

République Algérienne Démocratique et Populaire

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية

Ministère de l'Enseignement Supérieure et de la Recherche Scientifique

وزارة التعليم العالي و البحث العلمي

Ecole Nationale Supérieure Agronomique

D'EL-HARRACH (ALGER)

المدرسة الوطنية العليا للعلوم الفلاحية

الحراش (الجزائر)



Mémoire en vue de l'obtention du diplôme de magister en sciences agronomiques

Option : Sciences et Techniques et Production Végétale.

Thème

**Embryogenèse 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)**

Présentée par : Abed Ziani Fadila

Soutenue le : 21 Mai 2012

devant le jury d'examen

Pr Khelifi Lakhdar

Président

Dr Louanchi M

Directeur de thèse

Pr Rahmania F.

Examineur

Pr Khelifi M.

Examineur

Année universitaire : 2011 – 2012

Des explants de rejets de différents cultivars de trois régions du sud sont introduits en culture in vitro. L'induction de la callogenèse est étudiée sur le milieu de base MS (1962) modifié, additionné de trois combinaisons hormonales le 2,4D (25 et 100mg/l), Le Picloram à (12,5mg/l) et l'IPA à (1 et 3mg/l). Différents types de cals sont obtenus mais seuls les cals nodulaires et granulaires friables sont embryogènes. Le temps de réponse à la callogenèse est dépendant du génotype et est de 3 mois au minimum. Une étape en milieu liquide agitée est utilisée pour l'individualisation des embryons. Une filtration à 400 µm a permis d'obtenir des embryons matures capables de germer et d'évoluer en plantes entières. L'acclimatation des vitroplants est obtenus lorsque les conditions sont réunies ; L'humidité est de 90%, la température à 26 et 27 °C et les plants sont vigoureux. L'étude du polymorphisme peroxydasique présente le même phénotype pour 5 cultivars et leur vitroplants, seul le cultivar Tazerzait présente un phénotype différent du vitroplant.

Mots clés : palmier dattier, cultivars, embryogenèse somatique, callogenèse, synchronisation, acclimatation, conformité génétique, peroxydases

Abstract

Explants offshoot of different cultivars of three southern regions are introduced in vitro. Induction of callogenesis is studied on modified MS (1962) supplemented with 3 growth regulators combinations, 2,4D (25 and 100mg/l), Picloram at (12,5mg/l) and 2IP (1 and 3mg/l). Various calli types are obtained but only the nodular and granular friable calli are embryogenous. The callogenesis is genotype dependant and required at least 3 months. A phase in stirred liquid medium is used for individualizing the embryos. The filtration at 400 µm allows mature embryos can germinate and growth in full on plantlets. The acclimatization of vitroplants is obtained when all the conditions are met; Humidity at 90%, Température at (26-27°C), and the plantlets were vigorous. The polymorphism study of peroxydase present the same phenotype isoenzyme for 5 cultivars and their vitroplants, only Tazerzait show different phenotypic isoenzyme to his vitroplants.

Mots clés: date palm, cultivars, somatic embryogenesis, callogenesis, synchronization, acclimatization, genetic conformity, peroxydases

ملخص

مستأصلة من جبار مخلف أصنا نخيل ثلاث مناطق جنوبية تخدمت في زراعة الأنسجة.

درس حريض تشكيل كاس على (MS 1962) قاعدية متوسطة معدة، وأيضاً ثلاث مجموعات هرمونية من 2,4 D (25 و 100 mg / لتر) mPiclora (12.5 ملغم / لتر)، IPA (1 و 3 ملغم / لتر). وقد تم الحصول على أنواع مختلفة من الكاس وكن فقط في نسيج عقدي ومحبب قابلة لتفتيت تخليقي و زمن الاجابة تعتمد على 3 أشهر كحد أدنى. ويستخذ طوة أثارت في و طائل لإضفاء طابع فردي على الأجنة. ترشيج إلى 400 µm ققت أجنة ناضجة يمكن نبت ونمو تصبح نباتات كاملة. يتم الحصول على تأقلم من شتلات عندما يتم إيقاف شروط رطوبة 90٪، ودرجة حرارة في 26 و 27 درجة مئوية، ونباتات هي قوية.

بينت دراسة تطابق جيني بليمورفيز بروكسيداز وجود نفس النمط الظاهري خمسة ماعد صنف زرزيت الذي يحتوي على نمط ظاهري إزوانزيم مخالف لنبات مواد.

كلمات مفاج

نخيل، نمر، أصنا، زراعة الأنسجة، الأجنة الجسدية، كاس، أقلم، طابق جيني، بروكسيداز

REMERCIEMENTS

Les travaux présentés dans ce mémoire rentrent dans le cadre d'un projet de recherche financé par le Ministère de l'enseignement et de la recherche scientifique (MERSR I) et l'Institut National de la recherche agronomique

Les travaux de recherche ont été réalisés dans le laboratoire de physiologie végétale et d'amélioration des plantes de la station de Mehdi Boualem de l'INRAA.

Je remercie Madame Louanchi Meriem Maître de conférence de m'avoir encadré et encouragé tout au long de cette thèse.

Je la remercie également de m'avoir témoigné tout au long de ces années d'une grande confiance, et de sa patience pour la finalisation de ce manuscrit.

Je voudrais également remercier les membres de jury ;
Mesdames les Professeurs Rahmania F. et Khelifi M., pour avoir accepté d'évaluer ce travail.

Mes remerciements vont également au Professeur Khelifi L. d'avoir accepté de présider ce jury.

Je voudrais remercier également tous les techniciens du laboratoire de Physiologie végétale et d'amélioration des plantes de Mehdi Boualem, et en particulier Mr Amara B., Mr Yakhou MS et Chahinez de m'avoir aidé dans la réalisation de ce travail.

Mes collègues de l'INRAA pour leurs.

.

µm	Micromètre
°C	Degré celsius
2,4D	Acide 2-4 Dichlorophénoxyacétique
ADH	Alcool deshydrogénase
ADN	Acide desoxyribonucléique
AIA	Acide 3 - indole acétique
AIB	Acide 3 - indole butyrique
ANA	Acide naphthalène acétique
APS	Persulfate d'ammonium
BAP	6 – benzyl amino - purine
CCM	Chromatographie sur couche mince
DIA	Diaphorase
DTT	Dithiothreitol
DO	Densité optique
EC	Numéro de la commission des enzymes
EMSs	Embryogenèse somatique secondaire
EST	Estérases
EDTA	Acide éthylène diamine tétra acétique
Fe	Fer
g	Gramme
GOT	Glutamate Oxalo Transférase
Guaiacol	2- Methoxyphenyl, catechol mono methyl ether
Hcl	Acide chlorhydrique
H ₂ O ₂	Peroxyde d'hydrogène
IPA	Isopentyl aminopurine
Kb	Kilobase (kilopaire de nucléotides)
LAP	Leucine Amino Peptidase
M	Molaire

mA	Milli Ampère
mM	Millimolaire
MTT	3-(4,5 Dimethyl thiazol-2-yl). 2,5 diphenyl tétrazolium-bromide
MS	Murashige et Skoog (1962)
NaOH	Soude ou hydroxyde de sodium
N	Normalité
ng	Nanogramme
PAC	Phosphatase Acide
PGI	Phosphoglucoisomérase
PGM	Phosphoglucose mutase
Pm	Plante mère
PMS	Phenazine methosulfate
pH	logarithme décimal négatif de la concentration de H ⁺
Picloram	Acide 4-Amino-3,4,6 trichloropicolinique
Pox	Péroxydase
Rpm	Rotation par minute
RAPD	Random Amplified Polymorphic DNA
RFLP	Restriction Fragment Length Polymorphism
SDS	Sodium dodecylsulfate
sec	Seconde
TAE	Tris – acetate- EDTA
TBE	Tris -Borate- EDTA
TE	Tris -EDTA
TEMED	N, N, N, N- tétraméthylène diamine
Tris	Tris (hydroxyméthyl) amino méthane
V	Volt
Vp	Vitroplant

Figure 1: Carte d'Algérie illustrant les différentes régions phoenicicoles

Figure 2: (A) arbre du palmier dattier ; (B) régime de datte ; (C) rejet à la base du tronc d'un palmier dattier

Figure 3 : Protocole de mise en culture

Figure 4 : Protocole d'obtention d'une culture en suspension chez le palmier dattier

Figure 5: Schéma représentant la disposition des cultivars et leur vitroplants respectifs dans les puits

Figure 6 : Temps de réponse à la callogenèse des cultivars introduit en culture *in vitro*

Figure 7 : Pourcentage des cals induits par les cultivars d'Adrar

Figure 8: Pourcentage des cals induits par les cultivars de Ghardaïa

Figure 9 : Effet des milieux de culture sur les cultivars de Touggourt

Figure 10 : Type de cals obtenus

Figure 11 : Coupe histologique des cals embryogènes sur milieux d'induction et de maturation

Figure 12 : Développement asynchrone des embryons somatiques en milieu de germination

Figure 13: Courbe de croissance des cals en suspension

Figure 14: Suspension embryogène obtenue

Figure 15 : Différents stades de l'embryon somatique observé en milieu liquide

Figure 16 : Différentes formes et stade de développement de l'embryon et apparition des feuilles cotylédonaire

Figure 17 : Phénomène de vitrification

Figure 18 : Effet du milieu liquide sur le nombre d'embryons ayant germés

Figure 19: développement asynchrone en milieu de germination

Figure 20: Développement synchrone

Figure 21: Différentes formations en embryogenèse somatique

Figure 22: Effet du stade des plantules à acclimater sur le % de reprise en serre

Figure 23 : plantules classe (A) après un mois d'acclimatation

Figure 24: Effet de l'humidité sur le % de reprise des plantules

Figure 25: Effet de la Température sur le % de reprise des plantules

Figure 26: Effet du substrat sur la reprise des plantules en acclimatation

Figure 27 : Vitroplants acclimatés

Figure 28 : Zymogrammes peroxydasiques de cinq cultivars et leurs vitroplants de palmier dattier (*Phoenix dactylifera* L.)

Figure 29: Zymogrammes peroxydasiques de cinq cultivars et leurs vitroplants de palmier dattier (*Phoenix dactylifera* L.)

Figure 30: Schéma représentant le zymogrammes peroxydasiques de six cultivars de palmier dattier (*Phoenix dactylifera* L.) et leurs vitroplants de palmier dattier (*Phoenix dactylifera* L.)

Liste des tableaux

Tableau 1 : La production dattière en Algérie

Tableau 2 : Concentration du gel acrylamide en fonction du poids moléculaire

Tableau 3: Cultivars introduits en *in vitro*

Tableau 4: Pourcentage de callogenèse des cultivars d'Adrar

Tableau 5: Pourcentage de callogenèse des cultivars de Ghardaïa

Tableau 7: Effet de l'azote sur la germination

Tableau 8 : Influence de l'azote sur le pourcentage de vitrification

Tableau 9: Mobilité relative des isozymes

Introduction.....	1
I- Présentation du palmier dattier.....	4
I.1 Systématique	4
I.2 Origine.....	4
I.3 Répartition géographique.....	5
I.3.1 Dans le monde.....	5
I.3.2 En Algérie.....	6
I.4 Morphologie.....	7
I.4.1 Système racinaire.....	7
I.4.2 Tronc et rejets.....	8
I.4.3 Couronne ou frondaison.....	8
I.4.4 Inflorescences.....	8
I.5 Importance dans l'écosystème saharien.....	10
I.5.1 Exigences climatiques et édaphiques.....	10
I.5.2 Production dattière.....	10
I.5.3 Usage du palmier dattier.....	11
I.5.4 Composition et valeur nutritive de la datté.....	12
I-6 Mode de multiplication du palmier dattier.....	12
I.6.1 Multiplication par semis	12
I.6.2 Multiplication par rejets.....	14
I.6.3 Multiplication par les culture <i>in vitro</i>	14
I-7 Principaux ravageurs et maladies.....	14
I.7.1 La maladie du bayoud.....	14
I.7.2 La maladie des feuilles cassantes.....	15
II Techniques de culture <i>in vitro</i>	15
II.1 Historique de l'embryogenèse somatique	15
II.2. Les phases de l'embryogenèse somatique	16
II.2.1.1 La dédifférenciation cellulaire.....	16
II.2.1.2 La différenciation cellulaire.....	17
II.3 Facteurs influençant l'emryogenèse somatique.....	17
II.4 Facteurs impliqués dans la maturation des embryons somatiques.....	18
III Marqueurs d'identification et d'évaluation de la conformité génétique.....	19
III.1 Marqueurs morphologique	19
III.2 Marqueurs biochimiques.....	20
III.2.1 Les flavonoides.....	22
III.2.2 Les systèmes enzymatiques.....	23
III.2.3. Electrophorèse.....	26
II.3.1 Les supports utilisés pour l'électrophorèse.....	26
III.3.2 Méthodes d'électrophorèse.....	28
III.4 Marqueurs moléculaires.....	29

Chapitre II MATERIEL ET METHODES

I Embryogenèse somatique	31
I.1 Matériel végétal.....	28
I.2 Méthodes.....	29
I.2.1 Dissection des rejets	29
I.2.2 La désinfection du cœur de rejet.....	32
I.2.3 Les milieux de culture.....	34
I.2.4 Stérilisation des milieux de culture	35
I.2.5 Conditions de cultures	35
I.2.6 Observation et expression des cultures	36
I.3 Germination des embryons somatiques.....	36
I.4 Protocole d'établissement de la suspension cellulaire embryogène.....	36
I.4.1 Inoculation des suspensions cellulaires	36
I.4.2. Système de culture utilisé	37
I.4.3 Conditions de culture	37
I.4.4 Repiquage et amélioration de la qualité des embryons.....	37
I.5 Régénération en plantules	37
II Les techniques histologiques	39
II.1 Fixation des organes	39
II.2 La déshydratation des organes	39
II.3 Imprégnation des organes.....	39
II.4 Inclusion dans la paraffine.....	40
II.5 Confection des coupes.....	40
II.6 Coloration à la fushine basique - Naphthol Blue Black (NBB).....	40
III Acclimatation	40
III.1 Préparation des plantules à acclimater.....	40
III.2 Préparation du substrat.....	40
III.4 Mise en pots.....	41
IV Etude du polymorphisme des activités péroxydasiques	41
IV.1 Matériel végétal	41
IV.2.1 Extraction des enzymes.....	41
IV.2 Méthodes.....	41
IV.2.2 Préparation de gel.....	41
IV.2.2.1 Le choix de gel.....	41
IV.2.2.2 Préparation du gel d'acrylamide	42
IV.2.3 Préparation du tampon de migration.....	43
IV.2.4 Préparation de l'échantillon	43
IV.2.5 Condition d'électrophorèse.....	43
IV.2.6 Révélation des enzymes.....	44
IV.2.6.1 Révélation des peroxydases.....	45
IV.2.7 Conservation des tranches de gel	45

CHAPITRE III:RESULTATS ET DISCUSSIONS

I. Embryogenèse somatique.....	46
I.1 Induction de la callogenèse.....	46
I.1.1 Temps de réponse à la callogenèse.....	46
I.1.2 Influence du milieu de culture.....	49
I.1.2.1 Cultivars d'Adrar.....	49
I.1.2.2 Cultivars de Ghardaia	49
I.1.2.3 Cultivars de Touggourt.....	49
I.1.3 Texture et structure des cals.....	52
I.1.4 Prolifération des cals et maturation des embryons.....	52
I.1.5 Organisation cellulaire.....	53
I.1.6 Processus d'asynchronisation des embryons somatiques.....	54
I.2 Initiation de la suspension cellulaire embryogène.....	56
I.2.1 Effet des types de cals sur l'obtention de la suspension embryogène.....	56
I.2.2 Influence de la densité sur l'établissement de la suspension cellulaire.....	57
I.2.3 Evolution de l'embryon somatique.....	59
I.3 Germination des embryons somatiques.....	60
I.3.1 Influence de la source d'azote sur la germination des embryons.....	60
I.3.2 Influence du milieu liquide sur la germination des embryons.....	66
I.4 Embryogenèse somatique secondaire et néoformation de bourgeons.....	70
II. Acclimatation des plantules.....	72
II.1 Effet du type des plantules à acclimater.....	72
II.2 Effet des conditions d'environnement.....	73
II.3 Effet du substrat sur la reprise des plantules en acclimatation.....	75
II.4 Effet de la fertilisation.....	75
III Conformité Génétique par l'étude des systèmes peroxydasiques.....	78
III.1 Les peroxydases.....	78
III.1.1 Calcul de la mobilité relative.....	78
III.1.2 Comparaison des zymogrammes stade adulte	80
III.1.2.1 Tinaceur	80
III.1.2.2 Tegaza	80
III.1.2.3 Takerboucht essafra.....	80
III.1.2.4 Tazerzait.....	80
III.1.3 Comparaison des zymogrammes stade acclimatation (stade jeune plante)....	81
III.1.3.1 Taqerbucht El kahla.....	81
III.1.3.2 Tilemsou.....	81
Conclusions générales.....	85
Références bibliographiques.....	88

INTRODUCTION

Le palmier dattier *Phoenix dactylifera L*, est une espèce Monocotylédone à port arborescent, de la famille des Arecaceae, et fait partie des plus anciennes angiospermes du monde (Munier, 1973).

C'est une espèce d'intérêt écologique, économique et social majeur pour de nombreux pays des zones arides qui comptent parmi les plus pauvres du globe. En raison des grands espaces désertiques chauds, et de son adaptation aux conditions agro écologiques des oasis, le développement de la phoeniciculture permet de lutter durablement contre l'insécurité alimentaire et la pauvreté. Elle est importante tant par le produit financier qu'elle engendre que par la pérennité de vie qu'elle permet à une population humaine non négligeable.

Dans le monde, 90 000 000 palmiers dattiers sont recensés ; 800 000 hectares sont concernés et plus de 10 000 000 d'habitants vivent des produits et des revenus de la phoeniciculture.

En Algérie, la phoeniciculture s'étale sur une superficie de 160.000 ha avec un effectif de 17 millions de palmiers. La palmeraie algérienne est constituée d'une diversité génétique exceptionnelle grâce à la grande diversité des terroirs. A l'Est, dans le bas-sahara (Oued Righ, Souf, et les Ziban), près de 500 génotypes avec une prédominance du cultivar Deglet Nour, dans les autres régions tel que le sahara centrale (M'Zab), le sahara ouest (le Tidikelt, le Gourrara et le Touat) et la Saoura, il existe 600 génotypes avec quelques cultivars d'élites mais sans réelle valeur marchande, en plus les palmeraies sont anciennes, faiblement productives et plus ou moins entretenues. Cette situation de marginalisation dans les oasis traditionnelles conduit le plus souvent à une accélération du processus de dégradation de la diversité génétique du palmier dattier.

Cette palmeraie est créée grâce aux « djebbars » ou rejets qui se trouvent à l'aisselle des pieds mâles et femelles, et qui demeure aujourd'hui le seul mode de multiplication conforme. Cette voie de propagation s'avère limitée en raison du nombre restreint de rejets émis durant la phase juvénile du palmier dattier sans évoquer le problème d'enracinement des rejets.

D'autres contraintes s'ajoutent dans le processus de dégradation de la diversité du palmier dattier, à savoir le bayoud, une épidémie de fusariose provoquée par un champignon vivant

dans le sol (*fusarium oxysporum f.sp. albedinis* appelée « Bayoud » difficile à combattre, dévastant les palmeraies du Maghreb dont 12 millions d'arbres au Maroc et 3 millions en Algérie ont disparus (MALENÇON, 1934). La seconde maladie mortelle est les feuilles cassantes, qui a fait son apparition depuis plus d'une décennie et menacent sérieusement les palmeraies algériennes car l'agent causal est encore inconnu. La troisième menace potentielle est le charançon rouge qui fait des ravages en Égypte et en Espagne et dernièrement au Maroc.

Devant ces menaces qui pèsent sur la phoeniciculture en Algérie, la culture *in vitro* peut apporter des solutions pour la préservation des ressources phylogénétiques du palmier dattier. Des travaux de recherche pour la maîtrise des techniques de propagation *in vitro* du palmier dattier ont été initiés vers la fin des années 60. Ils se sont basés essentiellement sur le développement de l'organogénèse et de l'embryogénèse somatique. (Mater 1986; Reveuni, 1979 ; Sharma et al., 1984, 1986; Tisserat, 1979; Zaid et Tisserat, 1983, 1984; Daikh et al., 1987 et Zaid, 1989)

La multiplication rapide du Palmier dattier par les techniques de culture *in vitro* constitue l'unique voie pouvant apporter une solution dans un délai raisonnable d'autant plus que tous les clones sélectionnés pour leur résistance au Bayoud, et les cultivars rares et en voie de disparition sont représentés par un nombre faible d'individus. Cette technique permet également la production de vitroplants indemnes de bayoud, permettant ainsi, d'éviter la dispersion de la maladie (Djerbi, 1988, Letouze et Daguin, 1989).

L'embryogénèse somatique offre des potentialités et des applications énormes: rapidité, facilité, taux de multiplication très élevé comparativement aux autres techniques de propagation *in vitro*. C'est une méthode d'obtention rapide et en grand nombre de plants de palmier dattier.

Cette voie de régénération conduit à la formation d'embryons somatiques provenant de cellules somatiques à partir d'un tissu végétal déjà différencié. Elle ouvre aussi des perspectives pour l'amélioration de l'espèce dans la lutte contre le bayoud, (hybrides somatiques, mutagénèse, transformation génétique).

Le succès de la micropropagation du palmier dattier reste, également, lié à la conformité des vitroplants produits. Les travaux sur la conformité sont très controversés.

Depuis plus d'une vingtaine d'années environ la recherche sur les marqueurs biochimiques et moléculaires appliqués au palmier dattier, commencèrent à prendre de plus d'importance. Ces marqueurs ont été en particulier, dans l'identification variétale et la comparaison des plants descendant des croisements dirigés, ainsi que la comparaison entre les vitroplants et leurs cultivars correspondants.

L'objectif de ce travail est l'optimisation et le développement du processus de régénération par la technique de l'embryogenèse somatique afin d'être appliquée à l'échelle industrielle et de l'intégrer dans les programmes d'amélioration et de conservation de cette espèce.

S'appuyant sur l'étude bibliographique, nous proposons dans ce présent travail d'améliorer le protocole de régénération par la technique d'embryogenèse de plusieurs cultivars de palmiers de trois régions du sud, et d'étudier la conformité des vitroplants par les marqueurs biochimiques.

Ce manuscrit est constitué de trois chapitres:

- analyses bibliographiques
- Matériel et méthodes
- Résultats et discussions

I. Présentation du palmier dattier

Le palmier dattier (*Phoenix dactylifera* L.) qualifié de « prince du monde végétal » par Linne, (1734); doit son nom au fait que phœnix signifie chez les grecs de l'antiquité, arbre des phéniciens, et dactylifera dérive du mot grec "dactylos" qui veut dire: doigt allusion à la forme du fruit.

I.1 Systématique :

Le palmier dattier appartient est une angiosperme monocotylédone, classé pour la première fois par Linné en 1753, puis Moore en 1973, Takhtajan en 1980, Cronquist 1981 et enfin APGIII en 2009:

- Domaine : Eucaryotes
- Règne : Plantae
- Clade : Angiospermes
- Clade : Monocotylédones
- Clade : Commelinidées
- Ordre Arecales
- Famille : Arecaceae
- Sous famille : Coryphoïdeae
- Tribu : Phœnoceae
- Genre: Phoenix
- Espèce: *Phoenix dactylifera* L

Le genre phœnix comporte douze espèces d'après Chevalier, 1952. L'espèce *dactylifera* L., se distingue des autres espèces du même genre par un tronc long et par des feuilles glauques (Djerbi, 1992).

I.2 Origine

Les palmiers les plus anciens remontent au miocène. Le palmier dattier a été cultivé dans les zones chaudes entre l'Euphrate et le Nil vers 4500 ans avant J.C. De là, sa culture fut introduite en Basse Mésopotamie vers l'an 2500 ans avant J.C.

De nombreuses hypothèses en été émises sur l'origine du palmier dattier. Des traces de sa culture existent chez les Assyriens et les Babyloniens il y'a plus de 4000 ans (Djerbi, 1988). On attribue l'origine de la culture du palmier à des populations venues de la Libye qui se seraient établi en moyen Orient vers 4500ans Avant- Jésus- Christ (Munier, 1973)

Le palmier dattier cultivé, est le résultat de plusieurs hybridations de *Phœnix sylvestris* et *Phœnix reclinata*. L'origine des formes cultivées doit se situer dans la zone marginale septentrionale ou Orientale du Sahara (Caty, 1929).

Les phœnix comportent 36 chromosomes somatiques et peuvent facilement s'hybrider entre eux (Munier, 1973).

L'idée d'un ancêtre sauvage avait déjà été émise par Werth (1933) qui refusait la pluralité des ancêtres en raison de la stabilité des formes des organes floraux du palmier dattier cultivé dans toutes les régions du monde.

Selon les travaux de Zohary et Spigel-Roy, 1975 et Zohary et Hopf, 1988 (in Bouguedoura, 1991) l'ancêtre sauvage de cette espèce est identifié. Il est distribué sur la frange méridionale chaude et sèche du Proche Orient, sur le Nord Est du Sahara et le Nord du désert d'Arabie.

I.3 Répartition géographique

I.3.1 Dans le monde

Le palmier dattier est cultivé dans les régions arides et semi arides chaudes situées entre l'Euphrate et le Nil, entre les altitudes 35° Nord et 15° Sud. Les échanges commerciaux entre les différentes régions du monde ont aidé à sa propagation. Les plus importantes palmeraies se trouvent cependant en Afrique du nord et au moyen orient. L'Espagne reste le seul pays d'Europe à produire des dattes principalement dans la célèbre palmeraie d'Elche, située à l'Ouest d'Alicante à 39° Nord. Le palmier dattier est également cultivé à plus faible échelle au Mexique, en Argentine et en Australie. À l'Etats-Unis d' Amérique, le palmier dattier fut introduit au XVIIIème siècle mais sa culture n'a débuté réellement que vers les années 1900 avec l'importation des variétés algériennes, en particulier Deglet Nour, et des variétés Irakiennes (Hilgeman, 1972).

I.3.2 En Algérie

La culture du palmier dattier occupe toutes les régions situées sous l'Atlas saharien soit 6000 ha depuis la frontière Marocaine à l'Ouest jusqu'à la frontière Est Tuniso-libyenne.

Du Nord au Sud du pays, elle s'étend depuis la limite Sud de l'Atlas saharien jusqu'à Regane à l'Ouest, Tamanrasset au centre et Djanet à l'Est. On distingue approximativement trois régions du point de vue de la répartition des variétés.

La première région, située dans le Sahara du Nord, comporte les régions du Ziban, Oued souf, Oued Righ, Ouargla et le M'zab. C'est là où la phoeniculture moderne est née particulièrement dans l'Oued Righ et le Ziban. Les variétés cultivées les plus importantes sont Deglet Nour, Degla beida et la Ghars .

La deuxième région ou Sahara centrale comporte, El Goléa, Touât, Gourrara, Tidikelt et Saoura. Les variétés cultivées les plus importantes dans cette région sont les Tilemsou, Tinasser, Tegaza, Tazarzait, takerbouch, et Aghamou . Le recensement réalisé dans 10 jardins par localité a soulevé une composition variétale très riche et diversifiée. Elle est composée de 195 cultivars au Touat, 334 au Gourrara et 44 pour le Tidikelt (Zaki, 2011)

La troisième région ou oasis des Ajjers possède une grande gamme de dattes dont les plus importantes sont Telerh, Inan, Instinifes, Tat mellat et In tacoust .

Les principales régions productrices sont celles de l'Est, indemnes de Bayoud et qui concentrent toute la production de la variété *Deglet-Nour*, avec principalement les palmeraies de Oued Righ et des Zibans, de Oued souf, de la cuvette de Ouargla et du Mzab. A l'Ouest ce sont les palmeraies de l'Oued Saoura, du Touat, du Gourrara et du Tidikelt (figure1).



Figure 1: Carte d'Algérie illustrant les différentes régions phoenicicoles

I.4 Morphologie

I.4.1 Système racinaire

Il est de type fasciculé. On distingue quatre grands types de racines à savoir (Munier, 1973 ; Peyron, 2000)

- ✓ Les racines respiratoires : Ce système joue un rôle important, et nécessaire au palmier, dans les échanges gazeux avec l'air de l'atmosphère du sol.
- ✓ Les racines de nutrition : Constituent la plus forte proportion des racines du système, elles sont très longues, obliques ou horizontales.
- ✓ Les racines d'absorption : Ont pour fonction de chercher l'eau, la zone de ces racines est plus ou moins développée selon le mode de culture et la profondeur de la nappe phréatique.
- ✓ Les racines du faisceau pivotant : Il est quasi inexistant si la conduite de culture permet une absorption suffisante au niveau des racines de nutrition et d'absorption, il est réduit si la nappe phréatique se trouve à faible profondeur, Mais si nécessaire, ce véritable pivot de racines peut atteindre l'eau jusqu'à une profondeur de 17 mètres.

I.4.2 Tronc et rejets

Le tronc ou « stipe » est cylindrique, c'est-à-dire d'un même diamètre de bas en haut, sauf à la base, où l'on trouve les racines respiratoires qui poussent en faisant éclater les *kornafs*, on y trouve également les rejets. Dans la partie terminale du stipe, les palmes vertes sont insérées en hélices très rapprochées. (Munier, 1973 ; Peyron, 2000)

I.4.3 Couronne ou frondaison

C'est l'ensemble des palmes vertes qui forment la couronne du palmier dattier. On dénombre 50 à 200 palmes chez un palmier dattier adulte. Les palmes vivent de trois à sept ans, selon les variétés et le mode de culture. Elles sont émises par le bourgeon terminal ou « phyllophore », et on distingue : la couronne basale, la couronne centrale et les palmes du cœur. (Peyron, 2000)

Une palme, ou « djerid », est une feuille composée, pennée. La base pétiolaire, ou « *kornaf* », engaine partiellement le tronc et est en partie recouverte par le fibrillum, ou « lif ».

Le rachis, ou pétiole, est semi-cylindrique, plus ou moins ailé, il porte les épines, ou « chouques », et les folioles. Le pétiole est dur et relativement rigide. La morphologie et la disposition des folioles et des épines sur le rachis constituent l'un des éléments de caractérisation des cultivars, ils sont disposés en position généralement oblique le long du rachis, seules ou en un groupe de trois au maximum.

I.4.4 Inflorescences

Le palmier dattier est une plante dioïque, c'est-à-dire que les organes mâles et femelles sont sur des individus différents, pied mâle ou « Dhokkar » porte le pollen, pied femelle ou « Nakhla » porte le fruit.

Les inflorescences du dattier naissent du développement de bourgeons axillaires situés à l'aisselle des palmes dans la région coronaire du stipe. Elles sont caractérisées par une grappe d'épis, les fleurs sont quasi sessiles (sans pédoncule). Elles sont portées par des pédicelles, ou épillets. Les pédicelles sont portés par un axe charnu, la hampe, ou spadice, un seul ovule par fleur est fécondé et un seul carpelle se développe, les deux autres carpelles disparaissent. Le fruit, la datte, est une baie à une seule graine, le noyau (Peyron, 2000).

A



B



C



Source/ Photos Abed F. 2011

Figure 2: (A) arbre du palmier dattier ; (B) régime de datte ; (C) rejet à la base du tronc d'un palmier dattier

I.5 Importance dans l'écosystème saharien

Le palmier dattier constitue l'élément essentiel dans les systèmes agro-oasiens en zones arides ou semi-arides. Le succès de tout développement des oasis nécessite donc une amélioration de la production dattière, des soins culturaux et de la protection sanitaire du palmier dattier. Grâce à son architecture phénologique, le palmier crée un microclimat oasien favorable au développement des cultures sous-jacentes à savoir les arbres fruitiers, les cultures vivrières et les fourragères. Sur le plan socio-économique, cet arbre providentiel pour les populations sahariennes, contribue d'une part au revenu agricole des phoeniculteurs grâce à la valeur commerciale des dattes et d'autre part il permet l'amélioration du niveau de vie et de la santé des agriculteurs grâce à la valeur nutritive très riche des dattes. La disparition de cet arbre entraîne inévitablement le déséquilibre de cet écosystème, l'exode des populations et finalement conduit à la désertification.

I.5.1 Exigences climatiques et édaphiques

Le palmier dattier exige des étés chauds et sans pluie ni humidité élevée pour 5 à 7 mois depuis la pollinisation à la récolte. Il tolère bien la sécheresse mais très exigeant à l'eau d'irrigation pour son développement et sa production.

C'est une espèce thermophile, le palmier dattier ne peut fructifier au dessous de la température de 18 °C, mais supporte les températures basses. Il ne fleurit que si la température moyenne est de 20 à 25°C. L'humidité qui convient au palmier est celle de la zone saharienne, souvent inférieure à 40%. Pour assurer une bonne production dattière, le palmier a besoin de 16.000 à 20.000 m³/ha/an, selon la nature du sol, la profondeur de la nappe et le degré d'insolation et de température. Les estimations sont de l'ordre de 50 L/mn/ha en été et de 40 L/mn/ha en hiver.

Les palmiers sont cultivés dans des sols très variés ils se contentent de sols squelettiques, sableux, sans aucune consistance mais affectionne les sols meubles et profonds assez riches ou susceptibles d'être fertilisés. C'est une espèce qui craint l'argile.

1.5.2 La production dattière

En 2008 la production en Algérie a été estimée de 5.439.020 qx. Aujourd'hui le nombre de palmiers productifs est de l'ordre de 11 millions d'arbres (sur les 18,7 millions), assurant une production de 7 millions de quintaux dont 46% pour la seule variété Deglet-Nour (campagne 2010-2011) (Belguedj. 2011)

Tableau 1 : La production dattière en Algérie

Wilaya	Campagne 2010-2011			TOTAL
	Deglet-Nour	Mech-Degla et analogues (sèches)	Ghars et analogues (molles)	
Biskra	1 442 895	789 881	381 309	2 614 085
El-Oued	1 060 130	359 366	377 334	1 796 830
Ouargla	540 786	56 766	416 091	1 013 643
Ghardaïa	185 000	-	238 000	423 000
Adrar	-	821 194	-	821 194
Béchar	-	55 978	157 814	213 792
Tamanrasset	-	104 489	-	104 489
Illizi	763	6 046	9 093	15 902
Tindouf	-	240	5 760	6 000
TOTAUX	3 229 574	2 193 960	1 585 401	7 008 935

Source: Belguedj /DSA, Janvier 2011

I.5.3 Usage du palmier dattier

Outre sa production de dattes pour l'alimentation humaine, le palmier dattier offre une large gamme de sous-produits exploités par la population saharienne, à savoir

- Le vinaigre, l'alcool et les levures, par fermentation microbiologiques des dattes communes;
 - La farine de dattes utilisée dans la panification;
 - Le jus de dattes, utilisé comme sucrerie;
 - Le stipe, utilisé dans l'ébénisterie traditionnelle, bois de chauffage et charpentes de bâtiments;
 - Les palmes sèches, utilisées comme clôtures, brise-vent, dans la confection de couffins, de chapeaux, etc..... Ils peuvent même servir dans l'industrie du papier ;
 - Les régimes de dattes, comme balais traditionnels, et comme combustibles;
 - Le lif pour la confection des semelles de sandales;
 - Le lagmi, boisson très recherchée par la population locale, représentant la sève qui s'écoule du stipe.
 - L'utilisation des sous-produits du palmier dattier dans l'alimentation du bétail principalement, les déchets de dattes, les pédicelles de dattes et les palmes sèches.
- Le palmier dattier est aussi utilisé comme plants d'ornement dans les pays du monde.

I.5.4 Composition et valeur nutritive de la datte

La datte fraîche est constituée de la pulpe. Sa valeur énergétique est de 300 cal/100g, son apport en éléments minéraux et en vitamines font de la datte un aliment d'un grand intérêt nutritif

(Peyron, 2000). A titre d'exemple la pulpe de *Deglet-Nour* est constituée de

- Eau 23%, Sucres 72% (glucose, saccharose, fructose), cellulose 7,20%, protéine 1.5%, lipide 0.05%. La datte est riche en éléments minéraux (N, P, K, Cu, Mg) et en vitamines. C'est un fruit doté d'un bon équilibre entre les vitamines du groupe (B, PP et A), et autres (tanins, produits aromatiques...).

Les dattes peuvent être classés selon leurs consistances :

Dattes molles, exemple Ghars.

Dattes demi-molles, exemple Deglet Nour.

Dattes sèches, exemple Degla beida

I.6 Mode de multiplication du palmier dattier

Le palmier dattier peut être multiplié par les méthodes traditionnelles (voie végétative ou voie sexuée) ou encore par les techniques de culture *in vitro* (CIV).

I.6.1 Multiplication par semis

La reproduction sexuée par graine, donne une population composée de 50% de sujets mâles et 50% de sujets femelles (Aberlenc et *al.*, 2011), leur sexe ne peut être déterminé qu'à l'âge de 5 à 8 ans, date de développement des premières inflorescences. Ainsi, un seul arbre male suffit pour féconder 50 arbres femelles (Bouguedoura, 1991), ce qui rend cette technique consommatrice de temps et d'espace pour des résultats incertains (Jahiel, 1996). Cependant, cette méthode donne une population très hétérogène et offre ainsi la possibilité d'obtenir des phénotypes intéressants.

I.6.2 Multiplication par rejets

C'est le mode de reproduction le plus stable et le plus efficace. En effet, le rejet est un plant conforme au pied mère dont il provient. Cependant, il reste limité par le nombre réduit de rejets produits à la base de l'arbre, seulement 10 à 15 rejets en moyenne sont produits durant toute la vie d'un palmier. La réussite de la reprise des rejets varie en fonction de l'âge, du poids à la plantation, des fréquences d'irrigation et de la technique de transplantation.

I.6.3 Multiplication par les cultures *in vitro*

La multiplication rapide du palmier dattier par les techniques de culture "*in vitro*" est aujourd'hui possible grâce au développement des cultures de tissus, elle constitue l'unique voie pouvant apporter une solution dans un délai raisonnable pour le repeuplement ou l'extension des palmeraies, d'autant plus que tous les clones sélectionnés pour leur résistance au Bayoud sont représentés par un nombre faible d'individus. Cette technique permet également la production de vitroplants indemnes de *Fusarium oxysporum*, permettant ainsi d'éviter la dispersion de la maladie, et une meilleure reprise en champ.

Deux méthodes sont utilisées pour la propagation végétative des espèces végétales appliquées aussi au palmier dattier.

- **L'organogenèse ou multiplication par néoformation de bourgeons**

Dans ce type de multiplication, les bourgeons sont initiés sur des organes ou de tissus qui ne possèdent pas cette faculté dans les conditions naturelles. L'organogenèse directe est connue pour garantir l'authenticité génétique des plantes obtenues par rapport à la plante mère. Cependant un faible taux de multiplication est obtenu par cette technique. En plus l'organogenèse directe, sans passer par l'étape cal est très difficile à réaliser (Flick et *al.*, 1983). Les premiers travaux par Reuveni et al., (1972) et Reuveni et Lilien-Kipnis (1974) sur différentes parties de palmier adulte, sur des embryons zygotiques et sur des sections de jeunes plantules, ont mis en évidence que seuls les embryons ont été cultivés avec succès en donnant naissance à des cals.

Les travaux de Ammar et Benbadis (1977), Euwens (1978) ont permis l'apparition de cals sans aucune évolution vers une régénération en plantes entière. Finalement, les travaux de Poulain et *al.*, (1979) ont permis de régénérer des plantes entières et transférable en champ.

- **L'embryogénèse somatique**

L'embryogénèse somatique est le fait que des cellules somatiques se développent et forment des embryons complets, analogues aux embryons zygotiques. Les embryons somatiques, obtenus par voie directe (sans passage par cals) ou indirecte (après formation de cals constitués par des cellules indifférenciées en prolifération anarchiques), peuvent dérivées de cellules isolées ou de plusieurs cellules qui acquièrent un développement synchrone. L'embryon somatique passe pendant son développement par des étapes structurales distinctes, étape globulaire, cœur, torpille, cotylédonaire, et l'étape mature (Gamborg et Phillips, 1995). Cette technique est aujourd'hui très utilisée car elle est moins ardue et facile à reproduire.

I.7 Principaux ravageurs et maladies

Plusieurs maladies surtout d'origine fongique et des attaques dues aux ravageurs surgissent certaines années au niveau des collections variétales et au niveau des palmeraies. Les plus préoccupant pour les phoeniculteurs, sont le **Bayoud** (*Fusarium oxysporum f.sp. albedinis*), le **ver de la datte** (*Apomyelois ceratoniae*), d'autres maladies et parasites émergents sont à craindre comme la maladie des feuilles cassantes (MFC), le **charançon rouge** (*Rhynchophorus ferrugineus*).

1.7.1 La maladie du Bayoud

Le bayoud, est une maladie cryptogamique provoquée par un champignon vivant dans le sol (*fusarium oxysporun f.sp. albedinis* appelée « Bayoud », difficile à combattre. Le parasite pénètre par la racine et envahit le système vasculaire de l'arbre, ce qui se traduit par un blanchissement progressif suivi d'un dessèchement des palmes. Lorsque le bourgeon terminal est atteint, l'arbre meurt au bout de quelques mois, parfois quelques années selon l'entretien du jardin. Aujourd'hui la seule méthode de lutte est l'utilisation des cultivars résistants.

1.7.2 La maladie des feuilles cassantes

C'est une maladie mortelle, d'apparition récente en Tunisie (Triki et *al.*, 2003). En Algérie la maladie a été détectée dans plusieurs palmeraies de l'est et l'ouest. C'est une maladie qui se manifeste par un jaunissement des folioles qui apparaissent entièrement frisées et la palme devient cassante. La production de dattes est alors diminuée et la qualité affectée, il s'ensuit par la suite la mort de l'arbre. Plusieurs pistes sont investies pour la connaissance de la cause de cette maladie, mais aucun agent causal n'a encore été identifié.

II Techniques de culture *in vitro*

II.1 Historique de l'embryogenèse somatique

L'embryogenèse somatique, est un phénomène naturel rapporté sur plus de 3000 espèces. C'est un mode de reproduction asexuée, désigné par le terme d'apomixie, qui, à partir de cellule somatique conduit à la formation d'embryon parfaitement organisé permettant de régénérer des plantes entières génétiquement identiques à la plante d'origine (Sharma et Thorpe, 1995).

Si l'embryogenèse somatique existe à l'état spontané dans la nature, elle est surtout utilisée comme voie de régénération et de multiplication *in vitro*. Elle est déterminée par les conditions de culture et dépend des tissus et des organes végétaux utilisés. Vers la fin des années cinquante (Steward et *al.* 1958) ont décrit pour la première fois le phénomène de l'embryogenèse somatique *in vitro* à partir de culture de cellules isolées de carotte. Cette découverte a démontré la théorie de la totipotence cellulaire végétale. Depuis ces premières observations, le processus de l'embryogenèse somatique *in vitro* a été appliqué à de nombreuses espèces. Parmi les espèces ligneuses, trois monocotylédones ont fait l'objet de recherches, il s'agit du cocotier, palmier à huile et le palmier dattier.

Les travaux de recherche sur la culture *in vitro* du palmier dattier ont débuté en 1970 par Shroeder, suivi de Reuveni et *al.*, 1972 et de Reuveni et Kipnis, 1974 ; Benbadis et Ammar, 1975 ; Brochard, 1976-1981 ; Poulain et *al.*, 1979, Tisserat, en 1979, Tisserat et De Masson 1979 ; Sharma et *al.*, 1980 ; Zaid et Tisserat, en 1983, Drira en 1983 ; Mater, 1983 ;

Sharma et al, 1984 ; Drira et Benbadis, 1985 ; Daikh et Demarly, 1987 ; Letouze et Daguin, 1988. Tous ces travaux ont portés sur les corrélations existantes entre les génotypes, l'explant, les milieux de base, les additifs en acides aminés et les balances hormonales, ainsi que les conditions de cultures. Il est cependant à noter que le protocole de régénération du palmier dattier n'est pas encore totalement maîtrisé et reste tributaire de plusieurs facteurs. Les études sur l'embryogenèse somatique sont encore en cours pour examiner l'impact de différents composants utilisé dans les milieux de culture (Chabane 1996, Al kayri 2001). Des progrès ont été obtenus sur les générations de suspensions cellulaires, l'embryogenèse somatique, ainsi que le sauvetage d'embryon (Saka 2000, Al khayri 2002, Chabane 2007, Yatta 2007, Boufis, 2008, Maïdi 2010)

II.2 Les phases de l'embryogenèse somatique

L'embryogenèse somatique comporte deux phases. Une phase de dédifférenciation par callogénèse des cellules de l'explant. Une fois que le cal est formé, la deuxième phase est enclenchée par un stimulus qui est généralement nécessaire pour que les cellules s'engagent dans la voie de l'embryogenèse, c'est la phase de différenciation. Le stimulus le plus couramment appliqué est la suppression de l'auxine du milieu de culture.

II.2.1 La dédifférenciation cellulaire

L'embryogenèse indirecte est rencontrée lorsque l'embryon est issu à partir de cellules qui s'individualisent au cours de la prolifération d'un cal. Les cellules différenciées subissent une phase de dédifférenciation puis une réorientation vers l'embryogenèse (Sharp et al, 1982).

En théorie chaque cellule est capable de se dédifférencier et de se réorienter vers la formation d'une plante entière. En pratique, l'embryogenèse somatique dépend de la présence de cellules présentant une aptitude à l'embryogenèse capable de répondre aux stimuli extérieurs (Carman, 1990).

Chez certaines espèces, l'induction d'un cal semble spécifique aux cellules des régions méristématiques de la plante (Maddock, 1985). Chez le palmier à huile, le cal est induit à partir de cellules de la zone méristématique périvasculaire qui peuvent être localisées dans différents organes (feuilles, inflorescences, embryons zygotiques) (Duval et al., 1995).

II.2.2 La différenciation cellulaire

Elle se caractérise par deux étapes principales :

- L'initiation de la proembryogenèse: Elle est obtenue par la différenciation de cellules de type embryogène. Cette étape comporte deux phases : L'induction proembryogène et la prolifération. Elle est contrôlée principalement par les auxines qui stimulent les divisions des cellules embryogènes. Lorsque les cals sont transférés dans un milieu appauvri en auxines, le développement de proembryons est généralement observé (Nomura et Komamine, 1985).

- Le développement embryonnaire; elle est obtenue par la formation des embryons à partir des proembryons. Cette étape comporte deux phases : L'ontogenèse qui correspond à la première phase de l'embryogenèse zygotique. Elle est obtenue par la suppression de l'auxine sur les milieux de culture (Komamine *et al.*, 1990). Et la maturation, équivalente à la deuxième phase de l'embryogenèse zygotique qui comprend d'une part, l'expansion cellulaire et le développement des embryons, et d'autre part, l'accumulation des réserves. Une fois les étapes de morphogenèse terminées, les embryons somatiques ne subissent pas de phase de quiescence ou de dormance comme le cas de l'embryon zygotique.

II.3 Facteurs influençant l'embryogenèse somatique

Plusieurs facteurs jouent un rôle important dans l'initiation de l'embryogenèse somatique, cependant nous citerons les plus déterminants dans l'induction de l'embryogenèse.

Les régulateurs de croissance dans le milieu et en particulier les auxines qui sont essentiels pour l'induction et le maintien de l'embryogenèse.

Chez de nombreuses espèces, l'hormone utilisée pour réinitier la division cellulaire est l'auxine comme le 2,4D. C'est l'auxine la plus utilisée en raison de son fort potentiel calogène, mais d'autres auxines telles que l'AIA, l'ANA et le picloram peuvent aussi être employés (Zryd, 1988). Chez le palmier à huile, l'embryogenèse est obtenue en présence du 2,4D ou de l'ANA à concentration élevée (Pannetier *et al.*, 1981). Cependant le rôle de l'auxine dépend de l'explant et reste encore mal connu (Zimmerman, 1993).

Certains auteurs attribuent au 2,4D des rôles similaires à ceux des auxines naturelles qui agissent au cours du développement de la plante tels que le contrôle de la synthèse des macromolécules de la paroi, le contrôle du pH intra et extracellulaires, et l'hyperpolarisation des membranes plasmiques (Dudits et *al.*, 1991). Loshiavo et *al.*, (1989), soulignent que le 2,4D jouerait un rôle dans la régulation des gènes par méthylation de certaines région de l'ADN.

Schmidt et *al.*, (1997) ont montré que l'acquisition de cette compétence par les cellules somatiques est corrélée à l'expression très précoce du gène *SERK* (Somatic embryogenesis Receptor-like kinase) codant pour un récepteur kinase. Cette expression cesse après le stade globulaire. Ces résultats ont montré le rôle d'une protéine kinase dans la chaîne de transduction des signaux cellulaires identifiée dans le processus de l'embryogenèse somatique et zygotique.

D'autres facteurs ont un rôle inducteur de l'embryogenèse comme les cytokines (Maheswaren et Williams, 1985). Certains éléments nutritifs présents dans le milieu sont également nécessaires pour l'induction de l'embryogenèse comme la source de carbone et d'azote (nitrates et ammonium) (Merkle et *al.*, 1995).

II.4 Facteurs impliqués dans la maturation des embryons somatiques

Le développement des proembryons est généralement observé lorsque des cals sont mis en milieu dépourvu d'hormones, (Nomura et Komamine, 1985). Le stade embryonnaire globulaire est caractérisé par le début de la différenciation structurale (formation du protoderme). Les embryons somatiques présentent ensuite des structures morphogénétiques comparables à celles des embryons zygotiques (Stolars et *al.* 1991).

La composition des milieux de culture est importante pour le développement des embryons et varie pour chaque espèce étudiée (Merkle et *al.*, 1995). Généralement différentes sources d'azote sont utilisées (ammonium, nitrates, acides aminés et les hydrolisats de caséine)

(Trigiano et Conger, 1987). Le carbone est apporté le plus souvent par le saccharose. L'addition de cytokinines dans le milieu conduit à la mise en place du méristème caulinaire chez plusieurs espèces comme le bananier (Dhed'a et *al.*, (1991) ; l'hévéa (Montoro et *al.*, (1992) ; ou le palmier à huile (Aberlenc-Bertossi et *al.*, 1999).

D'autres facteurs chimiques entrent en jeu dans l'embryogenèse somatique, il s'agit des acides aminés, tels que la glutamine, l'arginine et l'adénine (Morcillo, 1999).

En ce qui concerne les marqueurs protéiques et moléculaires de la morphogenèse des embryons, les travaux de Cordewener et *al.* (1993) sur la carotte ont montré que la glycosylation des protéines extracellulaires apparaît comme une étape importante dans la maturation des embryons. En présence d'un inhibiteur de glycosylation, l'embryon reste bloqué au stade pré-globulaire. De Jong et *al.*, (1993) ont montré que des enzymes de type endochitinases EP3 peuvent stimuler le développement des embryons bloqués au stade globulaire, cette protéine jouerait un rôle dans la formation du protoderme.

Les protéines de réserve sont synthétisées dès l'initiation de l'embryogenèse somatique contrairement à l'embryogenèse zygotique (Zimmerman, 1993), et les quantités sont beaucoup plus faibles (Krochko et *al.*, 1992).

III Marqueurs d'identification et d'évaluation de la conformité génétique

III.1 Marqueurs morphologiques :

La reconnaissance des cultivars est basée essentiellement sur la description morphologique du fruit, mais de façon moins évidente, sur la description des différentes parties de l'arbre.

Cette description demeure très difficile, car pour un seul cultivar, il est possible de noter des différences morphologiques d'une palmeraie à une autre. Seuls les phoeniculteurs sont encore capables de distinguer les cultivars de leur jardin

Nixon, et al. (1965), se sont intéressés aux cultivars de palmier dattier et a décrit en détail les quelques 140 variétés qui ont été importées aux Etats-Unis et qui constituent une assez bonne sélection des cultivars les plus connus du patrimoine de l'ensemble des pays phœnicoptéridés.

Plusieurs auteurs ont ainsi décrit les cultivars de palmier dattier (Brac et benkhalifa, 1989). Il existe une grande diversité de cultivars dans le Maghreb, mais tous les cultivars ne sont pas encore décrits, ni catalogués.

Les travaux de Benkhalifa (1989) sur la variabilité des cultivars du Sud algérien, étude basée sur les caractères morphologiques du fruit et du noyau, ont montré une variabilité, génétique, intracultivar en particulier chez deux cultivars (Timliha et Takerboucht). Les caractères phénotypiques semblent être influencé par les conditions environnementales, d'où la nécessité de développer d'autre marqueurs susceptibles de caractériser les cultivars et leur vitroplants.

III.2 Les Marqueurs biochimiques

La conformité des vitroplants obtenus par embryogenèse somatique se pose aujourd'hui dans exactement les mêmes termes qu'elle avait été posée en 1990. Il a été souligné par Ferry et *al.*, (1998) que la diversité des protocoles possibles pour obtenir des embryons somatiques ne permettra pas de dire si la technique de l'embryogenèse somatique du palmier dattier est en soi conforme ou non. Par contre, il souligne que la conformité des vitroplants est garantie par organogenèse.

En effet, le maintien des cultures dans des milieux contenant des auxines tel que le 2,4D, hormone principale dans l'initiation de l'embryogenèse somatique est susceptible de conduire à la variation somaclonale. De plus, les milieux agités intensifient l'activité mitotique ce qui pourrait conduire, chez certaines espèces, à la formation de cellules aneuploïdes et/ou polyploïdes.

L'électrophorèse enzymatique est un outil performant pour étudier les structures génétiques de plusieurs espèces fruitières (Tores 1989, Weeden 1989). En effet cette technique permet de disposer à un stade précoce d'un nombre important de marqueurs génétiques. On peut donc avoir par ce moyen des marqueurs stables et déterminés par un petit nombre de gènes généralement non affectés par les conditions d'environnement et dont l'expression est

codominante, c'est-à-dire permettant la distinction entre les homozygotes et les hétérozygotes (Bennaceur et *al.*, 1991).

Cependant cette technique reste limitée, notamment dans la difficulté de détecter certaines mutations qui n'affectent pas la charge de l'enzyme et donc la nécessité d'étudier un nombre élevé de marqueurs pour l'identification de clones ou de variétés très étroitement apparentés.

Les travaux de Baaziz et *al* en 1993 sur le polymorphisme enzymatique du palmier dattier utilisé comme marqueur de la conformité génétique des vitroplants, a conclu que la multiplication par organogénèse permet de produire des plants conformes.

D'autres travaux sur les systèmes enzymatiques ont fait l'objet sur l'identification variétale de plusieurs cultivars marocains (Baaziz M et al 1988) et Algérien (Bennaceur et *al.* 1991). D'autres travaux ont tenté de caractériser des profils peroxydasiques spécifiques de cultivars réputés résistants au Bayoud (Bendiab et *al.* 1992). D'autres systèmes enzymatiques ont permis d'analyser les variations isoenzymatiques en fonction du stade de développement et de la méthode de régénération *in vitro* (Letouze et *al* 1991). Il a été souligné que le polymorphisme enzymatique au niveau de l'expression des activités peroxydasiques et estérases montre des différences stables et parfaitement reproductibles

L'identification de génotypes à travers l'analyse des estérases et des peroxydases a montré une variation parmi les clones hybrides et parentaux chez l'Eucalyptus (Umboh et *al.* in Picard 1999).

L'évaluation des peroxydases comme marqueurs de la tolérance à la salinité chez les céréales a permis de caractériser des variétés d'orges et de triticale, qui se sont révélés plus tolérants à la salinité par une augmentation de l'activité de leur peroxydases ioniques des racines (Aouad et *al.* in Picard, 1999).

Les marqueurs biochimiques constituent des critères valables pour la connaissance génétique du palmier dattier. Deux types principaux de composés biochimiques ont fait l'objet d'analyses, les composés flavonoïques (Ouafi et *al*, 1988) et plusieurs systèmes enzymatiques (Torres et *al* 1980; Baaziz et *al* 1988; Letouze et *al*. 1991, Bennaceur et *al* 1991)

III.2.1 Les flavonoïdes

Les flavonoïdes sont des composés phénoliques issus du métabolisme secondaire. On rassemble sous ce terme toutes les molécules biochimiques dont la structure ne se rattache pas directement aux glucides, lipides, protéines, ou acides aminés et qui possèdent au moins un noyau aromatique. Ces hétérosides sont souvent localisés dans la vacuole de la cellule. Ces molécules sont des substances qui possèdent un bon nombre de propriétés requises pour constituer de bons marqueurs biochimiques, elles constituent également les métabolites secondaires les plus largement distribués dans le règne végétal. (Ouafi, 1987).

a- Structure

Ces composés sont caractérisés par une structure en C₆-C₃-C₆ dans laquelle deux noyaux aromatiques (A) et (B) sont reliés par un hétérocycle (C) différent selon la nature des flavonoïdes.

b- Synthèse

Ces substances sont rarement libres, elles sont synthétisées au niveau des plastides cytoplasmiques et s'accumulent dans le suc vacuolaire. Dans ce cas, elles sont sous forme d'hétérosides faisant intervenir une liaison C-O-C entre un hydroxyl alcoolique ou phénolique du composé phénolique et un hydroxyl d'une molécule glucidique.

c- Classification

On en connaît une douzaine de classes. Mais elles sont généralement classées en trois grands groupes (Ribereau- Gayon, 1968), les Flavones, les Flavonoles et les dérivés voisins.

1- Chalcones, Dihydrochalcones et dérivés voisins.

2- Les Anthocyanes.

Selon les travaux de Ouafi F. (1987) on a trois résultats :

- Les quatre glycosides de flavonols (monoside de quercétine, monoside d'isorhamnetine, dioside de quercétine, dioside d'isorhamnetine) sont régulièrement présents chez tous les cultivars et en teneur assez importante.
- Certaines sont riches en hétéroside flavonique, alors que d'autres le sont moins.
- A l'aide de la technique de chromatographie (CMM) bidimensionnelle, la comparaison des cultivars un à un a montré qu'à aucun moment il y a deux chromatogrammes vraiment identiques, il existe toujours une différence que se traduit par l'absence de composé(s) glucosidique(s) chez l'un ou l'autre des cultivars. Ce fait très important, ouvre des perspectives d'utilisation des hétérosides flavoniques en tant que marqueurs biochimiques inter cultivars. En effet l'identification du reste des composées permet d'établir des cartes d'identité flavoniques pour chaque cultivars qui pourrait servir à retrouver l'appartenance d'un palmier inconnu à tel ou tel cultivar sans avoir à se baser sur les caractéristiques du fruit, qui jusque-là, reste des critères de reconnaissance des cultivars (Ouafi F; 1987).

III.2.2 Systèmes enzymatiques

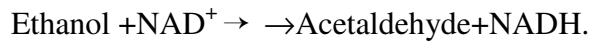
En se basant sur les littératures étudiées de (Bennaceur, 1991, Baaziz et Bendiab, 1992), le choix des systèmes enzymatiques a porté sur les systèmes enzymatiques suivantes:

a- Oxydoréductases

Les oxydoréductases; catalysent les réactions d'oxydo-réduction. La plupart de ces enzymes sont connues sous le nom de déhydrogénases, mais certaines d'entre eux sont appelés oxydases, peroxydases, oxygénases ou réductases (Weinman et *al.*, 2000).

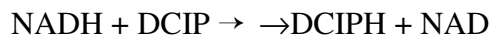
- **Alcool deshydrogénases** (ADH: E C 1.1.11)

Cette enzyme catalyse la réaction suivante:



- **Diaphorase** (DIA: EC 1.6.43)

Cette enzyme catalyse la réaction suivante :



- **Peroxydases** (POX: EC 1.11.1.7)

Ce sont des oxydo-réductases utilisant le peroxyde d'hydrogène dans l'oxydation des phénols, et elles sont très représentées chez le palmier dattier (*Phoenix dactylifera L*) (Baaziz M. 1990).

Elles jouent un rôle majeur dans quatre processus physiologiques; le catabolisme des auxines, la formation de la lignine, la défense contre les pathogènes et certains phénomènes respiratoires (Gaspar et *al.*, 1982). Les peroxydases présentent chez les plantes un nombre élevé d'isoformes (isoenzymes). Cependant, le rôle exact de chacune des formes reste encore imprécis (Baaziz, 1989).

Les peroxydases sont des protéines porphyriques contenant du fer (Enzymes héminiques), (Richter G, 1993).

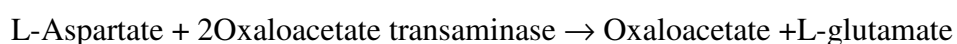
b- Les transférases

Les transférases catalysent les réactions de transfert de groupes moléculaires (d'une molécule à une autre), cette classe inclut les kinases (Weinman et Méhul, 2000). Trois sont pris en compte:

- **Glutamate-Oxaloacetate Transaminase** (GOT: EC 2.6.1.1)

- **Oxaloacetate aminotransférases**

Cette enzyme catalyse la réaction suivante:



- **f- Phosphoglucomutases:** (PGM EC : 2.7.5.1):

Elle le transfert du radical phosphate du carbone 1 au carbone 6 de la molécule du glucose.

La réaction est réversible

Glucose-1-phosphate \rightarrow \rightarrow Glucose-6-phosphate

Glucose-6-phosphate + NAD \rightarrow \rightarrow 6 Phospho gluconate +NADH

- **c- Les hydrolases**

Classe d'enzymes catalysant les réactions hydrolytiques dans le catabolisme général.

- **Les estérases** (EST E C 3.1.1.1)

Les estérases catalysent des réactions d'estérifications dans différents organes du végétal. Elles se distinguent des autres systèmes enzymatiques par une diversité catalytique remarquable d'un grand nombre des substrats dont seule une fraction mineure est in vivo connue. Les estérases sont révélées comme un système enzymatique très polymorphe (Trabsi I, 1987).

Les estérases sont un groupe d'enzymes homogènes qui hydrolysent les esters en acide et en alcool. Les estérases catalysent les réactions suivantes :

α -naphtyl acétate \rightarrow \rightarrow α -naphtol + acétate ou β -naphtyl acétate \rightarrow \rightarrow β -naphtyl + acétate.

- **Les phosphatases acides** (PAC: EC 3.1.3.2)

Ces phosphatases catalysent la réaction suivante :

α -naphtyl phosphate \rightarrow \rightarrow α -naphtol + acétone .

- **La leucine-Amino-Peptidase** (LAP: E C 3.4.11)

C'est une enzyme protéolytique qui hydrolyse les liaisons peptidiques. Elle intervient dans la réaction suivante :

H_2O + L-leucine-peptide \rightarrow L-leucine + peptide

d- Isomérases

Les isomérases catalysent les réactions d'isomérisation et de réarrangements intramoléculaires (Weinman et Méhul, 2000).

- **Phosphoglucose isomérases** (PGI: EC 5.3.19)

Ce système catalyse dans les deux sens la réaction d'isomérisation du glucose 6 phosphate en fructose 6 phosphate (transformation d'un aldose en cétose).

D glucose 6 phosphate → D fructose 6 phosphate.

III.2.3 Electrophorèse

L'électrophorèse est une technique analytique basée sur la migration différentielle de molécules ionisées soumises à un champ électrique continue, dans un milieu électrolytique tamponné, de pH et de force ionique précis (Gavrilovie, 1996).

III.2.3.1 Les Supports utilisés pour l'électrophorèse

- **Le papier**

Le papier filtre fut le premier à être employé. Actuellement de nombreux autres supports sont utilisés. L'inconvénient majeur du papier est d'adsorber des molécules sur la cellulose, ce qui peut entraîner une mauvaise séparation des zones (Plummer, 1989).

- **Acétate de cellulose**

Ce matériel présente peu d'adsorption et permet une bonne séparation d'un mélange en zones distinctes. De cette manière, les composés sont élués facilement avec un bon rendement. De faibles quantités de produit sont nécessaires et la séparation peut être réalisées en une heure au lieu d'une nuit pour l'électrophorèse sur papier. Cependant, l'acétate de cellulose est plus onéreux que le papier (Plummer, 1989).

- **Grains d'amidon**

Ce produit est préparé en compressant les grains d'amidon en un seul bloc dans un tampon. Les grosses molécules peuvent être séparées par ce type d'électrophorèse qui est idéal pour des travaux comme la séparation et l'isolement d'isoenzymes (Plummer, 1989).

- **Gel de polyacrylamide**

Le polyacrylamide est le plus récent des supports utilisés pour l'électrophorèse. Il possède l'avantage d'être transparent et de pouvoir ainsi être analysé en spectrophotométrie UV visible. En outre, une résolution très fine de mélanges complexes est possible. Comme la taille des pores peut être contrôlée, la séparation dépend autant de la taille et de la forme des molécules que de leur charge (Plummer, 1989).

Les gels en gradient d'acrylamide permettent d'obtenir des migrations extrêmement résolutive. L'utilisation de gradient de pH et de gel à larges pores (gels de concentration) précédant le gel à pores étroits (gel de séparation) permet l'obtention de bandes de protéines extrêmement fines. La concentration en acrylamide du gel de séparation variera en fonction du poids moléculaire des substances à séparer (tableau 2).

Tableau 2 : Concentration du gel acrylamide en fonction du poids moléculaire

Poids moléculaire	% acrylamide
10 000 à 40 000	15 à 20
40 000 à 100 000	10 à 15
1000 000 à 300 000	5 à 10
300 000 à 500 000	5
> 500 000	2 à 5

Les gels contiennent également un faible pourcentage (0,2 à 0,3%) de N`-méthylène bisacrylamide qui sert au pointage des chaînes de polyacrylamide (Kamoun, 1997).

Les migrations peuvent être effectuées en présence d'agents dénaturants. En urée à 6 M les protéines perd la forme de pelote statistique qu'elles adoptent en conditions non dénaturantes. Elles sont dissociées en sous unités ce qui autorise une caractérisation de ces dernières.

En présence de dodécylsulfate de sodium (SDS) ; celui-ci s'adsorbe sur les protéines, les chargeant négativement et leur donnant une forme de bâtonnet ayant la même charge par unité de masse. Il en résulte une migration proportionnelle au poids moléculaire des protéines, si le gel est réticulé (polyacrylamide). Un traitement par le mercaptoéthanol préalable à la migration entraîne une réduction des ponts disulfure et permet de déterminer le poids moléculaire et le nombre de chaînes polypeptidiques composant la protéine (Kamoun, 1997).

III.3.2 Méthodes d'électrophorèse

- **Electrofocalisation**

C'est une méthode de séparation des protéines en fonction de leur point isoélectrique; elle utilise un gradient combiné de densités et de pH. Cette méthode est douée d'un grand pouvoir de résolution (Kamoun, 1997).

- **Electrophorèse en deux dimensions**

Elle permet une séparation des protéines selon deux paramètres indépendants: leur point isoélectrique et la taille de leurs sous unités. Pour ce faire, une focalisation isoélectrique est réalisée dans une dimension puis une électrophorèse en présence de SDS est effectuée dans l'autre dimension. Cette méthode très résolutive permet l'individualisation simultanée de quelques milliers de protéines. L'analyse des résultats est hautement facilitée par l'utilisation de logiciels d'analyse d'image (Kamoun, 1997).

- **Immunoélectrophorèse**

L'analyse des macromolécules par immunoélectrophorèse combine les méthodes de l'analyse électrophorétique et celles de l'analyse immunologique. Elle s'applique donc aux macromolécules qui peuvent migrer dans un champ électrique (molécules chargées) et contre lesquelles on peut préparer des anticorps (immunogènes) capables de les reconnaître spécifiquement. Cette technique peut être utilisée pour l'identification d'un antigène et la caractérisation d'un anticorps. Elle est moins adaptée à la quantification précise d'un antigène. Une plaque de verre est recouverte d'une fine couche d'agarose; les échantillons sont placés dans des puits et soumis à une électrophorèse. Parallèlement au sens de migration, est découpée une gouttière dans laquelle est déposé, après arrêt de l'électrophorèse, l'antisérum. Les protéines, préalablement séparées par l'électrophorèse, et les anticorps aboutissent à la formation d'un arc de précipitation (Kamoun, 1997).

- **Electrophorèse en champ pulsé**

Le déplacement des particules chargées s'effectue dans un champ électrique dont le sens ou l'orientation varient de façon alternative. Le support est constitué d'agarose, le voltage imposé de l'ordre de 10V et la fréquence d'inversion du champ électrique de 10 à 0,01 hertz.

Cette technique est utilisée pour la séparation de molécules d'ADN de haut poids moléculaire (15 à 1000 kb). C'est une opération impossible par les systèmes d'électrophorèse conventionnels du fait d'une migration indépendante de la taille au-delà de 20 kb (déplacement linéaire dit par reptation) (Kamoun, 1997).

III.4 les marqueurs moléculaires

Les marqueurs moléculaires, basés sur le polymorphisme de la longueur de fragments de restriction d'ADN (RFLP), semblent être le meilleur outil pour remédier aux limites des marqueurs phénotypique et enzymatique, leur puissance réside dans le fait qu'ils ne sont pas soumis aux conditions environnementales, aux relations d'épistasies. Ils peuvent être exploités non seulement dans l'identification variétale et la conservation des ressources phylogénétiques mais aussi dans la cartographie des loci affectant des caractères quantitatifs ainsi que leur suivi dans des programmes d'introgession et de sélection (Picard 1985).

Ben Slimane (1989), a mis en évidence un polymorphisme par RFLP au niveau des profils de restriction par l'analyse de l'ADN mitochondriale de deux cultivars différents du palmier dattier, l'une résistante et l'autre sensible au bayoud. Différents plasmides circulaires super enroulés ont été mis en évidence, leur taille semble être corrélée au caractère de résistance ou de sensibilité au Bayoud chez six cultivars étudiés. D'autres travaux d'exploration du génôme du palmier dattier au moyen de la technique RFLP ont montré des variations génomiques inter et intra-variétales et ont distingué les deux cultivars Zahidi et Boustami noire sur la base d'un polymorphisme de longueur (Letouze et *al.*, 1991).

Les marqueurs RAPD ont permis de caractériser et de distinguer les différents cultivars, tout en différenciant les géniteurs de leurs descendants. Ils pourraient servir pour l'évaluation du potentiel phoenicicole pour l'analyse de la diversité génétique d'un grand nombre de cultivars femelles recensés dans les différents pays du Maghreb et pour assister des programmes de croisements dirigés dans la lutte contre le Bayoud (Ben Abdallah A et *al.*, 2000).

D'autres travaux sur les palmiers à huile ont permis la mise en place d'un contrôle de qualité fiable à l'aide de marqueurs moléculaires pour le développement de la micropropagation clonale du palmier à l'huile vers une exploitation commerciale durable (Rival et *al.*, 1998).

Des travaux récents ont cartographié une version « brouillon » du génôme du palmier dattier (*Phoenix dactylifera* L.). Le séquençage de trois cultivars (Khalas, Deglet Nour et Medjhou) ont permis de disposer d'informations importantes dans la génétique du palmier dattier (Al K-Dous et *al.*, 2011). Ces informations joueront un rôle important dans l'évaluation de la conformité et aussi dans l'identification des gènes responsables de la qualité et de la résistance au bayoud, et représentent une base de données inestimable pour tout programme d'amélioration de l'espèce.

MATERIEL ET METHODES

I.1 Matériel Végétal

Le matériel utilisé pour l'expérimentation est le cœur de rejet. Les rejets de 23 cultivars ont été prélevés dans des palmeraies de trois régions du sud (tableau 5), le nombre de rejet est différent selon la disponibilité au niveau des palmeraies ciblées. Le poids des rejets varie de 1 ,5 à 3 ,5 kg (figure 3).

Tableau 3: Cultivars introduits en *in vitro*

Adrar	Nombre de rejets	Ghardaia	Nombre de rejets	Touggourt	Nombre de rejets
Ahartan	2	Deglet Nour	4	Amari	3
Cheikh	2	U'rus	2	Adjina	2
M'hamed		Tazerzait	4	Degla Beida	4
Takerboucht	5	Tazoughart	4	Deglet Nour	6
essafra		Tantboucht	2	Dimollo	2
Takerbouchet	5			Ghers	3
El Kahla				Halwa	2
Tazerzait	4			Tacharwit	2
Tegaza	4			Tanaslit	3
Tilemsou	4			Tinissin	2
Tinacer	5				
8	31	5	16	10	29

I.2. Méthodes

I.2.1 Dissection des rejets

Le cœur du rejet est obtenu après dissection, qui se fait à l'aide de gros couteaux et de scies. Le rejet est débarrassé des palmes une à une jusqu'à l'obtention du cœur de rejet qui comprend les feuilles internes ainsi que leurs bourgeons axillaires et le bourgeon terminal. Le diamètre du cœur varie de 2 à 3 cm et la longueur est de 6 à 7 cm (Figure 3).

I.2.2 Désinfection du cœur de rejet

La désinfection du rejet se fait en deux étapes (figure3) selon le protocole suivant qui a été établi dans le cadre du CEE/TS2A-0097(CD) F.

1. Première étape :

Le cœur du rejet subit une désinfection superficielle à l'aide d'un fongicide systémique (le Benomyl ou Benlate ou encore Pelt 44) à travers les opérations suivantes :

-le cœur de rejet est rincé à l'eau courante afin d'éliminer les impuretés comme le sable, et la poussière ainsi que les fragments de tissus qui résultent des coups de hache.

-Il est ensuite badigeonné par une pâte à base de benomyl (6g/100ml) et placé au réfrigérateur à une température de 4°C pendant 45 minutes.

-Il est ensuite rincé à l'eau courante jusqu'à élimination de tout résidu de la pâte de benomyl apparente à la surface.

2. Deuxième étape

Le cœur de rejet est immergé dans une solution contenant de l'hypochlorite de sodium à 12° et de permanganate de potassium (100 mg/l) additionné de quelques gouttes de Tween 20 et placé sur un agitateur rotatif à 100 rpm pendant 20 minutes .

Après un passage sous vide pendant 2 minutes pour permettre la désinfection des tissus, le cœur de rejet est placé en conditions aseptiques sous hotte à flux laminaire pour trois rinçages successives à l'eau distillée stérile.

Les instruments de dissection (scalpels, pinces, ...) et le papier sont stérilisés à l'étuve à 180°C pendant 4 heures.

Les explants (figure 3) mis en culture sont :

- 1- l'apex coupé en quatre fragments
- 2- Les feuilles proches du dôme méristématique sont fragmentées en deux (base et haut de feuille)
- 3- Les bourgeons axillaires avec ébauches foliaires



Figure 3 : Protocole de mise en culture : (a) Rejet de palmier dattier $G = 1/60$, (b) dissection du rejet $G = 1/60$, (c) cœur de rejet $G=1/10$, (d) immersion du cœur dans une solution de benomyl à 6g/100ml pendant 45mn $G=1/10$, (e) (stérilisation des cœurs de rejet dans une solution d'hypochlorite à 12° et de permanganate de potassium à 100mg/l pendant 20mn $G=1/8$, (f) rinçage à l'eau distillée stérile $G=1/4$, (g) dissection du cœur sous hotte à flux laminaire $G=1/5$, (h) explants de cœur de rejets utilisés pour l'embryogenèse somatique $G=1/1$, (e) explants mis en culture en tube $G=1/3$

I.2.3 Les milieux de culture

Les milieux de culture contiennent les éléments nécessaires au développement des tissus végétaux, c'est à dire les éléments minéraux, les substances organiques, les régulateurs de croissance et le charbon actif ou le PVP (polyvenyl pyrolidone).

Les éléments minéraux

Correspondent à ceux de Murashige et Skoog (1962) (voir annexe1). Ils sont absorbés sous forme ionique.

Source de carbone

Le saccharose est ajouté à tous les milieux à des concentrations allant de 30 à 60 g/l. (annexe 3)

Acides aminés et autres additifs

La glutamine à 200 mg/l et l'adénine à 40 mg/l sont ajoutées au milieu. Ils ont un effet sur la prolifération des cals embryogènes et la germination des embryons somatiques.

Les anti oxydants

Le charbon actif est ajouté à des doses allant de 0.2% à 3%., le PVP (polyvenylpyrolidone) est utilisé au milieu liquide à une concentration de 2g/l. Ces deux anti-oxydants sont utilisés pour empêcher l'oxydation des tissus de palmier dattier riche en polyphénols suite à l'excision et pour réduire l'effet de l'oxydation qui provoque le brunissement des explants et la dégénérescence des cultures.

Les vitamines

Certaines vitamines favorisent la croissance des tissus en culture. Il s'agit de la thiamine fournie à 1 mg/l et du myo-inositol à 100 mg/l dont l'effet est très net sur la prolifération tissulaire.

Les régulateurs de croissance

Deux auxines, (2,4-D et le Picloram) et une cytokinine (IPA) ont été utilisées pour l'induction et la prolifération des cals embryogènes (annexe 3).La concentration en 2,4 D est de 25 et 100 mg/l, et en Picloram de 5 et 12,5 mg/l (Saka et al., 1997 et Saka, 2000)

Les différents composants du milieu sont préparés au préalable en solutions mère (annexe 2)

Agents gélifiants

Les milieux de culture sont solidifiés à l'agar agar à raison 7g/l. L'agar utilisé a une influence nette sur l'évolution des cultures aussi bien par sa qualité que par sa quantité. Pour le milieu de germination le Phytigel est utilisé à raison de 2g/l.

Ajustement du pH

Le pH des milieux est ajusté à 5,8 avec du NaOH (0,1 N) ou du HCl (0,1 N) avant leur distribution et stérilisation.

Distribution des milieux

Les milieux de culture sont distribués soit dans des tubes en pyrex de 25 x 160 mm à raison de 15 ml ou 20ml de milieu nutritif par tube, soit dans des erlenmeyers de 250ml, à raison de 100 ml par erlenmeyer, soit dans des bocaux de 200ml à 70 ml/bocal.

I.2.4 Stérilisation des milieux de culture

Les milieux de culture distribués dans des erlenmeyers, bocaux ou tubes sont stérilisés à l'autoclave pendant 20 minutes à 120°C. Pour les cultures réalisées dans des boîtes de Petri stériles, le milieu de culture est stérilisé à 120°C pendant 20 minutes avant d'être coulé sous hotte à flux laminaire.

I.2.5 Conditions de cultures

Après mise en culture, les explants sont placés à l'obscurité totale à une température de 28 °C pendant 16 heures et à 22°C pendant 8 heures pendant la phase d'induction des cals.

Les cultures sont repiquées toutes les 5 semaines sur un milieu neuf. Les explants devenus volumineux sont fragmentés.

Lors des repiquages toute partie ayant brunie est enlevée et les explants sont remis sur un milieu frais jusqu'à l'induction de la callogenèse.

Lorsque la callogenèse a lieu, les cals sont transférés au fur et à mesure sur un milieu de prolifération et maintenance contenant 5mg/l de picloram et 1mg/l d'IPA et placés, en lumière diffuse afin d'éviter les variations somaclonales. Lors des repiquages les cals devenus volumineux et nombreux sont fragmentés et replacés sur un milieu neuf.

I.2.6 Observation et expression des cultures

Les cultures sont observées régulièrement tous les 5 à 10 jours. Tout développement ou simple croissance des organes est noté. L'observation porte sur l'évolution des explants, les contaminations, les nécroses, et sur l'apparition de cals.

I.3 Germination des embryons somatiques

Une fois la prolifération des cals embryogènes est importante, ils sont transférés dans deux milieux de germination appelés (GMN et GMN200) (annexe 3). Les deux milieux de germination sont dépourvus de substances de croissance et sont modifiés par la concentration du nitrate d'ammonium du milieu MS (1962). La qualité et quantité d'azote apporté dans les milieux en culture *in vitro* est d'une grande importance. La présence de l'azote dans les milieux a des répercussions dans ; la morphologie, le taux de croissance, l'embryogenèse et la totipotence cellulaire.

I.4 Protocole d'obtention de la suspension cellulaire embryogène

L'établissement de la suspension cellulaire embryogène dépend de la qualité et de la quantité des cals embryogènes. Une observation régulière des cals est nécessaire lors de l'établissement de la suspension. Trois types de cals ont été utilisés. Cette expérimentation a été effectuée sur le cultivar Tegaza seulement.

I.4.1 Inoculation des suspensions cellulaires

Ces essais ont été effectués sur les cals de Tegaza initiés sur milieu gélosé. Ils sont placés alors en milieu liquide agité, la taille des cals au départ était de 0,5 à 1 cm. Cinq à sept fragments de cals sont pesés, hachés à l'aide d'un scalpel, et sont placés dans des erlenmeyer de 250 ml contenant 100 ml de milieu de culture de germination (GMn 200) liquide. Le poids des cals est de 5 et 10 g par erlenmeyer.

Les erlenmeyers sont recouverts avec du papier aluminium stérile, scellés avec du parafilm, et sont ensuite agités quelques secondes à l'aide d'un vortex afin de dissocier les cals, ensuite placés sur un agitateur rotatif à 100 tr/min.

I.4.2 Système de culture utilisé

L'obtention de suspension cellulaire embryogène est établie en système de culture continu et ouvert ; et qui consiste à la division du matériel végétal en deux, tout en renouvelant le milieu jusqu'à l'obtention de la suspension embryogène.

I.4.3 Conditions de culture

Les cultures sont placées en conditions photopériodiques de 16 h dans une chambre de culture dont la température est de 28 ± 2 °C à la lumière et 24 ± 2 °C à l'obscurité. L'agitation des cultures en milieu liquide est assurée par un agitateur orbital à 100 rpm.

I.4.4. Repiquage et amélioration de la qualité

Les cals sont repiqués régulièrement toutes les deux semaines jusqu'à l'obtention d'embryons somatiques individualisés. Les subcultures sont réalisées par filtration du contenu de l'erlenmeyer à travers un tamis de 400µm.

A l'apparition d'agrégats cellulaires, on procède à la filtration, on prélève ensuite les fragments de cals non dissociés en les remettant en culture dans un milieu neuf. La suspension fine est aussi placée sur un milieu neuf à 5mg/l de picloram.

Les filtrations sont effectués sur des mailles de 400µm, les amas (cals, embryons) retenus sur le filtre sont rincés à l'eau stérile, les cals sont replacés sur un milieu neuf et remis pour être dissocier (Figure4).

I.5 Régénération en plantules

Les embryons somatiques ayant germés sur les milieux de germination sont transférés ensuite en tubes contenant le milieu GMP à raison de 20 ml/tube. Les tubes sont ensuite placés dans la chambre de culture avec une photopériode de 16 de lumière. Les repiquages des plantules s'effectuent toutes les 8 semaines jusqu'à l'obtention de plants prêts à l'acclimatation.

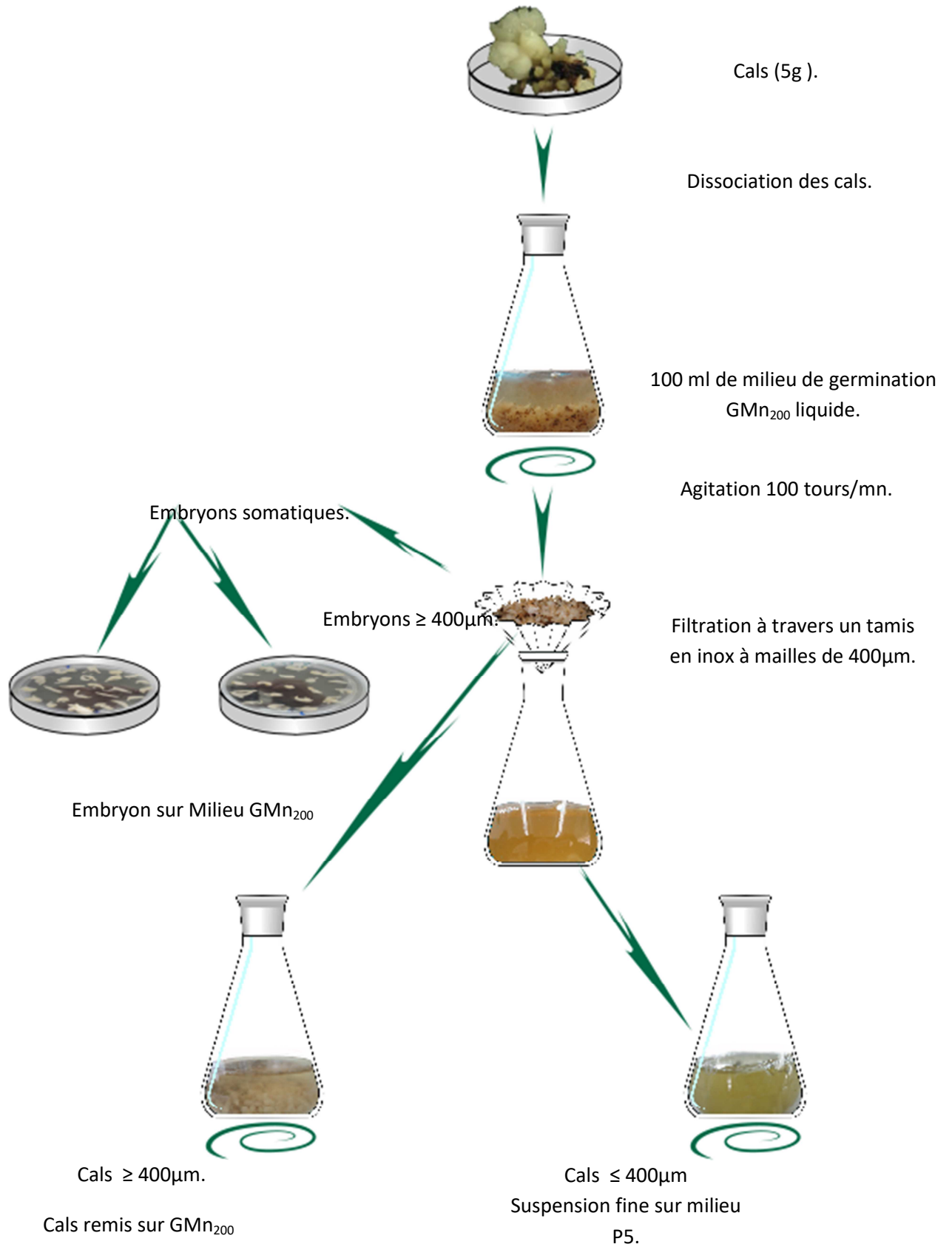


Figure 4 : Protocole d'obtention d'une culture en suspension chez le palmier dattier

II Les techniques histologiques

Elles sont utilisées pour l'examen microscopique des cals à différents stades de leur culture afin de définir l'origine des cals embryogènes et la formation des embryons somatiques.

Nous avons utilisé la technique d'inclusion à la paraffine qui s'est avérée satisfaisante pour notre matériel végétal.

II.1 Fixation des organes

Les fragments de cals sont fixés dans une solution de 100 ml, contenant 4 ml d'une solution de glutaraldehyde à 25%, 50 ml de tempon phosphate, 20 ml d'une solution de paraformaldehyde à 10%, 1g de caffeine dissout dans 26 ml d'eau distillée (Schwendiman, 1988).

La fixation est réalisée pendant 48 h avec un passage de 2 à 3 heures sous vide pour faciliter la pénétration du fixateur et éliminer l'air que contiennent les tissus. Les échantillons sont ensuite rincés puis conservés dans de l'alcool

II.2 La déshydratation des organes

La déshydratation est une opération qui se fait par passages successifs des cals dans des bains d'alcool à des concentrations croissantes

- Alcool 25% pendant 30 minutes
- Alcool 50% pendant 30 minutes
- Alcool 70% pendant 30 minutes
- Alcool 90% pendant 30 minutes
- Alcool 100 % pendant 30 minutes
- Alcool 100 % pendant 30 minutes à 2 heures
- Alcool 100 %: pendant 12 heures (toute la nuit).

II.3 Imprégnation des organes

Elle se fait par un passage des organes dans un mélange d'imprégnation composé d'alcool et de xylol pendant 45 minutes. Les échantillons sont ensuite placés dans trois bains successifs de Xylol.

II.4 Inclusion dans la paraffine

Les échantillons sont placés dans des moules en plastique contenant une quantité d'environ 1.5ml de paraffine. La polymérisation se fait à une température ambiante pendant toute la nuit.

II.5 Confection des coupes

Les coupes sont effectuées à l'aide d'un microtome (leica RM 2125RT) à différentes épaisseurs de 20 à 75 μm et étalées sous forme de rubans sur des lames en verre à l'aide d'un pinceau. Les coupes sont séchées sur une plaque réglée à 60°C.

II.6 Coloration à la fushine basique - Naphthol Blue Black (NBB)

Les coupes sont colorées par une double coloration de l'acide periodique de Schiff (PAS) qui colore en rouge les polysaccharides des parois, le mucus et les réserves amyloides alors que le Naphthol Blue Black (NBB) colore les noyaux en bleu, les nucléoles en bleu foncé et les réserves de protéines en bleu noir.

III Acclimatation

La réussite de l'acclimatation des vitroplants dépend principalement de la maîtrise d'un certain nombre de facteurs, à savoir, les conditions d'acclimatation, le substrat utilisé, le stade de développement des plantules, l'irrigation, la fertilisation et de la protection phytosanitaire.

III.1 Préparation des plantules à acclimater

Après leur sortie du tube les vitroplants sont rincés à l'eau tiède pour les débarrasser de la gélose qui se trouve au niveau des racines. Ils sont ensuite immergés dans une solution de benomyl ou benlate à raison de 1g/l pendant quelques minutes, et sont ensuite rincés à l'eau courante.

III.2 Préparation du substrat

Le substrat utilisé est composé de tourbe, et du sable de rivière respectivement à la proportion de 2/1. Le sable est lavé à l'eau courante, ensuite le mélange est effectué au niveau de la serre, une solution 6g/l de fongicide systémique (Benomyl) est incorporée dans le substrat pour un traitement préventif.

III.3 Mise en pots

Les vitroplants sont placés dans des sachets mesurant 15cm de large et 25 cm de long en matière plastique transparent ou de fertil-pots remplis préalablement avec le substrat traité. Une application de benomyl au niveau du collet est appliquée, le sachet ou le fertil pot est arrosé et placé dans des mini serres fermés chauffantes (27 à .

IV Etude du polymorphisme des peroxydases

IV.1 Matériel végétal

L'expérience a été réalisée sur du matériel issu de culture de tissus sur deux stades; des vitroplants en phase d'acclimatation (durcissement) et de vitroplants adultes (en production), comparées aux cultivars mères. Le prélèvement des échantillons des cultivars mères proviennent de jardins de la région d'Adrar, il s'agit de Tinaceur, Takerboucht el Kahla, Tegaza, Telemsou, Takerboucht essafra, et Tazerzait.

IV.2 Méthode

Le succès de la technique de régénération par embryogenèse somatique reste lié à la conformité des vitroplants des cultivars introduits. Dans ce travail nous utiliserons les marqueurs enzymatiques comme marqueurs précoce de l'évaluation de la conformité, il s'agit des peroxydases.

IV.2.1 Extraction des enzymes à partir des feuilles de palmier dattier

Les feuilles préalablement prélevées (1g), sont découpées et broyées dans 4ml de tampon d'extraction contenant (25ml Tris Hcl 0,2M pH= 8,5, 23mg DTT, 7,5µl β- marcapthoethanol, et 5g Saccharose). Cette opération est réalisée à froid (mortiers maintenus dans la glace), les extraits sont centrifugés à 4°C à 26000g pendant 20min.

Le surnageant, riche en enzyme est récupéré et conservé au froid jusqu'à l'étape de l'électrophorèse.

IV.2.2Préparation de gel

IV.2.2.1 Le choix de gel

On utilise le gel de polyacrylamide car il permet un degré de résolution élevé et présente des avantages pratiques multiples parmi eux, transparence, plasticité, porosité contrôlable,

possibilité de conservation et aussi sa stabilité sur une large échelle de pH, de température et de force ionique. (Fine 1981, Tanaka 1981 in Trabsi 1987)

IV.2.2.2 Préparation du gel d'acrylamide

La technique de préparation du gel a été réalisée selon la méthode décrite par Patel, (1994). Le gel à préparer est constitué de deux types de gels, l'un appelé gel de concentration et l'autre de séparation.

➤ Gel de concentration ou Stacking gel, 2.5%

C'est un gel de forte porosité, donc de faible concentration en acrylamide et bisacrylamide, il permet un meilleur étagement des composés protéiques avant que la séparation proprement dite ne soit entamée. Il permet aussi d'éliminer les particules insolubles indésirables (Trabsi, 1987). Sa préparation est la suivante :

- 2,5ml Acrylamide-bisacrylamide (30%- 0,8%).
- 5ml Tampon Tris Hcl 0,5M pH = 6,8.
- 11,5 Eau distillée.

Après dégazage à l'aide d'une pompe à vide on ajoute :

- 1ml Persulfate d'ammonium (APS) à 1,5%.
- 0,015ml TEMED.

➤ Gel de séparation ou gel de résolution ou Resluing gel, 5%

Il est caractérisé par une faible porosité, donc fortement concentré en acrylamide-bisacrylamide. C'est à ce niveau que la séparation proprement dite s'effectue.

Une solution de 5ml d'Acrylamide-bisacrylamide (30%-0,8%), additionnée de 3,75ml de Tompon Tris Hcl 3M à pH= 8,8 ajusté avec 19,75ml d'eau distillée est préparée. Après dégazage à l'aide d'une pompe à vide on ajoute 5ml d'APS à 1,5% et 0,015ml TEMED.

La solution de polymérisation du gel de séparation est coulée immédiatement après l'addition de l'APS et du TEMED entre deux plaques (l'une en verre et l'autre métallique) sur une hauteur de 5cm environ. Au début de la polymérisation du gel de séparation on ajoute délicatement sur une fine pellicule d'eau distillée pour éviter le contact air/gel qui influe négativement sur la jonction entre les deux gels (gel de séparation et le gel de concentration), après élimination de la pellicule d'eau distillée, on coule la solution de polymérisation du gel de concentration et on place le peigne.

Après polymérisation totale, le peigne est retiré. Dans les empreintes obtenues, sont déposés les extraits protéiques. Les plaques obtenues à la fin sont fixées sur le support de l'électrophorèse à condition que la plaque métallique se trouve contre le support de séparation de la cuve.

II.2.3 Préparation du tampon de migration :

La migration se fait en milieu basique dans un tampon de Tris glycine 0,025M avec un pH= 8,3, Le Tris à 30,28g et la Glycine à 140g sont dissous dans 500ml d'eau distillée, on ajuste le pH à 8,3 avec quelques gouttes d'acide chlorhydrique 1N, on complète le volume à un litre. Lors de son utilisation la solution sera diluée dix fois.

II.2.4 Préparation de l'échantillon

On prépare l'échantillon dans un eppendorf; la préparation est la suivant :

- 20 μ l d'échantillon (l'extrait enzymatique)
- 10 μ l de glycérol à 50%.
- 5 μ l de Bleu de Bromophenol à 1%.

La préparation de l'échantillon peut se faire selon deux manières possibles. La première consiste à mélanger au départ les trois constituants, par contre la seconde consiste en un mélange de l'échantillon avec le glycérol ; le bleu de bromophénol n'est rajouté qu'après dépôt du premier mélange (échantillon + glycérol).

Dans notre cas, nous avons essayé les deux modes de préparation, et nous avons sélectionné le premier, car il donne de meilleurs résultats.

II.2.5 Condition d'électrophorèse

Notre appareil est composé de deux plaques verticales à la fois, chaque plaque porte dix puits ; dans chaque puits 3 à 5 μ l d'échantillon sont déposés à l'aide d'une micropipette.

L'échantillon de la plante mère est déposé dans le premier puits, il est considéré comme témoin, et celui du vitroplant dans le deuxième puits, et ceci pour tous les échantillons.

La solution de migration est ensuite déposée dans la partie basale de la cuve à électrophorèse tapissant environ 2mm la plaque. Elle est également injectée par une pipette dans l'espace séparant (la plaque métallique- gel- plaque de verre) et la cloison de séparation de la cuve jusqu'à remplissage des puits.

L'électrophorèse est effectuée dans un gel discontinu de polyacrylamide en condition non dénaturante à 4C° parcouru par un courant électrique de 30mA, 125V et 4W pendant environ 3 heures.

L'évolution du front de migration est suivie grâce au bleu de Bromophenol. La manipulation est interrompue dès que le front de migration atteint la limite inférieure des plaques de verre. Les deux plaques sont retirées, le gel est séparé de celles-ci, puis déposé dans une boîte de petri de 15 cm environ ou dans une cuve. Le gel est lavé à l'eau distillée puis à l'alcool avant d'être incubé dans une solution de révélation (Figure 5).

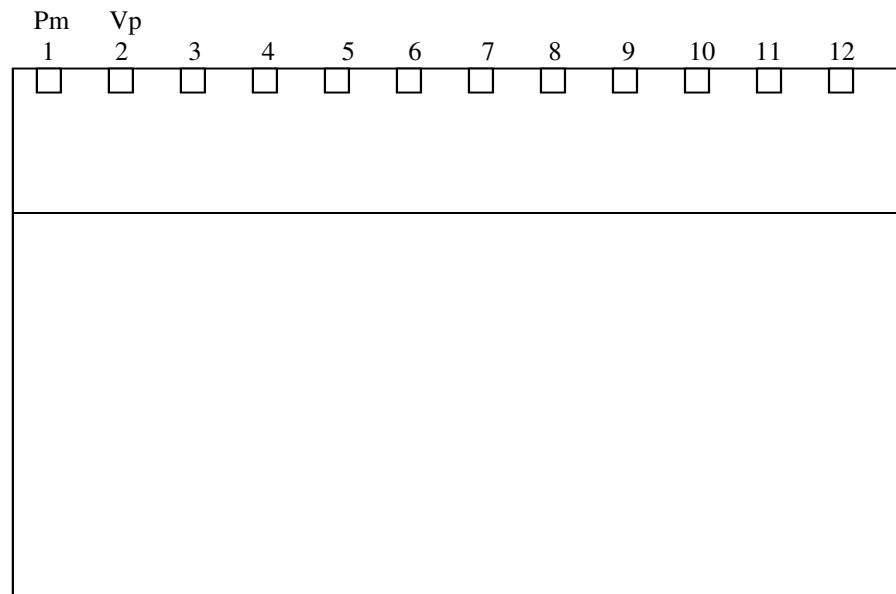


Figure 5: Schéma représentant la disposition des cultivars et leur vitroplants respectifs dans les puits. Pm : cultivar mère, Vp : Vitroplant, 1 et 2 (Tinacer), 3 et 4 (Takerboucht el Kahla, 5 et 6 (Tegaza), 7 et 8 (Tilemsou), 9 et 10 Takerboucht essafra, 11 et 12 (Tazerzait).

II.2.6 Révélation des enzymes

La révélation des systèmes enzymatique est basée sur le principe d'une réaction spécifique (enzyme-substrat), couplées d'une réaction de coloration. Pour les peroxydases le substrat spécifique est l'eau oxygénée (H₂O₂)

Le gel est abondamment lavé avant d'être incubé dans une solution de révélation.

II.2.7 Révélation des peroxydases

Le gel étant transparent et afin que les bandes des isoenzymes deviennent visibles (soient claires), le gel est incubé dans une solution de révélation. La solution de révélation des peroxydases est préparée à partir de deux solutions.

Solution A :

12,5g 3 amino-9-éthylcarbazol.

1,25ml Dimethyl formamide.

Solution B:

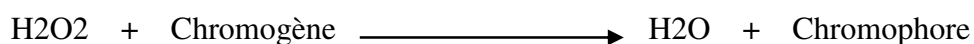
25ml Tampon acétate de Sodium 0,05M PH= 5. (Annexe 4) .

0,25ml Gaiacol 1%.

0,5ml Cacl₂.

Les solutions A et B sont mélangées, 125 µl de l'eau oxygéné à 30V sont ajoutés avant l'incubation à l'obscurité à 37C. Cette température est utilisée pour avoir un maximum de révélation de l'activité peroxydasique ;

Deux réactions principales et spécifiques se déroulent au cours de l'incubation ; la première consiste en la réaction suivante, qui est catalysée par la peroxydase en présence de l'oxygène H₂O₂ (substrat) :



La deuxième consiste en une réaction de coloration. Pour la peroxydase le colorant est le Gaiacol. La réaction est chimique et non enzymatique.

II.2.8 Conservation des tranches de gel :

Pour le gel de polyacrylamide, on utilise l'appareil à séchage sous vide. Le séchage s'effectue après avoir appliqué le gel sur une feuille de cellophane (semi-perméable). A la fin de l'opération, le gel adhère fermement sur ce support et peut être rangé comme une simple photo.

RESULTATS ET DISCUSSIONS :**I Embryogenèse somatique****I.1 Induction de la callogenèse**

Huit à douze explants sont mis en culture par rejet. Les premières proliférations et des excroissances sont observées au bout de 5 semaines de culture (Fig. n°5). Ces formations apparaissent au niveau des marges des feuilles et au sommet du dôme apical (composé de feuilles primordiales), et à la base des bourgeons, puis s'étendent sur tout l'explant.

La formation de cal n'a lieu qu'après 3 à 6 mois de culture, elle est précédée par une augmentation de volume de l'explant. A chaque repiquage, les zones formant le cal ainsi que les parties tendres en croissance végétative sont isolées et replacés en milieu neuf. A ce stade les explants présentent une hétérogénéité de réponse et varie d'un explant à l'autre. L'étude de la callogenèse nous a permis de constater que le temps de réponse à l'induction de cals est différent d'un cultivar à un autre, et même d'un explant à un autre d'un même cultivar.

I.1.1 Temps de réponse à la callogenèse

Les résultats représentés dans l'histogramme ci-dessous donne une idée sur la réactivité des cultivars sur les milieux de culture. Ils représentent les premières apparitions des cals.

Quel que soit le cultivar, les explants qui réagissent, ne produisent pas de cals en même temps. Le cultivar Taqerbucht El kahla a réagi au bout 2 mois de culture seulement, sur un rejet et sur le milieu P12.5. A partir du troisième mois de culture, la callogenèse a été observé que sur le milieu (P12.5), sur les cultivars Tinaceur, Tadelt, et Tanslit. A quatre mois de culture ce sont les cultivars Deglet noir (Touggourt), et Tagaza qui ont réagi sur le milieu P12.5, et Taqerbucht essaфра, Tinaceur, Tadelt, Deglet noir (Ghardaïa) et Tanslit sur le M100, par contre sur le milieu M25 aucun cultivar n'a répondu avant six mois de culture. En général la callogenèse est longue et exige au minimum 6 mois de culture pour la majorité des cultivars quel que soit le milieu utilisé. Certains cultivars sont récalcitrants et exigent un temps plus long tel que les cultivars Ahartan et Degla Beida qui ont réagi au bout de 9 mois de culture sur les deux milieux M100 et P12.5. La réponse à la callogenèse est dépendante de plusieurs facteurs, les explants, les milieux et les génotypes. D'après les travaux antérieurs (Saka et *al.*, 1997) les explants les plus réactifs sont l'apex et les bases de jeunes feuilles. D'autres auteurs rapportent qu'ils faudrait quatre à six semaines pour les explants de type embryons (Tisserat, 1979), seize à vingt-quatre semaines pour les bourgeons axillaires et le bourgeon apical (Sharma et *al.*, 1986 ; Mater, 1986 ; Scoarnec, 1991). Les travaux les plus récents rapportent que le temps de réponse à la callogenèse le plus court est observé avec des concentrations plus faible que le milieu de Tisserat et *al.*, (1979) (Chabane et *al.* 2005 ; Boufis,

2008). Nos résultats confirment les travaux cités puisque la réactivité des explants a été observé à partir du 2^{ème} mois, sur le milieu P12,5 contenant 12,5mg/l de Picloram.



Figure : Evolution des explants vers la callogenèse : a ; Explant d'origine mis en culture, (b) ; accroissement des explants, (c) apparition des cals sur la surface des explants mis en culture, (d) cals embryogènes obtenus (Gx1)

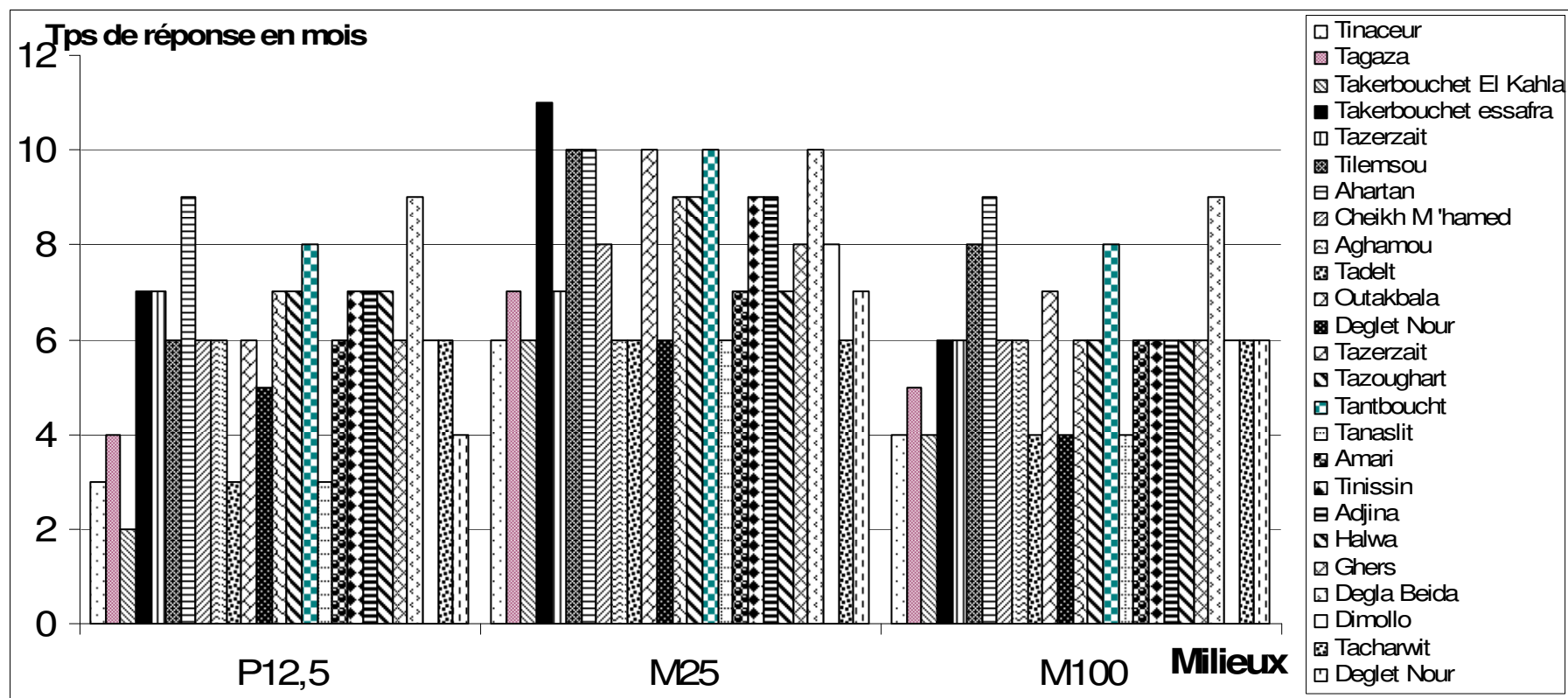


Figure 6 : Temps de réponse à la callogénèse des cultivars introduit en culture *in vitro* en fonction des différents milieux

I.1.2 Influence du milieu de culture

I.1.2.1 Cultivars d'Adrar

Sur les neuf cultivars de la région d'Adrar, les milieux testés ont permis de constater qu'il existe une différence nette sur l'induction de la callogenèse. D'après l'histogramme, c'est le milieu M100 et P12.5 qui donnent les meilleurs pourcentages de cals (77, 69 et 67%) respectivement pour les cultivars Tinaceur, Aghamou et Tegaza (sur le milieu M100), alors que sur le milieu P12.5, les pourcentages obtenus sont (85, 58 et 50) respectivement pour les cultivars Takerboucht el kahla, Tinaceur et Tegaza. Par contre le milieu M25 donne 39 et 31% respectivement pour les cultivars Aghamou et Tinaceur. Les cultivars Takerboucht essafra et Tazerzait ont très peu réagi sur les milieux P12.5 et M25, alors que sur le milieu M100, les pourcentages sont respectivement de 45 et 41%.

I.1.2.2 Cultivars de Ghardaïa :

Sur les six cultivars de la région de Ghardaïa, les milieux testés ont permis de constater qu'il n'existe pas de différence nette sur l'induction de la callogenèse. D'après l'histogramme, le milieu M100 donne des pourcentages de cals de 54,5 et 57% respectivement pour les cultivars Deglet Nour et Outkbala suivi de 49,5% et 45% sur le milieu P12,5 pour les mêmes cultivars, cultivars de haute qualité dattière pour la région. Le M25 donne un pourcentage de 33 pour le cultivar Deglet Nour. Le cultivar Tazoughart réagi peu sur le P12,5 et M25 ($\leq 4\%$), alors que sur le M100, il donne 42% de cals.

I.1.2.3 Cultivars de Touggourt

Sur les dix cultivars de la région testés, les milieux testés ont révélés que c'est le milieu P12,5 qui donne le meilleur pourcentage (62%) pour le cultivar Deglet Nour, suivi de 55% pour le cultivar Halwa. Le milieu M100 donne 58 et 55% respectivement sur les cultivars Tanaslit et Halwa, alors que le M25 donne le meilleur pourcentage 35 et 30 pour le cultivar Halwa et Deglet Nour.

Les milieux testés contenant différentes concentrations de 2,4D (Acide 2-4 Dichlorophénoxyacétique) et de Picloram (Acide 4-Amino-3,4,6 trichloropicolinique) n'ont pas induit un taux de callogenèse similaire, sauf pour le cultivar Halwa (Touggourt) sur les milieux M100 et P12, 5 (55%). Globalement les milieux M100 et P12,5 donnent les meilleurs pourcentages de cals pour l'ensemble des cultivars. Les pourcentages les plus faibles ont été observé sur le milieu M25 chez les cultivars Ghers, Adjina, Dimollo, Amari,

Tanslit (Touggourt), Taqerbucht essafra, Taqerbucht el Kahla, et Tazerzait (Adrar). Pour la région de Ghardaïa, les cultivars ont réagi très peu aux milieux par rapport aux cultivars des deux autres régions (Touggourt et Adrar). Ces résultats montrent que l'effet du génotype semble avoir une relation étroite avec les milieux de culture.

L'utilisation du picloram n'a pas permis une callogenèse plus importante, ni plus rapide pour les cultivars introduits comparés aux résultats précédents, ce qui confirme l'action du picloram sur l'induction de la callogenèse (Saka, *et al.* 1997). Tous les milieux testés ont montré que le taux d'induction de la callogenèse est différent d'un milieu à un autre et d'une région à l'autre. Il existe donc des différences variétales se traduisant par des réponses différentes. Plusieurs auteurs ont rapportés l'effet génotypique (Bagniol *et al.*, 1992 ; Sharma *et al.*, 1984 ; Sharma *et al.*, 1986, Saka *et al.*, 1997, Chabane, 2005, Yatta, 2007, Boufis 2009). En effet, l'embryogenèse peut être induite sur tous les milieux contenant une balance hormonale (Auxines/cytokinines > 1) mais à des taux différents. L'utilisation du 2,4D et du picloram comme agent inducteur de l'embryogenèse somatique est très utile. L'action de ces auxines fait retrouver à la cellule somatique sa totipotence. Toute fois la concentration des auxines dans le milieu s'est avérée importante dans l'induction du cal. Le 2,4D utilisé à 100 et 25 mg/l, et le picloram à 12,5 mg/l, a permis l'induction des cals mais à des taux différents. Les travaux antérieurs de (Abed *et al.*,1994) ont montré que le 2,4D utilisé à moins de 10mg/l donne un taux de callogenèse faible par rapport à la concentration de 100mg/l préconisé par Tisserat, (1979). Nos résultats confirment les travaux de Pannetier *et al.*, (1981), sur le palmier à huile et Yatta 2007 sur le palmier dattier qui montrent que la compétence à l'embryogenèse somatique est obtenue en présence d'une concentration élevée de 2,4D.

Cette expérimentation nous a révélé la formation sur quelques explants d'apex du cultivar Taqerbucht El kahla, des embryons somatiques formés directement sur l'explant et des bourgeons floraux. Ces formations ont été obtenues au bout de deux mois de culture seulement, cependant, elles ne se sont pas généralisées sur les autres explants. Ainsi, à partir de trois explants, des milliers d'embryons se sont produits, mais les paramètres qui les influencent sont restés mal connus. Plusieurs auteurs ont rapporté l'induction des embryons somatiques directe (Tisserat *et al.* 1979). L'apparition de bourgeons floraux a été étudiée et les facteurs qui les influencent ont été déterminés (Masmoudi F. *et al.* 2010). Les travaux de Zhang *et al.* (1992), et Wang *et al.*, (2001) signalent que l'apparition de bourgeons floraux sur des cultures de monocotylédones et dicotylédones est due aux cytokines présentes dans le milieu de cultures.

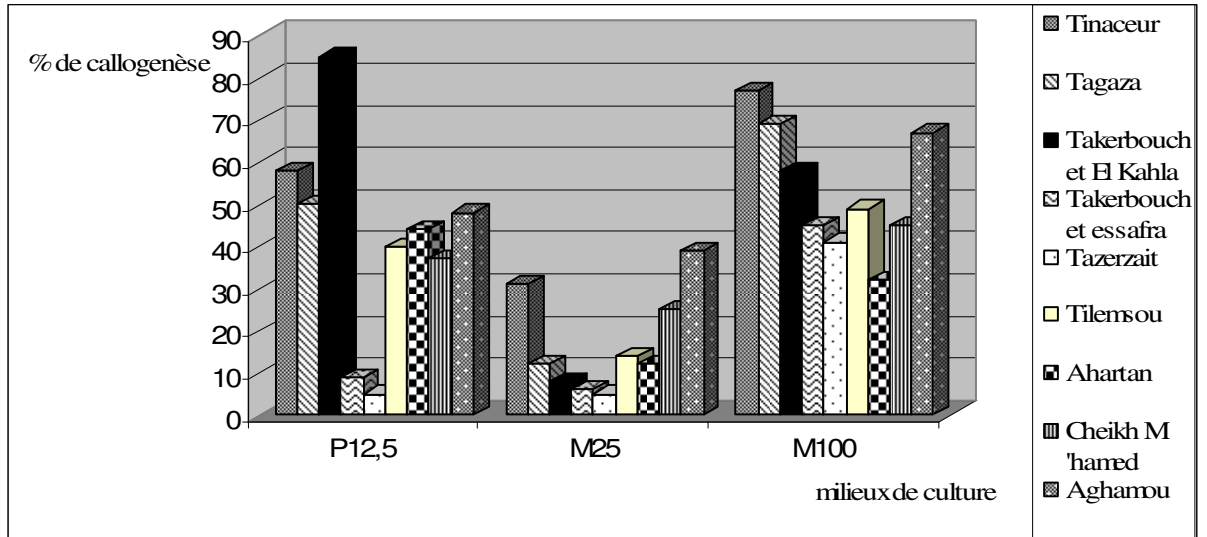


Figure 7 : Pourcentage des cals induits par les cultivars d'Adrar

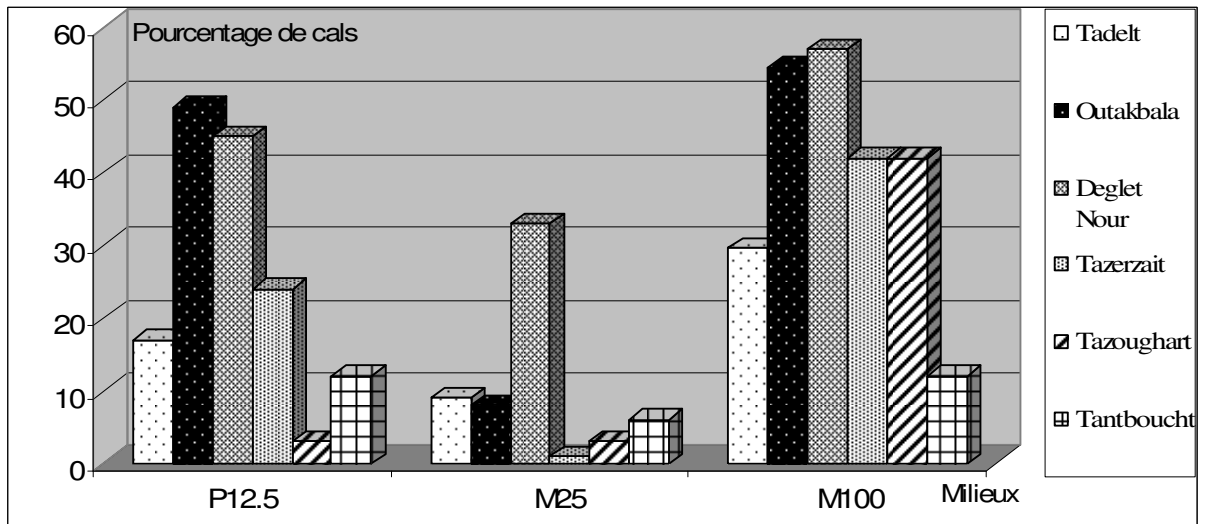


Figure 8 : Pourcentage des cals induits par les cultivars de Ghardaïa

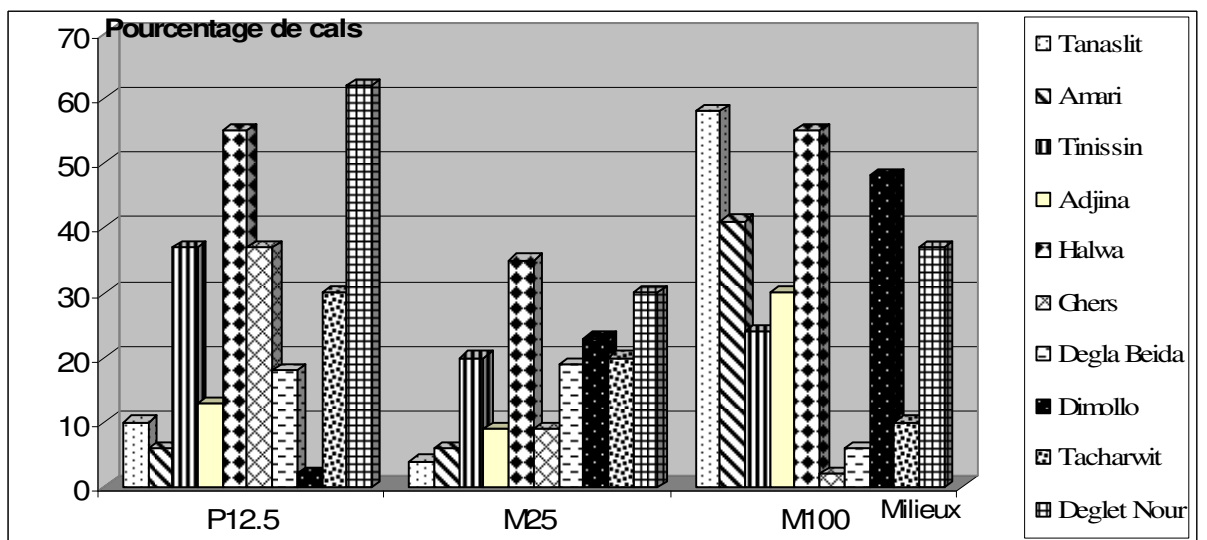


Figure 9 : Effet des milieux de culture sur les cultivars de Touggourt

I.1.3 Texture et structure des cals

La réponse des explants est assez hétérogène. Pour un cultivar, un même explant, les mêmes conditions, et un même milieu, quatre types de cals sont obtenus (Tableau 6).

Tableau 6: Aspect des cals induits sur les milieux de cultures

Texture	Structure	Couleur	développement
Cal translucide	Tissus hyperhydriques	beige à brun	Se désagrège complètement
Cal nodulaire compact	Gros nodules compacts	Jaunâtre à brun	Ne prolifère pas ou donne des racines
Cal nodulaire friable	nodulaire et friable de taille \geq à 1mm	beige clair	Prolifère et donne des embryons somatiques qui évoluent en plantes
Cal nodulaire friable	Granulaire et friable < 1mm	blanc	Prolifère très bien et donne des embryons qui évoluent en plantes

Ces cals sont observés quel que soit le milieu et quelques soient les cultivars. Ils sont différents par leur texture et leur croissance. Ces cals peuvent coexister sur un même explant. Seuls les cals nodulaires friables de couleur blanche à brun de structure plus ou moins compacts à granulaires, sont embryogènes. Les cals hyperhydriques sont souvent dus à une vitrification de certains explants au début de l'induction qui finissent par se désagréger au fur des repiquages. Les cals nodulaires compactes de grandes tailles n'évoluent pas ou donnent souvent naissances à des racines. Par contre le cal friable obtenu tardivement, demeure très satisfaisant pendant la phase de prolifération.

I.1.4 Prolifération des cals et maturation des embryons

L'acquisition et le maintien des aptitudes des cals vers une embryogenèse nécessitent la présence d'une auxine. Le transfert sur le milieu P5 contenant 5mg/l de picloram et 1mg/l d'IPA, des cals primaires issus des milieux de culture contenant 12,5 mg/l de picloram (P12,5) et 25 à 100 mg/l de 2,4D (M25 et M100) associés respectivement à 1 et 3mg/l d'IPA, a permis

d'obtenir des cals de structure homogène, nodulaire et friable (Fig.10 (A) et (B)) quel que soit le cultivar et quel que soit le milieu de départ.

I.1.5 Organisation cellulaire

L'étude histologique des cals sur les milieux d'induction montre des zones méristématiques en différenciation. Les cellules présentent une accumulation importante en protéines de réserve et de polysaccharides ainsi que des noyaux très denses (Fig.11 A).

Les coupes faites sur le cal à structure nodulaire friable en milieu de maturation, montre des cellules densément colorées et une accumulation de protéines de réserves. Ces cellules sont en phase de dédifférenciation. Ces coupes faites sur le cal nodulaire en phase de maturation (figure11 B), montre aussi des cellules en division, uniformément colorées et largement vacuolisées et entourées de cellules prévasculaires. Ces cellules s'organisent en zones concentriques pour former les proembryons (figure11 C). Ceci confirme l'existence d'une zone de cellules ayant de grande capacité morphogénétique. Sané, (2006), a observé une activité intense de cellules qui s'organise au niveau des cellules prévasculaires (procambiales). Cette étude a aussi montré la détection du 2,4D au niveau des cellules qui vont se réactiver ainsi que sa localisation au niveau des noyaux de ces cellules.

En théorie, une cellule somatique, devrait pouvoir se dédifférencier et ensuite se différencier pour se reproduire en plante entière. Toonen et *al.* (1994) ont montré que n'importe quelle cellule différenciée après « dédifférenciation » pouvait donner naissance à un embryon somatique.

D'après Carman, (1990), l'embryogenèse somatique dépend de la présence de cellules qui présentent des aptitudes à l'embryogenèse. Chez certaines espèces comme les Poacées la capacité à produire un cal semble être spécifique aux cellules méristématiques de la plante (Maddock, 1985), alors que chez les monocotylédones herbacées, l'embryogenèse est à l'origine de cellules individualisées prédéterminées (Sharp et *al.* 1982). Par contre chez le palmier à huile, le cal se développe à partir de cellules de la zone méristématique prévasculaire qui peuvent être localisées dans différents organes (feuilles, inflorescences, embryons zygotiques) (Duval et *al.* 1995).

I.1.6 Processus d'asynchronisation des embryons somatiques

Le processus de l'embryogenèse conduit le plus souvent à une asynchronisation au sein d'une même culture. Le transfert des cals non dissociés en milieu de germination, montre une large hétérogénéité du matériel végétal en régénération qui conduit à une exploitation insuffisante des proembryons et des embryons (Figure 12 A et B). Ce phénomène a été décrits par plusieurs auteurs (Tisserat, 1982 ; Sharma et *al.*, 1984 et 1986). Pour une meilleure synchronisation des différents stades de développement, plusieurs auteurs ont préconisés le passage par milieu liquide pour une homogénéisation des stades de développement (Daguin et *al.*, 1988, Fki 2005).

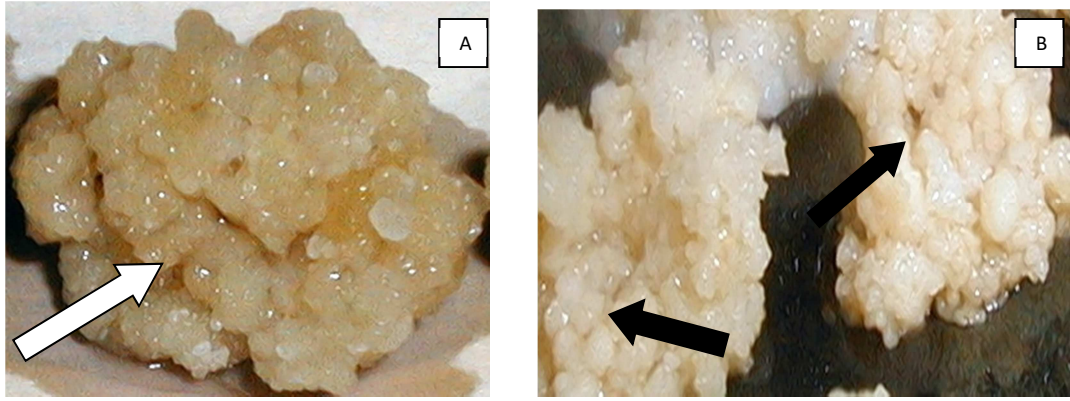


Figure 10 : Type de cals embryogènes obtenus : (A) flèche blanche montre le cal nodulaire compact; (B) flèche noir montre le cal nodulaire friable de couleur blanche à beige (GX 10)

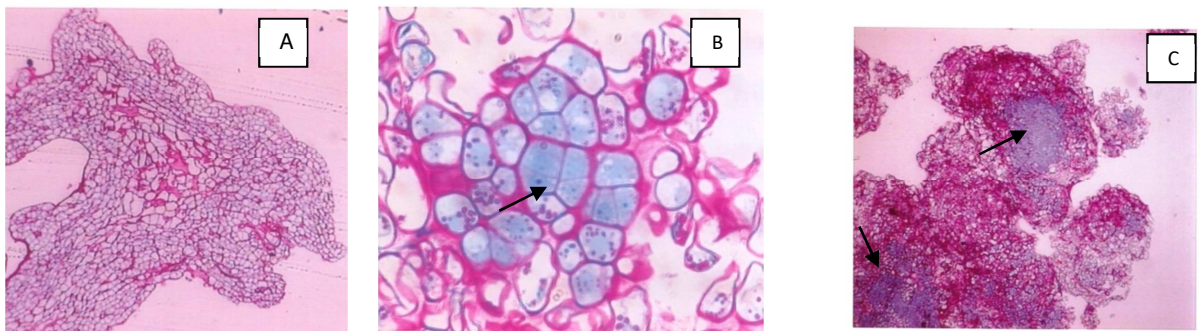


Figure 11 : Coupe histologique des cals embryogènes sur milieux d'induction et de maturation, (A) Cal à structure nodulaire friable : Cellules densément colorées et accumulation des protéines de réserves (x4); (B) cal à structure nodulaire friable en milieu de maturation : Cellules en division, uniformément colorées et largement vacuolisées entouré de cellules pré vasculaires (x40); (C) cal nodulaire en phase de maturation : organisation des amas cellulaires sphériques indiquent la formation des proembryons (x40).

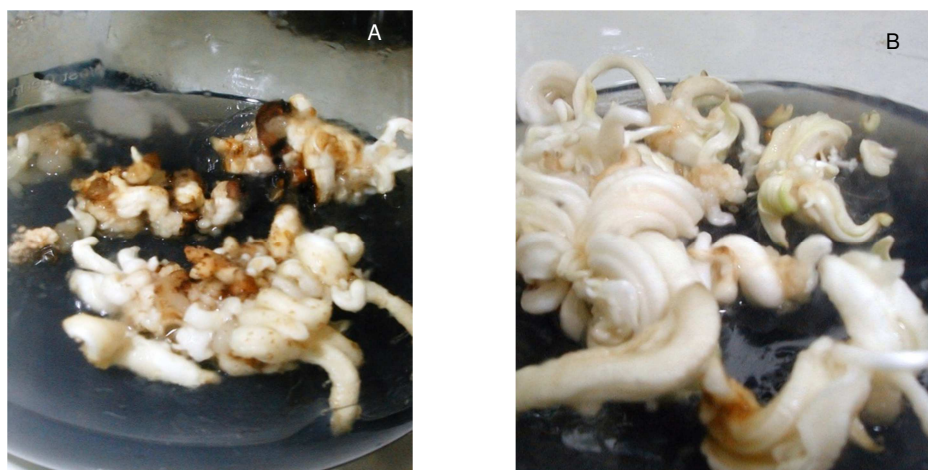


Figure 12 : Développement asynchrone des embryons somatiques en milieu de germination (A) embryons accolés et (B) touffes d'embryons en germination (G X 2)

I-2 Initiation de la suspension cellulaire embryogène

Afin d'obtenir une meilleure homogénéité des différents stades d'évolution des embryons somatiques, nous avons appliqué au processus de régénération de palmier dattier une étape de culture en milieu liquide agité en phase germination. Ce passage par milieu liquide agité assure l'individualisation des proembryons (ce qu'un transfert direct sur milieu solide rend impossible) et conduit à une meilleure maturation du matériel embryonnaire en vue des étapes ultérieures de régénération. En effet, lors de la régénération un nombre important d'embryons somatiques se trouvent accolés en amas, en plus de la coexistence de nombreux nodules embryonnaires à différents stades, c'est ce qu'on appelle l'asynchronisation des embryons somatiques. Ce type d'évolution conduit à une perte importante d'embryons et par la suite à de plants régénérés (Sharma 1986).

I.2.1 Influence du type de cals sur l'obtention de la suspension embryogène

Le choix du cal pour établir une suspension embryogène est important. Les cals obtenus sont souvent hétérogènes, il existe sur un même cal différentes structures et textures. Pour cela, des prélèvements effectués lors de chaque repiquage ont permis de préciser l'évolution des embryons en fonction de la structure des cals, de la densité et du temps de passage en milieu liquide agité.

Tableau 6 : Effet du type de cals sur l'initiation de la suspension cellulaire embryogène

Types de cals	Taux de multiplication	Taux d'embryons
Cals nodulaires compacts	++	++
Cals compacts	+	-
Cals granulaires friables	+++	+++

Prolifération : + Stable ; ++ Doublé ; +++ Triplé et plus

D'après les résultats illustrés dans le tableau 6, on remarque que les cals nodulaires compacts présentent un taux de multiplication très faible de 0,5 à 2 avec une présence de quelques amas cellulaires en suspensions. Les cals compacts ont très peu ou pas du tout proliféré et n'ont donné aucune structure embryogène, par contre les cals friables de structures granulaires friables qui portent de nombreux proembryons translucides ont montré l'aptitude à reformer des colonies de nodules, leur prolifération a triplé, voir quadriplé. Ce sont ces cals

qui conviennent au transfert en milieu liquide et ont une aptitude à la formation d'embryons somatiques.

Les essais effectués sur les trois cals ont montrés des différences remarquables sur l'établissement des suspensions cellulaires. Le volume des cellules pour les cals de structure nodulaire a doublé, alors que les cals friables, le volume a atteint quatre fois plus par période de deux semaines de repiquage, par contre les cals compacts sont restés stables tout au long des repiquages. Nous pouvons avancer que seules les cellules issus des cals granulaires et friables se multiplient relativement facilement dans un milieu liquide et évoluent vers la formation d'embryons somatiques et par la suite en plantules. Les travaux de Tisserat (1982) montrent que les cals friables issus de tissus foliaires des bourgeons végétatifs sont en réalité composés de nodules et que ce sont ces derniers qui sont dotés d'un pouvoir embryogène. Les résultats obtenus à travers cette expérimentation corroborent avec les travaux de Tisserat (1982), Daguin et Letouze (1988) et de Lachqer sillou (1989), car ce sont bien les cals nodulaires ou granulaires très friables qui ont présentés un pouvoir embryogène dans notre essai.

I.2.2 Influence de la densité sur l'établissement de la suspension cellulaire

D'après la courbe de croissance, on remarque que le poids des cals utilisé à raison de 5g a donné une prolifération plus importante que celle de 10g quel que soit la souche utilisée dans le milieu GMN200. Les cultures en suspension inoculées à 5g prolifèrent et donnent des taux de multiplication allant jusqu'à 15 fois la concentration de départ à la fin de la suspension. On note une croissance en phase exponentielle après la deuxième semaine et qui s'arrête au bout de la 5^{ème} semaine avec une phase stationnaire.

Le rendement de la suspension cellulaire embryogène inoculée à 10g est de 4 fois la concentration initiale avec une croissance qui s'est arrêté après 3 semaines de culture. Après la 5^{ème} semaine, c'est-à-dire au troisième repiquage, le rendement a commencé à chuter pour les suspensions inoculées à 10g. Cette perte de la compétence des cellules à l'embryogenèse est due probablement à une agglutination des cellules mortes provenant de la séparation des agrégats qui pourraient exercer une inhibition du processus d'embryogenèse. Hari, (1989) montre qu'il existe une relation linéaire entre la densité cellulaire à l'inoculation et le nombre d'embryons produits. Les cultures cellulaires à densité faible ou élevée, n'expriment pas l'ensemble de leurs

capacités embryogènes. La densité cellulaire est un paramètre qui influence la croissance des suspensions cellulaires (Hari, 1990 ; Ozawa et Komamine, 1989).

Georget *et al.* (2000), rapporte que la qualité d'une suspension cellulaire embryogène diminue avec le nombre de repiquages, en effet nos résultats ont permis de montrer que les suspensions cellulaires inoculées à 5g se sont arrêtées de croître après la 5^{ème} semaine. Ceci se traduit par une diminution du taux de croissance et un faible potentiel de régénération, en raison, de la prédominance de cellules denses riches en amidon dont la croissance est rapide. Nos résultats ont permis de noter que la quantité et la structure des cals sont importantes pour démarrer une suspension cellulaire embryogène.

On remarque qu'après filtration des structures embryogènes à l'aide d'un tamis de 400µm, des embryons structurés et bien individualisés, placés sur milieu de germination ont tous germés, alors que les structures plus fines placés sur milieu P5 contenant 5mg/l de picloram et 1mg/l D'IPA (Fig.9, c) ont redémarré une culture embryogène nouvelle.

Fki, (2005) suggère que les mailles supérieures à 500 µm de diamètre permettent la formation de petits groupes d'embryons difficiles à séparer alors que des mailles de 200 à 500 µm de diamètre conduisent au développement d'embryons en majorité individualisés, ce qui est confirmé par nos résultats.

Nos résultats concordent aussi avec les travaux de Georget *et al.*, (2000) qui donnent une description histologique détaillée des différentes parties d'une suspension cellulaire embryogène de bananier, de leur développement dans le temps et de leur potentiel embryogénique.

En effet, une suspension cellulaire embryogène de bonne qualité est caractérisée par :

- ❖ la présence d'une grande proportion (>80%) d'agrégats de cellules embryogènes en prolifération (Figure 14 b).
- ❖ Les suspensions blanchâtres ne sont pas désirables car ceci est souvent une indication de la présence d'une forte proportion de cellules non régénératrices riches en amidon,
- ❖ Une précipitation rapide des cellules (moins d'une minute) lorsque la suspension est retirée de l'agitateur orbital, indiquant une faible proportion de débris et cellules vides (Fig 14 a),
- ❖ Un taux de multiplication de 1,5 à 2 par période de 2 semaines entre repiquages,

Par rapport aux milieux gélosés, les milieux liquides sont nettement plus favorables pour la différenciation et la croissance des structures embryogènes, d'une part en créant de meilleures conditions d'échange de métabolites avec celles-ci et d'autre part en assurant la dilution des polyphénols cytotoxiques sécrétés par les tissus embryogènes.

D'après les résultats obtenus illustré dans la figure (14), en un mois, alors qu'il serait possible d'obtenir qu'une dizaine d'embryons à partir de 5g de cals par le biais des milieux gélosés, on pourrait produire des milliers en milieu liquide. Ces résultats sont en concordance avec l'étude d'une suspension de cellules de culture de bananier et bananier plantain qui a montré que sur 1ml on pourrait produire de 100 à 300 000 embryons dans les conditions les plus favorables (Strosse et *al.* 2003). L'utilisation du milieu liquide s'est avérée comme une étape importante pour augmenter rigoureusement la productivité de l'embryogenèse somatique (Fki, 2011).

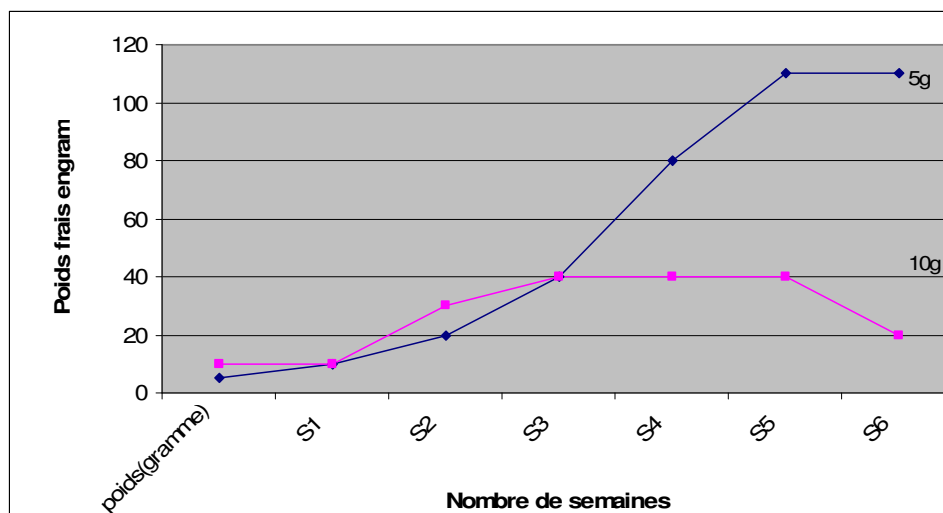


Figure 13: Evolution de la croissance des cals en suspension en fonction du poids et du temps

I.2.3 Evolution de l'embryon somatique

Après chaque subculture à raison de 2 semaines, les embryons sont répartis suivant leurs formes et leurs grandeurs. Les embryons somatiques connaissent les mêmes stades de développement morphologiques que traversent habituellement les embryons zygotiques à savoir ; le stade globulaire, cordiforme, torpille et cotylédonaire (Stolartz et *al.*, 1998). Le critère qui permet de reconnaître un embryon somatique est certainement sa structure bipolaire, qui développe précocement et simultanément un méristème caulinaire et un méristème racinaire (Fig15).

Les prélèvements effectués lors de chaque repiquage des suspensions embryonnaires nous ont permis de préciser l'évolution des embryons en fonction du temps de passage en milieu liquide.

Quatre stades bien distincts allant de l'état globulaire typique au stade d'embryon mature parfaitement différencié et structuré ont été répertoriés (Figure 15). Ces derniers sont classés en quatre classes répertoriées en embryogenèse (Fki, 2005):

Stade I : Embryons de forme globulaire d'un diamètre compris entre 400µm et 0.25cm.

Stade II : Embryons de forme torpille d'un diamètre supérieur à 0.25µm et inférieur à 0.5cm.

Stade III : Embryons cordiformes d'un diamètre supérieur à 0.5cm et inférieur à 1cm.

Stade IV : Embryons dicotylédonaire supérieur à 1cm.

Stade 1 : stade globulaire

La réponse positive des cals nodulaire à friable en milieu de germination liquide agité se manifeste dans un premier temps par la formation de petits nodules, bien arrondis à contour bien délimité de couleur blanc nacré. Ce stade est observé après deux à trois semaines de culture.

Stade 2 : stade cœur ou cordiforme

Ce stade peut être repéré au terme de quatre à six semaines de culture. Les embryoïdes manifestent, en début de développement, une structure rappelant le stade cœur chez les Dicotylédones. Ces embryoïdes sont caractérisés par une symétrie sensiblement axiale car le développement du cotylédon à l'origine de la feuille cotylédonaire est encore très faible.

Stade 3 : stade post-globulaire ou torpille

Les nodules blancs nacrés correspondant en fait à des proembryons qui s'allongent et prennent une allure piriforme caractéristique du stade de maturation appelé torpille, il se manifeste au bout de neuf semaines de culture.

Stade 4 : stade embryon structuré ou cotylédonaires

Ce stade prend forme à partir de la 12^{ème} semaine de culture. Le développement du cotylédon à l'origine de la feuille cotylédonaire est très important. Le méristème racinaire bien visible ne se montre pas encore très actif compte tenu du faible développement de la racine.

La récolte successive des embryons somatiques structurés et de même stade assure la synchronisation du développement embryonnaire et le maintien de la pérennité de la suspension cellulaire. En effet, les embryons obtenus apparaissent dans une première étape comme de petits nodules blancs nacrés, très caractéristique des embryons somatique obtenus chez *Bambusa beecheyama* (Yeh et Chang, 1986), chez le palmier à huile (Ahee et *al.*, 1981), chez le théier (Frisch et Camper, 1987) et chez le palmier dattier (Daguin et Letouze, 1988 ; Lachqer Sillou, 1989 et Zaid, 1989, Fki 2005). Après deux semaines de culture en milieu agité et en lumière, les embryons somatiques matures présentent une structure piriforme, ronflée à la base et effilée au sommet comparable aux embryons matures décrits par Lachqer Sillou (1989) sur les fragments de cœur de rejet et par Zaid (1989) qui décrit l'embryon mature comme étant une petite languette blanchâtre (Fig 16, A). Lachqer sillou, (1989) rapporte aussi que la phase lumineuse est indispensable pour l'induction de l'embryogenèse somatique. En effet, les embryons différenciés observés en phase de maturation à l'obscurité s'allongent et ne germent pas, mais dès qu'ils sont sous condition de lumière, ils germent automatiquement, et évoluent en plantes (Fig 16, B et C).

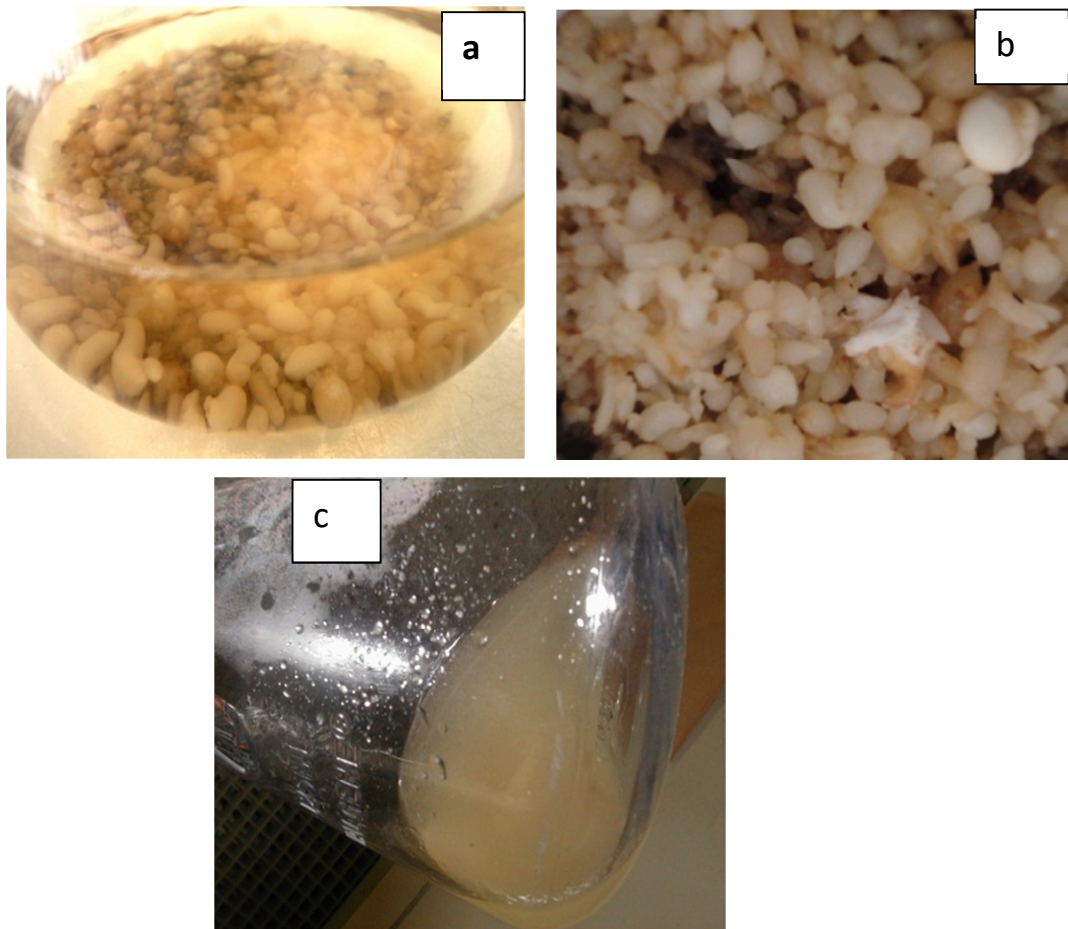


Figure 14: Suspension embryogène obtenue : (a) Proembryons en suspension, (b) proembryon et embryons somatique bien structuré après filtration à travers un tamis 400 µm ; (c): culture de cellules en suspension fine < 400 µm (Gx1).



Figure 15 : Différents stades de l'embryon somatique observé en milieu liquide: de gauche à droite **Stade I** globulaire, **Stade II** cordiforme, **Stade III** torpille, **Stade IV** cotylédonaires (Gx3).



Figure 16 : Différentes formes et stade de développement de l'embryon et apparition des feuilles cotylédonaire ; a : embryon en forme de languette (**Gx2**), b, développement de la gaine et apparition de la racine (**Gx3**) ; c : plantule en forme de poireau avec racine et feuilles (**Gx1**)

I.3 Germination des embryons somatiques.

I.3.1 Influence de la source d’azote sur la germination des embryons

Pour le palmier lorsque les proembryons sont prélevés et transférés sur milieux de germination sans substances de croissance, les proembryons continuent à se multiplier. Dans le même temps, quelques proembryons s’allongent puis commencent à germer. D’autres prennent un aspect vitrifié et se nécrosent par la suite (tableau 7). Cette expérimentation nous a permis de confirmer que l’azote apporté sous forme d’ammonium (NH₄⁺) ou de nitrate (NO₃⁻) joue un rôle important dans le développement et la croissance des plantes en culture *in vitro*. En effet des embryons somatiques placés sur milieu contenant une forte concentration en nitrate de potassium (MS, 1962), ont montré une vitrification importante (tableau 8 et figure 17 A), alors que les embryons placés sur milieu où la concentration a été réduite à 200mg/l, le phénomène n’a pas été observé (tableau 8, figure 17 B).

Tableau 7: Effet de l’azote sur la germination

Milieux	Temps de réponse à la germination	Aspect des embryons germés
GMN	6 mois et plus	Vitrification importante, feuilles plus ou moins chlorophylliennes hyperhydriques
GMN200	3 à 6 mois	Partie aérienne chlorophyllienne ne présentant aucun signe de vitrification

Tableau 8 : Influence de l’azote sur le pourcentage de vitrification

Milieux	Nombre d’embryons	% de vitrification
GMN	50	25
GMN200	50	5

Nous avons observés que seuls les embryons placés sur milieu MS (1962) devenaient vitrifiés. Nos résultats corroborent avec l’hypothèse du milieu riche en ion NH₄⁺. Ce phénomène n’apparaît pas sur milieu appauvri en azote ammoniacal.

En effet les deux formes d’azote minéral apportées dans les milieux de culture sont les nitrates et l’ammonium. La majorité des plantes utilisent indifféremment les deux formes mais certaines espèces présentent des préférences marquées. Des vitroplants de palmier cultivés en milieu liquide riche en nitrate d’ammonium ont mis en évidence la nette préférence aux ions ammonium (Refouvelet, 1992). Comme décrits par divers auteurs (Daguin et Letouze, 1984, Phan et Letouze 1983 ; Daguin 1984 ; Kevers et *al.* 1984), le

problème de vitrification est fortement corrélé à un excès d'ammonium dans les milieux. Ce phénomène est lié à une réponse de détoxification vis-à-vis de l'ammonium (Givan 1979), ou la présence d'un excès en ammonium qui joue un rôle particulier au niveau de la chaîne de biosynthèse des lignines ((Daguin et Letouze, 1985).

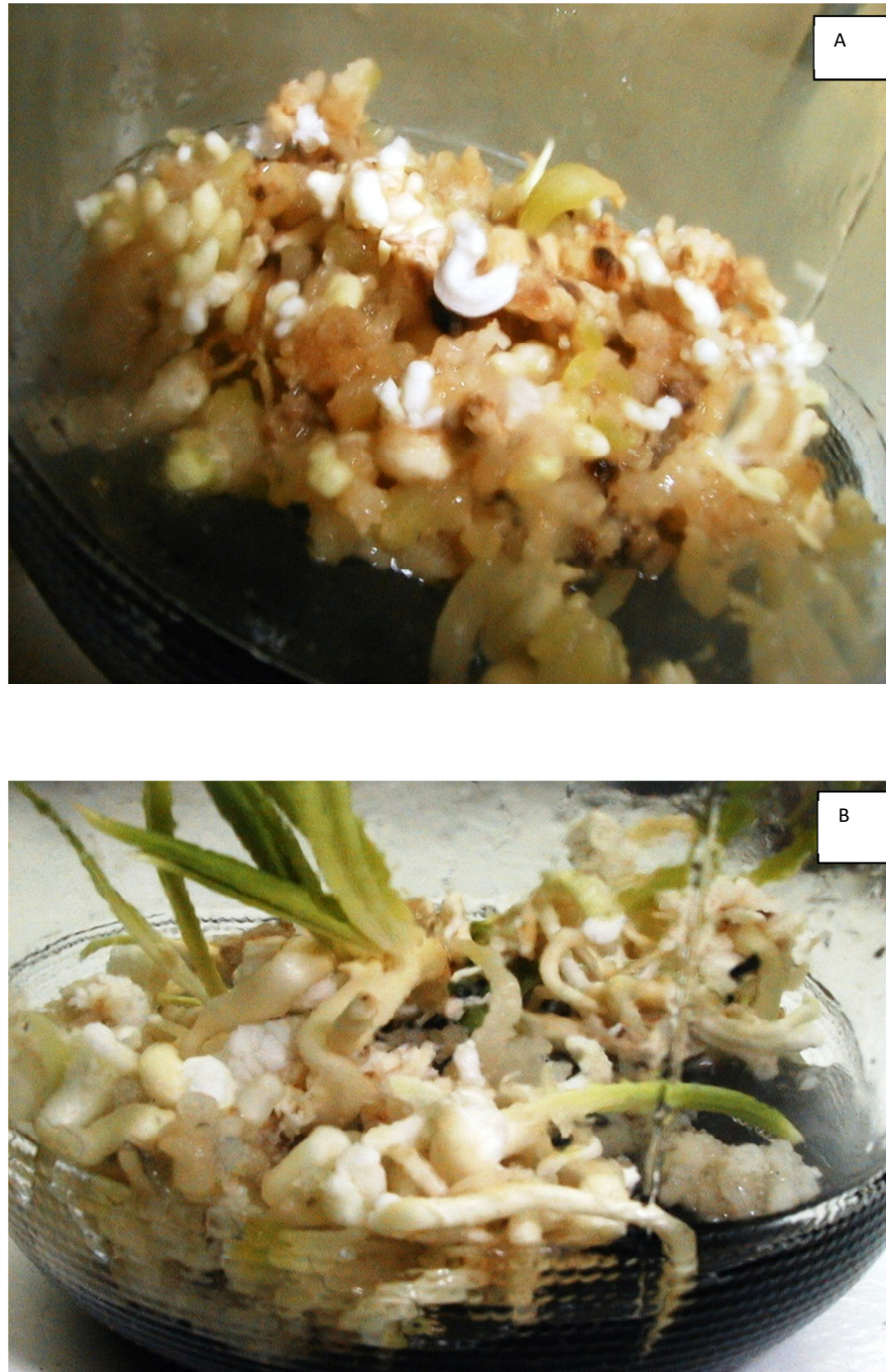


Figure 17 : Phénomène de vitrification : (A) embryons vitrifiés observé sur milieu GMN, (B) Absence de vitrification des embryons somatiques en germination sur milieu GMN200 (Gx1)

I.3.2 Influence du milieu liquide sur la germination des embryons

La germination des embryons somatiques a lieu quel que soit le processus de régénération. Toutefois, l'introduction d'un passage en milieu liquide a permis l'individualisation de tous les pro-embryons et la détermination des stades de maturation de ces derniers, ce qu'un transfert direct sur milieu de germination gélosé rend impossible.

Après transfert direct sur le milieu de germination, huit semaines sont nécessaires pour observer un début de germination, alors qu'après passage sur milieu liquide, la germination est obtenue après la 2^{ème} semaine avec un taux de germination plus important.

Les embryons somatiques après passage en milieu agité, placés sur milieu gélosé germent jusqu'à atteindre un taux de 70% au bout de la 24^{ème} semaine. Alors que la germination des structures embryogènes sans passage par milieu liquide, atteint 30% au bout de 24 semaines.

Comme décrits par plusieurs auteurs, il existe dans une même culture, des stades différents de l'embryon somatique (Tisserat 1982 ; Sharma *et al.*, 1984 et 1986), qui se traduit par une asynchronisation. En plus du phénomène de vitrification souvent observé en fort pourcentage sur le milieu GMN, la séparation des plantules est une opération délicate lors des repiquages, un nombre important de plantules se casse au niveau du collet. La présence de touffes de plantules ou amas d'embryons diminuent considérablement le nombre de plantules régénérées (Figure 19). Par contre les embryons produits en milieu liquide, leur germination est plus rapide et plus importante et montre une croissance individuelle de près de 95% avec un taux de reprise de 100%. Le passage supplémentaire que nous avons introduit, nous a permis d'améliorer grandement les pourcentages de régénération par une meilleure synchronisation des structures embryogènes (Figure 20).

Nos travaux montrent que les embryons somatiques sont produits par les cals friables et nodulaires. Nous avons pu induire à partir de 50 souches un nombre de 2394 embryons matures qui ont donné un nombre de 2318 de plantules régénérées. Transférées sur un milieu enrichi en saccharose à une concentration de 60g/l, et additionnés de 1mg/l d'AIB, ont donné des plantules capables d'être transférées en acclimatation (Figure 20).

De nombreux auteurs ont obtenu la germination des embryons somatiques sur un milieu de culture dépourvu de substance de croissance. Tisserat et De Mason (1980) et Sharma *et al.* (1984), Daguin et Letouze, (1988) ainsi que Reynolds et Murashige (1979) et Lachqer Sillou (1989). La maturation des proembryons en embryon somatique puis la germination de ces derniers peuvent également être obtenus sur le même milieu de germination solide. Tous les stades de développement peuvent être observés dans une culture. Cependant, une certaine

compétition paraît exister entre les embryons ou un certain nombre se nécrosent et dégèrent ; notamment les moins différenciés (Daguin et Letouzé, 1989). Ces nécroses en phase de germination peuvent provoquer des pertes importantes du matériel en régénération lorsque la densité en embryons est importante et le temps de repiquage n'est pas respecté (plus de deux mois au maximum). Reuveni et Kipnis (1974), Fisher et Tsai (1979), ont remarqué que le brunissement inhibe la croissance des organes du dattier et entraîne leur dépérissement. En réalité, ce phénomène n'est pas particulier au palmier dattier, plusieurs auteurs l'ont rapportés (Schroeder, 1970 ; Smith et Thomas, 1973 ; Wang et Huang, 1976). Il est très fréquent dans les cultures de nombreuses espèces de palmiers ; le palmier à huile (Jones, 1974) et le cocotier (Corley et al, 1976), il résulte de l'oxydation de polyphénols et de la formation des quinones qui sont toxiques pour les tissus.

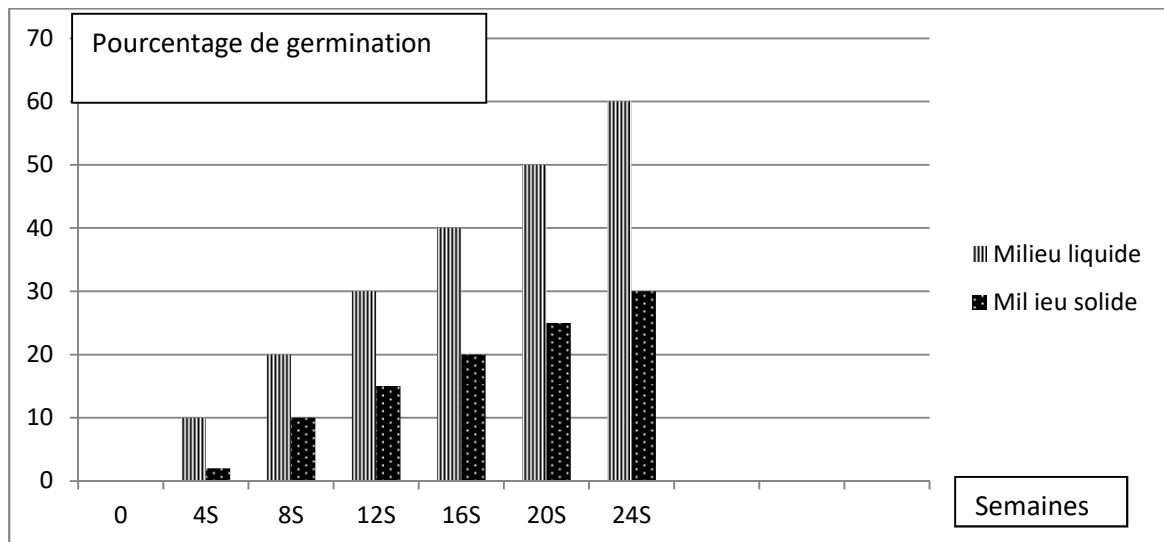


Figure 18 : Effet du milieu liquide sur le nombre d'embryons ayant germés en fonction du temps de culture

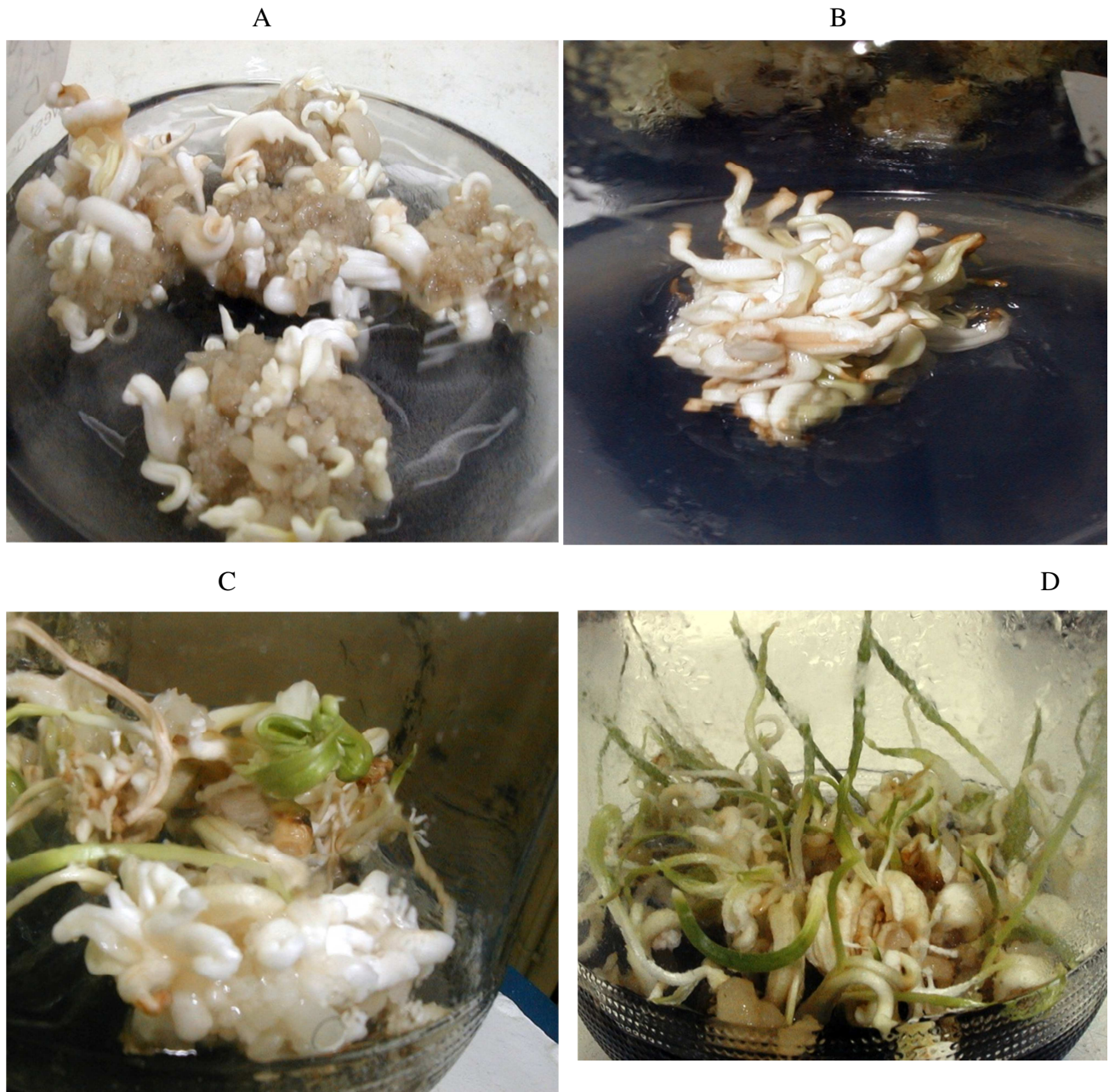


Figure 19: développement asynchrone en milieu de germination (A) Amas d'embryons à différents stade, (B) touffes d'embryons en germination (C) Touffes de plantules (C) touffes d'embryons en germination (Gx1)

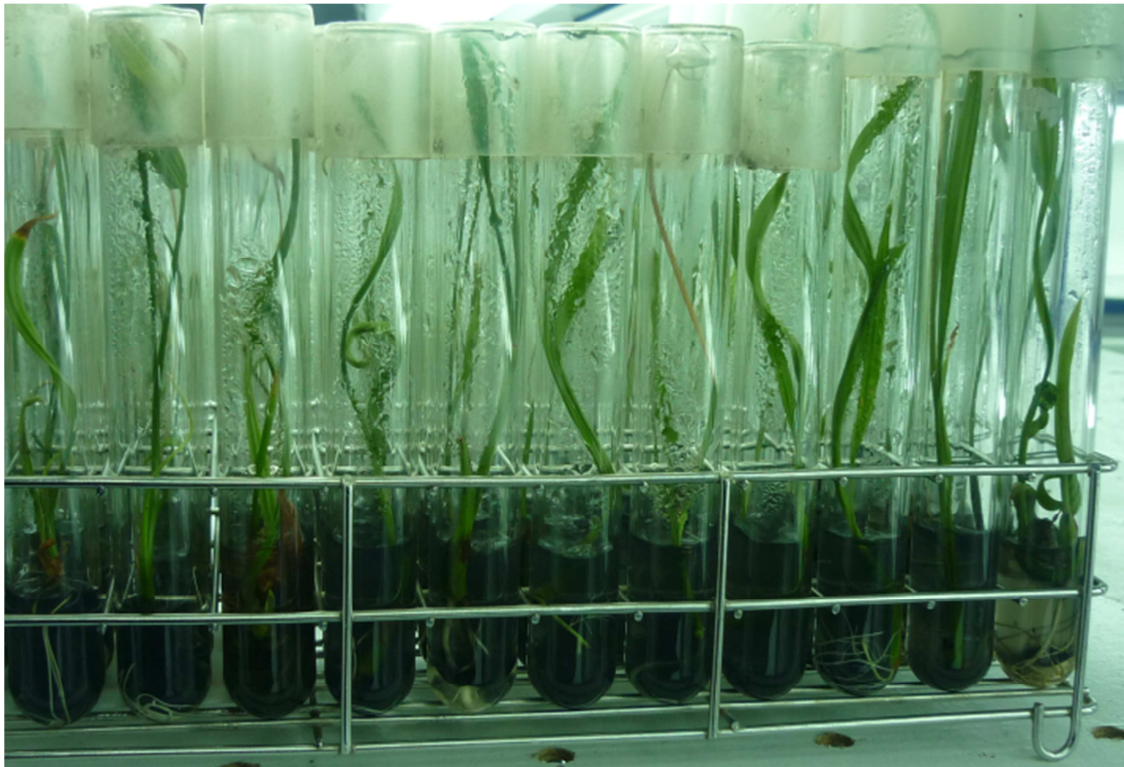


Figure 20: Développement synchrone (A) Embryons matures individualisés au stade torpille en milieu de germination, (B) régénération de plantules (Gx1/2)

I.4 Embryogenèse somatique secondaire et néoformation de bourgeons

Après deux mois de culture en milieu d'induction, certains explants d'apex du cultivar Takerbucht El Kahla ont formés des embryons somatiques directes. Ces embryons prolifèrent rapidement sur le milieu P12,5 solide contenant 12,5 mg/l de picloram et 1mg/l D'IPA, et donne naissance à une EMSs très proliférante où la capacité de régénération est de plus de 20000 plantules/5g de cals. D'une manière concomitante, un nombre élevé des embryons germés ne poursuivent pas leur développement vers le stade de plantules entières. Les embryons somatiques se présentent en forme de bouquet et une compétition paraît exister entre eux. Ces résultats confirment les travaux de (Schwendiman et *al.*, 1988) sur le palmier à huile qui rapporte la dégénérescence d'un nombre élevé d'embryons somatiques suite à leur accollement.

Bien que les milieux liquides permettent une synchronisation des embryons somatiques, le phénomène de l'induction d'une EMSs existe toujours, on observe souvent une embryogenèse somatique secondaire qui se forme autour des embryons somatiques (figure 21 A, B), à la base des plantules en phase de germination ou en marges de la feuille cotylédonaire (figure 21 C). Le processus de l'embryogenèse somatique est souvent combiné à une néoformation de bourgeons. On remarque que certaines feuilles des plantules ne sont pas issus d'une feuille cotylédonaire mais plutôt d'un développement d'un bourgeon (Figure 21, D). De nombreux auteurs ont signalés le phénomène de l'embryogenèse somatique secondaire, et la néoformation de bourgeons pendant la phase de germination (Othmani, 1998; Fki, 2005 ; Masmoudi, 2003).

En effet, la maîtrise des différentes phases de l'embryogenèse permet une meilleure exploitation de l'embryogenèse somatique secondaire dans l'intérêt d'une multiplication industrielle. Il a été rapporté que l'embryogenèse somatique secondaire est plus rapide et plus importante que l'embryogenèse somatique primaire. Des études histologiques ont montré qu'il n'existe aucune différence entre un embryon issu d'une embryogenèse somatique secondaire ou un embryon issu d'une embryogenèse somatique primaire.

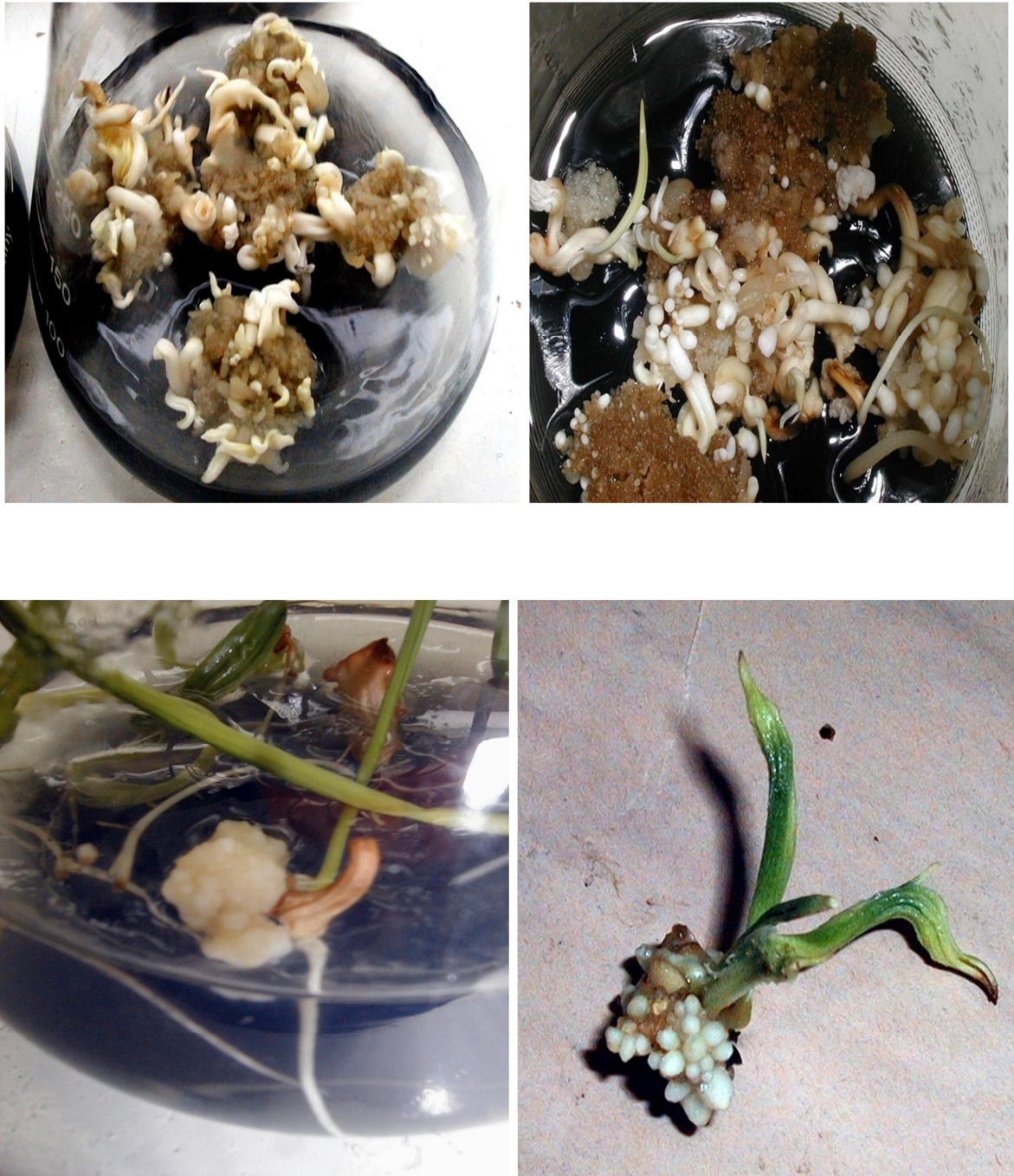


Figure 21: Différentes formations en embryogenèse somatique : (A) et (B) développement d'une forte embryogenèse somatique secondaire en phase de germination des embryons (Gx1); (C) induction d'une callogenèse sur les feuilles cotylédonaires (Gx1), (D) néoformation de bourgeons à la base d'une jeune plantule issus d'un bourgeon (Gx2)

II. Acclimatation des plantules

La réussite de l'acclimatation des vitroplants dépend principalement de la maîtrise d'un certain nombre de facteurs, à savoir, les conditions d'acclimatation, le substrat utilisé, et du stade de développement de la plantule, l'irrigation, la fertilisation et la protection phytosanitaire.

Dans nos conditions expérimentales, nous présentons quelques résultats sur les essais d'acclimatation conduits

II.1 Effet du type des plantules à acclimater

Différents types de plantules ont été utilisés pour l'acclimatation, des plantules ayant 2 à 3 feuilles bien développées avec un bon système racinaire, des plantules ayant 1 à 2 feuilles fines, des touffes feuillées avec un bon système racinaire. Les plantules sont placés dans deux conteneurs différents à savoir des sachets en plastique refermés avec un autre sachet et des fertil-pots placés dans des mini-serre chauffantes.

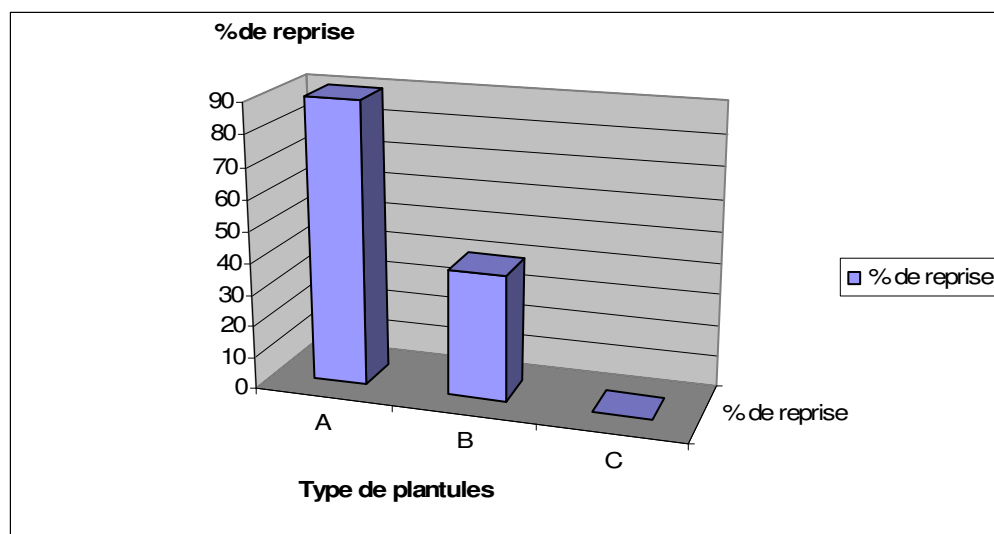


Figure 22: Effet du stade des plantules à acclimater sur le % de reprise en serre. (A): des plantules ayant 2 à 3 feuilles bien développées avec un bon système racinaire, (B) :des plantules ayant 1 à 2 feuilles fines avec un système racinaire, (C) des touffes feuillées avec un bon système racinaire

L'analyse de la figure 22 montre qu'après une semaine d'acclimatation, les plantules de la classe (B) et (C) présentent un léger flétrissement qui se manifeste après 3 semaines par un jaunissement des feuilles, alors que les plantules de la classe (A) ont repris de 90% quel que soit le conteneur utilisé (figure 23).



Figure23 : plantules classe (A) après un mois d'acclimatation (Gx1/2)

II.2 Effet des conditions d’environnement

La maîtrise des conditions d’acclimatation est importante pour réussir la sortie du vitroplant vers les conditions naturelles. Différents paramètres ont été pris en compte (l’humidité et la température).

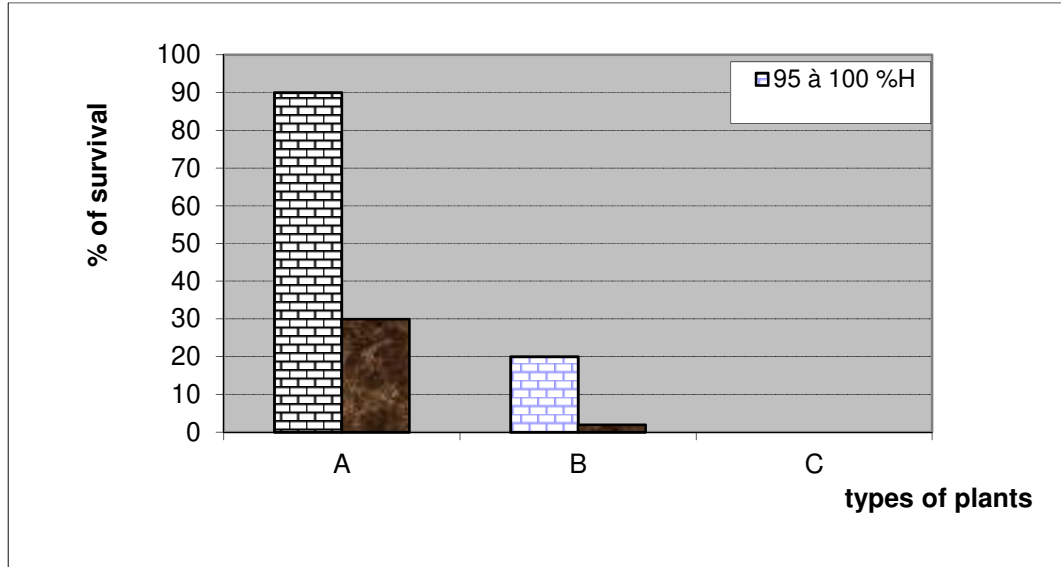


Figure 24: Effet de l’humidité sur le % de reprise des plantules

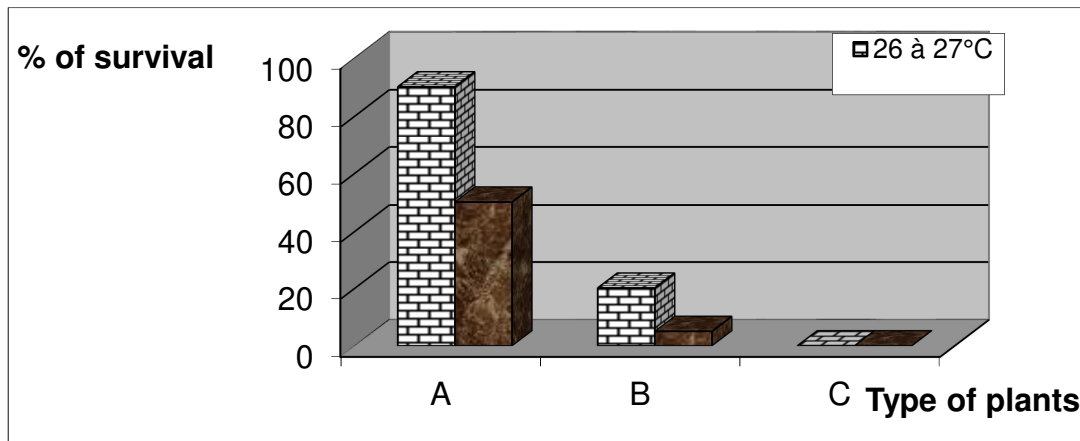


Figure 25: Effet de la Température sur le % de reprise des plantules

Les histogrammes des figures 1 et 2 ont permis de noter que les plantules de la classe A, ont un pourcentage de reprise de 90% lorsque l’humidité est saturante (95 à 100%) et la température est de 26 27 °C, alors que lorsque l’humidité est moins de 60% et la température est élevée de plus de 30°C, le pourcentage de reprise varie entre 20 et 50, ce qui diminue presque de moitié le taux de reprise. Pour la classe (B) le pourcentage est plus faible (2 à 5 %) lorsque la température est plus de 30 °c et l’humidité est moins de 60%, et de 20%

lorsque la température est de 26 à 27 °C et l'humidité est de 95 à 100%. La diminution du taux de reprise des plantules est due essentiellement aux pourritures du collet, causé par des températures élevées et une forte humidité. Les pertes peuvent être aussi dû à un dessèchement causé par une faible humidité.

II.3 Effet du substrat sur la reprise des plantules en acclimatation

Trois types de substrat ont été utilisés: la tourbe, la tourbe /perlite/sable (1:1:1), et la tourbe/sable (1:1)

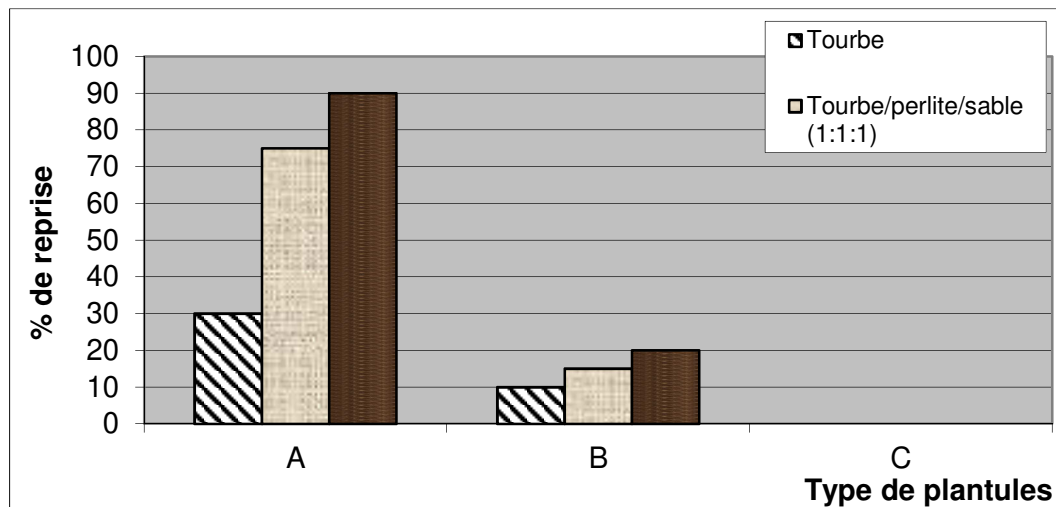


Figure 26: Effet du substrat sur la reprise des plantules en acclimatation

Les meilleurs résultats sont obtenus avec le rapport (1:1) en tourbe et sable avec un pourcentage de 90, et le rapport (1 :1 :1) en tourbe, sable et perlite avec un pourcentage de 75. Les substrats riches en tourbe ont donnés des pourcentages de reprise bien plus faibles quel que soit le type de plantules. Ces derniers sont asphyxiant et provoque la pourriture du collet.

II.4 Effet de la fertilisation

La fertilisation est apportée après la phase d'acclimatation, une fois que les plantules de palmier dattier sont sorties des conditions de confinement. La fertilisation est apportée par une solution de MS (1962) diluée 10 fois pendant les premiers mois d'acclimatation. Lorsque le plant développement 4 ou 5 feuilles, les plantules sont arrosées avec une solution fertilisante du commerce.

La fréquence des arrosages avec le fertilisant est d'une fois sur deux semaines.

L'acclimatation est définie comme étant le processus d'adaptation d'un organisme aux changements de l'environnement (brainerd et fushigami 1981). Un environnement très différent de celui où les vitro plants ont été élevés. Ce transfert de plants devrait être pratiqué en respectant les conditions nécessaires pour une bonne reprise des plants (saka 1998). La phase d'acclimatation détermine, presque à elle seule, la réussite de la micropropagation parce qu'elle devrait aboutir à un taux de reprise des vitroplants le plus élevé possible (proche de 100 %).

Les vitroplants connaissent une structure interne, une anatomie et un comportement physiologique souvent différents de celui des plantes qui poussent dans une serre ou en plein champ. Ces différences sont engendrées par les conditions de l'environnement.

Les facteurs qui régissent la réussite de la reprise en acclimatation sont l'humidité relative et la température. Elles doivent être progressives, en allant des valeurs très proches de celles de l'*in vitro* vers des valeurs modérées proches des conditions naturelles. Dans nos résultats, on a noté un pourcentage de reprise de 90% lorsque l'humidité est saturante (entre 95 et 100%) et la température est située entre 26 et 27°C. Ce résultat concorde avec celui obtenu par (Bouguerfaoui M., 1998).

La qualité du substrat a été prise en compte dans notre travail. Les meilleurs résultats sont obtenus avec le rapport (1:1) en tourbe et sable avec un pourcentage de 90. Ce résultat concorde avec celui obtenu par les travaux de Wuidart W. et Konan K., (1989).

L'acclimatation est le facteur déterminant pour la réussite de la micropropagation. En effet lorsqu'un plant est acclimaté, les chances de transfert en champ sont élevées. En effet sur l'expérience qui a été faite pour la transplantation dans les conditions naturelles, tous les vitroplants ont survécus et quel que soit la période.

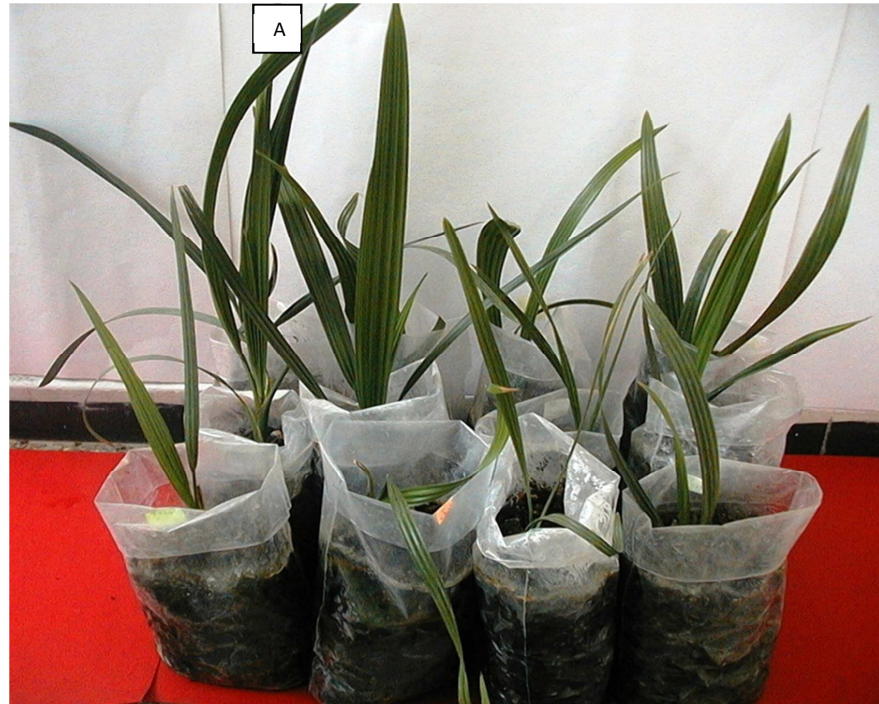


Figure 27 : Vitroplants acclimatés, (A) vitroplants âgés de 24 mois, (B) différents stades de développement en phase d'acclimatation

III Conformité Génétique par l'étude des systèmes peroxydasiques

Cette partie a été réalisé sur six cultivars (Tinaceur, Taqerbucht El Kahla, Tegaza, Tilemsou, Taqerbucht essafra, et Tazerzait) et leurs vitroplants issus par la technique d'embryogenèse somatique. Ces cultivars proviennent du sud-ouest (Adrar) de différents jardins et leur vitroplants proviennent de la station de l'INRAA d'Adrar à l'exception de deux vitroplants (Taqerbucht El Kahla et Tilemsou) qui sont au stade acclimatation (stade jeune plante) ont été prélevés au niveau de la serre d'INRAA station de Mehdi Boulem.

Les zymogrammes correspondant aux extraits foliaires des cultivars de palmier dattier adulte sont comparés à ceux des vitroplants (Stade jeune et adulte).

L'interprétation des zymogrammes a été fait sur la base des phénotypes électrophorétiques qui résultent de l'expression d'au moins un gène pour chaque enzymes (Baaziz et Bendiab, 1994).

Les techniques électrophorétiques ont permis d'obtenir des zymogrammes nettes pour les peroxydases

III.1 Les peroxydases

Les zymogrammes de chaque variété sont comparés en notant la présence ou l'absence de chaque bande électrophorétique à partir de profils synthétique (Figure 30) que nous avons élaboré à partir du gel. Ces bandes peuvent présenter des épaisseurs variables selon la concentration des isozymes.

III.1.1 Calcul de la mobilité relative

La mobilité relative est calculée selon la formule suivante :

$$\text{Mobilité relative} = \frac{\text{Distance parcourue par la protéine (cm)}}{\text{Distance parcourue par le bleu de bromophénol}}$$

Les figures 28 et 29 représentent le zymogramme des peroxydases obtenues après révélation des enzymes par l'eau oxygéné (H₂O₂) comme substrat

Les bandes des peroxydases sont rapprochées et difficiles à observer à partir de la photographie du gel. Pour cela, on a schématisé le zymogramme représenté dans la figure 30.

Les isozymes montrent des mobilités relatives comprises entre 0,357 à 0,457.

Pour l'ensemble des cultivars, trois phénotypes électrophorétiques sont mis en évidence pour le système peroxydase.

Tableau 9: Mobilité relative des isozymes

Cultivars et leur vitroplant	Isozymes (Pm, Vp)	Mobilité relative
Tinacer	PoxI	0,357
	PoxII	0,385
	PoxIII	0,428
Taquerbucht El Kahla	PoxI	0,357
	PoxII	0,385
	PoxIII	0,428
Tegaza	PoxI	0,357
	PoxII	0,385
	PoxIII	0,428
Tilemsou	PoxI	0,357
	PoxII	0,385
	PoxIII	0,428
Taquerbucht essafra	PoxI	0,357
	PoxII	0,385
	PoxIII	0,428
Tazerzait	PoxII (Pm, Vp)	0,385
	PoxIII (Pm)	0,428
	PoxIV(Vp)	0,457

Les différents cultivars (Tinaceur, Taquerbucht El Kahla, Tegaza, Tilemsou, Taquerbucht essafra, et Tazerzait) et leur vitroplants peuvent être différenciés par la position des bandes isoenzymatiques dans le gel (mobilité relative).

Quatre isoenzymes ont été révélés (Pox I, Pox II, Pox III, et Pox IV) comparables par l'intensité de leur coloration, ainsi que par leurs tailles (Tableau 9)

Pour tous les cultivars et leurs vitroplants respectifs, Pox II apparaît large et plus intense dans tous les zymogrammes observés.

III.3.1.2 Comparaison des zymogrammes stade adulte :

III.3.1.2.1 Tinaceur

Les zymogrammes des plantes mères et leurs vitroplants sont caractérisés par la présence de trois bandes, dénommées Pox I, Pox II, et Pox III (Fig.30), le cultivar mère est représenté par (1), et vitroplant par (2). La première et la troisième bande Pox I, et Pox III ont la même intensité et la même mobilité relative pour le cultivar et le vitroplant. La deuxième bande Pox II, elle présente la même mobilité relative que ce soit pour la plante mère ou le vitroplant. Par contre l'intensité de coloration de la bande de la plante mère est plus importante que celle du vitroplant.

III.3.1.2.2 Tegaza

Elle est caractérisée par la présence de trois bandes. La première et la troisième bande Pox I, Pox III ont la même intensité et une même mobilité relative pour le cultivar et le vitroplant (Fig 30), le cultivar mère est représenté par (5), et vitroplant par (6). La deuxième bande de la plante mère à une activité enzymatique plus grande que le vitro-plant. Par contre les mobilités relatives de la deuxième bande (Pox II) sont identiques chez la plante mère et le vitroplant, mais l'intensité de la coloration est là aussi importante chez le plant mère comparativement au vitroplant.

III.3.1.2.3 Takerboucht essaфра

Comme pour les autres cultivars, nous remarquons qu'il existe trois bandes chez la plante mère et le vitroplant (Pox I, Pox II et Pox III). Les trois bandes présentent des mobilités relatives identiques, alors qu'il existe des différences dans les intensités de coloration de celles-ci. En effet, la coloration de la Pox I est plus intense chez le vitroplant, alors qu'au niveau de la Pox II et Pox III, c'est chez la plante mère qu'elle est plus élevée.

III.3.1.2.4 Tazerzait

Pour le cultivar Tazerzait, on a observé des zymogrammes différents entre le cultivar et le vitroplant. En effet nous retrouvons uniquement deux bandes PoxII et PoxIII, la Pox I étant absente.

Une quatrième bande Pox IV apparaît chez le vitroplant. La deuxième bande (Pox II), a la même mobilité relative chez le plant mère et le vitroplant par contre l'intensité des bandes du plant mère apparaît plus élevée que celle du vitroplant.

La bande Pox III existe chez le cultivar et est complètement absente chez le vitroplant.

III.3.1.3 Comparaison des zymogrammes stade acclimatation (stade jeune plante)

III.3.1.3.1 Taqerbucht El kahla

Les zymogrammes des cultivars et leurs vitroplants sont là aussi caractérisés par la présence de trois bandes, dénommées Pox I, Pox II, et Pox III (Fig 30 ; le cultivar mère est représenté par (3), et vitroplant par (4). Les bandes Pox I et Pox III présentent la même mobilité relative et la même intensité de coloration. La mobilité relative de la bande Pox II est la même pour les échantillons, par contre l'intensité des bandes de la plante mère apparaît plus élevée que celle du vitroplant.

III.3.1.3.2 Tilemsou :

Dans le cas de variété Tilemsou les zymogrammes obtenus sont caractérisés par la présence de trois bandes Pox I, Pox II et Pox III. La mobilité relative est identique pour les trois bandes. Cependant il existe des différences dans les intensités de coloration de celles-ci. Elles sont plus élevées chez la plante mère en Pox I et Pox II, comparativement au vitroplant.

On a pu aisément remarquer que chez les cinq premiers cultivars testés, les mobilités relatives sont identiques dans les deux stades de développement des plants. Elles sont cependant différentes pour le cultivar Tazerzait.

Quant à l'intensité de coloration des bandes enzymatiques, les différences relevées le plus souvent apparaissent dans la bande Pox I, Pox II et Pox III, étant pratiquement identiques.

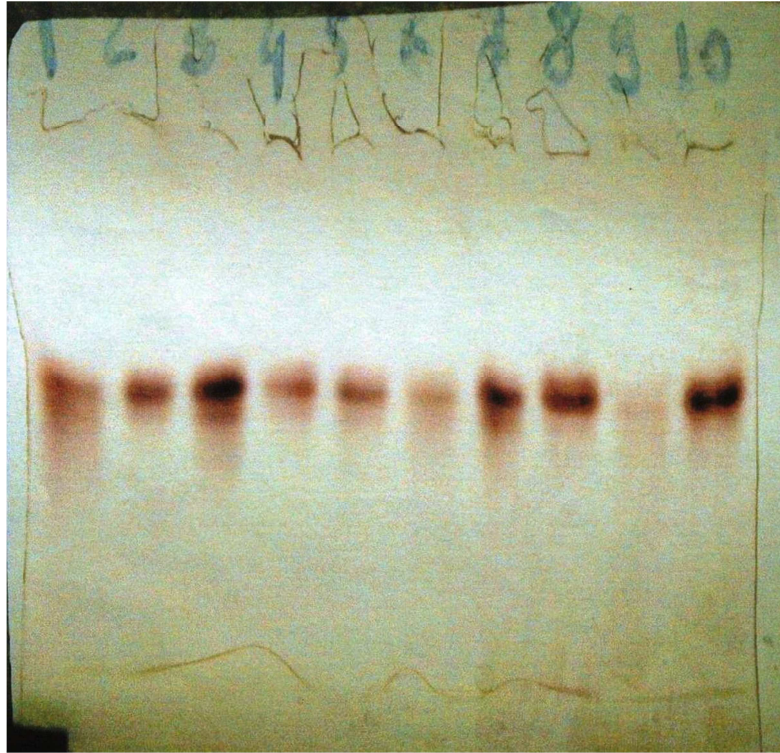


Figure 28 : Zymogrammes peroxydasiques de cinq cultivars et leurs vitroplants de palmier dattier (*Phoenix dactylifera* L.) : de gauche à droite : Pm1, Vp2 Tinaceur ; Pm3, Vp4 Taqerbucht El kahla ; Pm5, Vp6 Tegaza ; Pm7, Vp8 Tilemsou ; Pm9, Vp10 Taqerbucht essafra

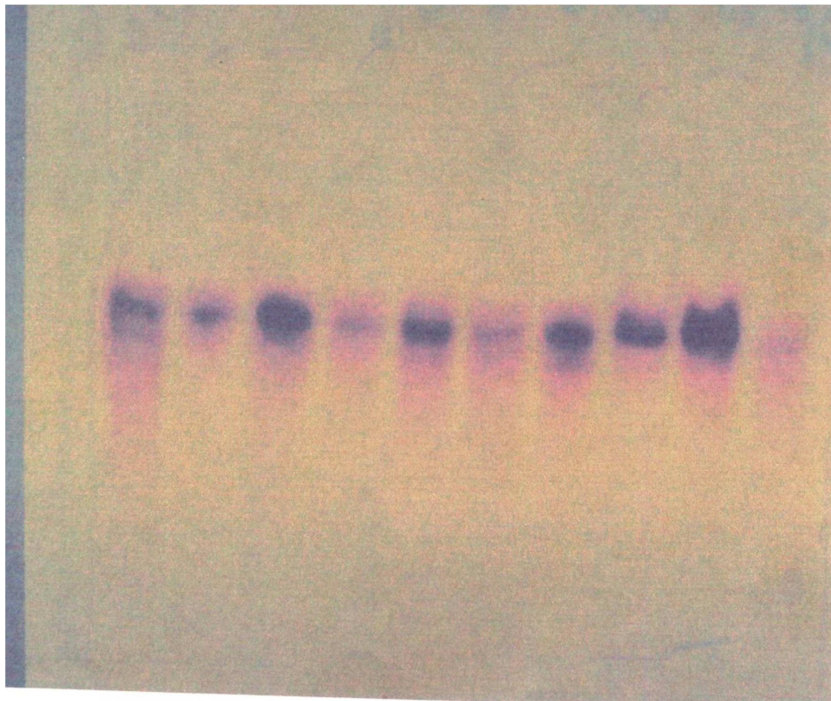


Figure 29: Zymogrammes peroxydasiques de cinq cultivars et leurs vitroplants de palmier dattier (*Phoenix dactylifera* L.) ; de gauche à droite : Pm3, Vp4 Taqerboucht El kahla ; Pm5, Vp6 Tegaza ; Pm7, Vp8 Tilemsou ; Pm9, Vp10 Taqerboucht essafra ; Pm11, Vp12 Tazerzait

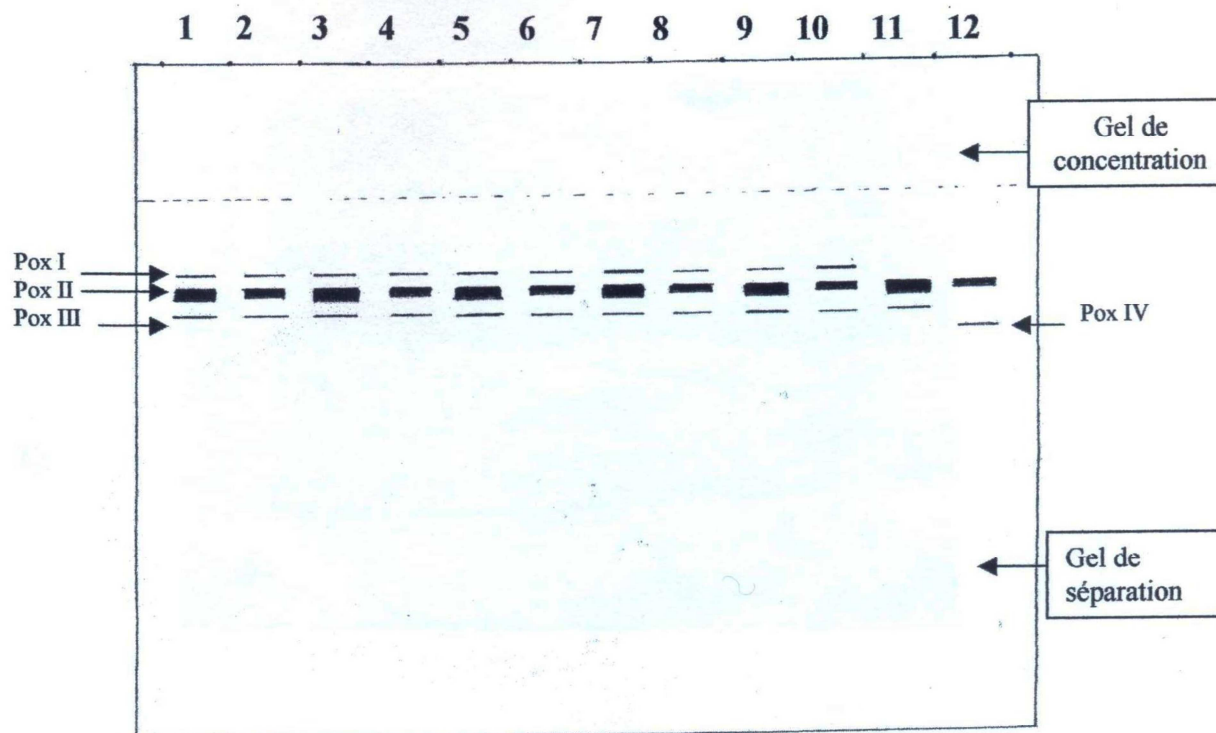


Figure 30: Schéma représentant le zymogrammes peroxydasiques de six cultivars et leurs vitroplants de palmier dattier (*Phoenix dactylifera* L.) ; de gauche à droite : Pm1, Vp2 Tinaceur ; Pm3, Vp4 Taqerbucht El kahla ; Pm5, Vp6 Tegaza ; Pm7, Vp8 Tilemsou ; Pm10, Vp11 Tazerzait

Les zymogrammes obtenus peuvent être différenciés par deux facteurs: La mobilité relative des bandes enzymatiques et l'intensité de coloration de celles-ci.

Parmi l'ensemble des échantillons étudiés, on peut certifier que les cultivars (Tinaceur ; Taqerbucht El kahla ; Tegaza ; Tilemsou et Taqerbucht essafra) ainsi que leur vitroplant présente trois bandes enzymatiques de faible intensité et de même mobilité. Il n'y a donc pas de différence entre les deux stades de développement (stade adulte et jeune plante).

La conformité de ces vitroplants est garantie en ce concerne les systèmes peroxydasiques. Pour le cultivar Tazerzait et son vitroplant, il présente deux bandes enzymatiques seulement. Une bande épaisse de mobilité relative identique à celle des cinq premiers cultivars, et une bande enzymatique plus fine et de mobilité relative identique à celle des autres cultivars chez la plante mère, alors qu'elle est inférieure chez le vitroplant. Cette différence dans la mobilité relative entre la plante mère (0,428) et son vitroplant (0,457) implique que le poids moléculaire de l'isozyme de ce dernier est inférieur à celui de la plante mère. Cette différence

pourrait être due à une variation causée par les substances hormonales utilisées lors du processus de l'embryogenèse somatique.

Nous pouvons donc dire que la conformité du vitroplant du cultivar Tazerzait est compromise, d'autres analyses sont prévues pour confirmer la variation obtenue ou l'infirmier.

Les résultats obtenus chez les cinq premiers cultivars étudiés et leurs vitroplants issus de l'embryogenèse somatique nous permettent de dire qu'il n'y a pas de différence entre les isozymes peroxydasiques des plantes mère et leurs vitroplants.

Il est vrai que chez les palmiers dattiers issus de croisements dirigés, Baaziz, (1990), a montré que la séparation électrophorétique des peroxydases, ne présente qu'un nombre réduit d'isoforme.

En effet, dans ses travaux de 1993, montre que les vitroplants du cultivar Jihel issus de culture *in vitro* par organogenèse, présente des isoformes différents à différents stades de développement (en *in vitro*, en acclimatation, et au stade adulte).

Ferry et *al.*, (1998), confirme l'utilisation des systèmes enzymatiques dans l'étude de la conformité. Des vitroplants issus de culture *in vitro* par embryogenèse somatique sont conformes.

Nous pouvons aussi nous appuyer sur les travaux de Scoarnec, (1991), qui a montré que l'étude de polymorphisme des estérases, des glutamates oxalate transaminases, des phosphoglucomutases, des phosphoglucoisomérasés et peroxydases a permis de caractériser le matériel par organogenèse et embryogenèse somatique pour le cultivar Deglet nour au stade bourgeons, vitroplants, et plants acclimatés. Les plants issus de ces deux voies ne présentent pas de différences au point de vue isoenzymatiques

Les travaux de Kanan et *al.* (1995), vont aussi dans le même sens, ils montrent une conformité phénotypique d'environ 95% chez les palmiers à huile issus d'embryogenèse somatique.

Après analyse des résultats de cette étude comparée avec différents travaux sur la conformité des vitroplants de palmier dattier, on peut affirmer que la conformité des vitroplants en ce qui concerne les systèmes peroxydasiques de cinq cultivars (Tinaceur ; Taqerbucht El kahla ; Tegaza ; Tilemsou et Taqerbucht essaфра) issus de culture *in vitro* par embryogenèse somatique, est garantie, alors que celle des vitroplants du cultivar Tazerzait n'a pas été confirmé, d'autres répétitions doivent être faite sur le cultivar Tazerzait pour s'assurer de la conformité ou affirmer la variation obtenue.

Conclusion générale

L'étude que nous avons entreprise sur l'embryogenèse somatique nous a permis d'étudier les différentes étapes de ce processus de régénération du palmier dattier. C'est la voie la plus rapide pour une propagation de palmier dattier à grande échelle. D'après Letouzé et *al.*, (1987), c'est une voie qui assure un taux de multiplication élevé, et un rajeunissement important du matériel végétal. Elle fait appel à la formation des cals puis des embryons somatiques à partir de la phase adulte de l'espèce. Elle est étudiée aussi pour la préservation et aussi pour aborder l'amélioration de l'espèce vis-à-vis de la maladie du bayoud.

Ainsi vingt six cultivars ont été introduits pour étudier l'efficacité des milieux de culture pour l'induction du cals embryogènes et l'introduction d'une étape en milieu liquide agité sur la prolifération et la synchronisation des embryogènes somatiques.

Nos résultats, ont montré que le temps de réponse à la callogenèse est différent. Le cultivar Takerboucht El kahla a réagi au bout 2 mois de culture seulement, sur un rejet et sur le milieu P12.5. A partir du troisième mois de culture, la callogenèse a été observé que sur le milieu (P12.5), sur les cultivars Tinaceur, Tadelt, et Tanslit. A quatre mois de culture ce sont les cultivars Deglet nour (Touggourt), et Tagaza qui ont réagi sur le milieu P12.5, et Taqerboucht essaфра, Tinaceur, Tadelt, Deglet nour (Ghardaïa) et Tanslit sur le M100

L'effet variétal sur l'induction des cals est observé. Les cultivars Takerboucht El kahla sur le milieu P12,5 et Tinaceur sur le M100 ont répondu plus vite que les autres cultivars quelque soit le milieu. Pour le reste des cultivars, la phase d'initiation peut durer jusqu'à douze mois. Ces résultats concordent avec ceux obtenus par Mater (1986), Abo el Nil (1986), Lachqer-Sillou, (1989), Sané 2006.

Tous les milieux testés ont montré que le taux d'induction de la callogenèse est différent d'un milieu à un autre et d'une région à l'autre. Il existe donc des différences variétales se traduisant par des réponses différentes. Plusieurs auteurs ont rapportés l'effet génotypique (Bagniol et *al.*, 1992 ; Sharma et *al.*, 1984 ; Sharma et *al.*, 1986, Saka et *al.*, 1997). En effet, l'embryogenèse peut être induite sur tous les milieux contenant une balance hormonale (Auxines/cytokinines > 1) mais à des taux différents

L'approche histologique dans notre expérience a montré que l'apparition et l'induction de cellules embryogènes est obtenue quel que soit le milieu. Elles se forment à partir de cellules de la zone méristématique prévasculaire. Ce résultat correspond aux résultats obtenus chez le cocotier (*Cocos nucifera* L.) de Hocher et *al.*, (1998). C'est un facteur qui conditionne le succès de la callogenèse à une forte activité auxinique en association avec le charbon actif (Buffard- Morel et *al.*, 1988).

La multiplication des cals embryogènes est obtenue dans le même milieu d'induction. Cependant le taux de multiplication pour l'ensemble des cultivars étudiés, après six mois de repiquage, est plus important dans le milieu P12.5, et le milieu M100, et faible dans le milieu M25. Ce dernier est qualifié de moyen. Après plusieurs repiquages sur le milieu P5, les cals deviennent nodulaires.

Plusieurs auteurs (Reuveni 1979; Reynolds et Murachige 1979; Zaid et Tisserat 1983; Huang et Murachige 1983 Sharma et *al.*, 1984; Daguin et Letouzé 1988 ; Zaid 1989, Saka et Abed 1989; Lachqer-Sillou 1989) rapportent la rapidité et la performance de ces deux hormones de croissance dans l'induction de la callogenèse à partir du cœur du rejet. Ceci est aussi en accord avec les résultats obtenus par Tisserat et *al.* (1979, 1982) sur les embryons zygotiques.

Le développement des cellules embryogènes n'est pas synchrone puisque des différenciations plus au moins avancées des embryons se rencontrent dans les cultures. Pour cela nous avons introduit une étape de culture en milieu liquide agité qui a permis d'obtenir une meilleure homogénéité des différents stades d'évolution des embryons somatiques.

L'effet de la quantité de cals et sa structure est important pour démarrer une suspension cellulaire embryogène. Notre expérimentation nous a permis de confirmer que le cal idéal pour obtenir une suspension embryogène est nodulaire et granulaire friable. Une filtration à 400µm a conduit à obtenir des embryons structurés dans le milieu GMN₂₀₀ dépourvu de substance de croissance et enrichi de 200mg/l de NH₄NO₃. Ceci confirme le résultat obtenu par Fki, (2005).

La maturation des embryons somatiques et leur germination s'obtiennent sur le milieu sans substance de croissance GMN₂₀₀ contenant 1 mg/l de Thiamine, 100 mg/l de KH₂PO₄, 170 mg/l de NH₂PO₄, 200 mg/l de Nitrate d'ammonium. En effet Guerra et *al.* (1999) affirme que le stade de maturation des embryons consiste en l'interruption des cycles des divisions cellulaires et l'utilisation d'un stimulus physiologique, biochimique et ou environnementale.

La germination des embryons somatiques se réalise sur un milieu sans hormones de croissance et à la lumière (photopériode de 16h). Ce résultat est déjà décrit par Tisserat et De Masson (1980), Sharma et *al.*, (1984), Lachqer –Sillou, (1989).

La plupart des auteurs suggèrent qu'un milieu appauvri ou sans hormones de croissance favorise la formation des embryons somatiques. Zaid et Tisserat (1989) ont obtenu des embryons sur milieu riche en auxine.

Le phénomène de vitrification a été réduit afin d'améliorer la qualité des embryons, lorsque le milieu MS est appauvri en ions ammonium. Nous avons observés que seuls les embryons placés sur milieu MS (1962) devenaient vitrifiés. Nos résultats corroborent avec l'hypothèse du milieu riche en ion NH₄⁺ Daguin 1984 ; Kevers et *al.* 1984.

Les résultats rapportés ici, montrent que les embryons somatiques sont produits par les cals friables et nodulaires. Au bout de 6 mois de culture, nous avons pu induire à partir de pré de 50 souches un taux de 2394 embryons matures qui ont germé et donné des plantules saines capables d'être transférées en phase d'acclimatation.

Nos résultats mettent en évidence le phénomène de l'embryogenèse somatique secondaire et la néoformation de bourgeons qui est obtenue que quelque soit le milieu liquide ou solide. Ceci représente un taux d'embryons somatiques secondaire non négligeable.

Dans la dernière étape, nous nous sommes intéressés à l'évaluation de la conformité génétique par les marqueurs enzymatiques. Les résultats obtenus, nous ont permis de constater qu'il n'y a pas de différence entre les isozymes peroxydasiques des plantes mère et leurs vitroplants. Nous avons pu mettre en évidence l'existence d'une conformité génétique

de cinq cultivars (Tinaceur ; Takerboucht El kahla ; Tegaza ; Tilemsou et Takerboucht essafra) issus de culture *in vitro* par embryogenèse somatique. Seul le vitroplant Tazerzait présente des isoenzymes peroxydasiques différents du cultivar mère.

En perspectives, nous envisageons :

- poursuivre l'amélioration de la qualité des embryons et exploiter l'embryogenèse somatique secondaire (EMSs) par l'introduction des bioréacteurs pour une multiplication industrielle,
- d'étudier les gènes marqueurs de l'embryogenèse somatique,
- de déterminer les facteurs influençant l'embryogenèse somatique directe,
- d'évaluer la conformité par les marqueurs moléculaires,
- d'utiliser le processus de l'embryogenèse somatique pour la conservation et pour l'amélioration de l'espèce vis-à-vis de la maladie du bayoud.

Les stress biotiques sont aujourd'hui considérés comme des freins pour le développement de la phoeniculture. En plus avec un marché plus important et plus exigeant, l'extension des palmeraies est tributaire de plants sains et homogènes. En effet, la culture *in vitro* est un moyen efficace pour produire des plants en masse. Les résultats que nous avons obtenus ouvrent des possibilités intéressantes pour le développement de la phoeniculture, et l'amélioration de cette espèce. Le transfert de cette technique de culture *in vitro* permettra de fournir aux agriculteurs, des plants sains, homogènes et facilement transférables en champ.

Références bibliographiques :

- 1- **Abed F. et Saka H, 1989.** La multiplication végétative in vitro du palmier dattier par embryogénèse somatique. Compte-rendu du deuxième séminaire magrebin sur la multiplication rapide du palmier dattier par les techniques de culture in vitro, FAO, PP : 71-73.
- 2- **Abed F., Saka H., Amara B, kermiche A., 1994.** Effet de quelques milieux de cultures sur l'induction de cals embryogènes de quatre cultivars de palmier dattier. Journées scientifiques de l'INRAA
- 3- **Abed F., Bougdoura N., Maatalah S., Khelifi L., Morsli A., Benkhalifa A., 2004.** Évaluation de la capacité nationale de multiplication ex-situ du palmier dattier en Algérie. Atelier régional sur le : « Renforcement des capacités nationales en matière de multiplication ex-situ du palmier dattier dans le Maghreb ». I.N.R.A. Alger. PP :26-40, 61 P.
- 4- **Aberlenc- Bertossi F., Daher A., Chabrilange N., Mohamed N., 2011.** Sex determination in date palm. Rec. 1^{er} Symp. Int. Palmier dattier, nov 2011
- 5- **Ahee J., Arthuis P., Cas G., Duval Y., Gunin G., Hanower J., H. P., Lievou D., Lioret G., Malorie B., Pannetier C., Raillot D., Varenchon C. et Zuckerman L. (1981).** La multiplication végétative *in vitro* du palmier à huile par embryogénèse somatique. *Oléagineux*, 36(3), pp : 113-116.
- 6- **Al K- Dous E., Binu G., AL-Mahmoud M., AL-Jaber M., Wang H., Salem Y. M., Al K- Azwani E., Chaluvadi S., Pontaroli A.C., De Barry J., Arondel V., Ohlrogge J., Saie Khaled I.J., Suliman-Elmeer M., Bennetzen J.L. Kruegger R., Un Malek J.** The genome sequencing and comparative genomic of date palm (*Phoenix dactylifera* L.) article on line, nature biotechnology 29, 521-527
- 7- **Ammar et Benbadis 1977.** Multiplication végétative du palmier dattier (*Phoenix dactylifera* L.) par la culture de tissus de jeunes plantes issus de semis. C. R. Biologies 284 : 1789- 1791
- 8- **Ait Chitt M., 1989.** Multiplication *in vitro* du palmier dattier (*Phoenix dactylifera* L.) par organogénèse. Compte rendu du deuxième séminaire maghrébin sur la multiplication rapide du palmier dattier par la technique de culture *In Vitro*, PNUD/FAO/RAB/88/024. 21-25
- 9- **Aissam. S. 1990.** Observations histologiques sur l'organogénèse et le développement des bourgeons du Palmier dattier (*Phoenix dactylifera* L.) en culture "in vitro", thèse de 3^{ème} cycle, Université Cadi Ayyad, Marrakech, Maroc, 99
- 10- **Baaziz M., Saaidi M. 1988.** Preliminary identification of date palm cultivars by esterase isoenzymes and peroxydase activities. Can. J. Bot. 66: 89-93.
- 11- **Baaziz M. 1989.** Les peroxydases de folioles de palmier dattier actives chez différents cultivars et palmiers issus de croisements dirigés. C.R.P.N.U.D6FAO, 2^{ème} séminaire Maghrébin « culture in vitro du palmier dattier P 129-149, al Watan press, lebanan

- 12- Baaziz M., et Bendiab K. 1993.** Le polymorphisme enzymatique du palmier dattier (*Phoenix dactylifera* L.) utilisé comme marqueur de la conformité génétique de vitroplants. Ed. Aupelf6UREF. John libbey Eurotext. Paris. pp 155-158
- 13- Bagniol S., Engelmann F., Michaux Ferriere M., 1992.** Histcytological study of a peaces from *in vitro* plantlets of date palm (*Phoenix dactylifera* L.) during a cryoconservation process. Cryo. Letters 13, 405-412
- 14- Barrow S., 1998.** A revision of phoenix. Reprinted from Kew. Bulletin Vol. 53, part 3. 1998. 544-551.
- 15- Beauchesne, G. 1988.** La culture “in vitro” du Palmier dattier. Données techniques sur la multiplication par organogenèse. C.R. Premier Séminaire Maghrébin sur la culture “in vitro” du Palmier dattier, Projet de lutte contre le Bayoud FAOIPNUD/RAB/88/024, Marrakech, Maroc, 24-27 Mai 1988,15-18
- 16- Beauchesne G., 1984.** L’historique et les fondements de la culture in vitro. In VIDALIE H, la culture in vitro et ses applications horticoles. Lavoisier. Paris. pp : 11-16.
- 17- Belguedj M. 2011.** La commercialisation des dattes algériennes. Rec. 1^{er} Symp. Int. du palmier dattier 2011
- 18- Bennaceur M., Lanaud C., Chevallier M. H., Bounaga N., 1991.** Genetic diversity of date palm (*Phoenix dactylifera* L.) from Algeria revealed by enzyme makers. Plant Breeding 107: 56-69.
- 19- Ben Abdellah A. et Bendiab K., 2000.** Identification de cultivars de palmier dattier (*Phoenix dactylifera* L.) par l’amplificattion aléatoire d’ADN (RAPD) ? Chiers d’études et de recherches francophones/Agricultures. Vol. 9, N.2, P103-7
- 20- Bendiab K., Baaziz M., Brakez z., Ait chitt M., 1992.** Corrélation of isoenzyme polymorphism and bayoud- disease resistance in date palm and progeny. Euphytica 65, 23-32.
- 21- Benkhalifa A. 1989.** Ressources génétiques du palmier dattier et lutte contre la fusariose, Organisation de la variabilité des cultivars du dattier des palmeraies du Sud-ouest Algérien. Thèse de Magister, ENS. Kouba, Alger, 103p.
- 22- Bennaceur M., Chevalier M. H., Bouguedoura N., et Benkhalifa A. 2006.** Transférabilité des marqueurs microsattellites du cocotier (*Cocos nucifera* L.) et du palmier à huile (*Elaeis Guineensis* Jacq.) chez le palmier dattier (*Phoenix dactylifera* L.).Conférence régionale: Mutagenèse induite et biotechnologies d’appui pour la protection du palmier dattier contre le Bayoud. Alger- 17 et 18 juin.
- 23- Benslimane A., 1989.** La RFLP, un outil pour l’amélioration génétique du palmier dattier. C.R. du 2^{ème} Seminaire Maghrébin sur la multiplication rapide du palmier dattier par les techniques de culture *in vitro*.

- 24 Benslimane A.A., Hartmann C., Ouenzar B., et Rode A., 1996.** Intramolecular recombination of a mitochondrial minicircular plasmid like DNA of date palm mediated by a set of short-repeat sequences. *Curr Genet*, 29. 591-593.
- 25- Booij I. et Macheix J.J. 1992.** Recherche de marqueurs biochimiques en vue de la caractérisation variétale chez le palmier dattier (*Phoenix dactylifera* L.), et étude de la stabilité de ces marqueurs pendant et après culture *in vitro*. Mémoire de DEA en biologie végétale, Université de Montpellier 2. 32p.
- 26- Bouabidi H. 1998.** Morphological characteristics of the leading Tunisian date palm cultivars. In Proceedings of *dactylifera* L): date palm Research and Development Network, ACSAD, Damas, Syria, 163- 169. (en arabe).
- 27- Bouchireb N., 1996.** Contribution à l'étude de la diversité génétique du palmier dattier (*Phoenix dactylifera* L.) et identification de quelques cultivars par marqueurs moléculaires. Thèse de Magister USTHB. Alger.
- 28- Boufis N., 2008.** Régénération par embryogenèse somatique de vitroplants de palmiers dattier (variété Degla beida) en vue de la résistance contre le bayoud. Thèse de magister INA. Alger
- 29- Brac de la Perriere R. A., 1995.** Le palmier dattier, histoire d'une plante en méditerranée. Alif, les éditions de la méditerranée.
- 30- Bouguedoura N., 1991.** Connaissance de la morphogénèse du palmier dattier (*Phoenix dactylifera* L.). Etude *in situ* et *in vitro* du développement morphogénétique des appareils végétatifs et reproducteurs. Thèse de doctorat d'état, USTHB, Alger. 201p.
- 31- Bouguerfaoui M., 1998.** Acclimatation des plantules obtenues *in vitro*. INRAM. Maroc. Polycoché. 9p..
- 32- Daguin F. 1984.** Caractérisation d'un phénomène d'hypolignification chez *Salix babylonica* L. en culture *in vitro* Rôle de l'azote ammoniacal. Thèse de 3^{ème}
- 33- Daikh H. et Demarly Y. 1987.** Résultats préliminaires sur l'obtention d'embryons somatiques et la réalisation de semences artificielles du palmier dattier (*Phoenix dactylifera* L.). *C.R. Acad. Agric.*, 11, pp : 1151-1154.
- 34- Dhed'a D., Dumortier F., Panis B., Vuylsteke D., De Langhe L. 1991.** Plant cell regeneration in cell suspension cultures of the cooking banana. *Fruits* 46: 125-135
- 35- Drira N., 1985.** Multiplication végétative du palmier dattier (*Phoenix dactylifera* L) par les néoformations induites en culture *in vitro* sur des organes végétatifs et floraux prélevés sur la phase adulte. Thèse de doctorat, faculté des sciences, Tunis, 26-45,121p
- 37- Caty R., 1929.** Les exigences et les aptitudes du palmier dattier. *Annales de l'Académie des sciences*, 227- 293.
- 38- Chabane D., 1996.** Réactions morphogénétiques *in vitro* de divers explants de palmier dattier. 4^{ème} journée scientifique de U.R.B.F.A., 19-20 Mars 1996.

- 39- Chabane D., Assani A, Bouguedoura N., Haicour R., Ducreux G., 2007.** Induction of callus formation from date palm protoplasts by means of nurse culture. C.R. Biologie N°330, pp.392-401.
- 40- Cordewener J., Booij H., VanEngelen F., Van Kammen A., De Vries S.C., 1993.** Tunicamycin-inhibited carrot embryogenesis can be restored by secreted cationic peroxidase isoenzymes. *Planta* 184:478-486
- 41- De Jong A.J., Schimidt D.L., De Vries S.C. 1993.** Early event in higher plant embryogenesis. *Plant Molecular Biology*. 22: 367-377
- 42- Duval Y., Engelmann F., Durand-Gasselin T. 1995.** Somatic embryogenesis in oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq). Bajaj Y.P.S. (ed) Somatic and synthetic seed I, *Biotechnology in Agriculture and Forestry*. Berlin, Springer-Verlag, 235-352
- 43- Djerbi .M, 1982.** Bayoud disease in North Africa: History distribution diagnosis and control .*Date palm journal* 12: 153-197p.
- 44- Djerbi .M. 1988.** Les maladies du Palmier dattier. Projet Régional de lutte contre le Bayoud RAB/84/018. 127 pp., 30 planches.
- 45- Djerbi M. 1990.** Précis de phéniculture. FAO. 191pp.
- 46- Drira, N. 1981.** Multiplication végétative et micropropagation du Palmier dattier (*Phoenix dactylifera* L.) à partir d'organes prélevés sur la phase adulte cultivé "in vitro". Thèse de Doctorat de spécialité. Faculté des Sciences de Tunis, 138 pp.
- 47- Dudits D., Bogre L., Gyorgyey H., 1991.** Molecular and cellular approaches to the analysis of plant embryo development from somatic cells *in vitro*. *Journal of cell Science* 99: 474-484
- 48- Ducreux G., 1994.** Isozyme modifications and plant regeneration through somatic embryogenesis, 4èmes journées du réseau Biotechnologies Végétales AUPELF-UREF, Orsay, 1994
- 49- El Hadrami I., 1995.** Options méditerranéennes, Série A: Séminaires méditerranéens n°28, Le palmier dattier dans l'agriculture d'oasis des pays méditerranéens. Rapport de synthèse de l'atelier "Culture *in vitro* du palmier dattier". 167-177.
- 50- Euwens C.J., 1978.** Effects of organics nutrients and hormones on growth development of tissues explants from coconut and date palm cultured *in vitro*. *Physiologia planetarium* 42(2): 173-174
- 51- Feraud-Keller C., Espach H., 1989.** Conditions d'apparition d'une embryogenèse somatique sur des cals issus de la culture de tissus foliaires du chêne vert (*Quercus ilex*). *Can. J. Bot* :67 N°4, pp 1066-1070

- 52- Ferry M., Bouguedoura N., El Hadrami I., 1998.** Patrimoine génétique et technique de propagation *in vitro* pour le développement de la culture du palmier dattier. *Cahiers sécheresse Vol 9 (2), p139-146.*
- 53- Fki L. 2005.** Application des suspension cellulaires embryogènes au clonage et à l'amélioration *in vitro* du palmier dattier (*Phoenix dactylifera* L.). Thèse de doctorat en sciences biologiques. Faculté de sciences de Sfax
- 54- Fki L, Masmoudi R., Kriaâ W., Mahjoub A., Sghaier B., Mzid R., Mliki A., Rival A., Drira N., 2011.** Date Palm Micropropagation via Somatic Embryogenesis in Date Palm Biotechnology, Shri Mohan Jain • Jameel M. Al-Khayri Dennis V. Johnson Editors, Chapter 4 : p 47-68
- 55- Flick C.E., Evans D.A. et Sharp W.R., 1983.** Organogenesis. In: Handbook of Plant Cell Culture. Evans, D.A., Sharp, W.R., Ammirato, P.V. et Yamada Y, ed. Macmillan Publishing Co. New York. Vol.1: 13-81.
- 56- Gamborg et Phillips, 1995.** Plant cell, tissue and organ culture. Springer labo. Manual. 358p.
- 57- Gautheret R. J., 1939.** La possibilité de réaliser la culture indéfinie des tissus de tubercule de carotte. CR. Acad. Sc., 208 : 118-120
- 58- Gavrilovic M. et al., 1996.** Manipulation d'analyse biochimique. 3^{ème} édition. Doin editeurs, P210
- 59- Givan C.V., 1979.** Methabolic detoxication of ammonia in tissues of higher plants. *Phytochemistry*, 18: 375-382
- 60- Greiner D., 1998.** Le marché de la datte, produit de rente des oasis: enjeux, diversité, tensions. Numéro spécial oasis. *Sécheresse* 1998, 9 (2): 155-162.
- 61- Gupta P.K., Timmis R., Timmis K., Carlson W., Grob J., Welty E., 1994.** Plantlet regenerated via somatic embryogenesis in Douglas-fir. *Biolog. Sci. Symp. Proc. Minneapolis* 35-39
- 62- Guerra M. P., Torres A.C., Teixeira J. B., 1999.** Embriogênese somática e semente sintética. In : Caldas L. S., Buso J. A.(ed) cultura de Tecidos e Transformação genetica de plantas Embrapa –SPI/CNPH, Brasilia, pp.533-568,
- 63- Hari V., 1980.** Effect of cell density changes and conditoned media on carrot cell embryogenesis. *Pflanzenphysiol.* 96:227-231
- 64- Haberlandt G., 1902.** Culturversuche mit isolierten, pflanzenzellen. In Beauchesnes, 1984: L'historique et les fondements de la culture *in vitro*. La culture *in vitro* et ses applications horticoles
- 65- Heylen C., Vendrig JC., 1988.** The influence of cytokinins and auxins on flower neoformation in thin cell layers of *Nicotiana tabacum* L. *Plant cell Physiol* 29: 665-671

- 66- Huang L.C. et Murashige T, 1983.** Tissue culture investigation of bomboos; 1- callus culture of *Bombosa*, *phyllostachys* and *Sasa*. Bot. Bull. Academia Sinica, 24, 31-52
- 67- Jahiel M., 1996.** Phénologie d'un arbre méditerranéen acclimaté en région tropicale. Le dattier au sud du Niger et son appropriation par la société Manga. Université Montpellier II. Sc. Tech. Languedoc. Doct. 239p.
- 68- Jones D., 1994.** Palmiers du monde. Edi. Könemann, 97-106.
- 69- Jonny E., Scherwinski-Pereira, Rodrigo S., da Guedes, Paulo César P., Fermino Jr, Tatiane L. Silva, Frederico Henrique S. costa 2010.** Somatic embryogenesis and plant regeneration in oil palm using the thin cell layer technique *In vitro* Cell.Dev.Biol.-Plant 46:378-385
- 70- Kamoun P. 1997.** Appareils et methods en biochimie et biologie moléculaire. P217-219
- 71- Kevers C., Coumans M., Coumans- Gilles M. F., Gaspar Th., 1984** Physiological and biochemical events leading to vitrification of plants cultured *in vitro* *Physiol. Plant.* 61: 69-74
- 72- Komamine A., Matsumoto M., Tsukahara M., Fujiwara A., Kawahara R., Ito M., Smith J., Nomura K. et Fujimura T. (1990).** Mechanisms of somatic embryogenesis in cell cultures physiology, biochemistry and molecular biology. VII International Congress of Plant Tissue and Cell Culture, Amsterdam. *Abstracts*, pp: 307-313.
- 73- Krochko J.E., Pramanic S.K., Bewley J.D. 1992.** Contrasting storage protein synthesis and messenger RNA accumulation during development of zygotic and somatic embryos of alfalfa. *Plant Physiol.* 99:46-53
- 74- Lachqer Sillou K. (1989).** Étude de l'embryogénèse somatique du palmier dattier (*Phoenix dactylifera* L.) à partir des tissus de cœurs de rejets. Thèse Doct. 3e Cycle, Univ. Cad Ayyad Marrakech, 120 p.
- 75- Letouze R. et Beauchesne G. 1989.** La technologie de la culture *in vitro*: principe et applications agricoles. Compte rendu du deuxième séminaire maghrébin sur la multiplication rapide du palmier dattier par la technique de culture *in vitro*, PNUD/FAO/RAB/88/024. 9-19.
- 76- Letouze R., et F. Daguin, 1989.** L'embryogénèse somatique: Des possibilités nouvelles pour la micropropagation du palmier dattier *Phoenix dactylifera* L. Compte rendu du deuxième séminaire maghrébin sur la culture *in vitro* du palmier dattier C.R.PNUD/FAO, Al watan press, lebanon, 51-56
- 77- Letouze R, Mercier L, Satour P, Daguin F et Lebrun J. J., 1991.** La caractérisation des espèces végétales: Application au palmier dattier. Bulletin PNUD. FAO. Réseau Maghrébin de Recherche sur la Phoeniculture et la Protection du palmier dattier, 1(4), 7-13, Al watan press, Lebanon.
- 78- Loshiavo F., Pitto L., Giulano G., Torti G., Nuti-Ronchi V., Marazziti D., Vergar R., Orselli S., Terzi M. 1989.** DNA methylation of embryogenic carrot cell cultures and its variations as caused by mutation, differentiation, hormones and hypomethylation drugs. *Theor. App. Genet.* 77 : 325-331

- 79- Loutfi K. (1989).** Multiplication végétative du palmier dattier (*Phoenix dactylifera* L.) à partir de la culture *in vitro* d'explants inflorescentiels. Thèse Doct.3e cycle. Marrakech, 105 p.
- 80- Louvet J., Bulit, J., Toutain G. et Rieuf P. 1970.** Le Bayoud, Fusariose vasculaire du Palmier dattier, symptômes et nature de la maladie, moyens de lutte. AI Awamia 35 : 161-182.
- 81- Maddock S.E. 1985.** Cell culture , somatic embryogenesis and plant regeration in wheat, barley, oats, rye and triticale. In: Brigh SWJ, Jones MGK (ed.) Advans in Agricultural Biotechnology: Cereal tissue and cell culture. Martinus, pp 131-174
- 82- Maheswaren G. et Williams E.G. 1985.** Origin and development of somatic embryoid formed directly on immature embryos of *Trifolium repens* *in vitro* Annals of botany 56: 619-630
- 83- Martin C., 1984.** La culture des plantes en éprouvette. La recherche, 160 (15) : 1362-137
- 84 Masmoudi-Allouche F., Meziou B., Kriaa W., Guargouri- Bouzid R., Drira N. 2010.** *In vitro* flowering induction in date palm (*Phoenix dactylifera* L) J; Plant growth regul. 29: 35-43
- 85- Martin C., Morel G., 1955.** Guérison de pomme de terre atteints d'une maladie à virus. C.R. Acad. Agric., 41 : 472-475
- 86- Mater, A.A., 1986.** *In vitro* propagation of *Phoenix dactylifera* L. Date Palm Journal 4137-152.
- 87- Merkle S.A., Parrot W.A., Williams E.G. 1995.** Application of somatic embryogenesis and embryos cloning. In Bhojwani SS (ed) plant Tissue culture: application and limitations. Amsterdam Elsevier, pp 67-101
- 88- Morel G., Martin C., 1952.** Guérison de dahlias atteints d'une maladie à virus. C.R. Acad. Sc. Paris, 235 : 1324-1325
- 89- Montoro P., Étienne H., Carron M.P. et Nougarede A. 1992 -** Incidence des cytokinines sur l'introduction de l'embryogenèse et la qualité des embryons somatiques chez *Hevea brasiliensis* Müll. Arg. C.R. Acad. Sci. Paris. T. 315, Série III, pp : 567-574.
- 90- Morcillo, F.F., 1999.** Etude comparée de l'accumulation des protéines de réserve pendant les embryogenèses zygotiques et somatiques du palmier à huile. Thèse de Doctorat. Université de Montpellier II, 125p
- 91- Munier .P. 1973.** Le palmier dattier. Techniques agricoles et productions.
- 92- Murachige, T. et Skoog, F. 1962.** A revised medium for rapid growth and biossays with tobacco tissue culture. Physiol. 15.pp:473-497.
- 93- Nixon R.W., Furr G.R. 1965.** Problems and progress in date palm breeding.

Date grower InsT. 42:2-5

- 94- Nomura K. et Komamine L., 1985.** Identification and isolation of single cells that produce somatic embryos at high frequency in carrot suspension culture. *Plant Physiol.* 79: 988-991
- 95- Ouafi S. S. 1987** Etude chimiotaxonomique par les flavonoïdes des cultivars du palmier dattier (*Phoenix dactylifera* L.). Magister en Biologie végétale, USTHB.
- 96- Ouafi S ; Bounaga N. 1988.** Les flavonoïdes marqueurs intraspécifiques chez le palmier dattier (*Phoenix dactylifera* L.). C.R. Acad. Sci. Paris, 306,III,399-404
- 97- Ouennoughi et Dubost, 2005.** Le voyage forcé des dattiers en Nouvelle Calédonie. Article scientifique. *Sécheresse* 2005. 16 (4). 241-246.
- 98- Ouinten M., 1996.** Diversité et structure génétiques des populations Algériennes de *Fusarium oxysporum f.sp. albedinis*, agent de la fusariose vasculaire (Bayoud) du palmier dattier. Thèse de doctorat présentée à l'université de Montpellier II. 63-68
- 99- Ozawa K. Komamine A., 1989.** Establishment of a system of high frequency embryogenesis from long-term cell suspension cultures of rice (*Oryza sativa* L.) *Theor. Appl. Genet.* 77 : 205-211
- 100- Pannetier C., Arthuis P., Lievroix D. 1981.** Néof ormation de jeunes plantes d'*Elaeis guineensis* à partir de cals primaires obtenus sur fragments foliaires cultivés *in vitro*. *Oleagineux* 36 : 119-122
- 101- Pasteur N., Pasteur G., Bonhomme F., Catalan J., Britton-Davidian J., 1987.** Manuel technique de génétique par électrophorèse des protéines. Techniques et documentations Lavoisier, 1-203.
- 102- Peyron G. 2000.** Cultiver le palmier dattier, G.R.I.D.A.O., Montpellier, 110 p
- 103- Phan C.T. et Letouze 1983.** A comparative study of chlorophyll, phenolic and protein contents, and of hydroxycinnamate: CoA ligase of normal and "vitreous" plants (*Prunus avium* L.) obtained *in vitro*. *Plant Sci. Lett.* 31: 323-327
- 104- Plummer D.T. 1989.** Techniques de biochimie. Edition Mc Graw-Hill, Paris, p89-102
- 105- Picard E. 1999.** Biotechnologie, Amélioration des plantes et sécurité alimentaire. Ed. ESTEM, Paris p 25-26
- 106- Renolds J. et Murachige T ; 1979:** Asexual embryogenesis in callus cultures of date palm *in vitro* 15(5), pp :385-387.
- 107- Refouvelet E. 1992.** Nutrition azotée de vitroplants de palmier dattier (*Phoenix-dactylifera* L.) en milieu solide et liquide. Maîtrise de Physiologie cellulaire et moléculaire Université de Clermont Ferrand

- 108- Renveni O., Adata Y., Lilien-Kipnis H., 1972.** A study of new and rapid methods for the vegetative propagation of date palms. Date growers inst. rept. 49: 16-24
- 109- Renveni O., Lilien-Kipnis H., 1974** Study of *in vitro* of date palm (*Phoenix-dactylifera* L.) tissues and organs. Agric. Res. Org. The volcanic enter Betdagan Israël
- 110- Rival A., Aberlenc-Bertossi F., Beulé T., Morcello F., Richaud F., Tregar J., Verdeil J.L., Durand-Gasselin T., Duval Y., Kouame B. 1998.** Multiplication clonale du palmier à huile par embryogenèse somatique (*Elaeis guineensis* Jacq.)
- 111- Saaidi. M., 1979.** Contribution à la lutte contre le Bayoud . fusariose vasculaire du palmier .Thèse de doctorat,université de Dijon France.
- 112- Saka H. 1998.** Acclimatation des vitroplants de palmier dattier INRAA. Cours Polycopié. Workshop AIEA. 8pp
- 113- Saka H., Abed F., Amara B., kermiche A. 1997** Embryogenèse somatique du palmier dattier (*Phoenix dactylifera* L.) –I- Induction de la callogenèse à partir d’organes de rejets de quelques cultivars. Rev. Rech. Agr. 0 : 1-8p
- 114- Schmidt E.D.L., Guzzo F., Toonen M.A.J., De Vries S.E. 1997.** A leucine –rich repeat containing recptor-like kinase markssomatic plant cells competent to form embryos. Development 124(10): 2049-2062
- 115- Sané D., Aberlenc-Bertossi F., gassama-Dia Y.K., Sagna M., Duval Y. , Borgel A. 2006.** Obtention de clônes acclimatées par embryogenèse somatique à partir de suspensions cellulaires de palmier dattier (*Phoenix dactylifera* L.).Recueil Conf. Int. Sur « Mutagénèse induite et biotechnologies d’appui pour la protection du palmier dattier contre le bayoud. 74p
- 116- Sharma K. et Thorpe T. A., 1995.** Asexual embryogenesis in vascular plants in nature and *in vitro* embryogenesis in plants, (T.A. Thorpe, ed.). Kluwer Academic Press, pp. 17-72.
- 117- Sharma D.R., Deepak S. et Chowdury, J.B. 1986.** Regeneration of plantlets from somatic tissues of the date palm *Phoenix dactylifera* L. Indian J. Exp. Bot. 24:763-766.
- 118- Scoarnec A. 1991.** Régénération du palmier dattier (*Phoenix dactylifera* L.) par organogénèse et embryogénèse somatique indirectes. Caractéristiques du matériel végétal en culture de tissus et en acclimatation. Thèse Doct. Univ. Angers, France, 160p.
- 119- Skoog F., Miller D., 1957.** Organ chemical control of growth and organ formation, in plant cultivated *in vitro*. Symp. Soc.exp. Biol., 11: 118-123
- 120- Steward F. et Mears K., 1958.** Growth and organised development of culture cells, organisation in culture grown from freely suspended cells. Am. J. Bot., 45: 705-708
- 121- Stolartz A., Macewics J., Lorz H., 1998.** Direct somatic embryogenesis and plant regeneration from leaf of *Nicotiana tabacum* L. Journal of plant Physiol. 137: 347-353

- 122- Schwendiman J., Pannetier C., et Michaux Ferrière N. 1988.** Histology of somatic embryogenesis from leaf explants of the oil palm (*Eleais guineensis* Jacq). *Annals of bot.*62: 43-52
- 123- Strosse H., R. Domergue, B.Panis, J.V. Escalant, et F.côte, 2003.** Suspensions cellulaires de bananiers et bananiers plantains. Guide technique INIBAP (A. Vézina et C.Picq, edits)
- 124- Thorpe TA, 1980. Organogenesis *in vitro* :** structural, physiological and biochemical aspects. IN vasil(ed) Perspectives in pant cell and tissue culture. Academic press, New York, pp 71-111
- 125- Toonen M.A.J., Hendriks T., Schmidt E.D.L., Verhoven H.A., Van Kammen A.B., De Vries S.C. 1994.** Description of somatic embryo-forming single cells in carrot cell suspension cultures employing video cell tracking. *Planta* 194: 565-572
- 126- Trabsi I. 1987.** Contribution à l'étude biochimique et électrophorétique des hordéines, des estérases et amylases de caryotypes du genre *Hordeum* L. DES en Physiologie végétale, USTHB
- 127- Triki M.A., Zouba A., Kouldia O., Ben Mahmoud O., Takrouni M.I., Garnier M., Bové J.M., Montarone M., Poupet A., Flores R., Daros J.A., Fadda Z.G.N., Moreno P., Duran-Villa N. 2003.** « Maladie des feuilles cassantes » or a Brittle leaf disease of date palms in tunisia/ Biotic or abiotic disease? *Journal of plant Pathology* 85 (2): 71-79
- 128- Trigiano R.N., Conger B.V., 1987.** Regulation of growth and somatic embryogenesis by praline and serine in suspension cultures of *Dactylis glomerata*. *Journal of plant physiology* 130:49-55
- 129- Wang S. Tang L. Chen F 2001.** *In vitro* flowering of bitter melon. *Plant cell Rep* 20: 393-397
- 130- Weinman S., et Mehul P., 2000.** Biochimie, structure et fonction des protéines Edition Dunad, Paris, p48-49
- 131- White P. R. , 1939.** Potentiality unlimited growth of excised plant callus in an artificial nutrient. *Am. J. Bot.*, 96: 59-64
- 132- Wuidart W. et Konan K. 1989.** Le sevrage des vitroplants de palmier à huile.Oléagineux. Vol. 44. N° 12. pp 573-576.
- 133- Yatta D., 2007.** Embryogenèse somatique du palmier dattier et etude de la conformité génétique des vitroplants par marqueurs moléculaire. Thèse de Magister USTHB. Alger
- 134- Yeh M.L. et Chang W.C., 1986.** Somatic embryogenesis and subsequent regeneration from inflorescence callus of *Bambusa beechayana* Munro var *Beecheyana*. *Plant Cell Reports* 5, pp : 409-411.
- 135- Zaid. M., 1989.** Embryogenèse somatique chez le Palmier dattier (*Phoenix dactylifera* L.) Thèse de Docteur ès Sciences, Université de Paris Sud, univ. d'Orsay, 92 pp.

- 136- Zaki A., Tirichine A., Moussaoui B., Kharsi M., 2011.** La connaissance de la diversité génétique du palmier dattier dans la région d'Adrar (Touat, Gourara, Tidikelt). Rec. 1^{er} Symp. Int. Symposium palmier dattier Nov, 2011
- 137- Zhang T., (2007)** In vitro flowering of *Perilla frutescens*. *In vitro cell Dev Biol Plant* 43:91-94
- 138- Zhou J.H., Zhou JR., Lin BC., Din J., 2004** Influence of 6-BA and amino acids on flower formation from cotyledons of cucumber in vitro *Plant Physiol Commun* 6: 31-33
- 139- Zimmermann E.S. et Read P., 1986.** Micropropagation of typha species. *Hort. Sci.*, 21 (5) : 1214-1216 .

ANNEXE I

TABLEAU 1 : COMPOSITION DU MILIEU MS

(Murashige et Skoog 1962)

MACRO ELEMENTS	Concentration en mg/l
Ammonium nitrate NH_4NO_3	1650
Potassium nitrate KNO_3	1900
Calcium chlorure $\text{CaCl}_2, 2\text{H}_2\text{O}$	440
Calcium nitrates $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2, 4\text{H}_2\text{O}$	370
Dihydrogénophosphate de potassium KH_2PO_4	170
MICRO ELEMENTS	(mg/l)
Acide borique H_3BO_3	6.2
Sulfaté de Manganèse $\text{MnSO}_4, \text{H}_2\text{O}$	16.
Sulfaté de Zinc $\text{ZnSO}_4, 7\text{H}_2\text{O}$	8.6
Potassium iodure KI.	0.83
Sodium molybdate Na_2MoO_4	0.25
Sulfaté de Cuivre $\text{CuSO}_4, 5\text{H}_2\text{O}$	0.025
Chlorure de Cobalt $\text{CoCl}_2, 6\text{H}_2\text{O}$	0.025
VITAMINES (mg/l)	

Pyridoxine	0,5
Thiamine-HCl	0,1
Acide nicotinique	0,5
Fer EDTA (mg/l)	
Na, EDTA	37.3
FeSO ₄ , 7H ₂ O	27.8

Macro MS modifié	Concentration mg/L
Potassium nitrate KNO ₃	1900
Calcium chlorure CaCl ₂ , 2H ₂ O	440
Calcium nitrates Ca(NO ₃) ₂ , 4H ₂ O	370
Dihydrogénophosphate de potassium KH ₂ PO ₄	170

ANNEXE 2

Solutions mères

MACRO ELEMENTS (mg/l)	Concentration en mg/L	(n) fois Concentration	Volume Prélevé de la solution de 2litres Macro MS
Ammonium nitrate NH_4NO_3	1650	X25	40ml
Potassium nitrate KNO_3	1900	X25	
Calcium chlorure $\text{CaCl}_2, 2\text{H}_2\text{O}$	440	X25	
Calcium nitrates $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2, 4\text{H}_2\text{O}$	370	X25	
Dihydrogénophosphate de potassium KH_2PO_4	170	X25	
MICRO ELEMENTS (mg/l)	Concentration en mg/L	(n) fois Concentration	Volume Prélevé de la solution de 1litre Micro MS
Acide borique H_3BO_3	6.2	X100	10ml
Sulfaté de Manganèse $\text{MnSO}_4, \text{H}_2\text{O}$	16.	X100	
Sulfaté de Zinc $\text{ZnSO}_4, 7\text{H}_2\text{O}$	8.6	X100	
Potassium iodure KI.	0.83	X100	

Sodium molybdate Na_2MoO_4	0.25	X100	
Sulfaté de Cuivre $\text{CuSO}_4, 5\text{H}_2\text{O}$	0.025	X100	
Chlorure de Cobalt $\text{CoCl}_2, 6\text{H}_2\text{O}$	0.025	X100	

VITAMINES (mg/l)	Concentration en mg/L	(n) fois Concentration	Volume Prélevé de la solution de 100ml vitamines MS
Pyridoxine	0,5	X100	
Thiamine-HCl	0,1	X100	1ml
Acide nicotinique	0,5	X100	
Fer EDTA (mg/l)	Concentration en mg/L	(n) fois Concentration	Volume Prélevé de la solution de 1litre FerEDTA MS
Na ₂ EDTA	37.3	X100	10ml
$\text{FeSO}_4, 7\text{H}_2\text{O}$	27.8	X100	

ANNEXE 3

Composition des milieux

-Milieux d'induction

Eléments	Milieu M25/litre	Milieu P12,5/litre	Milieu M100/litre
Macro MS	40 ml	40ml	40 ml
Micro MS	10 ml	10 ml	10 ml
Fer EDTA	10 ml	10 ml	10 ml
KH ₂ PO ₄	100 mg	100 mg	100 mg
NAH ₂ PO ₄	170 mg	170 mg	170 mg
Adenine	40 mg	40 mg	40 mg
Citrate d'ammonium	200 mg	200 mg	200 mg
L-Glutamine	100 mg	100 mg	100 mg
Thiamine	1mg	1mg	1mg
Myo-inositol	100mg	100mg	100mg
IPA	1mg	1mg	3mg
Picloram	-	12,5mg	
2,4D	25mg	-	100 mg
Saccharose	45mg	45mg	45mg
Agar Agar	7g	7g	7g
Charbon actif	200mg	200mg	3g

-Milieu de prolifération, maintien, et de régénération

Eléments	P5	GMN/litre	GMN ₂₀₀ /litre	GMP/litre
Macro MS	40ml	40 ml		40ml
Macro MS modifié			40ml	
Micro MS	10ml	10ml	10ml	10ml
Fer EDTA	10ml	10ml	10ml	10ml
KH ₂ PO ₄	100mg	100mg	100mg	100mg
NAH ₂ PO ₄	170mg	170 mg	170 mg	170 mg
Adenine	40mg	40mg	40mg	
Citrate d'ammonium		200 mg	200 mg	200 mg
L-Glutamine	200mg	100 mg	100 mg	100 mg
Thiamine	1mg	1mg	1mg	1mg
Myo-inositol	100mg	-	-	-
MnSO ₄	40mg	-	-	-
Vitamines MS : Thiamine Acide nicotinique Pyridoxine	-	1ml	1ml	1ml
IPA	1mg	-	-	-
Picloram	5mg	-	-	-
Saccharose	40g	60g	60g	60g

Agar agar	7g	-	-	-
Phytigel		2g	2g	2g
Charbon actif	200mg	200mg	200mg	200mg
NH ₄ NO ₃			200 mg	

ANNEXE 4

Protocole de coloration APS + Naphtol blue black

- 1- Hydrolyser par l'acide acétique périodique pendant 5mn
- 2- Laver à l'eau courante
- 3- Colorer par le réactif de schiff, à l'obscurité pendant 20mn
- 4- Laver à l'eau courante jusqu'à ce que l'eau soit incolore
- 5- Colorer dans le naphtol blue black à 1% dans l'acide acétique à 7% porté préalablement à 60°C pendant 5mn
- 6- Laver rapidement à l'eau
- 7- Régresser par l'acide acétique à 7%
- 8- Sécher et monter

Solutions mères pour l'étude enzymatique

- - **Solution d'acrylamide-bisacrylamide (30%-0,8%)**
 - - 30g d'acrylamide et 0,8g de bisacrylamide sont dissous dans 100ml d'eau distillée
 - - la solution est filtrée puis stockée dans un flacon sombre à 4°C
 - **Solution tampon Tris-Hcl 0,5M, pH 6,8**
 - 6g de Tris sont dissous dans 50ml d'eau distillée
 - On ajuste le pH à 6,8 avec Hcl 1N
 - On complète à 100ml avec de l'eau distillée
 - la solution est filtrée puis stockée dans un flacon sombre à 4°C
 - **Solution tampon Tris-Hcl 3M, pH 8,8**
 - 36,34g de Tris sont dissous dans 80ml d'eau distillée
 - On ajuste le pH à 8,8 avec Hcl 1N
 - On complète à 100ml avec de l'eau distillée
 - la solution est filtrée puis stockée dans un flacon sombre à 4°C
 - **Solution tampon Tris-Hcl 3M, pH 8,5**
 - 2,4g de Tris sont dissous dans 50ml d'eau distillée
 - On ajuste le pH à 8,5 avec Hcl 1N
 - On complète à 100ml avec de l'eau distillée
- la solution est filtrée puis stockée dans un flacon sombre à 4°C