

République Algérienne Démocratique et Populaire

Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique

Université de Blida 1



Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie

Département de Biologie des Populations et des Organismes

Mémoire de fin d'Etude

Présenté en vue de l'Obtention du Diplôme de Master en biologie

Option : Biodiversité et Physiologie Végétale

Thème

Etablissement de l'embryogénèse somatique à partir des protoplastes du palmier dattier (*Phoenix dactylifera L.*) et caractérisation moléculaire du matériel génétique

Soutenu par :

M^{lle} Hammoum Amira

Soutenu le 27 /09/2020

M^{lle} Achour Chahinez

Devant le jury :

-M ^{me} Chérif H.S.	MCA/BPO	UB-1-	Présidente
-M ^{me} Chabane D.	MAA/BPO	UB-1-	Examinatrice
-M ^{me} Yatta D.	Chargée de recherche	INRAA	Promotrice
-M ^{me} Amedjkouh H.	MAA/BPO	UB-1-	Co-promotrice

Promotion : 2019-2020

Remerciements

*C'est grâce à la volonté et l'aide d'ALLAH le Tout Puissant, que ce modeste projet a pu être réalisé.
Dieu merci pour nous avoir donné la foi et la force à achever ce projet.*

-A notre Promotrice

M^{me} Yatta Djamila chargée de recherche et chef des projets palmier dattier au laboratoire de physiologie végétale. Nous vous remercions pour votre accueil et vos conseils

Veillez trouver ici, l'expression de nos gratitudee et de nos grandes estimee.

-A notre Co-promotrice

M^{me} Amedjkouh Hafida .Maitre assistante classe A université de Blida, nous vous remercions pour ses conseils, ainsi que pour sa simplicité, sa gentillesse, ses qualités humaines et sa grande patience.

-Aux membres du jury

-M^{me} ChérifH.S. Maitre de conférences A à l'université de Blida, Présidente

- M^{me} ChabaneD. Maitre assistante classe A à l'université de Blida, Examinatrice

Nous remercions d'avoir accepté l'examination de ce travail

-Nous remercions toute l'équipe du plateau technique de la division Biotechnologie et amélioration des plantes qui nous ont accueilli chaleureusement surtout M^{me} Ezzaouaoui Sanna et M^{me} Bouamra Lydia

Pour leurs informations et leurs soutiens.

-Nos profondes gratitudee s'orientent vers tout le personnel du Département de Biologie des populations et des organismes.

-Et en dernier nous remercions toutes les personnes qui ont contribué des près ou de loin à la concrétisation de ce travail.

Chahinez et Amira.

Dédicaces

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

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

Inchaallah.

À mon père, Aucune dédicace ne saurait exprimer l'amour, l'estime, le dévouement et le respect que j'ai toujours eu pour vous. Rien au monde ne vaut les efforts fournis jour et nuit pour mon éducation et mon bien être. Ce travail est le fruit de tes sacrifices que tu as consentis

Pour mon éducation et ma formation.

À mon cher frère Boualem, L'épaule solide, l'œil attentif compréhensif et la personne la plus digne de mon estime et de mon respect.

Aucune dédicace ne saurait exprimer mes sentiments, que Dieu te Préserve et je te souhaite une vie heureuse avec tes enfants.

À mon frère Sofiane, je te remercie pour ton amour, ton soutien et leur encouragement.

À mes agréables sœurs Hayet, Amel, Zahia, Naima, Safia et Sarah, Que ce travail l'expression de ma profonde affection. Je vous remercie pour le soutien moral et l'encouragement que vous m'avez accordés. Je vous souhaite tout le bonheur que vous méritez.

À la personne qui partagé tous le travail, qui a supporté mon humeur au moment de stress,

À mon binôme Amira pour la sœur agréable qu'elle était et qu'elle restera toujours, et à tout la famille Hammoum.

À tous mes chers amis, pour le soutien que vous m'avez offert, je vous dis MERCI.

Aimablement, Chahinez.

Dédicaces

A ma mère, affable, honorable, aimable, tu représentes pour moi symbole de la bonté par excellence, la source de tendresse et l'exemple du dévouement qui n'a pas cessé de m'encourager et de prier pour moi.

Ta prière et ta bénédiction m'ont été d'un grand secours pour mener à bien mes études.

Aucune dédicace ne saurait être assez éloquente pour exprimer ce que tu mérites pour tous les sacrifices que tu n'as cessé de me donner depuis ma naissance, durant mon enfance et même à l'âge adulte.

Je te dédie ce travail en témoignage de mon profond amour. Puisse Dieu, le tout puissant, te préserver et t'accorder santé, longue vie et bonheur Inchaallah.

A mon père, Aucune dédicace ne saurait exprimer l'admiration, l'amour et le respect que j'ai toujours eu pour toi.

Ce modeste travail est le fruit de ton affection et de tous tes efforts fournis jour et nuit pour mon bien être bien. Puisse Dieu te procurer bonne santé et longue vie Inchaallah.

*A mes agréables sœurs **khalida et fouzia**, merci pour votre soutien, vos encouragements et surtout pour vos conseils. Trouver à travers ce mémoire l'expression de mon profonde reconnaissance et le témoignage de mon respect.*

Que Dieu les protèges et leurs offre la chance et bonheur

*A mon cher frère **samir** et sa femme **faiza**, pour leur soutien, je leur souhaite tout le succès et tout le bonheur du monde.*

*A **mnaouar**, tu as su trouver les mots pour m'encourager, me faire avancer et ne pas baisser les bras dans les moments difficiles.*

Je te remercie pour ta patience, ton aide, ta gentillesse, ta compréhension et ton soutien permanent tout au long de ce travail.

*A mon binôme **Chahinez**, et avant tout ma sœur qu'elle était restera toujours pour moi. Qui j'ai surmonté bien nombre d'obstacle.*

*Et a tout la famille **Achour**.*

A tous les membres de famille Hammoum, je dédie ce travail à tous ceux qui ont participé à ma réussite.

Aimablement, Amira

Liste des abréviations

ADN : Acide désoxyribonucléique.

APG : Angiospermes Phylogeny Group.

ARNase : Acide ribonucléase.

DN : Deglet Nour.

EDTA: Ethylene Diamine Tetra Acetic Acid.

FAO: Food and Agriculture Organisation.

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

GMN₂₀₀ : milieu de germination.

GMP : milieu de multiplication.

INRAA : Institut National de Recherche Agronomique d'Algérie.

Macro : macroélément.

MATAB : Mixed Alkyltrimethylammonium Bromide.

Micro : microélément.

MS : Murashige et Skoog (1962).

NaOH : Hydroxyl de sodium.

PCR : Polymerase Chain Reaction.

pH : Potentiel d'hydrogène.

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

RAPD : Random Amplification of polymorphic DNA.

Rpm : Tour par minute.

SSR : Simple sequence repeat.

TBE : Tris-Bromate-EDTA mA.

TE : Tampon d'extraction.

TGZ : Tegaza.

TKB : Takerboucht.

Liste des figures

Figure 1 : Palmier dattier (<i>Phoenix dactylifera</i> L).....	3
Figure 2 : Présentation schématique d'un palmier dattier.....	5
Figure 3 : Répartition géographique du palmier dattier dans le monde.....	8
Figure 4 : La collecte des jeunes feuilles pour l'extraction de l'ADN.....	19
Figure 5 : Présentation de matériel biologique.....	19
Figure 6 : Les solutions utilisées lors de l'extraction de l'ADN.....	20
Figure 7 : Préparation des milieux de cultures.....	21
Figure 8 : Préparation et stérilisation des milieux de culture.....	23
Figure 9 : Préparation de substrat.....	24
Figure 10 : Plantation des vitroplants.....	25
Figure 11 : A) broyage manuelle au mortier de l'échantillon frais B) séchage à l'étuve à 40°C C) broyage électrique avec un broyeur.....	27
Figure 12 : A : obtention d'un mélange broyat + tampon d'extraction B : homogénéisation manuelle par retournement C : filtration à l'aide de la toile à blute.....	28
Figure 13 : A : répartition du filtrat dans les tubes B : centrifugation C : deux phases distinctes après centrifugation surnageant + culot.....	29
Figure 14 : A) Le résultat de la centrifugation pratiquée après l'ajout du chloroforme isoamylique B) Résultat de la deuxième centrifugation.....	30
Figure 15 : Incubation à l'étuve pendant 1 heure à 37°C.....	30

Figure 16 : Représentation de l'ADN.....	31
Figure 17 : ensemble de dilutions réalisées.....	33
Figure 18 : Gel d'agarose en gélification dans la moule.....	33
Figure 19 : Gel d'agarose dans la cuve d'électrophorèse.....	34
Figure 20 : La migration sur gel d'agarose sous un voltage de 60 V.....	34
Figure 21 :A)- Stérilisation des graines sous la hotte à flux laminaire	36
B)- les graines stériles dans l'étuve.	
Figure 22 : Apparition des nodules.....	37
Figure 23 : Maturation des embryons somatiques.....	38
Figure 24 : Germination des embryons.....	39
Figure 25 : Taux de survie des vitroplants après huit semaines d'acclimatation.....	42
Figure 26 : Nombre des vitroplants acclimatés.....	43
Figure 27 : A et B : Différentes phases pour l'obtention de la pelote d'ADN.....	45
Figure 28 : Culots d'ADN.....	45
Figure 29 : évaluation de la qualité des extraits d'ADN obtenus par la méthode au sorbitol par la migration	46
Figure 30 : Evaluation de la qualité des extraits d'ADN obtenus par la méthode du DN easy maxi kit Qiagen par la migration sur gel d'agarose.....	46
Figure 31 : Spectre obtenu par nanodrop de l'échantillon d'ADN.....	47

Liste des tableaux

Tableau 1 : Classification du palmier dattier APG III (2009).....	4
Tableau 2 : Nombre de cultivars dans le monde.....	10
Tableau 3 : Les régions principales de culture des dattes.....	11
Tableau 4 : Méthode de dénombrement chromosomique.....	35
Tableau 5 : Pourcentage des embryons germés sur le milieu MS modifié.....	40
Tableau 6 : Résultats obtenus par le dosage au Nanodrop.....	48
Tableau 7 : Composants de la solution mère des Macroéléments MS	Annexe 1
Tableau 8 : Composants de la solution mère des Microéléments MS	Annexe 1
Tableau 9 : Composants de la solution mère Fer MS.....	Annexe 1
Tableau 10 : Milieu de la germination et prolifération GMN et GMP	Annexe2
Tableau 11 : L'effet de l'acclimatation sur les vitroplants.....	Annexe6

SOMMAIRE

Introduction	1
<i>Synthèse bibliographique</i>	
1. Historique et origine de palmier dattier	3
2. Position systématique	4
3. Caractérisation morphologique	5
4. Cycle de développement	7
5. Production des dattes et répartition géographique du palmier dattier	8
5.1 Dans le monde	8
5.2 En Algérie	9
6. Les menaces biotiques et abiotiques	9
7. Diversité génétique du palmier dattier	10
7.1 Dans le monde	10
7.2 En Algérie	10
8. Les techniques de multiplication des palmiers dattiers	11
8.1 La multiplication par semis	12
8.2 La multiplication par rejets	12
8.3 La multiplication <i>in-vitro</i>	12
9. Acclimatation	15
10. Les marqueurs moléculaires et leurs applications sur le palmier dattier	16
10.1 L'identification du sexe	16
10.2 La stabilité génétique.....	16
10.3 L'identification de cultivars de palmier dattier	16
10.4 L'utilisation des marqueurs moléculaires pour lutter contre le Bayoud.....	17
<i>Partie expérimentale</i>	
I. Matériel et méthodes	18
I.1. Matériel.....	18
I.1.1. Matériel biologique	18
I.1.1.1 Les hybrides somatiques	18
I.1.1.2. Acclimatation des plantules.....	18
I.1.1.3. Caractérisation moléculaire de matériel génétique.....	18
I.1.1.4. Caryologie.....	19
I.1.2. Matériel non biologique.....	19

I.2. Méthodes.....	20
I.2.1. Induction de l'embryogenèse somatique des hybrides somatique.....	20
I.2.1.1. Technique de stérilisation du matériel végétal.....	20
I.2.1.2. Préparation du milieu de culture (GMN ₂₀₀ /GMP).....	21
I.2.1.3. Stérilisation des milieux de culture	23
I.2.2. Acclimatation des plantules	23
I.2.2.1. Préparation de substrat.....	24
I.2.2.2. Préparation des vitroplants pour l'acclimatation.....	24
I.2.2.3. Observation et critère d'évaluation.....	25
I.2.2.4. Analyse statistique.....	26
I.2.3. Caractérisation moléculaire de matériel génétique	26
I.2.3.1. Extration d'ADN	26
I.2.3.1.1. Méthode au sorbitol.....	26
I.2.3.1.2. L'extraction par la méthode Maxi KIT Qiagen.....	31
I.2.3.2. Dosage d'ADN.....	31
I.2.3.2.1. Dosage par Nano drop 2000c.....	31
I.2.3.2.2. Contrôle sur gel d'agarose.....	32
I.2.3.3. Méthode RAPD.....	35
I.2.4. Caryologie	35
I.2.4.1. Dénombrement chromosomique.....	35
II. Résultat et discussion.....	37
II.1 Induction de l'embryogenèse somatique des hybrides somatiques.....	37
II.1.1. Multiplication et germination des embryons somatique.....	37
II.1.2. Phase d'acclimatation.....	41
II.1.2.1. Effet de l'acclimatation sur les plantules.....	41
II.2. Approche génétique.....	44
II.2.1. Caractérisation moléculaire de matériel génétique.....	44
II.2.1.1. Extration d'ADN	44
II.2.1.2. Dosage de l'ADN.....	46
II.2.1.2.1. Contrôle de la qualité d'ADN sur gel d'agarose	46
II.2.1.2.2. Dosage par le Nanodrop.....	47
Conclusion.....	52
Références bibliographique	54

Annexes



Résumé

L'objectif de ce travail est la régénération et la caractérisation moléculaire du matériel génétique chez les trois cultivars de palmier dattier (*Phoenix dactylifera* L) : Deglet Nour, Takerboucht et Tagaza.

L'induction de l'embryogénèse somatique a lieu sur le milieu GMN₂₀₀ à une photopériode 16h de lumière et à une température 28°C, la germination des embryons somatiques est obtenue sur le milieu MS modifié sans hormones de croissance avec un taux de germination 56.33%.

L'élongation et l'enracinement des plantules sont obtenus sur milieu GMP (Milieu de germination) contenant 100 mg/l de Thiamine chlorhydrate, 170mg/l de NH₂PO₄, 200 mg/l de Nitrate d'ammonium, 40 mg/l d'Adénine, 50 mg/l de Acide nicotinique, 50 mg/l de pyridoxine. Ce travail nous a permis de produire 80 plantules et 182 touffes de plantules prêtes à l'acclimatation.

Concernant l'effet d'acclimatation, les vitroplants obtenus *in vitro* ont été acclimatés avec succès à partir de la première semaine marquant la meilleure survie jusqu'à la huitième semaine, avec un pourcentage de réussite moyen 68.3%.

La caractérisation moléculaire des vitroplants issus de la régénération des protoplastes par embryogénèse somatique est réalisée d'abord par l'extraction de l'ADN suivie par deux méthodes d'analyses permettant de quantifier et d'analyser la pureté de l'ADN: la technique de la migration sur gel d'agarose et le Nanodrop, les résultats obtenus montrent que l'ADN est de bonne qualité, avec des concentrations de l'ordre de 100 à 880.02 ng/ul et des ratios typiques pour l'ensemble des échantillons avoisinant le 1.8 pour la DO 260/230 et des valeurs de 2.27 à 2.36 pour la DO 260/230.

Mots clés : *Phoenix dactylifera* L, acclimatation, protoplastes, embryogénèse somatique, ADN.



Abstract

The objective of this work is the regeneration of three cultivars of date palm (*Phoenix dactylifera* L): Deglet Nour, Takerboucht and Tagaza.

The induction of somatic embryogenesis takes place on the GMN200 medium at a photoperiod of 16 hours of light and at a temperature of 28°C, the germination of somatic embryos is obtained on the modified MS medium without growth hormones with a germination rate of 56.33%.

Elongation and rooting of the seedlings are obtained on GMP (Germination medium) medium containing 100 mg/l of Thiamine hydrochloride, 170mg/l of NH₂PO₄, 200mg/l of ammonium nitrate, 40 mg/l of Adenine, 50 mg/l Nicotinic acid, 50 mg/l of Pyridoxine. This work allowed us to produce 80 seedlings and 182 clumps of seedlings ready for acclimatization.

Concerning the acclimatization effect, the *in vitro* plants obtained *in vitro* were successfully acclimatized from the first week marking the best survival to the eighth week, with an average success rate of 68.3%.

Molecular characterization of the vitroplants resulting from the regeneration of protoplasts by somatic embryogenesis is carried out first by DNA extraction followed by two methods of analysis to quantify and analyze the purity of DNA: the technique of migration on agarose gel and Nanodrop, the results obtained show that the DNA is of good quality, with concentrations ranging from 100 to 880.02 ng/ul and typical ratios for all samples around 1.8 for OD 260/230 and values from 2.27 to 2.36 for OD 260/230.

Keywords: *Phoenix dactylifera* L, acclimatization, protoplasts, somatic embryogenesis, DNA.



ملخص

الهدف من هذا العمل هو تجديد ثلاثة أصناف من نخيل التمر (*Phoenix dactylifera* L): Deglet Nour, Takerboucht and Tagaza.

يتم تحريض الجنين الجسدي على وسيط GMN200 في فترة ضوئية 16 ساعة من الضوء وعند درجة حرارة 28 درجة مئوية، يتم الحصول على إنبات الأجنة الجسدية على وسط MS معدل بدون هرمونات نمو بمعدل إنبات 56.33%. يتم الحصول على استطالة وتأسيس الشتلات على وسط GMP (متوسط الإنبات) يحتوي على 100 ملغ/ل هيدروكلوريد الثيامين 170 ملغ/ل NH₂PO₄ ، 200 ملغ/ل نترات الألمونيوم ادينين، 50 ملغ/ل. حمض النيكوتين، 50 ملغ/ل من البيريديوكسين. سمح لنا هذا العمل بإنتاج 80 شتلة و182 شتلة جاهزة للتأقلم.

فيما يتعلق بتأثير التأقلم، تم تأقلم نباتات زراعة الأنسجة التي تم الحصول عليها في المختبر بنجاح من الأسبوع الأول مما يمثل أفضل بقاء حتى الأسبوع الثامن، بمعدل نجاح 68.3%.

يتم إجراء التوصيف الجزيئي لنباتات زراعة الأنسجة الناتجة عن تجديد الخلايا الأولية عن طريق التطور الجنيني الجسدي أولاً عن طريق استخراج الحمض النووي متبوعاً بطريقتين تحليليتين مما يجعل من الممكن قياس وتحليل نقاء الحمض النووي: التقنية من الهجرة على هلام Nanodrop agarose، أظهرت النتائج التي تم الحصول عليها أن الحمض النووي ذو نوعية جيدة، مع تركيزات من 100 إلى 880.02 نانوغرام / ميكرو لتر ونسب نموذجية لجميع العينات المجاورة 1.8 لـ OD 260/230 والقيم من 2.27 إلى 2.36 لـ OD 260/230.

الكلمات الأساسية: *Phoenix dactylifera* L، التأقلم، البروتوبلاست، التطور الجنيني الجسدي، الحمض النووي.



Introduction





L'Algérie classé parmi les principaux pays producteurs de dattes, dispose d'un potentiel Phoenicicole important avec sa diversité des cultivars inventoriés, celui-ci offre par la dominance variétale des dattes communes (80 % des cultivars sont rares ou très rares) à côté des cultivars connus et appréciés (20%) (**Ben abbes, 2011**), elle se distingue par contre par sa faible présence sur la marché international. Selon les statistiques mondiales, l'Algérie est classé troisième pays producteur de dattes après l'Égypte et l'Iran, il a exporté six (06) fois moins que la Tunisie (1^{er} exportateur mondiale de dattes malgré sa faible producteur) (**ONFAA, 2017**).

Malheureusement le palmier dattier est confronté à diverses contraintes (biotiques et abiotiques) qui rendent la menace grandissante (**Sedra, 2011 ; Meddich et al., 2018**).

La plus redoutable étant le Bayoud, causé par un champignon tellurique *Fusarium oxysporum f.sp. albidinis* (F.O.A) (**Sedra, 2013; Meddich et al., 2018**). Plusieurs méthodes chimiques et biologiques ont été employées pour lutter contre cette maladie qui ne cesse de se propager non seulement dans les jardins déjà infestés mais aussi dans les plantations indemnes (**Bouguedoura, 2007; Bouguedoura et Yatta, 2013; Meddich et al., 2018; Yatta et al., 2018**), 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 (**El-Hadrami, 2005; Naik et Al-Khayri, 2016; Bouguedoura et al., 2017**). Une approche a été élaborée et consiste en la production de cultivars combinant la résistance et la qualité des dattes, soit par mutagenèse ou par fusion de protoplastes (**Chabane et al., 2007; Yatta et al., 2014; Yatta et al., 2015; Yatta et al., 2016**).

Nos travaux entrent dans le cadre d'un programme de recherche, lancé par l'équipe Palmier de l'institut national de la recherche agronomique (INRA), pour l'amélioration et conservation du palmier dattier par les techniques de culture *in vitro*. Nous avons entrepris l'induction des embryons somatiques et leur acclimatation et caractérisation moléculaire de matériel génétique.

Ainsi notre présent travail est divisé en quatre parties :

- Multiplication et germination des embryons somatiques de trois cultivars de palmier dattier (Deglet Nour, Takerboucht et Tagaza) par repiquage périodique sur

Introduction



les milieux de cultures : GMN₂₀₀ (milieu de multiplication) et GMP (milieu de germination).

- Acclimatation des vitroplants.
- La caractérisation moléculaire des vitro plants régénérés des protoplastes.
- L'étude caryologique.



*Synthèse
bibliographique*





1. Historique et Origine de palmier dattier

Le palmier dattier (*Phoenix dactylifera*) est l'un des arbres fruitiers le plus anciennement cultivé dans le monde (**Fig1**), il est rustique s'adaptant aux régions les plus arides du monde et constitue la principale source de vie de la population saharienne (**Hazzouri et al., 2020**).

C'est Linné, en 1734, qui a donné le nom de *Phoenix dactylifera* et a fait la description morphologique complète de cette espèce. Par ailleurs, plusieurs auteurs ont décrit la signification de *Phoenix dactylifera* ; dans la l'étymologie, du mot "*Phoenix*" dérive de nom de dattier chez les Grecs, qui considéraient comme l'arbre des phéniciens et "*dactylifera*" vient de latin "dactylus" dérivant du grec dactylis, signifiant doigt, en raison de la forme du fruit.

Les études menées par **Aoudah-Ibrahim (2011)**, ont montré que "dactylis" ou "Datte" dérivé du mot "Daguel" ou "Dachel" origine hébraïque, signifiants doigts. Il est cultivé depuis l'antiquité, mais jusqu'à présent, aucun vestige de Phoenix n'a été trouvé dans les zones actuelles du Palmier Dattier (**Absi, 2013 ; Hazzouri et al., 2020**).



Fig 1: Palmier dattier (*Phoenix dactylifera* L).

L'origine géographique précise du Palmier Dattier paraît très controversée, selon les résultats de l'hybridation de plusieurs types de Phoenix. Bien que, plusieurs hypothèses ont été abordées sur son origine, mais toujours ont révélé que son origine fréquemment dans la



Bible (se trouve à Babylone et datent de 4000 ans avant Jésus. Christ). Depuis ce lieu d'origine, la culture du Palmier Dattier s'est étendue vers l'Est et vers l'Afrique orientale (15^{ème} siècle) et du nord (11^{ème} siècle). Dès le 20^{ème} siècle, il est introduit en Amérique par les conquêtes espagnoles et en Australie (Absi, 2013 ; Yatta et al., 2014; Meddich et al., 2018).

2. Position systématique

Le genre *Phoenix* L. (1753) dont les six synonymes hétérotopiques cités par la littérature sont : *Elate* L. (1753), *Palma* Mill. (1754), *Dachel Adams*. (1763), *Phoniphora* Neck. (1790), *Fulchironia* Lesch. (1829) et *Zelonops* Raf. (1837) fait partie de la classe des *Liliopsida* de (Monocotylédones), de l'ordre des *Arecales* *Bromhead* (1840).

Selon la classification de **Cronquist (1981)** et phylogénétique **APG II (2003)** et **APG III(2009)** (Tableau01), les *Arecales* ne comprennent qu'une seule famille, celle des, 1789 ou *Arecaceae* Bercht. Et J.Presl, 1820 ; famille de plantes tropicales (exemples : palmier dattier, palmier à huile, cocotier...etc.) la mieux connue sur le plan systématique.

Par ailleurs, la classification phylogénétique **APG IV (2016)** a récemment introduit les *Dasyogonaceae* parmi les *Arecaceae*.

La famille des *Arecaceae* regroupe 6 sous-familles **Cronquist (1981)**: les *Coryphoideae* ou *Arecoideae* , *Calamoideae*, *Nypoideae*, *Ceroxyloideae*, *Arecoideae*, et *Phytelephantoideae*. La sous-famille des *Coryphoideae* se subdivise actuellement en 4 tribus, les : *Corypheeae*, *Phoeniceae*, *Borasseae* et *Chuniophoeniceae*, cette dernière a été introduite suite à la nouvelle classification (APG IV, 2016).

Tableau 01 : Classification du palmier dattier (APG III, 2009).

Règne	Plantae
Sous-règne	Tracheobionta
Phylum	Spermaphytes
Embranchement	Magnoliophyta
Classe	Liliopsidae
Sous-classe	Commelinidae
Ordre	Arecales
Famille	Arecaceae
Sous-famille	Coryphoideae



Tribu	Phoeniceae
Genre	<i>Phoenix</i>
Espèce	<i>Phoenix dactylifera</i> L.

3. Caractérisation morphologique

Le palmier dattier est une monocotylédone arborescente considérée comme une herbe géante pour ses caractéristiques morphologiques (**Fig 2**), il se distingue par quatre parties : les racines, le stipe, les feuilles et l'appareil reproducteur (**Abbouna et Nechachbi, 2017**).

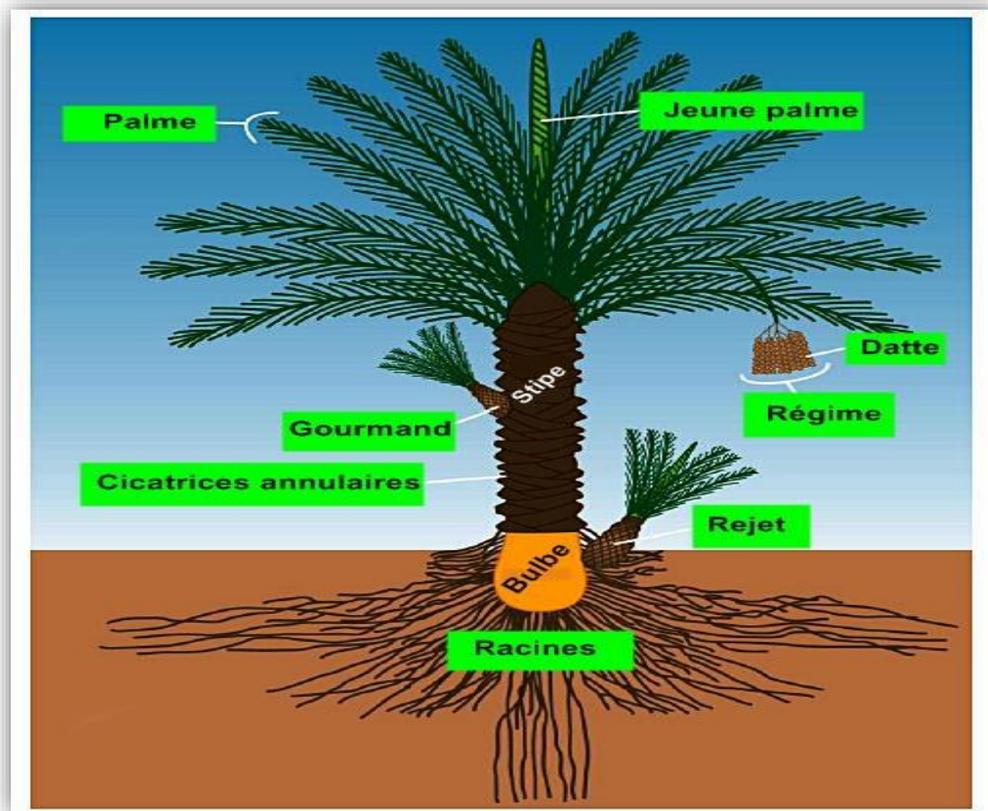


Fig 2 : Présentation schématique d'un palmier dattier (**Rouai et Zouzou, 2017**).

3.1. Système racinaire ou radiculaire

Le système radiculaire est fasciculé (**Peyron, 2000**), il augmente avec la croissance du palmier verticalement et en même temps latéralement (**Simmons, 1926**), il présente quatre zones d'enracinement : Racines respiratoires, Racines de nutrition, Racines d'absorption, Racines de profondeur (**Munier, 1973 ; Peyron, 2000**).



3.2. Tronc (stipe), le rejet et le bulbe

Tronc : C'est un stipe généralement cylindrique, non ramifié (Munier, 1973), il est doté d'un simple bourgeon terminal ou zone de croissance en longueur. Le stipe est couvert régulièrement des cicatrices de l'ancienne palme (Toutain, 1967), dont l'activité végétative est indéfinie durant toute la vie de la plante. En général, les pieds mâles croissent plus rapidement que les pieds femelles (Al-khayri et al., 2018).

Rejet : c'est une jeune pousse du végétal, qu'il est possible de planter pour obtenir un nouveau palmier, celui-ci sera choisi par l'homme parmi une sélection des meilleurs palmiers (Sbiai, 2011).

Bulbe : Se situant à la base du stipe, le bulbe constitue la réserve du palmier. De là, part les systèmes racinaires d'où émergent les racines primaires courtes de moins d'un mètre, et longues de plus de 20 mètres (Sbiai, 2011).

3.3. Palmes

La palme ou «*Djérid*» est une feuille composée, pennée, ou *Kornat*, engaine partiellement le tronc et est en partie recouverte par le fibrilleux.

Le rachis ou pétiole, est semi cylindrique, plus ou moins ailé et porte les épines, *chokes* ou encore *chouques* et la foliole. Le pétiole est dur et relativement rigide, les épines sont plus ou moins nombreuses et plus ou moins longues (Peyron, 2000).

3.4. Les organes floraux

Comme tous les *phœnix*, le palmier dattier est dioïque (Peyron, 2000), ce qui entraîne une allogamie obligatoire qui permet un brassage génétique, mais aussi une hétérozygotie responsable de la diversité qui conduit à la formation de plusieurs milliers de cultivars de palmier femelle dans le monde (Hanachi et al., 1998).

3.4.1. L'inflorescence

Les inflorescences du dattier naissent du développement de bourgeons axillaires situés à l'aisselle des palmes dans la région coronaire du tronc, l'inflorescence est caractéristique : c'est une grappe d'épis.



Les fleurs sont quasi sessiles, sans pédoncule, elles sont portées par des pédicelles qui sont portés, à leur tour, par un axe charnu : la hampe ou spadice. L'ensemble est enveloppé dans une grande bractée membraneuse close : la spathe. Les spathes sont de forme allongée d'une manière très générale, les spathes d'un palmier mâle sont plus courtes et plus renflée (**Peyron, 2000**).

3.4.2. Les fleurs

➤ La fleur mâle

Les fleurs mâles sont ivoire, elles sont inodores. Elles sont un peu plus allongées que les fleurs femelles. La corolle est composée de trois pétales légèrement allongés et pointus et de trois étamines remplies de pollen. Le calice, en forme de cupule, comporte trois sépales soudés (**Peyron, 2000**).

➤ La fleur femelle

Les fleurs femelles ont une couleur entre ivoire et vert claire. Elles mesurent 3 à 4 millimètre, et sont globulaire. La corolle est constituée de 3 pétales ovales et arrondis et de trois étamines avortées, ou staminodes. Le calice est en forme de cupule, ou cupuliforme. Il comporte trois sépales soudés (**Peyron, 2000**). Le gynécée est formé de trois carpelles indépendants comportant chacun un ovule inséré à la base de l'ovaire et possède trois styles libres, se terminant chacun par un stigmate (**Munier, 1973 ; Peyron, 2000**).

3.5 Fruits

Le fruit du palmier dattier est une baie appelée «Datte» ou «Tmar» en arabe, contenant une seule graine (noyau), après fécondation, l'ovule évolue pour donner un fruit de couleur verte (taille d'un pois, puis d'un fruit de raisin jusqu'à la taille normale de datte) (**Hazzouri et al., 2020**). La couleur des dattes est variable selon les espèces : jaune plus ou moins clair, jaune ambré translucide, brun plus ou moins prononcé, rouge ou noir. Sa consistance est également variable, elle peut être molle, demi-molle ou dure, les dattes à consistance dure sont dites dattes sèches, leur chair a un aspect farineux (**Munier, 1973**).

La datte est constituée d'un mésocarpe charnu, protégé par un fin péricarpe ; le noyau est entouré d'un endocarpe parcheminé, il est de forme allongé, plus ou moins volumineux,



lisse ou pourvu de protubérances latérale en arêtes ou ailettes, avec un sillon ventrale : l'embryon est dorsale, sa consistance est dure et corné (**Hazzouri et al., 2020**).

4. Cycle de développement

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

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

5. Production de dattes et répartition géographique du palmier dattier

5.1. Dans le monde

Le dattier est une espèce xérophile, il ne peut fleurir et fructifier normalement que dans les déserts chauds (**Amorsi, 1975**). Le palmier dattier fait l'objet d'une plantation intensive en Afrique méditerranéenne et au Moyen-Orient (**Fig 3**). L'Espagne est l'unique pays européen producteur de dattes, principalement dans la célèbre palmeraie d'Elche. Aux Etats-Unis d'Amérique, le palmier dattier fût introduit au XVIIIème siècle, sa culture n'a débuté réellement que vers les années 1900 avec l'importance de variétés irakiennes (**Bouguedoura, 1991**). Le palmier dattier est également cultivé à plus faible échelle au Mexique, en Argentine et en Australie (**Ortiz-Uribe et al., 2019**).

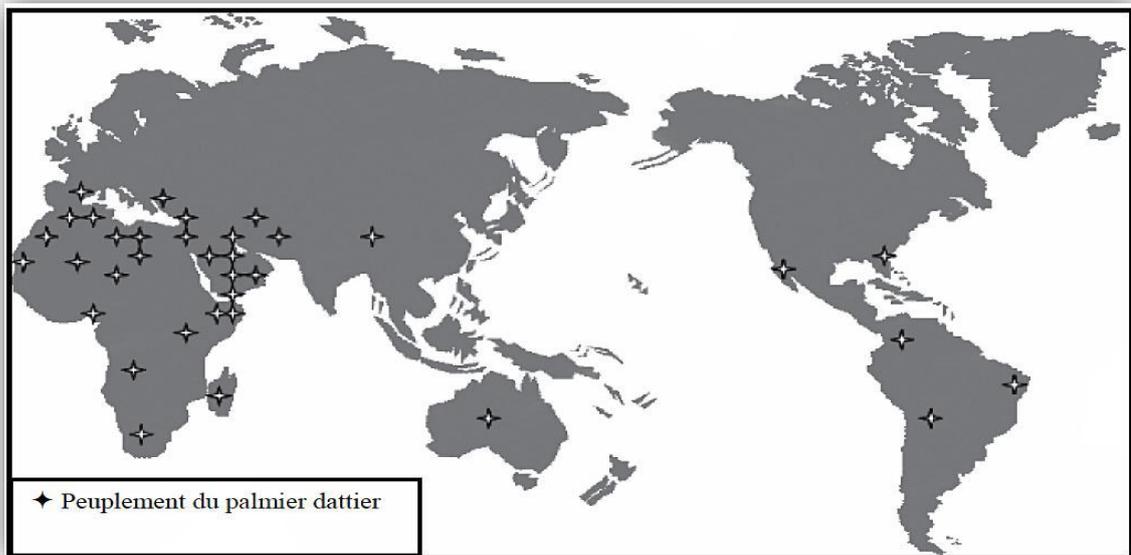


Fig 3 : Répartition géographique du palmier dattier dans le monde (El Hadrami 2009).

La production mondiale de dattes est d'environ 7 millions de tonnes par année et a plus que doublé depuis les années 1980 (FAO. 2010). Cela place la datte au 5^{ème} rang des fruits les plus produits dans les régions arides et semi-arides. D'après la F.A.O (2018), la production mondiale de dattes est estimée à 8,166 814 tonnes.

5.2. En Algérie

La production est estimée à 492.217 tonnes dont 244.636 tonnes (50%) de dattes demi molles (Deglet Nour), 164.453 tonnes (30%) des dattes sèches (Deglet Beida et analogues) et 83.128 tonnes soit 17% des dattes molles (Ghars et analogues). La palmeraie algérienne est constituée de plus de 11 millions de palmiers répartis à travers 09 wilayas sahariennes : Biskra, El-Oued, Ouargla, Ghardaïa, Adrar, Béchar, Tamanrasset, Illizi et Tindouf. Le palmier dattier se trouve également dans d'autres wilayas situées dans des zones de transition entre la steppe et le Sahara que l'on considère par rapport aux palmeraies sahariennes de «marginales» (Belguedj, 2007).

Actuellement la production de la datte a presque doublé passant de 600.096 tonnes en 2012 à environ 1.100.000 tonnes en 2017 dont 3% sont exportées. L'Algérie est classée parmi les principaux pays producteurs de dattes (4^{ème} rang mondiale avec 14 % de la production mondiale) et le montant des exportations en 2016 a été de 37 millions de dollars ce qui est qualifié d'insignifiant par rapport au potentiel existant (Chambre Algérienne de Commerce et d'Industrie, 2017).



Selon la **FAO en 2018**, la production nationale des dattes est estimée à 1,058 559 tonnes avec un rendement de 63,136 kg/ pied. En Algérie, la superficie occupée par le palmier dattier couvre 167 663 ha. Elle diffère d'une wilaya à une autre. La superficie la plus importante concerne les wilayas de Biskra et d'Oued représentant 52 % de la superficie totale occupé par le palmier dattier.

6. Les menaces biotiques et abiotiques

Le dattier représente l'espèce clé de l'écosystème oasien mais cependant il est du moins vulnérable comme toute autre espèce végétale et est composé à divers contraintes phytosanitaires faisant partie intégrante des divers facteurs alarmants causant son érosion génétique. Bien nombre des pathologies causés par des parasites et des ravageurs touchent le palmier dattier et sont responsable des dommages significatifs colossaux pour les phoeniculteurs. A l'heure actuelle la maladie des feuilles cassantes est virale et semble préoccuper les phoeniculteurs algériens, elle est due à un trouble physiologique bien que son étiologie demeure inconnu. En Tunisie la maladie de la pyrale des dattes ou *Ectomyelois sp.* (Lepidoptera. Pyralidae) constitue le ravageur le plus redouté (**Mzali et al., 2002**).

Elles sont à prendre en considération car elles mettent en péril le développement du dattier mais jusqu'à nos jours le bayoud reste la principale maladie la plus grave et incurable des maladies du palmier dattier. Le bayoud ou encore la fusariose vasculaire du dattier (*Phoenix dactylifera* L) est causée par un champignon imparfait d'origine tellurique *Fusarium oxysporum f. sp. albedinis* (**Hazzouri et al., 2020**). Cependant diverses mesures de luttés ont été employées pour contrecarrer l'effet néfaste de l'infestation de ce champignon.

- La lutte chimique consiste en l'utilisation des fongicides à action systématique ou endothérapie. (**Meddich et al., 2018**).
- La lutte culturale (**Tirichine, 2007**), consiste en l'amélioration des pratiques agricoles. Les mesures prophylactiques ont permis de ralentir la progression de la maladie sans l'arrêter définitivement.
- La lutte génétique par l'utilisation de variétés résistantes reste la seule méthode efficace pour contrecarrer la fusariose vasculaire et semble être la plus prometteuse (**Mahdi, 2011**).

7. Diversité génétique du palmier dattier

7.1. Dans le monde



A l'échelle mondiale (Ferry et al., 1998 ; Ziad et al., 2002) ont recensé environ 3000 cultivars répartis comme suit (Tableau 4) :

Tableau 2 : Nombre de cultivars dans le monde.

Pays	Nombre de cultivars	Pays	Nombre de cultivars
Algérie	800	Maroc	244
Arabie	250	Oman	300
Egypte	26	Pakistan	250
Irak	370	Soudan	22
Iran	400	Tunisie	250
Libye	300	USA	196

(Ziad et al., 2002).

7.2. En Algérie

L'Algérie est un pays classé au sixième rang mondial et au premier rang dans le Maghreb pour ses grandes étendues de culture avec 160 000 ha et plus de 2 millions de jardins et sa production annuelle moyenne de dattes de 500 000 tonnes.

Le palmier dattier en Algérie est établi en plusieurs oasis réparties sur le Sud du pays où le climat est chaud et sec (zone saharienne). Sa culture s'étend depuis la frontière Marocaine à l'ouest jusqu'à la frontière tuniso-libyenne à l'est et depuis l'Atlas saharien au nord jusqu'à Regagne (sud-ouest), Tamanrasset (centre) et Djanet (sud-est).

Près d'un Millier de cultivars ont été inventoriés et les trois régions principales de culture se distinguent sur le plan de la diversité génétique (Tableau 3). A cette catégorie, il faut ajouter un grand nombre de pieds francs ou «*Khalts*» qui poussent au hasard dans les oasis et qui représentent une source appréciable pour de nouvelles sélections de cultivars appréciables pour leur datte et pour leur résistance au Bayoud (Bougedoura et al., 2017).

Tableau 3 : les régions principales de culture des dattes.

Région	Nombre de cultivars	Cultivars les plus courants
Ouest		
Atlas	70	Ghares, Asyan, Feggus,
Saoura	80	Feggus, Hartan, Cherka, Hmira, Deglet
Gouarara	230	Talmine
Touat	190	Hmira, Tinnaser, Taqerbuch



Tidikelt	60	Tagazza, Aghamu, Taqerbuch Tagazza, Taqerbuch, Cheddakh, Aggaz
Centre		
El-Ménia	70	Timjuhart, Ghars, Timedwel
M'Zab	140	Azerza, Ghars, Deglet Nour, Taddela
Est		
Ouargla	70	Ghars, Deglet Nour, Degla Beida
Oued Righ	130	Deglet Nour, Ghars, Degla Beida
Souf	70	Deglet Nour, Ghars, Degla Beida, Mich Degla
Zibans	140	Deglet Nour, Ghars, Degla Beida, Mich Degla
Aures	220	Buzrur, Alig, Buhles, Mich Degla
Tassili	180	Tanghimen, Tabanist, Khadaji

(Bouguedoura et al., 2017).

8. Les techniques de multiplication du palmier dattier

La multiplication du palmier dattier peut s'effectuer selon 03 différents modes (Nixon et Carpenter, 1978 ; Ziad et De Wet, 2002) :

8.1. La multiplication par semis

Cette technique de multiplication produit des descendants non conformes au pied mère d'où une graine donne 50% de chance d'avoir les deux sexes. Cette méthode de production est une technique consommatrice du temps, elle ne permet d'obtenir des pieds productifs qu'au bout d'une dizaine d'années (Yatta et al., 2014 ; Naik et Al khayri., 2020; Yatta et al., 2020).

8.2. La multiplication par rejets

C'est la méthode classique de multiplication végétative, les nouveaux arbres sont génétiquement identiques au pied mère qui leur donne naissance (Hadji et al., 2015). Les meilleurs rejets sont prélevés à la base du tronc ou voisinage du sol, leurs poids sera de 15 à 20 Kg (Munier, 1973).

Cette technique de multiplication est donc considérée comme la plus stable et la plus efficace par les phoeniculteurs (Yatta et al., 2014 ; Naik et Al khayri., 2020; Yatta et al., 2020).



8.3. La multiplication *in-vitro*

Depuis que les techniques conventionnelles de micropropagation sont limitées en termes de fournir un nombre insuffisant de plantes de palmier dattier, la biotechnologie a prodigué une alternative prometteuse pour répondre à la demande croissante de vitro- plants pour le palmier dattier depuis ces dernières décennies (**Yatta et al., 2014 ; Naik et Al khayri., 2020**).

Le succès des biotechnologies reste lié à la maîtrise complète des méthodes de régénération du dattier et à la définition de protocoles fiables, simples et de reproductibilité élevée.

8.3.1. L'embryogenèse somatique

C'est un processus biologique issu de la reproduction asexuée. Cette technique est considérée comme la méthode de régénération la plus efficace pour la micropropagation du palmier dattier (**Al khayri, 2011 ; Abed et al., 2014**). Elle permet l'obtention de structure semblable à des embryons zygotiques à partir des cellules somatiques (à 2n chromosomes), connus sous l'appellation d'embryons somatiques (**Margara, 1989 ; John et Smith, 2004**). Les explants, provenant de la base de jeunes feuilles de cœurs de rejets ainsi que les inflorescences, sont cependant les plus utilisés (**El Hadrami et al., 1997**).

Il existe deux voies d'embryogenèse somatique :

- L'embryogenèse somatique directe : s'effectuant à partir de très jeunes cellules embryogenèse individualisées au sein de l'explant primaire sans le passage par le stade cal.
- L'embryogenèse somatique indirecte : des nombreuses divisions cellulaires prennent rapidement départ à partir des tissus cultivés grâce à l'apport d'une forte dose d'auxine, ceci menant à l'obtention d'un amas de cellules indifférencié appelé le cal.

8.3.2. L'organogénèse

Elle s'adresse aux potentialités meristématiques préexistantes chez les explants mis en culture et qui permettent la néoformation directe des bourgeons, la régénération des plantules par cette technique comprend différentes étapes allant de l'initiation de bourgeon à l'obtention de plantules enracinées. Les plantules sont développées directement sans phase intermédiaire de cal, ce qui réduit au minimum la variation somaclonale. L'organogénèse permet de générer des plantes génétiquement conformes à la plante mère (**Aitchitt, 1989**) et permet aussi la production de plantes indemnes de virus. De plus,



l'organogénèse a été utilisée avec succès pour la modification génétique de nombreuses plantes (Chandra et al., 2003).

8.3.3. Fusion des Protoplastes

a) Obtention des hybrides somatique de palmier dattier

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

Le succès de l'hybridation somatique passe par la maîtrise de plusieurs facteurs (Yatta et al., 2013), tel que: l'isolement des Protoplastes en grande quantité et régénération de plantes, les techniques de fusion des protoplasmes, la sélection de structures hybrides, la régénération à partir de cals hybrides et la confirmation de la nature hybride des structures régénérées. Cependant, la fusion des protoplastes nécessite la connaissance des gènes d'intérêts, particulièrement ceux liés aux mécanismes de résistances aux maladies.

b) Isolement de protoplaste

➤ Plasmolyse

Pour un isolement réussi il a été jugé essentiel d'induire la contraction du protoplaste à une distance considérable de la paroi cellulaire qui est fermement accolé lorsque la cellule est turgescente. Ainsi la rupture de la paroi est réalisable par un procédé mécanique référant à la plasmolyse et par un procédé enzymatique par lequel une solution enzymatique mixte combinant plusieurs enzymes sera utilisée pour la digestion de la paroi.

➤ Dégradation de la paroi

Dans la cellule végétale, le plasmalemma est doublé par une paroi cellulaire constituée de fibres de cellulose et de pectine. La dégradation de la paroi est obtenue grâce à la digestion enzymatique. Pour obtenir des activités cellulosiques et pectinasique, l'utilisation des champignons tels que *Trichoderma viride* et *Aspergillus niger* est nécessaire (Chabane et al., 2007).

Divers facteurs influencent l'isolement des protoplastes notamment les facteurs génétiques des plantes, la composition et la concentration des solutions enzymatiques (Zhu et al.,



2005; Assani et al., 2011) et les conditions d'isolements (Sinha et al., 2003 ; Aoyagi, 2006; Yatta et al., 2013; Yatta et al., 2020).

c) Culture des protoplastes

Les protoplastes isolés sont très fragiles, vulnérables et particulièrement confrontés à des dommages soit physiques ou chimiques. S'ils sont maintenus dans un milieu liquide, il ne doit pas être agité et le fort potentiel osmotique du milieu dans lequel l'isolement a été effectué doit être temporairement entretenu. La croissance des protoplastes dépend d'une aération adéquate. Des densités de placage assez fortes peuvent être nécessaires, pour lesquelles produits chimiques endogènes soient susceptibles d'imprégner ces cellules non protégées. Pour la culture et la conservation de protoplaste, les milieux de cultures cellulaires végétales qui sont généralement utilisés comme support de base sont le milieu Murashing et Skoog (Yatta et al., 2015) le milieu B (Yatta et al., 2013) et le milieu KM (Badr-Elden et al., 2017) et sont commercialement disponibles.

d) Fusion des protoplastes proprement dit

Afin d'obtenir un hybride somatique, les cellules végétales doivent d'abord être débarrassées de leur paroi pectocellulosique pour être induites à fusionner. De plus, l'avantage des cellules végétales est leur totipotence, qui leur procure ainsi la potentialité de régénérer une plante entière à partir d'une cellule isolée.

Le protoplaste se repousse mutuellement en vue des charges électrostatiques négatives présentes à la surface de la membrane plasmique qui sont causées en majeure partie aux groupes phosphates, et pour une part plus faible, à des protéines. Afin d'induire une fusion cellulaire. Deux stratégies efficaces de fusion sont couramment utilisées, les méthodes chimiques et électriques (Chabane et al., 2007; Badr-Elden et al., 2017).

9. Acclimatation

Les plantes issues de la culture *in vitro* nécessitent une période de sevrage ou acclimatation avant leur transfert au champ. L'acclimatation est le dernier stade de la culture des tissus, cependant c'est une étape nécessaire et cruciale pour toute la chaîne de production des vitro plants (Mizab et al., 2018).

Les conditions de sevrage des vitroplants peuvent se résumer en 2 facteurs essentiels évoqués ci-dessous :



- **Condition Pré conditionnement au repiquage**

La sortie des récipients de culture contenant les vitroplants dans la serre est préconisée quelque jours avant le repiquage afin de pré-adapter les plantes aux conditions physiques qui y prévalent. Il est aussi nécessaire de maintenir un degré hydrométrique relativement élevé, proche de la saturation pour prévenir tout risque de dessiccation des feuilles (**Yatta, 2017**).

- **Substrats d'acclimatation**

La plupart des espèces ligneuses se développent bien sur un substrat qui assure un bon drainage et qui a une bonne porosité. Il doit aussi être bien aéré et avoir un pH pas trop élevé. Il est aussi possible d'employer des substrats artificiels du type polyuréthane, laine de roche, etc. L'arrosage des vitroplants avec une solution qui contient les sels organiques du milieu de culture original est préconisé mais certaines espèces peuvent préférer des solutions nutritives spécifiques (**Bouguedoura et al., 2016**).

10. Les marqueurs moléculaires et leurs applications sur le palmier dattier

Les marqueurs morphologiques sont indispensables pour identifier et classier les cultivars du palmier dattier, mais ils ne suffisent pas pour une identification ou une classification bien définitive. Actuellement les marqueurs RAPD (Radom amplified polymorphic DNA), RFLP (restriction fragment length polymorphism) ou polymorphisme de longueur des fragments de restriction et ISSR (Inter –simple Sequence Repeat) sont les plus utilisés pour identifier et analyser la diversité génétique du palmier dattier (**Al-Khalifa et Askari 2003; Zehdi et al., 2005 ; Yatta et al., 2014**).

Les marqueurs moléculaires peuvent caractériser des gènes spécifiques à une plante donnée et des gènes liés à certaines maladies. Contrairement aux marqueurs traditionnels (morphologiques et biochimiques), les marqueurs moléculaires ne sont pas influencés par les facteurs de l'environnement et sont indépendants de l'organe analysé et du stade de développement de la plante.

Les marqueurs génétiques peuvent avoir de nombreuses applications dans les différentes phases des programmes de sélection de palmier dattier :



10.1. L'identification du sexe

-Les marqueurs moléculaires RAPD sont utilisés pour la contribution à l'étude de l'identification des pieds mâles et femelles chez le palmier dattier (**Zaher et al., 2006**).

10.2. La stabilité génétique

-La technique de RAPD a été employée pour comparer le tissu cultivé *in vitro* de palmier avec l'origine la plante mère.

-Des amorces aléatoires ont été utilisé avec succès pour amplifier l'ADN et ont donné polymorphisme pour chaque cultivar et peut être appliqué avec succès pour déterminer la stabilité génétique (**Al-Qurainy et al., 2002 ; Eshraghi et al., 2005 ; Bader et al., 2007**).

10.3. L'identification de cultivars de palmier dattier

-la technique RADP a été utilisé pour l'identification des cultivars (**Bennaceur et al., 1991**).

- sélection des amorces polymorphes pour faire la différence entre les cultivars (**Ben Abdallah et al., 2000; Rawashdeh et al., 2006; EL-Rayes, 2009**).

10.4. L'utilisation des marqueurs moléculaires (RAPD, RFLP et ISSR) pour lutter contre le Bayoud

La sélection des variétés de qualité et résistantes à la maladie par les seules méthodes conventionnelles de la génétique est très lente. Avec les nouvelles techniques, le sélectionneur peut inférer la présence d'un gène par la recherche du marqueur qui lui est étroitement lié et pourra ainsi sélectionner les individus résistants avant même que le caractère considéré ne soit exprimé et en absence du pathogène. Ces marqueurs nous donnent actuellement la possibilité de juger scientifiquement la qualité des plantes et surtout de les identifier (**Baaziz, 2003**).



Partie expérimentale





Matériel et méthodes





L'expérimentation a été réalisée au niveau de la division Biotechnologies et Amélioration des plantes de l'Institut National de la Recherche Agronomique (INRAA) de Barrak' Algérie. Elle a duré 2 mois à cause du confinement.

I. Partie expérimentale

I.1. Matériel

I.1.1. Matériel biologique

I.1.1.1. Les hybrides somatiques

Notre travail a été effectué sur des hybrides somatiques issus de fusion de protoplastes au stade germination des embryons et leur développement en plants, de trois cultivars de palmier dattier Deglet Nour (DN), Takerboucht (TKB), Tegaza (TGZ), qui ont été choisis par rapport à leur comportement vis-à-vis de la maladie du bayoud.

- ❖ Les cultivars «DegletNour» et «Tegaza» : sensible au Bayoud et d'une bonne qualité de dattes.
- ❖ Le cultivar «Takerboucht» : résistant au Bayoud et d'une qualité dattière moyenne.

La technique de fusion de protoplasme a été réalisée au niveau de laboratoire d'INRAA en 2015.

I.1.1.2. Acclimatation des plantules

- Les vitro-plants sont obtenus par la culture *in vitro*, dans des conditions aseptiques.
- Substrat pour l'acclimatation constitué d'un mélange de sable, et tourbe à volume égal (1/2).

I.1.1.3. Caractérisation moléculaire de matériel génétique

Nous avons travaillé sur des très jeunes feuilles issues de vitro plants de Tagaza, Takerboucht et Deglet Nour obtenus par culture *in vitro* à l'INRAA (Fig 4).



Fig 4 : La collecte des jeunes feuilles pour l'extraction de l'ADN.

I.1.1.4. Caryologie

Nous avons utilisé des graines des cultivars, Deglet Nour, Takerboucht et Tagaza, à raison de 72 graines par cultivar, elles proviennent de la collection de l'INRAA, récoltées au niveau de trois stations de l'INRAA à savoir : la station Sidi-Okba à Biskra, pour la variété DN (2020), la station Adrar, pour la variété TKB (2015-2016) et la station Sidi-Mahdi à Tougourt, pour la variété TGZ (2015-2016) (**Fig 5**).



Fig 5 : Présentation de matériel biologique.

I.1.2. Matériel non biologique

Le matériel non biologique représenté par les produits chimiques sont détaillés en (Annexe 1 et 6) :



- Les milieux de cultures utilisés au cours de ce travail sont GMN₂₀₀ et GMP, ils ont été mis au point par l'équipe du laboratoire de physiologie végétale de l'INRAA. Ils sont de base Murashige et Skoog (MS) (1962) avec quelques modifications au niveau de composition de milieu culture GMP (Annexe 2).

- Pour l'extraction de l'ADN, les solutions utilisées sont détaillées en (Annexe 3).



Fig 6 : Les solutions utilisées lors de l'extraction de l'ADN.

I.2. Méthodes

I.2.1. Induction de l'embryogenèse somatique des hybrides somatiques

I.2.1.1. Technique de stérilisation du matériel végétal

Pour réussir la culture *in vitro*, les conditions d'asepsie totale doivent être réunies à savoir :

- Nettoyer la hotte avec de l'alcool à 70°
- Allumer la hotte, au moins une demi-heure avant chaque manipulation.
- Les instruments de travail (scalpels et pinces) qui sont ainsi stérilisés par l'étuve, sont placés dans un stérilisateur à bille. (il faut toujours tripler les instruments de travail, pour permettre le refroidissement des uns tandis que les autres sont en usage ou en stérilisation dans le stérilisateur à billes).
- Tous les instruments de travail doivent être à la portée du manipulateur de façon à avoir le moins de geste à faire au cours de la manipulation (de grands mouvements entraînent des déplacements d'air donc des risques de contamination).
- Les mains doivent être lavées au savon et désinfectées à l'alcool 70°.
- Les instruments stérilisés doivent être disposés de façon à les avoir dans l'aire stérile.



La verrerie (Les bocaux, tubes à essai, erlenmeyers, éprouvettes) sont nettoyés à l'aide d'un détergent commercial (Isis) et rincés avec de l'eau ensuite à l'eau distillée. Ils sont ensuite stérilisés à l'autoclave à 120° C pendant 20 minutes.

Les instruments utilisés dans le repiquage comme les scalpels, les bistouris, spatules, les pinces longues et courtes sont stérilisés dans des boîtes de stérilisation à l'étuve à 180° C pendant 24 heures puis dans le stérilisateur à billes pendant leur utilisation. Le papier sur lequel les cultures sont repiquées et le papier millimètre sont enveloppés dans du papier aluminium et stérilisés à l'étuve à 180° C pendant 3 heures.

I.2.1.2. Préparation des milieux de culture (GMN200/ GMP)

Les milieux de culture contiennent les éléments indispensables au développement des tissus végétaux tels que les éléments minéraux, les substances organique, les régulateurs de croissances et charbon actif (Annexe 2) (**Fig 7**).



A) Stérilisation des bocaux



B) Préparation des pesés



C) Les solutions utilisées



D) Stérilisation du milieu

Fig 7 : Préparation des milieux de cultures.



A) Les éléments minéraux

- **Macroélément MS** contiennent l'azote (N), et phosphore (P) entrent dans la composition des protéines et des acides nucléique. Le potassium (K), le magnésium (Mg), et le calcium (Ca) interviennent dans le maintien de l'équilibre entre anions et cation. L'ion K^+ règle la pression osmotique et l'équilibre acido-basique de la plante. Le Mg^{2+} entre dans la composition de la chlorophylle. Le Ca^{2+} est un antagoniste des ions K^+ et Fe^{2+} (Annexe 1).

- **Microéléments MS** contiennent sulfate (S), Manganèse (Mn) fournis sous forme sulfatée, zinc (Zn), iode (I), molybdène (Mo), sodium (Na), cuivre (Cu), cobalt (Co), jouent un rôle important dans les mécanismes enzymatiques (annexe 2).

- **Fer MS** : Sulfate de fer, acide éthylène diamine tetracetique et acide selde sodium.

B) Les éléments organiques

- **Source carbone** : Le saccharose est ajouté à tous les milieux à des concentrations allant de 45 à 60 g/l. Ces sucres utilisés à des concentrations élevées, ont une forte action sur l'embryogenèse somatique de même que sur la rhizogenèse.
- **Acides aminés et autres additifs** : La glutamine et l'adénine sont ajoutés au milieu. Ils ont un effet sur la prolifération des cals et la germination des embryons somatiques.
- **Les vitamines** : Il s'agit de la thiamine fournit à 1mg/l et du myoinositol à 100 mg/l dont l'effet est très nette sur la prolifération tissulaire.
- **Charbon actif** : est ajouté à des doses allant de 0.2% à 0.3%. Il a la propriété d'absorber les composés phénoliques excrétés par l'explant et diffusés dans le milieu et provoque le brunissement et une inhibition de la croissance.

C) Les régulateurs de croissance (hormones végétales)

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

D) Agents gélifiants :

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



I.2.2.1.3. Stérilisation des milieux de culture

Les milieux de culture sont distribués dans des bocaux à 80 ml par bocal de 250 ml à l'aide d'un distributeur automatique. Le pH des milieux est réglé à 5.8 avant d'être stérilisés à l'autoclave à 120°C pendant 20 minutes (Fig 8).



A) Ajustement du pH



B) Distribution du milieu culture



C) Stérilisation du milieu culture



D) Milieu culture

Fig 8 : Préparation et stérilisation des milieux de culture.

I.2. Acclimatation des plantules

La phase d'acclimatation est l'un des facteurs limitant de la culture *in vitro*. Au cours de cette étape de sevrage en serre, le taux de mortalité des plantes issues de conditions *in vitro* peut être élevé. Les plantes commencent d'abord par flétrir puis se nécrosent, laissant des signes indicateurs de la pourriture du collet et des lésions sur la tige.



II.2.1. Préparation du substrat

Le substrat utilisé pour l'ensemble des plantules est constitué un mélange de sable, et tourbe à volume égal (1/2). Le sable a été stérilisé à l'étuve à 200°C pendant 2 h 30 mn, Le sable refroidi est mélangé avec la tourbe, puis le mélange est traité par des fongicides à raison de (15g/1kg) et le pH ne doit être pas trop élevé (5-6) (**Fig 9**).



Fig 9 : Préparation de substrat.

I.2.2.2. Préparation des vitroplants pour l'acclimatation

- Rinçage des vitroplants avec l'eau tiède puis trempage dans une solution antifongique (Zellomile à 3g/l) pendant 20 min.
- Servage des vitroplants dans des alvéoles humidifiées contenant un substrat qu'a été mis dans des sachets plastiques de 15 cm de diamètre sur 25 cm de hauteur.
- La température de la serre a été réglée à $26 \pm 2^\circ \text{C}$ (une photopériode de 12h d'obscurité et 12h de lumière).
- L'humidité relative été contrôlé au voisinage de 70% grâce au système d'humidification. Afin de favoriser l'humidité, les alvéoles ont été mis en place sous des tunnels en plastiques.
- Après chaque 2 à 3 jours les vitroplants ont été pulvérisées à l'aide d'une solution antifongique (Zellomile) afin d'éviter, la pourriture des feuilles et du collet (**Fig 10**).



Fig 10 : Plantation des vitroplants.

I.2.2.3. Observation et critères d'évaluation

Pour évaluer l'effet des différents milieux de cultures sur le comportement et l'élongation des plantules ainsi que leur vigueur avant leur transfert en serre pour l'acclimatation, des observations ont été faites pour chaque milieu et lors de chaque repiquage.



a) Nombre et longueur des feuilles néoformées

Ce critère d'évaluation représente une estimation de la capacité des plantules, mises en culture sur les milieux, à s'allonger et à néoformer d'autres feuilles. Le nombre des feuilles néoformées et leurs longueurs ont été notés au moment de chaque observation.

b) Nombre et longueur des racines néoformées

Ce critère d'évaluation estime la capacité des plantules, mises en culture sur les milieux, à néoformer d'autres racines. Le nombre des racines néoformées et leurs longueurs ont été notés au moment de chaque observation.

I.2.2.4. Analyse statistique

Les observations et les mesures des plants dans le substrat ont porté sur les paramètres suivants :

- Le comptage du nombre de plants ayant repris chaque semaine d'acclimatation ;
- Les données quantitatives ont été soumises à une analyse de variance au seuil de 5%.
- Les liens entre les paramètres ont été également mis en évidence à l'aide du logiciel Gen Stat.
- La représentation graphique des résultats a été réalisée à l'aide du logiciel Excel.
- Le nombre de vitroplants vivants à la fin du sevrage a permis de calculer le taux de reprise au sevrage selon la formule suivante :

$$\% \text{plants sevrés} = \frac{\text{Nombre de plants vivants}}{\text{Nombre total de plants transférés ou sevrage}} \times 100$$

I.2.3. Caractérisation moléculaire de matériel génétique

I.2.3.1. Extraction de l'ADN

I.2.3.1.1. Méthode au sorbitol

Pour une expérimentation réussite les mesures aseptiques doivent être prises en considération et respectées, donc nous avons en premier lieu stérilisé toute la verrerie utilisée lors des séances de manipulation pour ensuite préparer les diverses solutions qui seront utiliser lors du processus d'extraction.

Le protocole d'extraction du palmier à huile est employé pour l'extraction de l'ADN du palmier dattier (Annexe 4) (Yatta, 2006 et 2007) :



▪ Nettoyage et broyage des feuilles

L'extraction commence par la cueillette des jeunes feuilles issus de vitroplants de palmier dattier de différents cultivars que nous avons ensuite nettoyé à l'aide d'un papier absorbant et d'un peu d'eau distillée. Par la suite nous les avons découpé en petits morceaux en les insérant dans des papiers Kraft que nous avons envoyé sécher à l'étuve à 40°C durant 48 heures, nous avons ensuite procédé au broyage mécanique des feuilles déshydratées par la méthode électrique qui est praticable par l'utilisation du broyeur (**Fig 11**).

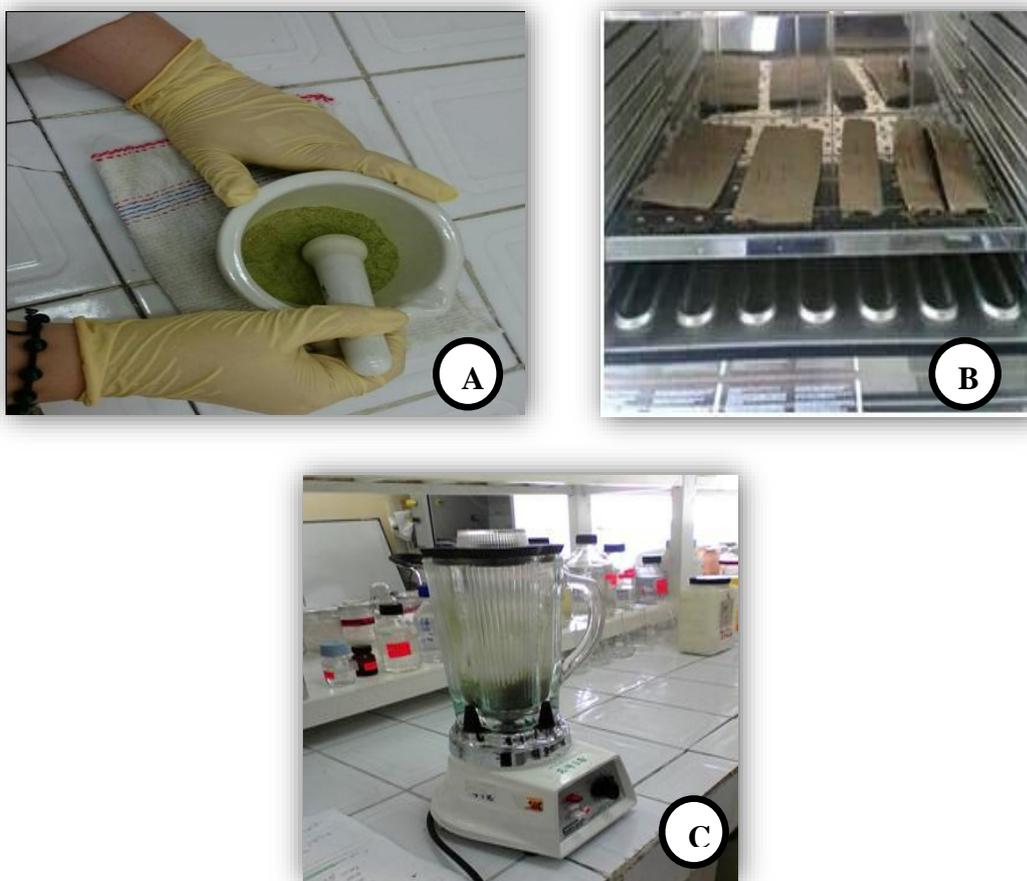


Fig 11 : A) broyage manuelle au mortier de l'échantillon frais. B) séchage à l'étuve à 40°C. C) broyage électrique avec un broyeur.

Nous avons par la suite prélevé 200 ml de tampon d'extraction additionné de bisulfite de sodium à raison de 1 g qu'on a rajouté extemporanément (valable que pour un échantillon constitué de 2 g de broyat), pour la dilution de la matière poudreuse obtenue par le broyage le tout dans un erlenmeyer de 250 ml, une homogénéisation du mélange obtenu a été pratiquée par une agitation manuelle pendant 10 min puis nous avons filtré à l'aide d'une toile à bluter (**Fig 12**).

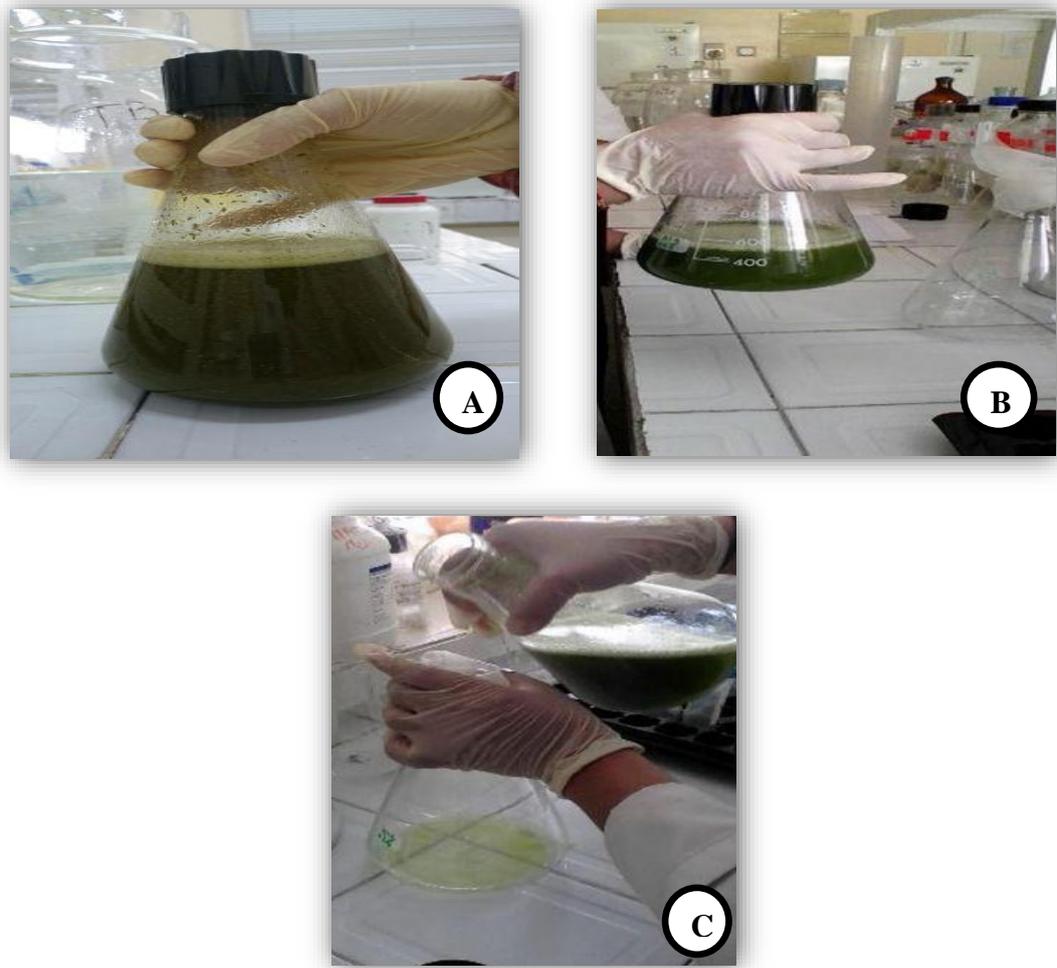


Fig 12 : A : obtention d'un mélange broyat + tampon d'extraction B : homogénéisation manuelle par retournement C : filtration à l'aide de la toile à bluter.

▪ Centrifugation et incubation

Nous avons reparti le filtrat dans 4 tubes de 50 ml, à un volume de 40 ml de filtrat par tube puis nous avons effectué une centrifugation à 4000 rpm pendant 30 minutes de temps. En pipetant le surnageant à l'aide d'une micropipette, nous avons récupéré les culots en les reprenant dans 30 ml de tampon de lyse dans un seul même tube. Une incubation au bain marie a été réalisée pendant 4 heures à 65°C en agitant de temps à autre. Après 5 minutes de refroidissement sur la paillasse nous avons complété le tube à 50 ml avec un volume de chloroforme isoamylique (24/1 : v/v) (**Fig 13**).

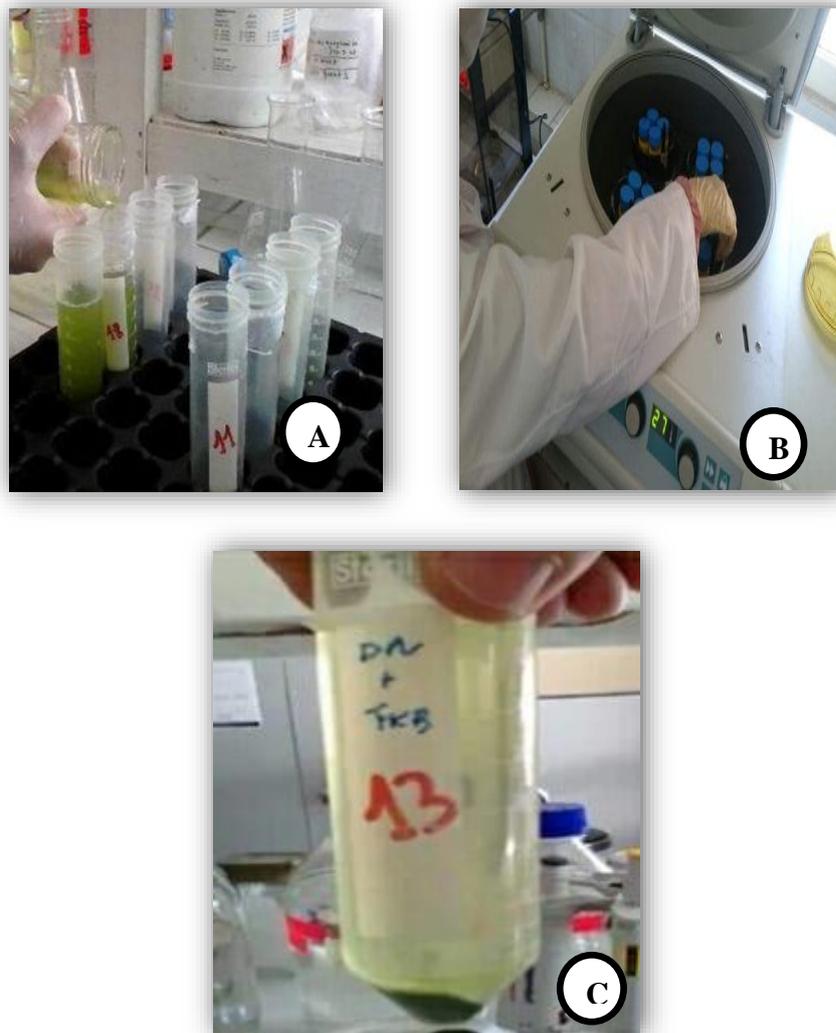


Fig 13 : A : Répartition du filtrat dans les tubes. B : Centrifugation. C : deux phases distinctes après centrifugation surnageant + culot.

▪ Préparation du mélange chloroforme isoamylique

Ces deux composés étant dangereux nous avons réalisé la préparation sous la hotte en portant un masque et des gants. Nous avons prélevé 144 ml de chloroforme qu'on a ajouté à 6 ml d'alcool isoamylique. Ensuite nous avons procédé à l'ajout du chloroforme isoamylique et portés les tubes à une centrifugation de 10 minutes à 4000 rpm. En récupérant la phase supérieure dans un autre tube, cette étape est à refaire pour une seconde fois (**Fig 14**).

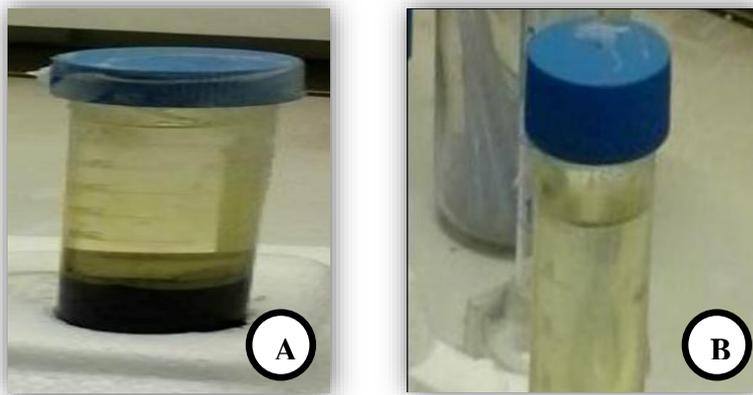


Fig 14 : A : Le résultat de la centrifugation pratiquée après l'ajout du chloroforme isoamylique. B : Résultat de la deuxième centrifugation.

Nous avons recueillis la phase aqueuse dans un autre tube de 50 ml contenant 200 μ l de RNase puis l'ensemble a été incubé pendant 1 heure à 37°C à l'étuve. (**Fig 15**)

▪Préparation de la solution de RNase

12.5 mg de RNase sont pesés et introduit dans un tube de 15 ml et complété avec un volume de 1.25l d'acétate de sodium à 0.01M de pH 5.2. Le mélange est bouillit pendant 15 min sur une plaque chauffante, après refroidissement pendant 5 min sur la paillasse, 31.25 μ l de la solution de tris HCl 1M de pH 8 est ajoutée au mélange. La solution de RNase est distribuée dans des tubes de 1.5 ml et conservée au congélateur.



Fig 15 : Incubation à l'étuve pendant 1 heure à 37°C.



▪ Précipitation de l'ADN

L'ADN est précipité avec un volume d'isopropanol qui est utilisé pour compléter le tube jusqu'à 50 ml cependant une agitation manuelle et requise durant cette phase de l'extraction.

La saisie de la pelote d'ADN est ensuite réalisable à l'aide de la pipette de pasteur, elle sera introduite dans des tubes de 1.5 ml puis rincée à l'éthanol 70 %, on laisse sécher durant toute une nuit sur du papier absorbant. Pour la continuation nous avons suspendu les culots d'ADN contenus dans les tubes de 1.5 ml dans un volume de 100 μ l de tampon TE (tris HCl 10M, EDTA 1mM, pH=8) (**Fig 16**).



Fig 16 : Représentation de l'ADN.

I.2.3.1.2. L'extraction par la méthode Maxi KTT Qiagen

La méthode de DN easy Plant maxi KTT Qiagen est une méthode facile et un moyen rapide pour extraire et purifier l'ADN, elle est aussi efficace et avantageuse par le fait qu'elle permette de travailler sur des petites doses de matériel végétal allant de 100 mg à 1 g. La purification ne nécessite pas une extraction par le chloroforme, ou encore la précipitation par l'alcool et ainsi elle requiert une manipulation minimale. L'ADN purifié est élué dans un tampon de faible teneur en sel ou avec de l'eau, la membrane de DNeasy assure l'élimination complète de tous les inhibiteurs de la PCR.

I.2.3.2. Dosage de l'ADN

I.2.3.2.1. Dosage par le NanoDrop 2000c

Nous avons également utilisé le nanodrop 2000c pour la quantification de l'ADN, et ceci en suivant les différentes étapes d'un protocole qui sera cité ci-dessous par la suite, il



permet grâce à sa nouvelle technologie de pointe la quantification de très petites quantités d'échantillons d'ADN de l'ordre du microlitre.

- ✓ Pour commencer nous avons procédé au nettoyage de surfaces supérieures et inférieures du système de rétention du nanodrop 2000c par pipetage de 2-3 μl d'eau déminéralisée en assoyant les surfaces optiques avec un chiffon sec non pelucheux.
- ✓ Par la suite nous avons ouvert le logiciel Nanodrop et sélectionnés l'application des acides nucléiques, en utilisant une pipette calibrée nous avons déposé 1 μl de tampon TE pour faire le blanc sur la surface inférieure optique du système de rétention du nanodrop et ceci en effet en cliquant sur « blank » dans l'application acide nucléiques.
- ✓ Une fois l'essai à blanc terminée, nous avons nettoyé les surfaces optiques à l'aide d'un chiffon propre sec.
- ✓ Nous avons poursuivi en choisissant la constante appropriée de l'échantillon qui doit être mesuré, puis nous avons reparti 1 μl d'échantillons d'ADN sur la partie inférieure du piédestal optique en refermant le bras du levier.
- ✓ Pour clôturer cette procédure nous avons sélectionné le volet « mesure » dans le logiciel d'application. Le logiciel calcule automatiquement le taux de concentration d'acide nucléiques et de pureté ainsi que l'émission de l'image spectrale de notre échantillon d'ADN.

I.2.3.2.2. Contrôle sur le gel d'agarose

Il est réalisé sur un mini gel d'agarose 1% dans du tampon de TAE 0.5 X sous une migration à 60 volt, la solution d'ADN à doser est exposée à une série de dilutions notamment à 1/20, 1/40, 1/80 et 1/100 (**Fig 17**) (Annexe 5). Tout démarre à partir de la dilution à 1/20 qui est préparée à partir d'un volume de 2 μl de la solution d'ADN qui sera mélangé avec 38 μl d'eau stérile. Le volume de dépôt est de 13 μl (10 μl d'ADN dilué + 3 μl de bleu de migration), après la migration, le gel est coloré au bromure d'éthidium, permettant ainsi la visualisation des bandes d'ADN sous les radiations UV.



Fig 17 : ensemble de dilutions réalisées.

a) Préparation du gel d'agarose

- Pour préparer la solution de TAE 0.5 X, un volume de 10 ml de TAE 50 X est prélevé puis ajuster jusqu'à 1 litre avec de l'eau distillée stérile. Ensuite nous avons prélevé 70 ml de la solution de TAE 0.5 X pour y rajouter une masse de 0.7 g d'agarose, la mixture est par la suite chauffée à la micro-onde pendant 10 minutes pour obtenir une fois l'agarose fondue une solution limpide, ensuite nous avons coulé le gel d'agarose dans le moule préalablement préparé en plaçant les peignes vers une extrémité du gel, en attendant une heure pour le refroidissement et la gélification du gel (**fig 18**).

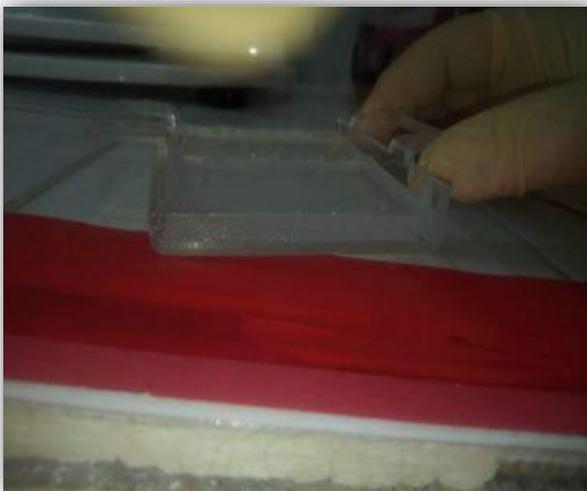


Fig 18 : Gel d'agarose en gélification dans le moule.



- Ensuite nous avons placé le support avec le gel dans la cuve d'électrophorèse, les puits doivent être du côté de la cathode (fil noir) car l'ADN est chargé négativement et migre vers l'anode (fil rouge) (**fig 19**) ; la cuve est remplie avec du tampon TAE 0.5 X



Fig 19 : Gel d'agarose dans la cuve d'électrophorèse.

- Les dépôts sont constitués d'extraits d'ADN qui sont délicatement chargés dans les puits du gel en se positionnant en haut du puit et déversant le contenu du cône de la pipette et ainsi que de marqueur de poids moléculaire à 1 kb DNA ladder et d'un colorant (bleu de bromophenol) pour suivre la migration sur gel (**Fig 20**).



Fig 20 : La migration sur gel d'agarose sous un voltage de 60 V.



- La révélation de l'ADN sur le gel d'agarose est réalisée par le bromure d'ethidium qui est un agent intercalent, il est ajouté une fois l'électrophorèse terminée à une concentration de 0.5 µl/ml, les fragments d'ADN sont rendus visibles par exposition du gel aux rayons UV à l'obscurité.
- Ensuite nous avons tenté de mettre en place une expérimentation basée sur l'utilisation de l'outil moléculaire permettant l'évaluation de la conformité génétique de plants régénérés par les protoplastes par comparaison de leurs profils électrophorétiques à ceux des pieds mère à l'aide des marqueurs RAPD.

I.2.3.3.Méthode RAPD

La réaction de l'amplification est réalisée dans un mélange réactionnel de 25 µl, contenant 5 mg d'ADN génomique, 0,5Mm d'NTP, tampon taq appligène 1X, taq appligène 5u, 10Mm d'amorce. Les amplifications d'ADN sont réalisées dans un thermocycleur (Pekin Elmer) et les produits sont visualisés sur gel d'agarose à 1,8 %. Les 3 amorces arbitraires testées, oligonucléotides de 10 bases de 5' à 3', proviennent de Kits RAPD Primer (OPERON Technologies), ce sont les Kit A, Kit B et Kit D, chacun codé de 01 à 20.

I.2.4. Caryologie

I.2.4.1. Dénombrement chromosomique

Le dénombrement chromosomique est réalisé sur la base des observations des divisions mitotiques au niveau des cellules meristématiques de racines, au stade métaphase (**Fig 21**). Nous avons adopté le protocole suivant (Tableau 4) :

Tableau 4 : Méthode de dénombrement chromosomique.

Sur pailleasse	- Trempage dans l'eau pendant 24h pour rebouillir les téguments et réaliser un tri-densitométrique des graines
Sous hotte à flux laminaire	<ul style="list-style-type: none"> - Trempage dans une solution d'hypochlorite de calcium (CaClO) 8% pendant 10 min - Trois rinçages successifs avec l'eau distillée stérile (5min/bain) - Trempage dans l'alcool 70° pendant 5 min - 3 rinçages successifs avec l'eau distillée stérile (5min/bain) - Retirer les graines stériles et les placer dans les boites, puis transférées dans une étuve réglée à $32 \pm 1^{\circ}\text{C}$ (Après 20 à 25 jours d'incubation, les graines ont germé)

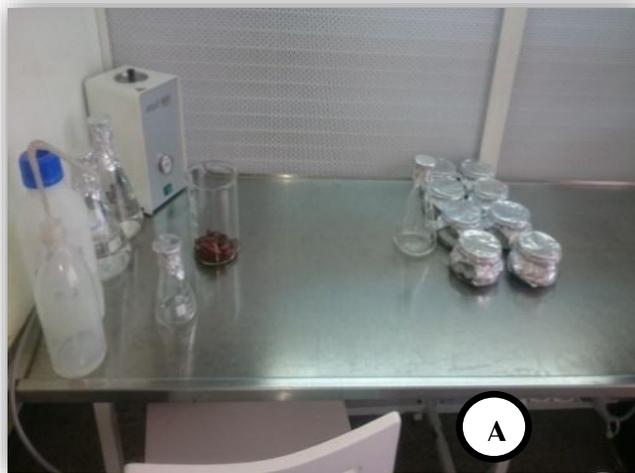


Fig 21 : A) Stérilisation des graines sous la hotte à flux laminaire.

B) les graines stériles dans l'étuve.

Malheureusement nous n'avons pas terminé cette expérimentation à cause de covid-19.



Résultats et discussion





II. Résultats et discussion

II.1. Induction de l'embryogenèse somatique des hybrides somatiques

II.1.1. Multiplication et germination des embryons somatiques

Des cals embryogènes sont transférées sur des milieux de multiplication GMN₂₀₀ pour la formation des hybrides somatiques et placés dans des bocaux à une photopériode 16 heures de lumière à une température 28°C. Les subcultures sont effectuées par fragmentation des cals qui grossissent. Après deux mois et demi de culture, des nodules embryonnaires apparaissent à la surface des cals. La formation des embryons somatiques est réalisée par trois stades de développement :

II.1.1.1. Stade de nodulation

La réponse positive du cal nodulaire issue du milieu d'induction de l'embryogenèse somatique (milieu MS modifié dépourvu de substances de croissance) se manifeste dans un premier temps par la formation à la surface du cal nodulaire de petits nodules très friable. Ces derniers de couleur blanche nacré ont une taille variable entre 3 et 4 mm et se présentent sous une forme arrondie ou allongées. Les nodules de contour bien délimités peuvent s'isoler les uns des autres ils peuvent rester groupés (**Fig 22**).





Fig 22 : Apparition des nodules.

II.1.1.2. Stade de maturation

Les proembryons qui sont des nodules sphériques compacts sont maintenus dans les mêmes conditions de culture. Ils évoluent ensuite en petites formes allongées et sont typiques des embryons somatiques de palmier dattier.

Les proembryons peuvent apparaître séparés ou rester en touffes. Les premiers embryons somatiques apparaissent au bout de 6 mois après leur transfert (**Fig 23**).



Fig 23 : Maturation des embryons somatiques.

II.1.1.3. Stade de germination

Les embryons évoluent et germent dans les conditions de culture identiques, qui se prennent une coloration verdâtre, le cotylédon et la radicule apparaissent. Il y a allongement du cotylédon qui possède à sa base la fente cotylédonnaire d'où émerge une première feuille cotylédonnaire.

Les embryons somatiques ne présentent pas un développement synchrone : la germination n'affecte pas tous les embryons somatiques en même temps. Le nombre et la taille des embryons formés varient selon le type de cals et explants dont ils sont issus (**Fig 24**).



Fig 24 : Germination des embryons.

Le pourcentage des embryons germés est illustré dans le tableau 5



Tableau 5 : Pourcentage des embryons germés sur le milieu MS modifié.

Cultivars	Cals	Nombre total d'embryons	Nombre d'embryons germés	Pourcentages d'embryons germés	Nombre totale des touffes	Nombre des touffes germés	Pourcentages des touffes germés
1F₁(a)	53	80	50	62.5	60	51	85
1F₁(b)	30	40	30	75	30	25	83.33
1F₁(c)	15	60	10	16.66	10	04	40
1F₂(a)	38	40	20	50	12	06	50
1F₂(b)	40	50	35	70	40	30	75
1F₂(c)	25	30	24	80	30	22	73.33

1F₁ : l'hybride somatique issu de fusion de protoplastes entre DN et TKB.

1F₂ : l'hybride somatique issu de fusion de protoplastes entre TGZ et TKB.

Le tableau ci-dessus n'illustre que le milieu de germination a permis l'obtention d'embryons somatiques chez tous les cultivars étudiés des hybrides somatiques 1F₁ et 1F₂. Le pourcentage des embryons somatiques germés varie entre 16.66 et 80%.

Le Taux de germination des embryons somatiques dépend des cultivars étudiés. Le plus grand nombre d'embryon est obtenu avec le 1F₁(a) qui a formé 50 embryons. Le nombre le plus faible est obtenu avec le 1F₁(c) qui a formé 10 embryons. Ceci montre que le nombre d'embryon mature varié d'un cultivar à un autre.

Discussion

Les nodules blancs nacrés sur les cals friables correspondent à la formation des proembryons qui vont évoluer en embryons somatiques. Les embryons issus des explants floraux peuvent se présenter isolés ou sous la forme de bouquet d'embryons comme dans le cas de palmier à huile (Scwendiman et al., 1988; Mazri et Maziani, 2013; Mazri, 2015 ; Al Najm et al., 2018).

L'induction des nodules embryogènes a lieu sur le milieu GMN₂₀₀ à une photopériode 16h de lumière et à une température 28°C, ce qui concorde avec (Ferrgani, 1998 ; Yatta, 2007 ; Abed et al., 2014 ; Yatta et al., 2014 ; Al Najm et al., 2018) qui ont rapporté que l'exposition des cals à la lumière est indispensable pour réussir l'induction de l'embryogénèse somatique.



Le développement des proembryons en embryons somatiques se réalise sur le même milieu GMN₂₀₀. Tous les stades de développement peuvent être observés dans une même culture ce qui semble entraîner une certaine compétition où un certain nombre dégénère. Ce phénomène est fréquent chez le palmier dattier (Abed et al., 2014 ; Yatta et al., 2014).

(Zaid, 1989 ; Yatta et al., 2015 ; Bouguedoura et al., 2017) conseillent de séparer les embryons pendant les repiquages.

La structure des embryons somatiques mature est piriforme, renflés à la base et effilés au sommet, ces résultats concordent avec ceux de (Lachqer Sillou, 1989 ; Ferrgani, 1998 ; Yatta et al., 2007 ; Abed et al., 2012) sur les fragments de cœur de rejet.

Comme toutes les monocotylédones les embryons somatiques de palmier dattier s'expriment par un allongement du limbe cotylédonaire puis la fente se déchire et laisse apparaître la feuille engainante. La racine se développe plus tard.

Différents stades de développement des embryons somatiques peuvent se retrouver sur un même cal. A cette diversité des cultures s'ajoute la formation d'une embryogénèse secondaire ou adventive à partir des cellules de la périphérie des embryons somatiques en cours de leur évolution (Tissérat et De Mason, 1980 ; Bhaskaran et Roberta, 1995 ; Chukwuemeka et al., 2005).

II.2.2.Phase d'acclimatation

II.2.2.1. Effet de l'acclimatation sur les plantules

La réussite de l'acclimatation des plantules dépend principalement de la maîtrise d'un certain nombre des facteurs, à savoir les conditions de l'environnement (humidité, température), le substrat utilisé, le stade de la plantule à acclimater, l'irrigation et la protection phytosanitaire.

Cette étude met en évidence l'influence positive de la qualité morphologique des plants racinés obtenus à partir de multiplication et développement en plant avec l'utilisation de milieu MS modifié sur le succès d'acclimatation.

Les plantes vigoureuses ayant un système racinaire bien développé avec un nombre de racines supérieur à quatre et une longueur d'au moins 10 cm, sont transférées en pots dans un substrat constitué de (sable, tourbe et fongicide), sous les conditions (humidité 70%, température à $26 \pm 2^\circ\text{C}$).



Après une semaine de la culture, nos observations montrent que pendant la première semaine d'acclimatation dans la chambre de culture, tous les vitroplants au nombre de (80) par essai ont survécu (100% de survie) (Annexe 6) (**Fig 25**).

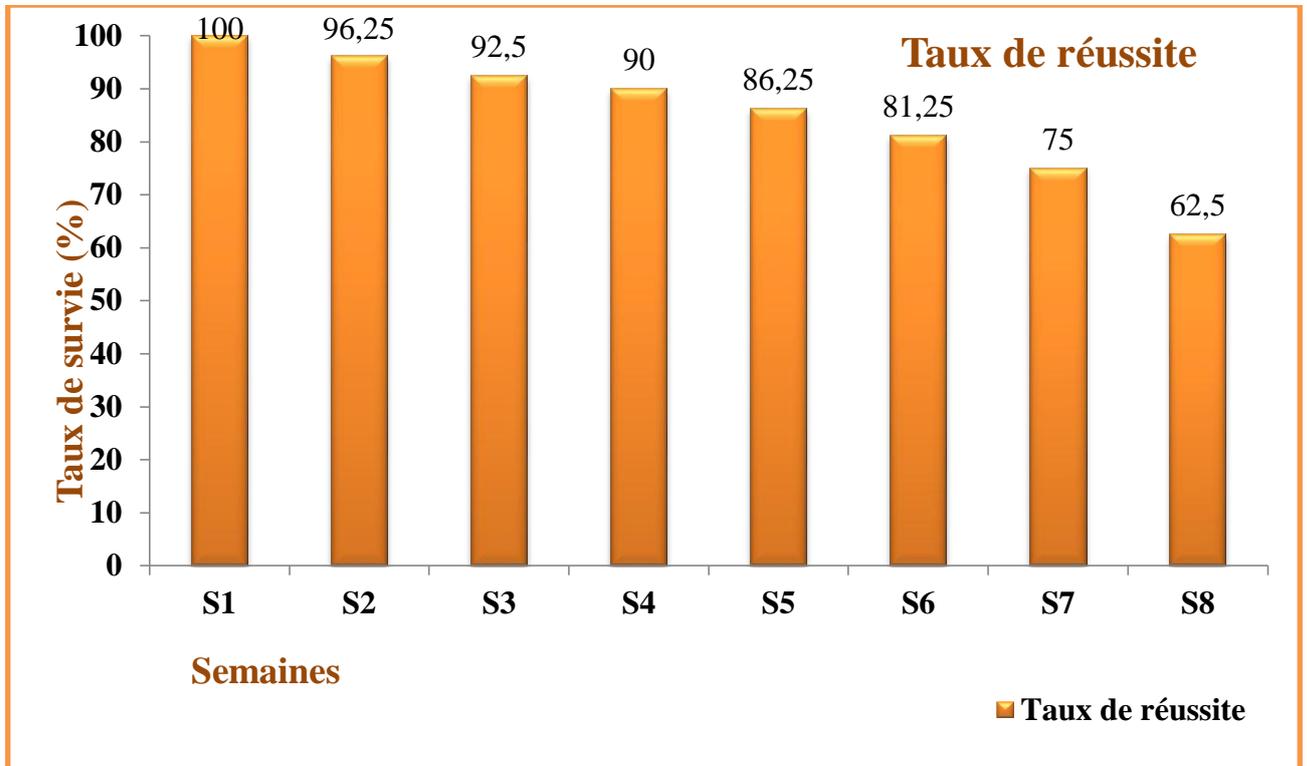


Fig 25 : Taux de survie des vitroplants après huit semaines d'acclimatation.

Les résultats du début d'acclimatation après deux semaines montrent que les plantules sont bien développées en chambre de culture.

La figure (26) a révélé que durant les 21 jours de l'acclimatation, 6 sur 80 plantules acclimatées, n'ont pas survécu, après 3 semaines avec le pourcentage de 92.5%.

À partir de la quatrième semaine **S4** d'acclimatation, les plantules obtenues présentent une bonne reprise et un taux de survie de 90%.

Durant les quarts dernières semaines, nous avons remarqué que le taux a connu une baisse et sont respectivement 86.25% avec (69) plantules à la cinquième semaine **S5**, 81.25% avec (65) plantules à la sixième semaine **S6**, 75% avec (60) plantules à la septième semaine et 62.5% avec (50) plantules à la huitième semaine, c'est le plus faible taux de reprise.

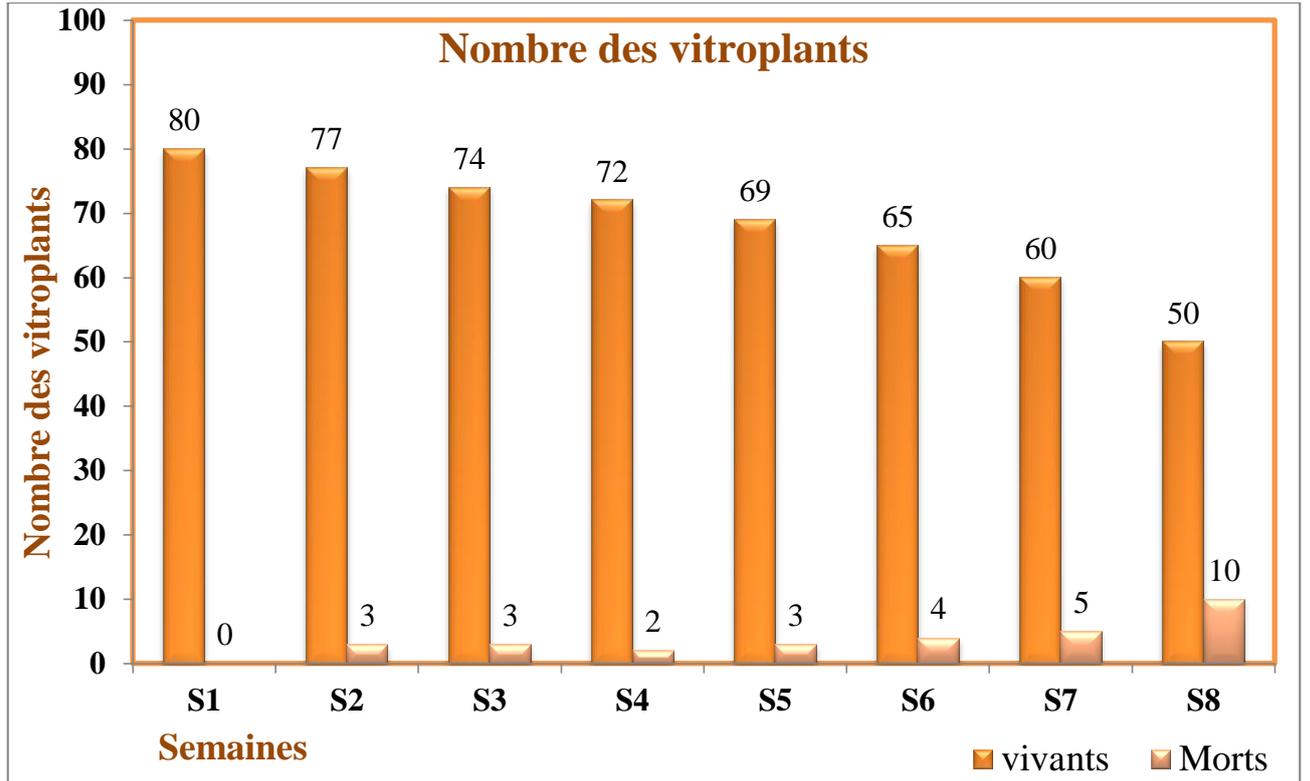


Fig 26 : Nombre des vitroplants acclimatés.

Discussion :

La germination des embryons somatiques, leurs développements en plants ainsi que l'acclimatation sont des étapes importantes qui demeurent le problème fondamental dans le programme d'amélioration du palmier dattier (Ahee et al., 1981; Konan et al., 1989; Kozai, 1991 ;Kumar et Rao, 2012), ces auteurs ont rencontré une grande difficulté à maintenir des vitro-plants en acclimatation.

Le taux d'acclimatation est calculé à partir de la première semaine marquant la meilleure survie des plantules jusqu'à la huitième semaine où nous avons observé une baisse de cette survie. Durant notre expérimentation des faibles pourcentages ont été observés, dans les quatre dernières semaines. Certain de ces plantules n'ont pas repris leur croissance par contre d'autre partie des plantules sont subi un dessèchement. Ceci est dû probablement au transfert du tube vers le substrat.

Aucune perte de vitroplants n'a été enregistrée pendant les premiers jours d'acclimatation. Ces observations concordent avec les travaux de (Youmbi et al., 2005 ; Abed et al., 2014 ;Yatta et al., 2014 et Al -Najm et al., 2018).



Durant notre expérimentation, nous avons remarqué qu'au cours des premières quatre semaines d'acclimatation, un bon développement des plantules. Elles présentent une bonne adaptation en conditions optimales de nutrition et d'environnement qui ont abouti à un pourcentage de réussite égale à 96.5%. Ces observations concordent avec les travaux de (Konan et al., 2015). Le taux de reprise moyen de 68.3 % de plants survies dans nos conditions d'acclimatation confirme ceux d'autres équipes travaillant sur le servage des vitroplants de palmier à l'huile (Ginting et Fatmawati, 1995 ; Tan et al., 1999 ; Abed et al., 2014 ; Yatta et al., 2014 ; Al- Najm et al., 2018).

Selon BOXUS, 1995 les vitroplants présentent plus ou moins de profondes modifications morphologiques, anatomiques et physiologiques. Les feuilles de plantules obtenues « *in vitro* » ne sont que peu ou pas recouvertes de couche cireuse sous l'épiderme, la morphologie et la densité des stomates sont souvent modifiées, leur fonctionnement est altéré, les cellules palissadiques sont moins abondantes et contiennent moins de chloroplastes. Dans notre étude, les pertes des vitroplants au cours d'acclimatation sont peut-être liées à ces modifications. Ce résultat est en accord avec ceux de (Dustan et Turner, 1984 ; Preece et Sutter, 1991 ; Ziv, 1991 ; Desjardins, 1995 ; Ghorbel et al., 1998 et Lescot, 2012).

II.2. Approche génétique

II.2.1. Caractérisation moléculaire de matériel génétique

II.2.1.1. Extraction de l'ADN

L'extraction de l'ADN prit départ par le broyage électrique de jeunes feuilles issues des vitroplants des différents cultivars (Deglet Nour, Takerboucht, et Tegaza) afin d'obtenir une substance poudreuse, en utilisant deux différentes méthodes, la première étant l'emploi du protocole d'extraction d'ADN au sorbitol et la deuxième étant l'utilisation de la méthode du DNeasy maxi kit Qiagen.

Nous avons par la suite observé qu'après l'étape de l'ajout du tampon de lyse et de l'incubation à 65 °C pendant 4 heures la couleur du mélange ainsi obtenu a viré du vert clair au vert foncé. La centrifugation après ajout du chloroforme isoamylique a permis la formation de phases bien distinctes au nombre de trois, la deuxième extraction a généré quant à elle deux phases. Après l'ajout de la solution de RNase pour la dégradation de l'ARN et incubation pendant toute une heure à 37°C, nous avons précipité l'ADN en ajoutant de l'isopropanol, des lors nous avons observé l'apparition de la pelote qui est méticuleusement récupérée puis rincée par ajout de l'éthanol et séché (Fig 27).

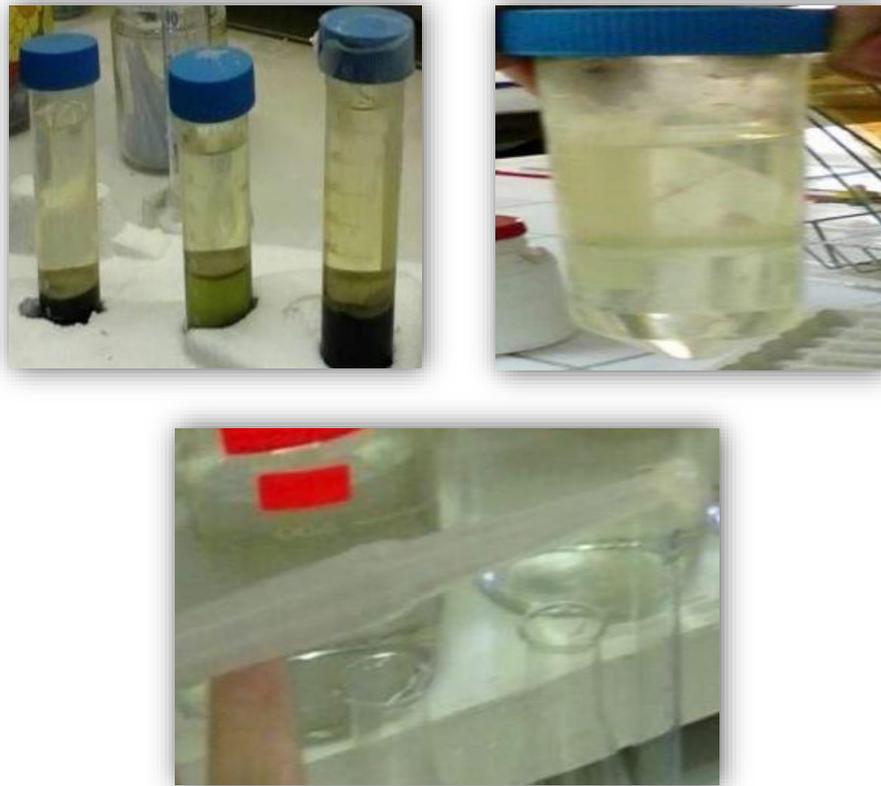


Fig 27 : Différentes phases pour l'obtention de la pelote d'ADN.

Cependant la méthode de DNeasy Plant maxi kit Qiagen permet de réaliser une extraction rapide de l'ADN génomique avec une meilleure pureté et avec un rendement plus important. Le DNeasy Plant Maxi Kit peut traiter jusqu'à 1 g de tissu. (**fig 28**).



Fig 28 : Culots d'ADN.



II.2.1.2. Dosage de l'ADN

II.2.1.2.1. Contrôle de la qualité d'ADN sur gel d'agarose

Nous avons évalué la qualité des extraits d'ADN obtenus après l'extraction en pratiquant une migration sur gel d'agarose qui nous a donné des concentrations différentes en ADN allant de 10 à 60 ng.μl⁻¹ pour les deux types d'extraction (**Fig 29**).

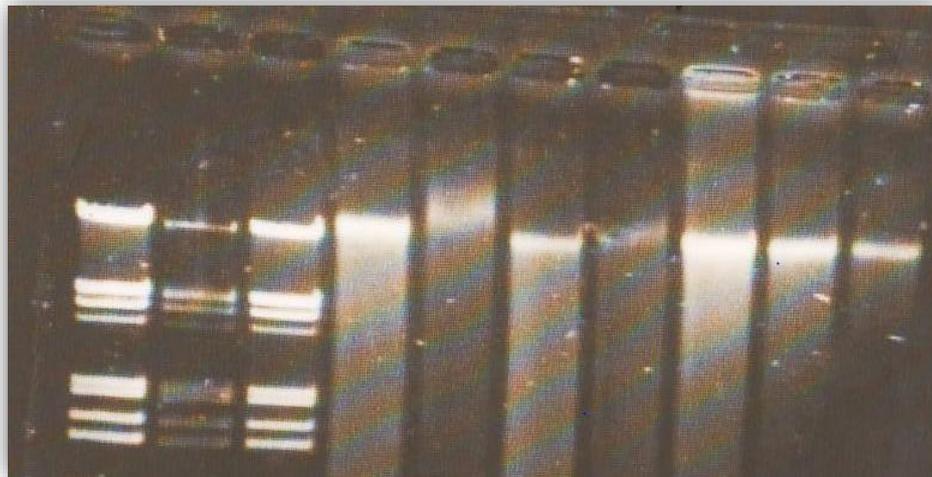


Fig 29 : Evaluation de la qualité des extraits d'ADN obtenus par la méthode au sorbitol par la migration sur gel.

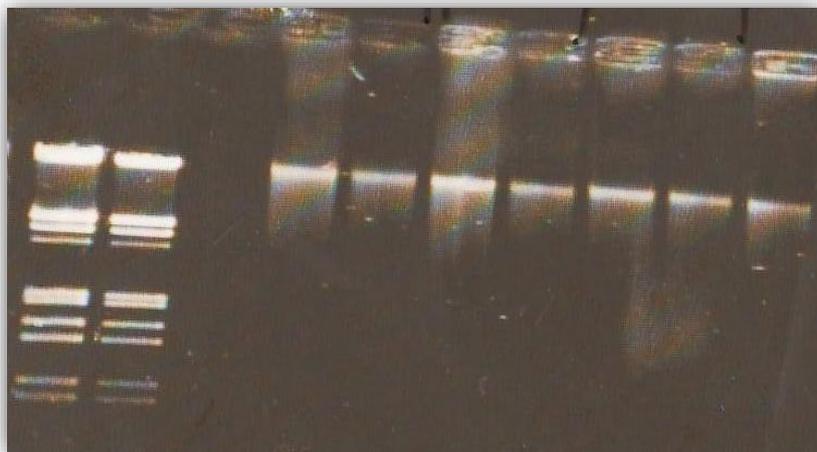


Fig 30 : Evaluation de la qualité des extraits d'ADN obtenus par la méthode du DN easy maxi kit Qiagen par la migration sur gel d'agarose.

La qualité de l'ADN extrait à partir des feuilles des vitroplants issus de trois cultivars (Deglet Nour, Takerboucht, et Tegaza) est meilleure. Ceci s'expliquant en partie par l'usage des feuilles liophilysées juste après la cueillette. Nous avons toutefois remarqué que les deux méthodes utilisées pour l'extraction de l'ADN à partir des jeunes feuilles du



palmier dattier ont donné des extraits d'ADN d'une très bonne qualité avec l'observation d'une meilleure pureté pour la méthode du DNeasy maxi kit Qiagen. Ceci est montré par la quasi-absence de traînées lors de la migration sur gel d'agarose.

La migration sur gel d'agarose permet l'évaluation de la qualité et la quantification des extraits d'ADN et nécessite une délicatesse au moment de sa réalisation. Nous avons en effet obtenu des résultats satisfaisants pour les extraits d'ADN obtenus à partir des deux méthodes d'extraction avec cette technique.

II.2.1.2.2 Dosage par le Nanodrop

La figure 31 représente le Spectre obtenu par nanodrop de l'échantillon d'ADN

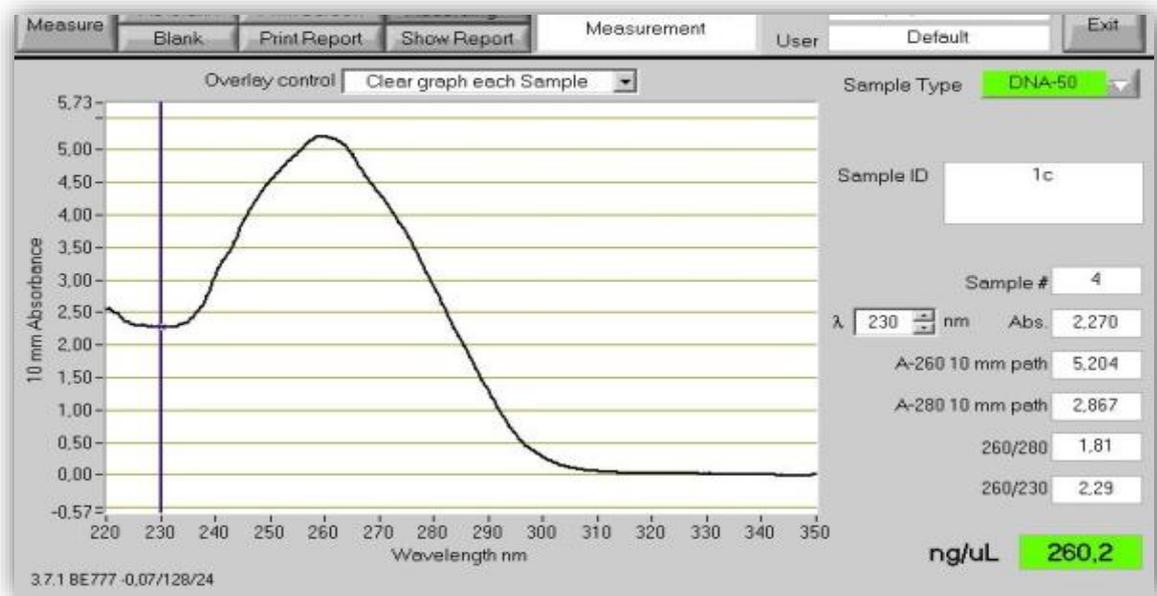


Fig 31: Spectre obtenu par nanodrop de l'échantillon d'ADN.

Ce spectre est le profil typique des acides nucléique (ADN), sans la présence de contaminant nous avons observé une absorbance à 4 longueurs d'onde, à 230 nm, à 260 nm, à 280 nm et à 340 nm (Tableau 6). Les changements des pics et des creux de certains échantillons par rapport à un profil typique du spectre d'un échantillon résultent de la présence de contaminants ou d'une mauvaise purification de l'ADN.



Tableau 6 : Résultats obtenus par le dosage au Nanodrop.

Echantillon	User ID	Date	Temps	µg/µl	A260	A208	260/280	260/230	Contant	Cursor Pos	Cursor abs	Cursor raw
TGZ1	Default	09/03/2020	12 :00	370.85	7.417	4.077	1.82	2.36	50	230	3.145	0.04
TGZ2	Default	09/03/2020	12 :04	880.02	17.6	9.564	1.84	2.28	50	230	7.736	0.075
TGZ3	Default	09/03/2020	12 :07	292.08	5.842	6.344	0.92	0.46	50	230	12.678	32.786
TGZ4	Default	09/03/2020	12 :10	260.2	5.204	2.867	1.81	2.29	50	230	2.27	0.106
TGZ5	Default	09/03/2020	12 :14	776.74	15.535	8.564	1.81	2.27	50	230	6.842	0.094
TKB1	Default	09/03/2020	12 :16	360.5	7.035	3.778	1.81	2.35	50	230	2.99	0.04
TKB2	Default	09/03/2020	12 :19	293.04	45.44	6.443	0.93	0.45	50	230	10.648	30.786
TKB3	Default	09/03/2020	12 :21	870.03	17.9	9.634	1.83	2.29	50	230	7.772	0.082
TKB4	Default	09/03/2020	12 :23	880.02	17.6	9.564	1.84	2.28	50	230	7.736	0.075
TKB	Default	09/03/2020	12 :25	260.02	5.204	2.867	1.81	2.29	50	230	2.27	0.106
DN1	Default	09/03/2020	12 :27	775.54	16.063	8.554	1.83	2.229	50	230	6.998	0.092
Dn2	Default	09/03/2020	12 :30	292.08	5.842	6.344	0.92	0.46	50	230	12.678	32.786
DN3	Default	09/03/2020	12 :33	870.03	17.9	9.634	1.83	2.29	50	230	7.772	0.082
DN4	Default	09/03/2020	12 :35	776.74	15.535	8.564	1.81	2.27	50	230	6.842	0.094
DN5	Default	09/03/2020	12 :38	293.04	45.44	6.443	0.93	0.45	50	230	10.648	30.786

Le dosage de l'ADN par nanodrop a été effectué sur les extraits d'ADN de 15 échantillons au total, et qui sont issus des vitroplants des trois cultivars (Deglet Nour, Takerboucht, et Tegaza), chaque cultivar étant représenté par 5 souches. Sur ce tableau les concentrations, sont représentés en µg/µl les ratios en 260/280 ; et en 260/230 ainsi que les absorbances en 260 et en 280. Les concentrations sont variables et s'étalent sur un intervalle de 260.02 à 880.02 par contre les ratios de 260/280 ont pour la plupart une valeur approximative de 1.8 plus précisément allant de 1.81 à 1.84, le ratio de 280/230 présente une valeur allant de 2.27 à 2.36, pour la plupart des échantillons dosés, en déduction tous les ADN sont de bonnes qualités car les valeurs des ratios obtenus sont dans les normes demandées (la quantification et la pureté d'ADN).

Discussion

Les cellules végétales présentent une paroi cellulaire rigide qui nécessite des forces de cisaillement afin de les désintégrer et de libérer l'ADN dans la solution d'extraction (Arabnezhad et al., 2012 ; Hamza et al., 2013), la rupture de la paroi cellulaire est la première étape dans le procédé d'extraction de la molécule d'ADN.

L'utilisation de tissus lyophilisé ou séché contourne le problème de la décongélation et rend le broyage plus convenable, toutefois si des quantités importantes de matière sèche sont à traiter, un moulin à café pourrait être un équipement approprié. Afin d'obtenir des



rendements d'ADN élevés intact, il est important d'utiliser les plus jeunes feuilles de plantes saines.

Le tampon d'extraction permet de solubiliser les différents composés cellulaires, Il contient notamment un polyol qui est le sorbitol aux propriétés séquestrantes qui précipitent les polyphénols mais aussi le tris (hydroxyméthyl) aminométhane, HCl qui est un tampon biologique permettant de maintenir la stabilité du pH, et perméabilise aussi la membrane cellulaire, cet effet est renforcé par l'ajout de l'EDTA qui est un agent chélateur présentant une très grande affinité pour les ions métalliques bivalents (Ca , Mg,...etc.) utilisés comme Co facteur par les nucléases pour la dégradation de l'ADN, ainsi l'EDTA inhibe leurs activités en les liant et préserve par cet action l'ADN. Mais aussi le tampon d'extraction contient un anti-oxydant limitant l'action des polyphénols (**Yatta et al., 2007 ;Hamza et al., 2013; Moussouni et al., 2017**).

Le tampon de lyse permet de lyser les parois cellulaires afin de séparer les différentes composantes cellulaires constituant la cellule végétale. Il contient le NaCl qui permet de solubiliser la molécule d'ADN ainsi que les autres composés cellulaires et neutralise les charges négatives de la molécule d'ADN pour provoquer son agrégation.

La purification de l'ADN est habituellement réalisable en deux étapes, la première consiste à traiter le mélange d'extraits de cellules avec des solvants organiques seuls ou en mélange comme le chloroforme et l'alcool isoamylique (IAA). La deuxième étape consistant à centrifuger le mélange de lyse (juste après l'addition de solvant de composés organiques dans l'extrait cellulaire) dans le but de séparer l'ADN contenu dans la phase aqueuse de la phase organique contenant des protéines et des lipides dénaturés contaminants (**Arabnezhad et al., 2012 ; Cherif et al., 2013 ; Aberlenc- Bertossi et al., 2014 ; Yatta et al., 2014**).

Le chloroforme dénature les protéines et l'alcool isoamylique facilite la séparation de la phase aqueuse et de la phase organique et réduit la formation de mousse pendant la centrifugation (**Hamza et al., 2013**). La purification par le chloroforme isoamylique peut être effectuée deux fois de suite afin d'obtenir une molécule d'ADN pure exempt de tout contaminant. Des nombreux chercheurs et auteurs (**Kanazawa et Tsutsumi, 1992;Arabnezhad et al., 2012**) ont préféré l'extraction par le Cho/IAA (24 :1) au lieu de celle du phénol chloroforme pour seule raison que le phénol réduisait la qualité et la quantité de l'ADN isolé (**Arabnezhad et al., 2012**).



La contamination de l'ARN au cours de la procédure d'isolement d'ADN, peut souvent provoquer une surestimation de la quantité d'ADN extraite lors de la quantification par la mesure de l'absorbance UV ou lors d'une électrophorèse sur gel d'agarose (**Kanazawa et Tsutsumi, 1992 ; Arabnezhad et al., 2012 ; Hamza et al., 2013**). Généralement pour surmonter la contamination de l'ARN, une enzyme la RNase A est fréquemment utilisée pour digérer l'ARN en des petits fragments de ribonucléosides.

(**Arabnezhad et al., 2012 ; Cherif et al., 2013**) a révélé qu'un traitement d'une heure avec de la RNase A est assez suffisant pour dégrader l'ARN en des petits ribonucléosides qui ne sont pas détectables dans un gel d'agarose.

Nous avons utilisé l'isopropanol pour la précipitation de l'ADN, il s'est avéré plus efficace que l'éthanol pour la précipitation de l'ADN de haut poids moléculaire des polysaccharides ce résultat est en accord avec ceux de (**Cherif et al., 2013 ; Yatta et al., 2014**). Le culot d'ADN est habituellement rincé avec de l'éthanol 70% pour éliminer toute trace d'impureté, c'est pour cette raison que (**Hamza et al., 2013**) ont déclaré que la précipitation avec de l'isopropanol, suivie d'un rinçage à l'éthanol donne plus d'ADN. Il ressort aussi que l'éthanol permet la déshydratation de la molécule d'ADN, après le séchage de l'ADN nous avons ressuspendu le culot dans un volume minimum de TE. Ces résultats concordent avec ceux de (**Kanazawa et Tsutsumi, 1992 ; Arabnezhad et al., 2012**).

La méthode de DNeasy Plant maxi kit Qiagen permet de réaliser une extraction rapide de l'ADN génomique avec une meilleure pureté et avec un rendement plus important.

En utilisant les deux méthodes d'extraction nous sommes arrivés à l'affirmation que l'application du protocole d'extraction du palmier à huile sur le palmier dattier a notamment donné des résultats favorables et satisfaisants, l'extraction au sorbitol est une méthode efficace permettant de travailler avec des quantités plus importantes d'échantillons, mais toutefois ce protocole comprend plusieurs étapes qui rendent sa réalisation plus ou moins longue à exécuter plus particulièrement l'inclusion des étapes d'incubations (4 heures au bain marie et une heure pour la dégradation de l'ARN) qui sont notamment des opérations chronophages néanmoins cette méthode présente l'avantage d'être économique tandis que la méthode au maxi Kit Qiagen est une technique d'extraction plus rapide permettant d'obtenir un ADN d'une pureté inégalée, sans avoir recours à l'extraction par les solvants organiques ou la précipitation par l'éthanol et permet une conservation plus prolongée qui est d'une période de 10 ans, cette méthode est utilisée



pour l'extraction d'ADN de référence, les rendements sont similaires pour les deux méthodes qui ont été satisfaisantes dans l'ensemble plus particulièrement la méthode du DNeasy maxi kit Qiagen qui est d'une plus grande efficacité et rapidité et permet d'obtenir des ADN plus pur exempt de contaminant tout en facilitant la manipulation.

En biologie moléculaire, il est important de quantifier et d'analyser la pureté de l'ADN après son extraction. La méthode de Nanodrop confine la mesure d'une large gamme de concentration d'acides nucléique (ADN) éliminant ainsi la nécessité d'effectuer des dilutions. Par la réduction des volumes d'échantillons requis pour l'analyse spectroscopique le Nanodrop facilite l'inclusion d'autres étapes de contrôle de qualité et améliore ainsi l'efficacité et la fiabilité des résultats attendus (**Aberlenc Bertossi et al., 2014 ; Moussouni et al., 2017**).

Un ADN pure a généralement un ratio de rendement $260/280 \approx 1.8$, ce ratio est dépendant du pH et de la force ionique du tampon utilisé pour effectuer les mesures d'échantillons, des ratios significativement différents de pureté peuvent révéler une contamination par les protéines, des phénols ou d'autres contaminants. Le ratio 260/230 est une deuxième mesure de pureté de l'ADN avec des valeurs pour un acide nucléique « pure » de l'ordre de 1.8-2.2. Nous avons obtenu pour notre part pour le dosage de l'ADN au Nanodrop, des ratios de 260/280 s'étalant sur une range de 1.81 à 1.84 et des ratios de 260/230 s'étalant sur un intervalle de 2.27 à 2.36, ces résultats ont prouvé par ailleurs la qualité remarquable des échantillons dosés (**Aberlenc Bertossi et al., 2014**).



Conclusion





La préservation de la perpétuité de la culture du palmier dattier relève du défi majeur de ce siècle, de part sa coriacité morphologique cette espèce est en constante vulnérabilité à des multiples dangers plus particulièrement à la maladie du bayoud pouvant causer son érosion génétique, de ce fait la biotechnologie apporte des compléments aux méthodes traditionnelles par les méthodes *in vitro* qui sont ainsi utilisées pour l'amélioration des plantes et pour la création de variétés résistantes.

L'induction des nodules embryogènes a lieu sur le milieu GMN₂₀₀ à une photopériode 16h de lumière et à une température 28°C, le développement des proembryons en embryons somatiques se réalise sur le même milieu GMN₂₀₀.

La structure des embryons somatiques mature est piriforme, renflés à la base et effilés au sommet, et présente une morphologie légèrement différente de celle de l'embryon zygotique du palmier dattier.

La germination des embryons somatiques est obtenue sur le milieu MS modifié sans hormones de croissance avec un taux de germination 56.33%. La germination des embryons somatiques, leurs développements en plants ainsi que l'acclimatation sont des étapes importantes qui demeurent le problème fondamental dans le programme d'amélioration du palmier dattier.

Durant notre expérimentation, nous avons remarqué qu'au cours des quatre premières semaines d'acclimatation, un bon développement des embryons somatiques en plantules feuillés avec des systèmes racinaires bien développés. Elles présentent une bonne adaptation en conditions optimales de nutrition et d'environnement qui ont abouti à un pourcentage de réussite égale à 96.5%.

Pour la suite de notre travail nous avons eu recours à l'outil moléculaire pour effectuer une série d'analyse qui a notamment pour objectif d'évaluer la diversité génétique des cultivars de palmier dattier.

La caractérisation moléculaire des vitroplants issus de la régénération des protoplastes par embryogénèse somatique est réalisée d'abord par l'extraction de l'ADN.

En biologie moléculaire, il est important de quantifier et d'analyser la pureté de l'ADN après son extraction, l'ADN extrait est donc quantifié par la technique de la migration sur gel d'agarose et le Nanodrop, il s'est avéré que les extraits d'ADN issus des deux méthodes d'extraction sont de bonne qualité, nous avons obtenue des concentrations de

Conclusion



l'ordre de 260.02 à 880.02 ng/ul et des ratios typiques pour l'ensemble des échantillons avoisinant le 1.8 pour la DO 260/230 et des valeurs de 2.27 à 2.36 pour la DO 260/230.

Enfin, une étude génétique par le biais des marqueurs moléculaires doit compléter ces observations et fournir une analyse plus complète qui aidera à entreprendre un programme d'amélioration du palmier dattier. Ainsi, l'utilisation des marqueurs RAPD pour l'identification des cultivars à travers le profilage ADN est utile pour mesurer la variation génétique dans les collections de matériel génétique, en raison de sa simplicité technique et de sa vitesse de réalisation.



*Références
bibliographiques*





-A-

Abadi S., et Chekalaine R. 2015. L'effet de l'irradiation au Cobalt 60 à la dose 15 Gy sur la régénération des cals embryogènes de palmier dattier (*Phoenix dactylifera*), Mémoire de Master 2 en Génomique et Biotechnologie végétales, Univ Saad Dahleb Blida 1, Alger, P2.

Abbouna Y., et Nechachbi A. 2017. Caractérisation des palmiers mâles (Dokkars). Dans l'exploitation de l'université. UKMO Ouargla, et un essai de pollinisation mécanique. Mémoire de Master, Université d'Ouargla, P 55.

Abdallah A.B. 1990. La phoeniciculture. (ed.) Les systèmes agricoles oasiens, Montpellier : CIHEAM. Options Méditerranéennes : Série A. Séminaires Méditerranéens, (11).

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

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

Aberlenc Bertossi F., Castillo K., Tranchant-Dubreuil C., Cherif E., Ballardini M., Abdoukader S, et al. 2014. In silico mining of microsatellites in coding sequences of the date palm (Arecaceae) genome, characterization, and transferability. Applications in Plant Sciences.2014 ; 2 : 1300058.

Absi N.2013. Analyse de la diversité variétale du Palmier Dattier (*Phoenix dactylifera* L.): Cas des Ziban (Région de Sidi Okba). Mémoire de Magister, Agriculture et environnement en régions arides. Biskra : Université Mohamed Kheider Biskra, P 105.

Ahee J., Arthuis P., Cas G., Duval Y., Guenin G., Hanower J., Hanower P., Lievoux D., Lioret C., Malaurie B., Pannetier C., Raillot D., Varechon C., et Zuckermann L. 1981. La multiplication végétative *in vitro* du palmier à huile par embryogénèse somatique. Oléagineux (3) PP : 113-118.

Aitchitt M. 1989. Problèmes rencontrés en culture *in vitro* du palmier dattier *Phoenix dactylifera* L. par la technique d'organogénèse. Compte rendu première groupe de travail



sur la multiplication rapide du palmier dattier par techniques de culture in vitro. FOA Marrakech 9 -12 oct 1989.

Al-Khalifa N.S., Askri E., Ohmure T., Al-Hafedh Y.S., et al. 2003. Phylogénie moléculaire de sept cultivars de palmier dattier (*Phoenix dactylifera* L.) par empreinte ADN [2003].

Al-Khayri J.M. 2011. Basal salt differ according to culture stage and cultivar in date palm somatic embryogenesis. American Journal of Biochemistry and Biotechnology 7 (1): PP 30 -42.

Al-Khayri J.M., Naik P.M. 2017. Date palm micropropagation: advances and applications. *Ciência e Agrotecnologia*, 41: 347-358.

Al-Khayri J.M., Naik P.M., Jain S.M., Johnson D. V. 2018. Advances in date palm (*Phoenix dactylifera* L.) breeding. In: **Al-Khayri J.M., Naik P.M., Jain S.M., Johnson D.V. (Eds).** *Advances in Plant Breeding Strategies: Fruits. Volume 3.* Springer: 727-771.

Al-Najm A., Brauer S., Ethowam R.T., Ahmed N. 2018. Optimization of in vitro micropropagation of several date palm cultivars. Plant Breeding Institute, Faculty of Agriculture and Environment, University of Sydney, 107 Cobbitty Road, Cobbitty, NSW 2570, Australia. The Date palm Research Center, University of Basrah, Basrah, Iraq. River land Date Garden, 376 Gurra, SA 5343, Australia.

Amorsi G. 1975. Le palmier dattier en Algérie, Ed, Tlemcen, P 131.

Aoyagi H. 2006. Developement of a quantitative method for détermination of the optimal conditions for protoplast isolation from cultured plant cells. *Biotechnol Lett.* 28 (20): PP 1687 -1694.

APG II. 2003. An update of the Angiosperm phylogeny Group classification for the orders and families of flowering plants: APG II. *Botanical Journal of the Linnean Society*, 141, PP: 399 – 436. <https://doi.org/10.1046/j.1095-8339.2003.t01-1-00158.x>

APG III. 2009. An update of the Angiosperm phylogeny Group classification for the orders and families of flowering plants: APG III. *Botanical Journal of the Linnean Society*, 161, PP: 128 – 131.

APG IV. 2016. An update of the Angiosperm phylogeny Group classification for the orders and families of flowering plants: APG IV. *Botanical Journal of the Linnean Society*, Volume 181, Issue 1, May 2016, P 1-20. <https://doi.org/10.1111/boj.12385>.

Al Qurainy F., Alsaad F., Filfitan S. 2002. Comparative study between cultivars of date palm (*Phoenix dactylifera* L.) productuced from tissue culture and offshoot originis by RAPD Technology College of science king Saud University Saud Arabia. P 03.



Arabnezhad H., Bahar M., Mohammed H.R., Latifian M. 2012. Developemnt, caracterization and use micro-satillite markers for germplasm analysis in date palm (*Phoenix dactylifera* L.). Scientia Horticulturae. 2012 ; 134 :150-156.

Assani A., Chabane D., Shittu H., Bouguedoura N. 2011. Date palm cell and protoplast culture. In: **Jain SM., Al- Khayri J.M., Johnson Dv (eds)** Date palm biotechnology. Spainger, Dordrecht, PP : 605 – 629.

-B-

Baaziz M. 2003. Culture du palmier dattier (*Phoenix dactylifera* L.)au Maghreb et les stress pesant sur la pheonisciculture dont la maladie du Bayoud Université Cadi Ayyed Marrakech. date palm mitochondria. Curr. Genet. 26, 535 – 541. .

Badr EIDen I., Hamdy E., Mahdia G., Ahmed N., Tamer A.E. 2017. Plants formation from protoplast-derived from date palm callus. Bioscience Research, 14 : PP 982-992.

Bader Saleh M., Baum M., Khierallah Hussam S.M., Choumame W. 2007. The use of RAPDs technique for the detection of genetic stability of Date Palm plantlets derived from un vitro culture of inflorescence. J. Edu. & Sci., The first conference on Biology.

Belguedj M. 2002. Les ressources génétiques du palmier dattier : caractéristiques des cultivars de dattier dans les palmeraies du Sud-Est Algérien. Revue annuelle de l'INRAA N°1, P 289.

Ben Abbas F. 2011. Etude de quelques propriétés chimiques et biologiques d'extraits de dattes (*Phoenix dactylifera* L.). Thèse de Magister, Université Ferhat Abbas-Setif, P 68.

Bennaceur M., Lanaud C., Chevalier M.H., Boungua N. 1991.Genetic diversity of the plasmid –libe dans isolated from **Ben Abdallah A., Stiti K., Lepoivre P., Du Jardin P. 2000** – Identification de cultivars de palmier dattier (*Phoenix dactylifera* L.) par l'amplification aléatoire d'ADN (RAPD) cahiers d'études et de recherches francophones Agricultures. Volume 9 Numéro 2, PP : 103 – 107.

Bhaskaran S., and Roberta H.S. 1995. Somatic embryogenesis in date palm (*Phoenix dactylifera* L.). in Jain S., Gupta P., and Newton R(eds). Somatic embryogenesis in woody plants. Vol 2. PP : 461-470.

Bouguedoura N. 1991. In Boufis N, 2008. Régénération par embryogènèse somatique de vitroplants de palmier dattier (variété Degla Bayda) en vue de la résistance contre le bayoud.



Bouguedoura N., Benkhalifa A. et Bennacem M. 2010. Le palmier dattier en Algérie. Situation, contraintes et apports de la recherche.

Bouguedoura N., Chabane D., et Selmani C. 2016. Diversité et valorisation des cultivars de palmier dattier de quelques régions du sud Algérien. Forum Interprofessionnel des Fruits et Légumes «SIAFIL ». 04-07 Octobre 2016. Palais des expositions SAFEX.

Bouguedoura N., Si-Dehbi F., Fergani K., Arban A., Chabane D. 2017. Somatic embryogenesis in date palm (*Phoenix dactylifera* L.)[†] ‘Deglet Nur’ and ‘Takerbucht’ cultivars. The International Journal of Plant Reproductive Biology, 9: 43-48.

Boxus P. 1995. Rôle de la culture in vitro dans la conservation du matériel génétique sur un espace réduit. BV 93, Ed Cned Aupelf- Uref. P 191.

-C, D-

Chabane D., Assani A., Bouguedoura N., Haïcour R., et Ducreux G. 2007. Induction of callus formation from difficile date palm protoplasts by means of nurse culture. Comptes Rendus Biologies, 330 : 392-401.

Chandra A et al., 2003. In Sirate Sing S et Tansaout F. 2016. Contribution à la régénération des protoplastes et à la caractérisation moléculaire en vue de l'amélioration du palmier dattier (*Phoenix dactylifera* L.) à la résistance au bayoud. Université M'Hamed Bougara de Boumerdes, Algérie.

Cherif E., Zehdi S., Castillo K., Chabrilange N., Abdoukader S., Pintaud J.C., et al. 2013. Mais-specific DNA markers provide genetic evidence of an XY chromosome system and recombination arrest, and allow to trace paternal lineages in date palm. New Phytologist, 2013; 197: 409-415.

Chukwauemeka R.E., Peter A., and Omerefe A. 2005. Somatic embryogenesis in date palm (*Phoenix dactylifera* L.) from apical meristem tissues from ‘Zebia’ and ‘loko’ land races. African Journal of Biotechnology Vol, 4 (3), PP: 244-246.

Cronquist A. 1981. An Integrated system of classification of flowering plants. Columbia University Press. New York, PP: 268- 279.

Desjardins Y. 1995. Factors affecting CO₂ fixation in string to optimize photoautotrophy in micropropagated plantlets. Plant Tiss. Cult. Biotechnol., 1 (1) : 13-25.

Dustan D.I., et Turner K.E. 1984. The acclimatization of micropropagated plants. In: Cell Culture and Somatic Cell Genetic of Plants, 1 (15): 123-129.



-E, F, G-

- El- Hadrami I., Al- Djarrari S. et DAAYF. 1997.** Les biotechnologies végétales : Intégration chez le palmier dattier (*Phoenix dactylifera* L.) pivot de l'agriculture oasienne, cas du Maroc. Sixième journée scientifique du réseau biotechnologies végétales. AUEPLF, Orsay PP : 23 – 27.
- El-Hadrami I., et El-Hadrami A. 2009.** Breeding date palm. Univ. Marrakech. PP: 191 – 195.
- El –Rays D. 2009.** Characterization of three date palm cultivars based on RAPD fingerprints and fruit chemical composition. JK AU : Met., Env. & Arid Land Agric. Sci., 20 (20): 3 – 20.
- Eshraghi P., Zarghami R., Ofoghi H. 2005.** Genetic stability of Micropropagated plantules in Date palm. Journal of sciences. Islamic Republic of Iran 16(4) : 311-315.
- FAO. 2010.** FAOSTAT. Food and Agriculture Organization.
- FAO. 2018.** FAOSTAT. Food and Agriculture Organization.
- Fergani K. 1998.** Embryogenèse somatique du palmier dattier (*Phoenix dactylifera* L.). Cultivars Deglet Nour. Thèse de Magister. USTHB. P 117.
- Ferry M., Bouguedoura N., et El-Hadrami I. 1998.** Patrimoine génétique et technique de propagation *in vitro* de la culture de palmier dattier. Science et changement planétaire-Sécheresse Vol : 9 N°2. AUF. Canada.
- Ginting G., Fatmawati. 1995.** Vegetative propagation of oil palm (*Elaeis guineensis* jacq.) from laboratory to field. FELD's experience. In : Proceedings of the 1993 ISOPB International Symposium on Recent Development in Oil palm Tissue Culture and Biotechnology. Eds : V. Rao. I. E. Henson and N. Rajanaidu. Kuala Lumpur : 33-37.
- Ghorbel A., Chatibi A., Kchouk M.L., et Zemni H. 1998.** Maîtrise des aléas de la production *in vitro* et à grande échelle du pêcher-amandier GF-557, X^{ème} colloque du GREMPA Zaragoza, Meknès MOROCCO. Laboratoire de Biotechnologie Végétale, I NRST, CIHEAM-Méditerranéennes, PP : 147-148.
- Guessoum M. 1986.** Approche d'une étude biologique de l'acarien *Oligonychus afrasiaticus*(Boufaroua) sur palmier dattier. Journée d'étude sur la biologie des ennemis animaux des cultures, dégâts et moyens de lutte, 25 et 26 mars 1985. Annales de l'INA, Vol. 10, n°1, 1986, PP : 153 - 166.



-H, I, J-

Hadji F., et Hamada F. 2015. Caractérisations morphologique des « vitro - plants » du palmier dattier (*Phoenix dactylifera* L.) dans la station INRAA de Touggart UNI KASDI M erbah Ouargla, Mémoire du diplôme de Master Académique science de la Nature et de la Vie, Uni Saad Dahleb Blida – 1 -, P 2.

Hamza H., Ben Abederrahim M.A., Elbekkay M., Ferchichi A. 2013. Comparison of the effectiveness of ISSR and SSR markers in determination of date palm (*Phoenix dactylifera* L.) agronomic traits. Australian Journal of Crop Science. ISSN : 1835. 2013 ; 7(6) : 763-769.

Hanachi S., Khitri D., Ben khalifa A. et Brac De Perriere R.A. 1998. Inventaire variétal de la Palmeraie Algérienne, P 225.

Hazzouri K. M., Flowers J.M., Nelson D., Lemansour A., Masmoudi K., Amiri K.M.A. 2020. Prospects for the Study and Improvement of Abiotic Stress Tolerance in Date Palms in the Post-genomics Era. Frontiers in Plant Science, 11,293, PP 13.

Ibrahim A.I. 2011. «Genetic variance between some Egyptian Date Palm cultivars using PCR-based markers with emphasis on the prevalence of Al wijam disease ». Archives of Phytopathology and Plant Protection, 44 (8, May 2011), P : 732-742.

INRAA. 1998. La lutte biologique. Les ravageurs du palmier dattier. INRAA. France. Juillet 1998. P 08.

John E., et Smith. 2004. Biotechnology, Cambridge Uni press, PP : 37-38.

-K, L, M-

Kanazawa A., Tsutsumi N. 1992. Extraction of restrictable DNA from plants of the genus *Nelumbo*. Plant Molecular Biology Reporter 10, P 316-318.

Kao K.N., et Michayluk M.R. 1975. Nutrient requirements for growth of *Vicia lajastana* cells and protoplasts at very low population density in liquid media. Planta 126 : 105-110.

Konan K., Durand-Gasselin., Duval Y., et Pannetier C. 1989. Weaning oil palm ramets obtained by *in vitro* micropropagation (*Elaeis Guineensis Jacq*). Communication In « Proc. 50 the Annivesary of Nifor » 22-25 Nov 1989, Benin City (Nigeria).

Konan J.N., Allou D., Diabate S., Konan E.P., et Koutou A. 2015. Evaluation de l'interogression du caractère croissance lente de quelques géniteurs Akpadanou (origine



Bénin) chez quelques géniteurs améliorés de palmier à huile (*E. guineensis Jacq.*) de l'origine La Mé (Côte d'Ivoire). Centre National de Recherche Agronomique, Station de Recherche de La Mé 13 BP 989 Abidjan 13, Côte d'Ivoire.

Kumar K., and Rao I.U. 2012. Morphophysiological problems in acclimatization of micropropagated plant in – *ex vitro* conditions a review. J. Ornament Hortic Plants 2(4) : 447-469.

Lachqer-Sillou K. 1989. Etude de l'embryogenèse somatique du palmier dattier (*Phoenix dactylifera* L.) à partir des tissus de cœurs de rejets. Thèse de 3^{ème} cycle. Université Cad Ayyad Marrakch, P 120.

Lescot T. 2012. La diversité génétique des bananiers. Fruitrop (Eds. Français) (200) : 74.

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

Margara, 1989. In Anjame M., Bougerfaoui M., et Abahmane L. 2005. Les techniques de micropropagation du palmier dattier : Expérience de l'INRAA – Maroc.

Mazri M.A., Maziani R. 2013. An improved method for micropropagation and regeneration of date palm (*Phoenix dactylifera* L.). J Plant Biochem Biotechnol 22 : 176-184.

Mazri M.A. 2015. Role of cytokinins and physical state of the culture medium to improve in vitro shoot multiplication, rooting and acclimatization of date palm (*Phoenix dactylifera* L.) cv. Bouleggous. J Plant Biochem Biotechnol 24 : 268-275.

Meddich A., El-Mokhtar M. A., Bourzik W., Mrrsui T., Baslam M., et Hafidi M. 2018. Optimizing growth and tolerance of date palm (*Phoenix dactylifera* L.) to drought, salinity and vascular fusarium-induced wilt (*Fasarium oxysporum*) by application of arbuscular mycorrhizal fungi (AMF). In: Giri B., Prasad R., Varma A. (Eds). Root Biology. Series Soil Biology, 52. Springer : 239-258.

Meliani S., Bouguedoura N., et Bennaceur M. 2016. Etudes morphologique et histologique du développement de l'ovaire chez le palmier dattier (*Phoenix dactylifera* L.) International Journal of innovation and Applied Studies, 18 (3), 682.

Mizab O., Mesnoua M., Tahirine M., et Lahmadi S. 2018. Etude de l'acclimatation des vitro-plants de palmier dattier. La seconde édition de la rencontre internationale Agrosem2018, du 09- 10 Décembre 2018.



Moussouni S., Pintaud J.C., Vigouroux Y., et Bouguendoura N. 2017. Diversity of Algerian oases date palm (*Phoenix dactylifera* L., Arecaceae) : Heterozygote excess and cryptic structure suggest farmer management had a major impact of diversity.

Munier P. 1973. Le palmier dattier – techniques agricoles et productions tropicales. France : Maison neuve et Larousse, P 217.

Murashige T., et Skoog F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tabbaco tissue culture. *Physiol. Plant.* 15 : 473 – 497. In **Sirate Sing., et Tansaout F. 2016.** Contribution à la régénération des protoplastes et à la caractérisation moléculaire en vue de l'amélioration du palmier dattier (*Phoenix dactylifera* L.) à la résistance au Bayoud, Uni M'Hamed de Boumerdes, Alger.

Mzali M.T., Lasram M., et Rhouma A. 2002. L'arboriculture fruitière en Tunisie. Les arbres à noyaux et le palmier dattier. T. 2 : 201-235.

-N, O, P-

Naik P.M., et Al-Khayri J.M. 2016. Somatic embryogenesis of date palm (*Phoenix dactylifera* L.) through cell suspension culture. In: Jain S. M. (Ed.). *Protocols for in vitro cultures and secondary metabolite analysis of aromatic and medicinal plants*, 2nd ed. *Methods in molecular biology*. New York, Springer, 1391: 357-366

Naik P.M., et Al-Khayri J.M. 2018. Cell suspension culture as a means to produce polyphenols from date palm (*Phoenix dactylifera* L.). *Ciência e Agrotec-nologia*, 42 :464-473.

Naik P. M., et Al-Khayri J.M. 2020. Influence of culture parameters on phenolics, flavonoids and antioxidant activity in cell culture extracts of date palm (*Phoenix dactylifera* L.). *Erwerbs-Obstbau*. 62: 181-188.

Nixon R.W., and Carpenter J.B. 1978. Growing dates in United States. U. S. Dep. Agric. Inf, bull, P 207.

ONFAA. 2017. Observatoire National des Filières Agricoles et Agroalimentaires. Rapport sur le commerce extérieur des dattes.

Ortiz-Uribe N., Salomon-Torres R., et Krueger R. 2019. Date palm status and perspective in Mexico. *Agriculture (MDPI)*. 9: 46. PP 15.

Peyron G. 2000. Cultiver le palmier dattier. Editions Quae, P 109.



Preece J.E., et Sutter E.G. 1991. Acclimatization of micropropagated plants to the greenhouse and field. In: Micropropagation Technology and Application, Debergh P.C. et Zimmerman R.H. (Eds), Kluwer Academic Publisher Dordrecht. P 71-93.

-R, S-

Rawashdeh I., et Amri A. 2006. Genetic characterization of date palm varieties using RADP markers. Jordan J. Agric. Sci. 2 : 234 – 241.

Rouai M., et Zouzou A. 2017. Estimation du potentiel de la production d'Hydrogène de Master. Université d'Ouargla, P 79.

Sbiai A. 2011. Matériaux composites à matrice époxyde chargée par des fibres de palmier dattier : effet de oxydation au tempo sur les fibres (Doctoral dissertaton, Lyon, INSA).

Scwendiman J., Pannetier C., and Michaux-ferriere N. 1988. Histology of somatic embryogenesis from leaf explants of the oil palm (*Elaias guineensis*). Ann. Bot (Lond.) 62 : 43-52.

Sedra M.H. 2011. Development of new Moroccan selected date palm varieties resistant to bayoud and of good fruit quality. In : Jain S.M., Al-Khayri J.M., Johnson D.V. (Eds). Date Palm Biotechnology. Springer. Dordrecht. 513-533.

Simmons L.T. 1926. Rooting habits of the date palm. Ann. Rep. Date Growers Inst, 3, 13.

-T-

Tan C.C., Wong G., Soh A.C. 1999. Acclimatization and handling of oil palm tissue cultured plantlets for large scale commercial production. Applied Agriculture Research Sdn. Bhd. Locked Bag N° 212, 47000 Sg. Buloh. Selangon. P 8.

Toutain G. 1967. Le palmier dattier culture et production. Al awamia.

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

Tisserat B., and Demason D. 1980. A histological study of development of adventive embryos in organ culture *Phoenix dactylifera* L. In vitro. 15. 383-387.



-Y, Z-

- Yatta D., et Bouguedoura N. 2003.** « The Date palm in Algerie », San Remo (Italy).
- Yatta-El Djouzi D. 2007.** Etude de l'embryogenèse somatique chez le palmier dattier (*Phoenix dactylifera* L.) et caractérisation moléculaire du matériel végétal initial en vue de l'étude de la conformité des vitroplants. Thèse de Magister. USTHB. P 100.
- Yatta El Djouzi D., Abed F., Amara B., Yakhou M. S., et Bouguedoura N. 2013.** Proto-plast isolation from cellular suspension of two Algerian cultivars of date palm (Takerbucht and Tagaza). *Acta Horticulturae*. 994: 323-329.
- Yatta El Djouzi D., Abed F., Amara B., Yakhou M.S., et BenHafsi F. 2014.** The genomic DNA structure in somatic embryogenesis of date palm (*Phoenix dactylifera* L.) by flow cytometric, RAPD and AFLP analysis. NOVA publishers, New York, 1: 241-252.
- Yatta-El-Djouzi D., Al-Khayri J.M., and Bouguedoura N. 2020.** Plant regeneration from cell suspension derived protoplasts of three date palm cultivars. *Propagation of Ornamental Plants*, Vol. 20. N° 1, 2020 : 28-38.
- Youmbi E., Fonkam N.J.P., Ngaha D., et Nkeng M.N. 2005.** Comportement de vitroplants de bananiers plantains issus de bourgeons axillaires et apicaux au cours de l'acclimatation et en champ. March 2005. *Fruits* 60(2).
- Zaher H., Baaziz M. 2006.** Contribution à l'étude de l'identification des pieds mâles et femelles chez le palmier dattier par utilisation des marqueurs moléculaires RAPD. INRA Marrakech, P 69 -70.
- Zaid M. 1989.** Embryogenèse somatique chez le palmier dattier (*Phoenix dactylifera* L.). Thèse de Doctorat, Université de Paris Sud. Orsay, France. P 92.
- Zehdi S., Sakka H., Ould Mohamed Salem A., Rhouma A., Marrakchi M., and Trifi M. 2005.** Molecular polymorphism and genetic relationships in a Tunisian date palm (*Phoenix dactylifera* L.) collection using ISSR amplification fingerprinting. *Genetic Resources Newsletter* 144, 44-49.
- Ziad A., Wet P.F., Djerbi M., et Ohabi A. 2002.** Diseases and pests of date palm. In : **Ziad A. (Ed)**, Date palm cultivation., 1st ed. Plant production and protection, Food and Agriculture Organisation of the United Nations, Rome, P 227-242.
- Ziv M. 1991.** Vitrification: morphological and physiological disorders of in vitro plants. In: *Micropropagation*. Debergh P. C., Zimmermann R.H, Eds Kluwer academic publishers.
- Zrÿd J.P. 1988.** Cultures des cellules, tissus et organes végétaux. Fondement théoriques et utilisations pratiques. Ed Press. Polytechnique Romande Suisse.

Références bibliographiques





Annexes



Annexe1

Tableau 7 : Composants de la solution mère des Macro MS.

Produits	Concentration du milieu	(n) fois concentration	Concentration de la solution mère
KNO₃	1.9g/l	X25	45.5g
NH₄NO₃	1.65g/l	X25	41.25g
CaCl₂, 2H₂O	0.44g/l	X25	11g
MgSO₄, 7H₂O	0.37g/l	X25	9.25g
KH₂PO₄	0.17g/l	X25	4.25g

Tableau 8 : Composants de la solution mère des Micro MS.

Produits	Concentration du milieu	(n) fois concentration	Concentration de la solution mère
H₃BO₃	6.2mg/l	X100	620mg
MnSO₃, 7H₂O	16.9mg/l	X100	1690mg
ZnSO₄, 7H₂O	8.6mg/l	X100	90mg
CuSO₄, 5H₂O	0.025mg/l	X100	2.5mg
CaCl₂, 6H₂O	0.025mg/l	X100	2.5mg
NaMoO₄, 2H₂O	0.25mg/l	X100	25mg
KI	0.83mg/l	X100	83mg

Tableau 9 : Composants de la solution mère Fer MS.

Produits	Concentration du milieu	(n) fois concentration	Concentration de la solution mère
Na₂EDTA	0.03735g/l	X100	3.73g
FeSO₄, 7H₂O	0.02785g/l	X100	2.78g



Annexe 2

Tableau 10 : Milieu de la germination et prolifération GMN et GMP.

Eléments	Milieu GMN ₂₀₀	Milieu GMP
Macro MS	40ml (Macro MS modifiée)	40ml
Micro MS	10ml	10ml
Fer MS	10ml	10ml
Vitamines : MS : thiamine (32)/acide nicotinique (103)1/pyridoxine (128)		1ml/l
KH₂PO₄	100mg	100mg
NaH₂PO₄	170mg	170mg
Adénine	40mg	/
L-glutamine	200mg	200mg
Charbon actif	200mg	200mg
Saccharose	60g	60g
Agar/Phytigel	7g/2g	7g/2g
Thiamine	1ml	/
Myoinositol	100mg	100mg
NH₄NO₃	200mg	/

Ph=5.8



Annexe 3

• EDTA 0.5 M pH 8

EDTA : 46.5g
NaOH : 5.0g
Qep : 250ml

L'EDTA se met en solution quand le pH atteint 8, Autoclaver et conserver à 4°C.

•TAE 50X

Tris: 60.5 g
Glacial acetic acid: 14.28 ml
EDTA 0.5M PH: 8 25 ml
QSP: 250 ml

• TBE 10X

Tris : 27 g
Acide Borique : 13.75 g
EDTA 0.5 M Ph 8: 10 ml
QSP: 250 ml

• HCl 0.25 M

HCl 37%: 10.5 ml
Qsp: 500 ml

• NaOH 0.4 M

NaOH 10 N: 20 ml
Qsp: 500 ml

• Tampon d'extraction Sorbitol

Sorbitol 0.35M, Tris 0.1 m, EDTA 0.005M, bisulfite de Na 0.5%, Ph 8.

Sorbitol: 127.5 g
Tris HCl 1M Ph 8: 200 ml
EDTA 0.5M PH 8: 20 ml
Qsp : 2000 ml

Avant l'emploi, rajouter dans le tampon le bisulfite de Na pour une concentration finale de 0.5% (c'est à dire qu'on aura 5 g de bisulfite de sodium pour 1 l de tampon d'extraction de sorbitol).



- **Tampon de lyse MATAB 4%**

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

NaCl : 146 g

Tris HCl 1M PH 8 : 200 ml

EDTA 0.5M PH8 : 80 ml

Qsp : 2000 ml

Avant l'emploi, rajouter dans le tampon préchauffé à la micro-onde le Matab pour une concertation finale de 4% (on aura 4 g dans 100 ml de tampon de lyse).



Annexe 4

Protocole d'extraction de l'ADN du palmier à huile.

- Cueillir des jeunes feuilles et les découper en petits morceaux
- Sécher à l'étuve à une température de 180 °C pendant toute une nuit.
- Broyer 2 g de feuilles lyophilisées au moulin à café.
- Ajout de 200 ml de **tampon d'extraction** au broyat, puis agiter manuellement pendant 10 minutes et filtrer avec la toile à bluter
- Repartir le filtrat dans quatre tubes de 50ml tout en complétant
- Centrifuger pendant 10 minutes à 4.000rpm/
- Récupérer le culot
- Suspendre les culots dans 30 ml de **tampon de lyse**.
- Incuber 4h à 65°C au bain-marie en agitant de temps en temps.
- Laisser refroidir 5 min sur la paillasse, puis compléter le tube avec un volume de chloroforme Isoamylique (24/1 ; v/v).
- Agiter et centrifuger 4.000rpm/10min.
- Récupérer la phase aqueuse (supérieure) dans un autre de 50ml contenant 200 µl de RNase et incuber 1 heure à 37°C.
- Précipiter l'ADN en complétant le tube avec de l'isopropanol.
- Rincer la pelote d'ADN dans un volume de 100 µl d'éthanol 70% puis sécher à l'air libre à une température ambiante.
- Suspendre le culot dans un volume minimum de **TAMPON TE** pour obtenir un échantillon concentré (1µg/µl).
- Faire un gel pour mesurer la quantité d'ADN.

NB : en absence de l'apparition de la pelote d'ADN, nous avons poursuivi la suite du protocole d'extraction.

- Centrifuger le tube contenant l'isopropanol pendant 10 minutes à 4000 rpm
- Reprendre le culot dans un volume de 800 µl de Tampon TE
- Transvaser dans un tube de 2 ml.
- Additionner 80 µl d'acétate de sodium (3 M, PH 5.2).
- Précipiter l'ADN avec 800 µl d isopropanol, agiter pour une précipitation réussie de l'ADN.
- Micro centrifugé pendant 10 minutes.



Annexe 5

Préparation des dilutions

Dilution 1/40 : 5 μ l de 1/20 + 5 μ l d'eau.

Dilution 1/80 : 2.5 μ l de 1/20 + 7.5 μ l d'eau.

Dilution 1/100 : 2 μ l de 1/20 + 8 μ l d'eau.



Annexe 6

Tableau 11 : L'effet de l'acclimatation sur les vitroplants.

Semaines	Plantes vivants	Plantes mortes	Pourcentages des plantes vivantes
S1	80	0	100
S2	77	3	96.25
S3	74	3	92.5
S4	72	2	90
S5	69	3	86.25
S6	65	4	81.25
S7	60	5	75
S8	50	10	62.5