation from callus of *Populus euphratica* and H<sup>+</sup> fluxes across plasma membrane under NaCl stress. *Forestry Studies in China*. 2007, V. 9, n° 3, pp : 198-202.
- 133.** Hou, S.W. et Jia, J.F., Plant regeneration from protoplasts isolated from embryogenic calli of the forage legume *Astragalus melilotoides* Pall. *Plant Cell Rep.* 2004, n°22, pp : 741-746.
- 134.** Majewska-Sawka, A., Nakashima, H., Mori, K. et Shimaoto, Y., Protoplast isolation from mésophylle of *Beta* species. *Proc. Japan. Soc. Sugar Beet Technol.* 1990, n°32, pp : 129-133.
- 135.** Mehri-Kamoun, R., Lepoivre, P. et Boxus, P., Relation entre l'activité spécifique des enzymes et la digestion de la paroi pour l'obtention de protoplastes de *Prunus cerasus* L. « Montmorency », In *Biotechnologies, Amélioration des plantes et sécurité alimentaires, Actes des 6<sup>èmes</sup> Journées Scientifiques du Réseau Biotechnologies Végétales AUPELF.UREF*. Centre universitaire d'Orsay, du 30 juin au 3 juillet 1997, 571 p. pp : 513-518.
- 136.** Azad, M.A.K., Yokota, S., Ishiguri, F. et Yoshizawa, N., Plant regeneration from mesophyll protoplasts of a medicinal plant, *Phellodendron amurense* Rupr. *In Vitro Cell. Dev. Biol.-Plant.* 2006, n°42, pp : 502-507.
- 137.** Lyon, G.D. et Mayo, M.A., The phytoalexin Rishitin affects the viability of isolated plant protoplasts. *Phytopath. Z.* 1978, n° 92, pp : 298-304.
- 138.** Luo, J.P. et Jia, J.F., Plant regeneration from callus protoplasts of the forage legume *Astragalus adsurgens* Pall. *Plant Cell Reports.* 1998, n° 17, pp : 313-317.
- 139.** Kim, J.B., M. Bergervoet, J.E., M. Raemakers, C.J.J., Jacobsen, E. et Visser, R.G.F., Isolation of protoplasts, and culture and regeneration into plants in *Alstroemeria*. *In Vitro Cell. Dev. Biol.-Plant.* 2005, n° 41, pp : 505–510.
- 140.** Sinha, A., Wetten, AC. et Caligari, P.D.S., Effect of biotic factors on the isolation of *Lupinus albus* protoplasts. *Australian Journal of Botany.* 2003, V. 51, n° 1, pp : 103-109.
- 141.** George, E.F., Plant tissue culture procedure – Background, In George, E.F., Hall, M.A. et De Klerk, G.J., *Plant propagation by tissue culture, V. 1: The Background*, 3<sup>ème</sup> Edition. Ed. Springer, Netherlands, 2008, 501 p. pp : 1-28

- 142.** Conde, P. et Santos, C., An efficient protocol for *Ulmus minor* Mill. protoplasts isolation and culture in agarose droplets. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. 2006, n° 86, pp : 359–366.
- 143.** Umoh, E.O., A comparative assessment of the purification techniques for etiolated seedling protoplast of *Sorghum bicolor*. *African Crop Science Journal*. 1997, V. 5, n° 2, pp : 197-200.
- 144.** Srivastava, L.M., Plant growth and development hormones and environment. Ed. ELSEVIER Academic Press, USA. 2002, 772 p.
- 145.** Bond, P.A., Batch suspension culture, In Pollard, J.W. et Walker, J.M., *Methods in molecular biology*, V. 6 : Plant cell and tissue culture. Ed. The Humana Press, USA. 1990, 588 p. pp : 495-502.
- 146.** Horine, R.K. et Ruesink, A.W., Cell wall regeneration around protoplasts isolated from *Convolvulus* tissue culture. *Plant Physiol*. 1972, n°50, pp : 438-445.
- 147.** Watanabe, M., Setoguchi, D., Uehara, K., Ohtsuka, W. et Watanabe, Y., Apoptosis-like cell death of *Brassica napus* leaf protoplasts. *New Phytologist*. 2002, n° 156, pp : 417-426.
- 148.** Morgan, P.W. et Drew, M.C., Plant cell death and cell differentiation, In Noodén, L.D., *Plant cell death processes*. Ed. ELSEVIER Academic Press, USA. 2004, 392 p. pp : 19-36.
- 149.** Mattoo, A.K. et Handa, A.K., Ethylene signaling in plant cell death, In Noodén, L.D., *Plant cell death processes*. Ed. ELSEVIER Academic Press, USA. 2004, 392 p. pp : 125-142.
- 150.** Beyl, C.A., Getting started with tissue culture: media preparation, sterile technique, and laboratory equipment, In Trigiano, R.N. et Gray, D.J., *Plant development and biotechnology*. Ed. CRC Press, USA. 2005, 358 p . pp : 19-37.
- 151.** Gaba, V.P., Plant growth regulators in plant tissue culture and development, In Trigiano, R.N. et Gray, D.J., *Plant development and biotechnology*. Ed. CRC Press, USA. 2005, 358 p . pp : 87-99.
- 152.** George, E.F. et De Klerk, G.J., The components of plant tissue culture media I: macro- and micro-nutrients, In George, E.F., Hall, M.A. et De Klerk, G.J., *Plant propagation by tissue culture*, V. 1: The Background, 3<sup>ème</sup> Edition. Ed. Springer, Netherlands, 2008, 501 p. pp : 65-113.



- 153.** Taiz, L. et Zeiger, E., – Plant physiology. Ed. Annals of Botany Company, 3<sup>ème</sup> édition, USA. 2003, 690 p.
- 154.** Machakova, I., Zazimalova, E. et George, E.F., Plant growth regulators I: introduction; auxins, their analogues and inhibitors, In George, E.F., Hall, M.A. et De Klerk, G.J., Plant propagation by tissue culture, V. 1: The Background, 3<sup>ème</sup> Edition. Ed. Springer, Netherlands, 2008, 501 p. pp : 175-204.
- 155.** Ruesink, A.W., Fusion of higher plant protoplasts, In Jakoby, W.B. et Pastan, I.H., Methods in enzymology, V. LVIII: Cell Culture. Ed. Academic Press, USA. 1979, 642 p. pp : 359-368.
- 156.** Benmoussa, M., Mukhopadhyay, S. et Desjardins, Y., Factors influencing regeneration from protoplasts of *Asparagus densiflorus* cv. Sprengeri. Plant Cell Reports. 1997, n° 17, pp : 123-128.
- 157.** Hanke, D. E. et Northcote, D. H., Cell wall formation by soybean callus protoplasts. J. Cell Sci. 1974, n° 14, pp : 29-50.
- 158.** Dickison, W.C., Integrative plant anatomy. Ed. Academic Press, USA. 2000, 533 p.
- 159.** Yu, C., Chen, Z., Lu, L. et Lin, J., Somatic embryogenesis and plant regeneration from litchi protoplasts isolated from embryogenic suspensions. Plant Cell, Tissue and Organ Culture. 2000, n° 61, pp : 51-58.
- 160.** Tourte, Y., Tourte, C. et Moreau-Vauzelle, C., Génie génétique et biotechnologies : concepts, méthodes et applications agronomiques. Ed. DUNOD, 2<sup>ème</sup> édition, Paris, France, 2002, 241 p.
- 161.** Borgato, L., Pisani, F. et Furini, A., Plant regeneration from leaf protoplasts of *Solanum virginianum* L. (*Solanaceae*). Plant Cell Tiss Organ Cult. 2007, n° 88, pp : 247-252.
- 162.** Van Staden, J., Zazimalova, E. et George, E.F., Plant growth regulators II: cytokinins, their analogues and antagonists, In George, E.F., Hall, M.A. et De Klerk, G.J., Plant propagation by tissue culture, V. 1: The Background, 3<sup>ème</sup> Edition. Ed. Springer, Netherlands, 2008, 501 p. pp : 205-226.
- 163.** Anjum, M.A., Effect of protoplast source and media on growth and regenerability of protoplast derived calluses of *Solanum tuberosum* L. Acta Physiologia Plantarum. 1998, V. 20, n° 2, pp : 129-133.