

République Algérienne Démocratique et Populaire

Ministère de l'Enseignement supérieur
et de la Recherche Scientifique



Université Mouloud Mammeri de Tizi-Ouzou
Faculté des Sciences Biologiques et Sciences Agronomiques
Département de biologie animale et biologie végétale

MEMOIRE

de fin d'étude en vue de l'obtention du diplôme de
MASTER en sciences biologiques.

Spécialité : génétique et amélioration des plantes.

Intitulé :

Contribution à la multiplication de cals embryogènes et
à l'initiation de la suspension cellulaire chez trois
cultivars de palmier dattier (*phoenix dactylifera* L.)
(Deglet Nour, Tagaza et Takarbucht).

Présenté et soutenu publiquement le : Mardi 08 juillet 2014

Par: M^r **AZZOUG** Rabah

M^r **BERRICHI** Khaled

Devant de jury:

Promoteur : Mme D. YATTA

Chargée de la recherche à l'INRA.

Co-promoteur: Mme S. YAKOUB – BOUGDAL

Professeur à l'UMMTO.

Président : Mme K. TALEB

M.A.A à l'UMMTO.

Examineur : Mme L. LAKABI

M.A.A à l'UMMTO.

Examineur : Mme S. ALI AHMED

M.A.B à l'UMMTO.

Le mémoire fut une expérience très spéciale. C'est un long chemin qu'on commence avec une multitude de questions et avec des périodes de hauts et de bas. Quand les travaux sont achevés, on se rend compte que sur ce temps de travail, on a réalisé beaucoup de progrès au niveau du savoir et surtout du savoir faire. Ce mémoire reste, une belle aventure humaine et scientifique dans laquelle la curiosité, l'envie d'acquérir le savoir, nous incitent à avancer toujours plus loin.

Si cette expérience a été menée à bien c'est grâce à de nombreuses personnes que nous avons rencontrées durant la réalisation de ce mémoire et que nous souhaitons remercier vivement.

Ce travail a été effectué dans le cadre d'un projet de recherche PNR 4 et projet de coopération avec l'AIEA (Agence Internationale de l'Energie Atomique) lancé par la division biotechnologie et amélioration des Plantes de l'Institut National de la Recherche Agronomique d'Algérie (INRAA). Que Madame YATTA Djamila, chargée de la recherche et chef de projet, en soit ici remerciée avec beaucoup de reconnaissance pour les efforts qu'elle déploie pour la bonne marche du projet, pour son encadrement, ses orientations le long de notre expérimentation.

Nous exprimons également nos remerciements particuliers à Madame YAKOUB BOUGDEL Saliha professeur et chargée de recherche à l'université MOULOUD MAAMRI de TIZI-OUZOU, qui a bien voulu codiriger ce travail. Nous souhaitons vivement continuer à bénéficier de son expérience et de son aide pour nos travaux ultérieurs.

Nos vifs Remerciements vont aussi à Madame K.TALEB (M.M.A) à l'UMMTO pour l'honneur qu'elle nous a fait de présider notre jury.

Nous sommes très reconnaissants à Madame L.LAKABI (M.M.A) et Madame S.AIT AHMED (M.A.B) à l'université MOULOUD MAAMRI de TIZI-OUZOU qui malgré leurs nombreuses obligations ont accepté de juger ce travail. Quelles trouvent ici l'expression de Nos remerciements les plus vifs et nous sommes convaincus que leurs judicieuses remarques nous seront d'une grande utilité.

Nous tenons à exprimer toute notre gratitude à tout le personnel du laboratoire de C.I.V de l'INRA.A pour leur sympathie et leur gentillesse. Nous avons passé vraiment un séjour inoubliable au sein de votre laboratoire.

Nous adressons par la même occasion nos remerciements à tous ceux qui ont contribué de proche ou de loin à la réussite de ce travail. Merci à vous tous.

Dédicaces

Je dédie cet ouvrage à mes grands parents :

- Mes défunts grand-mère « Mennoun » et grand père Mohand Ouamar (que DIEU les accueille dans son vaste paradis) qui ont trouvé le repos éternel durant la réalisation de ce manuscrit.

- Mon grand père « Amar », a ma grand-mère « Chavha » (que DIEU les accueille dans son vaste paradis).

Je dédie ce modeste travail à ma famille, notamment:

- A celle qui m'a comblé d'amour d'affection et d'encouragement pour que je devienne l'homme que je suis aujourd'hui. Merci maman « Ouiza ».

- A mon père « Amar » qui a sacrifié tout ce qu'il avait de chère pour que je garde le sourire et pour me voir grandir en homme fier.

- A mon grand frère « Lyes » qui est pour moi un exemple, sa femme « Kahina » et à leurs enfants « Ilann » et « Elena » ces petits anges qui me comble de joie.

- A mon petit frère « Mahdi », qui a toujours été présent pour moi.

- A mes tantes « Djoudjou » et « Mamou » qui m'ont toujours soutenus.

Ce travail est également dédié à mes amis :

- Toute la team .tizi. surtout les quatre inséparables « Pipiyou, Zari3a, 9ninha et Punicher », ces frères qui m'ont constamment épaulé.

- Mes très chères « Fatma, Karima, Said, Fatah, Younes et Moumouh », j'ai toujours trouvé en vous le soutien et le réconfort.

- Sans oublier mon ami binôme « Rabah ».

Khaled

Dédicaces

Après ce long chemin, **Dieu** merci, enfin la lumière, un rêve qui se réalise.

Maman, sache que je t'aime à en mourir. Tu es le mot pureté et sa définition, que **Dieu** prolonge ta vie à l'infini afin que je puisse contribuer à te rendre heureuse le plus longtemps possible...

Papa, merci pour tous que **Dieu** te soigne nchallah et te garde toujours pré de moi.

A toi mon frère Azzedine je te dédis ce mémoire .ma famille je pense à vous chaque jour et je vous aime très forts.

Quant à toi Lynda, que dois-je te dire ? Les mots ne suffisent pas pour te définir ta toujours été là pour me soutenir et me comblé d'amour. Tu m'as donné le courage et la bravoure. Que **Dieu** me donne la force pour te donner la vie que tu mérites.

Je dédie aussi ce modeste travail à toute ma grande famille. En particulier pour toi mon oncle Rabah, t'était toujours à mes cotés dans les moments les plus dures de ma vie. Merci pour tous.

Mes pensées aussi à vous tous, cousins et cousines sans exception je vous adore.

Mes amies vous êtes nombreux Kouci, Said, Fateh, Aziz, Younes, Moumouh Lakhder..... Permettait moi de vous dire que je n'oublierais jamais les moments qu'on a passés ensemble merci pour tous.

Tizi team appeler aussi les inséparables (Pipiyou, 9ninha, Zari3a, Punicher) vous n'êtes pas mes amies plutôt mes frères, je vous aime à l'infinie merci pour tous Khaled, Hakim, Khero.

A toute personne qui m'a aidé de près ou de loin pour terminer ce travail.

Que **Dieu** nous protège est nous guide...

Rabah

Liste des abréviations

2,4-D : l'acide 2,4-diclorophénoxyacétique

ADN : Acide désoxyribonucléique.

AIB : L'acide indole butyrique

An : Annexe.

ANA : l'acide naphtalène acétique

APG III : Angiosperm Phylogeny Group

ARN m : Acide ribonucléique messenger

DN : Deglet Nour.

E S : Embryogenèse Somatique.

E Z : Embryogenèse Zygotiques.

FAO : Food and Agriculture Organization

Hcl : Acide chlorhydrique.

IPA : l'Isopentenyl adénine

J.-C : Jésus Cris.

M100 : Milieu solide.

MS : Murashige et Skoog.

NaOH : Soude.

NBB : Naphtol blue black

P12,5 : Milieu solide modifier 12,5g piclorame

P5 : Milieu liquide.

PH : Potentiel hydrogène

Picloram : l'acide 4-amino-3,5,6 trichloropicolinique

SCE : Suspension cellulaire embryogène.

TGZ : Tagaza.

TKB : Takarbucht.

N°	Titre de la figure	Page
Figure 1	Propagation de la culture du palmier dattier dans l'ancien continent (d'après MUNIER, 1973).	3
Figure 2	Graine archéologique carbonisée, datant du V ^{ème} siècle avant notre ère (Ayn-Manâwir, oasis de Kharga, Egypte) (d'après Newton C., 2006)	4
Figure 3	Distribution de l'espèce <i>Phœnix dactylifera</i> L. dans le monde (Anonyme)	5
Figure 4	Pourcentage de palmier dattier dans 5 pays du Maghreb.	6
Figure 5	Distribution du palmier dattier en Algérie (d'après HANNACHI et al., 1998)	7
Figure 6	Représentation de la distribution des différentes espèces de <i>phœnix</i> dans le monde (d'après Barrow, 1998 ; Henderson, 2009).	10
Figure 7	Représentation schématique des parties composantes du palmier dattier (d'après MUNIER, 1973).	13
Figure 8	Schéma d'une coupe transversale d'une datte (éléments constitutifs d'une datte) (d'après MUNIER, 1973).	14
Figure 9	Répartition de la production mondiale de dattes.	16
Figure 10	Plantules obtenus d'une multiplication par graines (original).	21
Figure 11	Rejets à la base des stipes (original).	22
Figure 12	Les trois modes de reproductions <i>in vitro</i> ((d'après PEYRON, 2000).	24
Figure 13	Cals friable du cultivar Deglet Nour en culture sur milieu solide M ₁₀₀ .	30
Figure 14	Cals en culture dans un milieu liquide.	31
Figure 15	Cals destiné à l'étude histologique.	31
Figure 16	Distributeur de milieux de culture (A). Stérilisation du milieu M ₁₀₀ solide dans l'autoclave (B).	33
Figure 17	Repiquage des cals sous la hotte à flux laminaire.	34
Figure 18	Les différentes étapes de mise en culture dans un milieu liquide.	35
Figure 19	Fixation des cals dans le fixateur F.A.A.	36
Figure 20	Pompe à vide (A). Désoxygénation des cals par la pompe à vide (B).	36
Figure 21	Les cals après un passage sous vide.	37
Figure 22	Passage dans l'eau distillée.	37
Figure 23	Déshydratation dans les alcools à différentes concentrations.	38
Figure 24	Passage des cals dans les bains successifs de solvant (xylol).	38

Figure 25	Bloques de paraffine contenant des cals.	39
Figure 26	Echantillon sur porte block (A). Réalisation des coupes sur microtomes (B).	39
Figure 27	Étalement de la gélatine sur les lames (A). Dépôts d'un ruban sur une lame (B).	40
Figure 28	Collage des lames sur plaque chauffante à 60° (A). Séchage des lames à température ambiante (B).	40
Figure 29	Lames obtenues après coloration.	41
Figure 30	Induction de la callogenèse (A). Multiplication de cals (B).	43
Figure 31	Effet de la concentration et de la nature des régulateurs de croissance sur le nombre de souches obtenues chez les trois cultivars après 4 mois de subculture.	43
Figure 32	Evolution du nombre de cals des trois cultivars durant la phase d'induction et de multiplication.	45
Figure 33	Nombre de cals des trois cultivars en multiplication sur milieux P _{12,5} (A). Nombre de cals des trois cultivars en multiplication sur milieu M ₁₀₀ (B).	46
Figure 34	Taux de multiplications et d'infections des trois cultivars.	47
Figure 35	Mise en culture du cal. (A et B) Aspect du cal après trois semaines (apparition de microcals de classe I et II). (C) Suspension cellulaire en milieu liquide agité. (D, E et G)	54
Figure 36	Cal embryogène dissocié en petits groupes cellulaires (G x 40).	57
Figure 37	Type de cellules colorées par fluorescéine di-acétate (FDA) sur le microscope inversé (G x 40).	57
Figure 38	Courbe de croissance de la suspension cellulaire du cultivar DN _{4A} et TGZ _{3B}	58
Figure 39	Grosses cellules dépourvus de cytoplasmes. (A) Cellules avec gros noyaux et cytoplasme dense. (B)	63
Figure 40	Aspects histologiques de cals friables et compacts obtenus chez le cultivar Tagaza (G x 40).	64
Figure 41	Indication du tissu parenchymateux et des cellules embryogènes sur une coupe histologique.	65

N°	Titre du tableau	Page
Tableau I	Les quatorze espèces du genre "Phœnix", ainsi que leur répartition, (CHEVALIER, 1952) modifiée par AZZOUG et BERRICHI, 2013.	9
Tableau II	Les principales variétés de dattes algériennes et leur localisation (AMRANI, 2002).	11
Tableau III	Les composants nutritifs de la datte (anonyme).	15
Tableau IV	L'importance relative et la distribution des principaux ravageurs du palmier dattier.	19
Tableau V	L'importance relative et la distribution des principales maladies du palmier dattier.	20
Tableau VI	Les principaux travaux de culture in vitro (embryogenèse somatique) sur palmier dattier.	25
Tableau VII	Etude de la callogenèse et de la prolifération des souches embryogènes sur les deux milieux de culture M ₁₀₀ et P _{12.5} .	44
Tableau VIII	Récapitulatif des analyses descriptives selon les milieux de culture.	48
Tableau IX	Récapitulatif des analyses descriptives selon les trois cultivars.	49
Tableau X	Les différentes étapes appliquées tout au long de la période de culture et prolifération des cals.	56
Tableau XI	La variation du poids frais des suspensions cellulaires en fonction des repiquages durant 10 semaines.	58

Introduction	1
--------------	---

CHAPITRE 1 : Données bibliographiques du palmier dattier.
--

1.	Origine et répartition géographique	3
1.1.	Origine	3
1.1.1.	Aperçu historique	3
1.2.	Répartition géographique dans le monde	5
1.3.	Répartition géographique des palmiers dattier en Algérie	6
2.	Taxonomie	8
	• La classification de Munier	8
	• La classification de Cronquist	8
	• La classification phylogénétique	8
2.1.	Distribution de l'espèce phoenix dans le monde	9
2.2.	Diversité variétale	10
3.	Description morphologique	11
3.1.	L'appareil végétatif	11
3.1.1.	Le système racinaire	11
3.1.2.	Rejet	12
3.1.3.	Le stipe ou tige	12
3.1.4.	Gourmand	12
3.1.5.	Les palmes	12
3.1.6.	Les bourgeons	13
3.2.	L'Appareil de reproduction	14
3.2.1.	L'inflorescence	14
3.2.2.	Les fleurs	14
3.2.3.	Le fruit	14
4.	Intérêt économique	16
	• En Algérie	17
5.	Importance écologique	17
6.	Contraintes du développement de la phoeniciculture	18
6.1.	Contraintes agronomiques	18
6.2.	Autres contraintes de développement	18
7.	Mode de multiplication chez le palmier dattier	21
7.1.	Méthodes classiques	21
7.1.1.	Multiplication par graine (par semis)	21
7.1.2.	Multiplication par rejet	22
7.2.	Multiplication in vitro	23
8.	La suspension cellulaire	26
8.1.	Initiation d'une suspension cellulaire	26
8.2.	Maintenance d'une suspension cellulaire	26
9.	Histologie	28

CHAPITRE 2 : Matériels et méthodes

1.	Matériel végétal	30
1.1.	Multiplication de cals	30
1.2.	Suspension cellulaire	31
1.3.	Histologie	31
2.	Méthodologie	32
2.1.	Multiplication de cals	32
2.1.1.	Stérilisation du matériel de culture	32
2.1.2.	Préparation des milieux solides (M ₁₀₀ , P _{12,5})	32
2.1.3.	Stérilisation du milieu	33
2.1.4.	Entretien et conditions de culture	33
2.2.	Suspension cellulaire	34
2.2.1.	Stérilisation du matériel de culture	34
2.2.2.	Préparation du milieu liquide	34
2.2.3.	Stérilisation du milieu	34
2.2.4.	Protocole expérimental suivi	34
2.3.	Histologie	36
2.3.1.	Le prélèvement	36
2.3.2.	La fixation	36
2.3.3.	Le lavage	37
2.3.4.	La deshydratation	37
2.3.5.	L'imprégnation (la substitution)	38
2.3.6.	L'inclusion	38
2.3.7.	La réalisation des coupes	39
2.3.8.	Confection des lames	39
2.3.9.	La coloration	40
2.3.10.	La lecture des lames	41

CHAPITRE 3 : Résultats et discussions

1.	Multiplication de cals	42
1.1.	Analyse comparative de la multiplication sur les deux milieux	42
1.2.	Analyse comparative de la callogenèse chez les trois cultivars	45
1.3.	Les contraintes de la multiplication	46
1.4.	Analyse statistique	48
a)	Analyse descriptive selon les milieux de culture	48
b)	Analyse descriptive selon les cultivars	49
➤	Discussion et conclusion	51
2.	Etablissement de la suspension cellulaire	54
2.1.	Entretien des suspensions en culture	54
2.2.	Les observations microscopiques	56
2.3.	Développement et régénération de la suspension cellulaire primaire	59
➤	Discussion et conclusion	60
3.	Histologie	63
➤	Discussion et conclusion	66
	Conclusion générale	68
	Références bibliographiques	70

ANNEXES**RESUME**

Le palmier dattier, *Phoenix dactylifera* L. (Arecaceae), est un palmier subtropical anciennement domestiqué (MUNIER, 1973). Il est largement cultivé pour ses multiples usages et ses services écosystémiques, en particulier pour ses fruits comestibles dont des milliers de variétés ont été sélectionnées (BOUGUEDOURA, 1979) et pour sa capacité d'adaptation aux conditions des climats arides les plus sévères (BEN AÏSSA, 2008). Sa présence crée un microclimat permettant le développement de diverses formes de vie animale et végétale indispensables pour le maintien et la survie des populations du désert (EL HOUMAIZI, 2002).

Dénommé par LINNE depuis 1734 (*Phoenix dactylifera* L.), Le palmier dattier est une plante pérenne et lignifiée bien adaptée aux climats sahariens chauds et secs. C'est une espèce dioïque, diploïde ($2n=36$) et polyploïde pour certaines variétés. Elle est angiosperme, monocotylédone.

Le palmier dattier est répandu sur tous les continents, car en plus des zones sahariennes la plante est cultivée à petite échelle en Europe, principalement en Espagne et Italie, aux États-Unis d'Amérique, en Amérique latine (Mexique, Argentine) mais aussi en Australie (HILGEMAN, 1972).

La production mondiale de dattes varie selon les années mais occupe aujourd'hui une grande place dans l'économie (ABERLENC-BERTOSSI, 2012). Le monde arabo-musulman contribue à 70% de cette production et l'Égypte étant le premier pays producteur mondial avec environ 1 375 000 tonnes donc 18,5% de la production mondiale (FAO, 2013 in YATTA 2013). L'Algérie, par son effectif de plus de 18 millions de palmiers et de 900 variétés, occupe une place importante parmi les pays producteurs et exportateurs de dattes dans le monde.

Outre sa production de dattes pour l'alimentation humaine, le palmier dattier, offre une large gamme de sous-produits utilisables (BOUNA, 2002).

Le Bayoud ou fusariose est une maladie engendrée par un champignon (*Fusarium oxysporum* f.sp *albedenis*) vivant dans le sol. Cette maladie tellurique contamine les racines du palmier et finit par atteindre l'intégralité de l'arbre.

Apparue au Maroc cette maladie a progressé vers l'Algérie. Cette décimation, aussi impressionnante soit-elle, ne reflète pas à elle seule les dégâts, car le Bayoud a aussi contribué à accentuer le phénomène de désertification.

La lutte contre le Bayoud diffère suivant les caractères que ce dernier présente. Plusieurs méthodes et mesures contre le Bayoud ont été adoptées sur le palmier dattier telles que :

- La lutte chimique, méthode qui est écartée car elle consiste à utiliser des fongicides à action systémique ou endothérapie, qui sont des produits peu stables dans le sol donc polluants.

- Les mesures prophylactiques, qui visent à protéger les zones encore saines en interdisant le matériel végétal et les sols provenant de pays infectés.

- La lutte biologique, par la mise en œuvre de stratégies curatives pour mieux contrôler le champignon et protéger les arbres.

Ces méthodes n'ont pas pu stopper le Bayoud, en plus certaines sont non seulement coûteuses mais provoquent des problèmes environnementaux.

- Actuellement, la multiplication végétative par culture *in vitro* s'avère efficace pour le maintien et la préservation de la diversité, indispensables pour accroître la vitesse de reconstitution des palmeraies détruites, leurs rajeunissement, et l'extension des palmeraies existantes.

La multiplication *in vitro* (lutte génétique) par embryogenèse somatique utilise la différenciation et la dédifférenciation cellulaire pour la formation d'embryons à partir de cellules somatiques, apporte des solutions pour compléter les techniques traditionnelles dans un délai raisonnable (JOHN E. SMITH, 2004).

La culture *in vitro* permet donc soit la multiplication conforme, soit la création de variétés nouvelles (BOUGUEDOURA, 1991).

La suspension cellulaire embryogène constitue un matériel de choix pour le développement de protoplastes viables ayant de bonnes aptitudes à la division et à la régénération de nombreuses plantes.

Nos travaux s'inscrivent dans le cadre des travaux de recherche de la division palmier dattier de l'Institut National de la Recherche Agronomique d'Alger (INRA-A) qui a pour objectif d'améliorer le palmier dattier par voies biotechnologiques.

Ainsi, notre travail comportera trois parties ; une multiplication de cals de trois cultivars de palmier dattier (Deglet Nour, Tagaza, Takerbucht) par repiquage périodique sur les deux milieux, M₁₀₀ et P_{12.5}. L'établissement d'une suspension cellulaire afin d'obtenir du matériel pour l'isolement de protoplastes et en fin une étude histologique de cals embryogènes pour explorer leurs structures tissulaires.

1. Origine et répartition géographique

1.1. Origine

Les palmiers les plus anciens remontent au miocène. Le palmier dattier a été cultivé dans les zones arides et semi-arides de l'ancien monde situé 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. Depuis, elle progressa vers le Nord du pays et gagna la région côtière du plateau Iranien puis la vallée de l'Indus (MUNIER, 1973). Depuis l'Egypte, les techniques culturales du dattier gagnèrent la Libye puis se propagèrent d'abord vers les autres pays du Maghreb comme la Tunisie, l'Algérie et le Sud Marocain et arrivèrent ensuite dans l'Adrar Mauritanien.

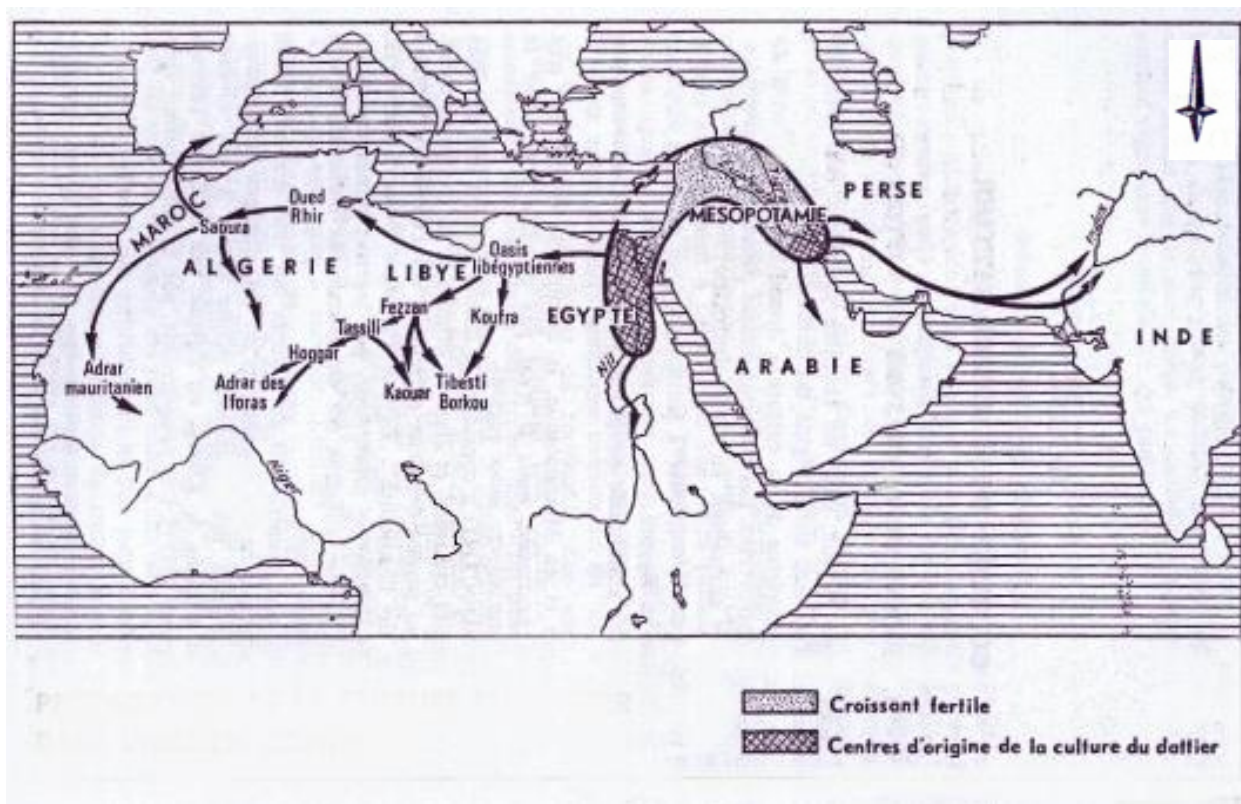


Figure 1 : Propagation de la culture du palmier dattier dans l'ancien continent (D'après MUNIER, 1973).

1.1.1. Aperçu historique

Actuellement la culture du dattier s'étend dans l'Hémisphère Nord préférentiellement dans les régions arides et semi-arides chaudes (OUINTEN, 1995). Les vestiges archéobotaniques les plus anciens, attestant de la consommation de dattes, sont des graines

carbonisées et minéralisées d'assemblages orientales et datées du VI^{ème} millénaire avant J.-C. (BEECH et SHEPHERD, 2001 ; BEECH, 2003). Le statut du palmier dattier n'est toutefois pas établi pour cette époque, car à l'état actuel des recherches, aucun caractère ne permet de différencier dans le matériel archéobotanique les dattes de palmier « sauvage » des dattes de palmier cultivé (BEECH, 2003 ; TENGBERG, 2003a).

Dès lors et surtout à partir du II^{ème} millénaire avant J.-C jusqu'au début de l'ère chrétienne, de nombreuses attestations archéobotaniques (Fig.2), représentations iconographiques et mentions textuelles montrent que la palmeraie oasienne se développe partout autour du golfe persique et en Afrique saharienne, particulièrement en Egypte (NEWTON et *al.*, 2006) et en Libye (VAN DER VEEN, 1992 ; PELLING, 2005).



Figure 2 : Graine archéologique carbonisée, datant du V^{ème} siècle avant notre ère (Ayn-Manâwir, oasis de Kharg, Egypte) (D'après NEWTON C., 2006).

1.2. Répartition géographique dans le monde

Le palmier dattier est localisé dans l'hémisphère nord, là où les conditions climatiques le permettent, entre le 35^{ème} degré et le 15^{ème} degré de latitude nord.

Sa culture est localisée sur la rive méditerranéenne de l'Afrique jusqu'au proche-orient, depuis le sud de l'Iran jusqu'à la côte atlantique de l'Afrique du nord et en Asie.

Dès le 18^{ème} siècle, il a été introduit en Amérique en particulier en Californie. Il ne vit que dans les déserts chauds et s'étale entre les parallèles Nord 9°18' (Cameroun) à 39°44' (Elche en Espagne).

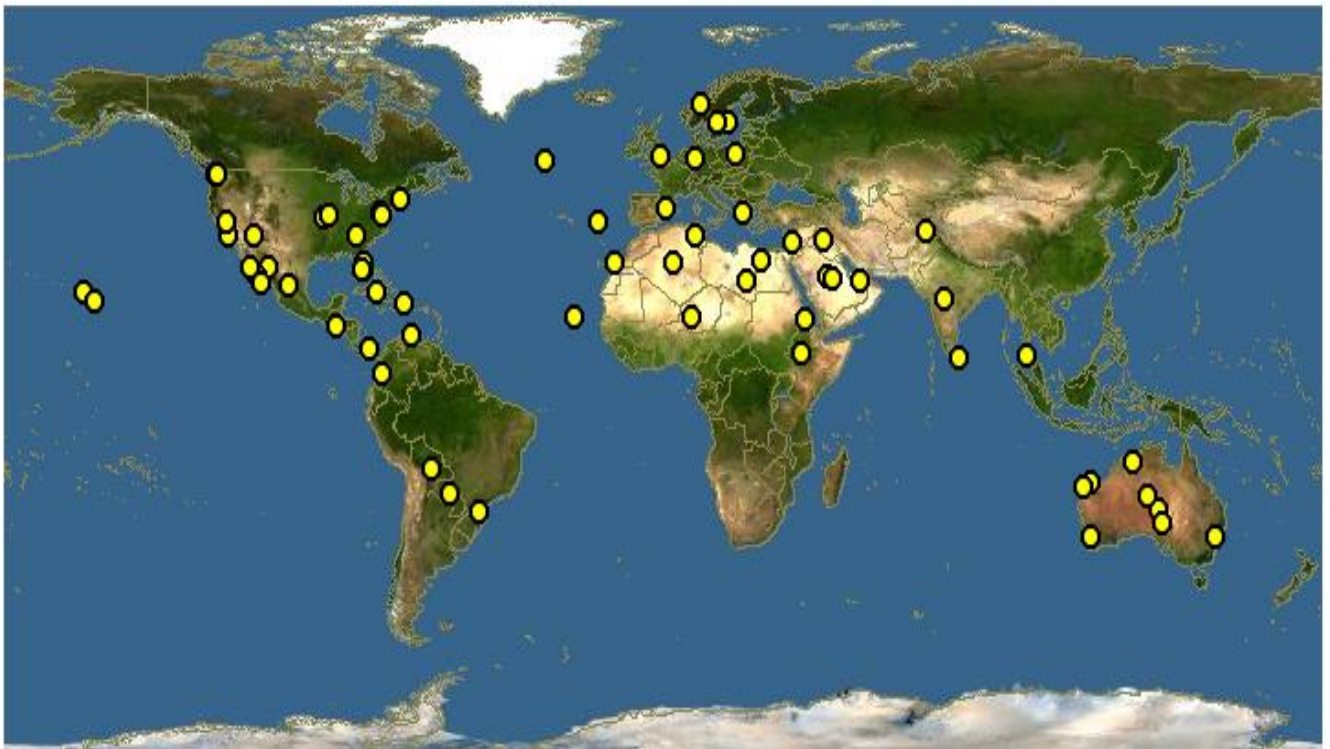


Figure 3 : Distribution de l'espèce *Phoenix dactylifera* L. dans le monde (Anonyme)

Le nombre de palmiers dans le monde peut être estimé à 100 millions d'arbres, répartis essentiellement du proche Orient depuis le sud de l'Iran à l'Est jusqu'à la côte atlantique de l'Afrique du Nord à l'Ouest. (OUINTEN, 1995).

Le Maghreb compte actuellement plus de 26 millions de palmiers dattier, repartis sur 5 pays du Maghreb (Fig.4) :

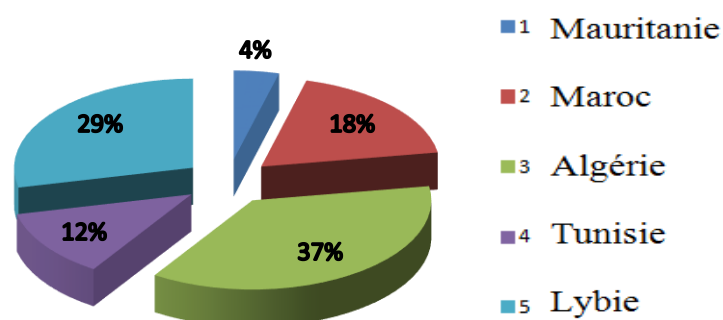


Figure 4 : Pourcentage de palmier dattier dans 5 pays du Maghreb.

Le nombre de palmier au Maghreb est relativement faible comparé à d'autres pays tels que l'Irak, l'Iran et l'Arabie saoudite comptant respectivement 23, 21 et 12 millions d'individus. Les plantations les plus récentes et à faible échelle se situent en Amérique latine (Argentine, Brésil, Pérou), en Australie et en Afrique (Niger, Mali et Sénégal) (JAHIEL, 1996). La datté constitue un support d'activité commerciale important entre les pays du sud et ceux du nord.

1.3. Répartition géographique des palmiers dattier en Algérie

Le palmier dattier est reparti sur plusieurs oasis dans le sud du pays où le climat est chaud et sec. Sa culture s'étend depuis la frontière marocaine (Ouest) jusqu'à la frontière Tuniso-libyenne (Est), et depuis l'Atlas saharien jusqu'à Reggane à l'Ouest, Tamanrasset au sud et Djanet à l'Est.

Les principales régions phœnicicoles (Fig.5) sont :

II. À l'Est les Zibans (Biskra), l'Oued Rhir (entre Ouargla et Touggourt), l'Oued Souf, la cuvette de Ouargla et le M'zab (Ghardaïa). Ces palmeraies sont constituées principalement de Deglet Nour, cultivar à très haute valeur commerciale. Deglet Nour est répandue vers l'oasis jusqu'aux oasis de M'zab et El Goléa dans le Touat, le Gourara, la Saoura et le Tidikelt.

III. À l'Ouest, la Saoura (Beni Abbes), le Touat (Adrar), le Gourara (Timimoune), le Tidikelt (Reggane) et El Goléa. Ces palmeraies comportent un verger très diversifié. Ces cultivars produisent des dattes, de qualité commerciale très faible.

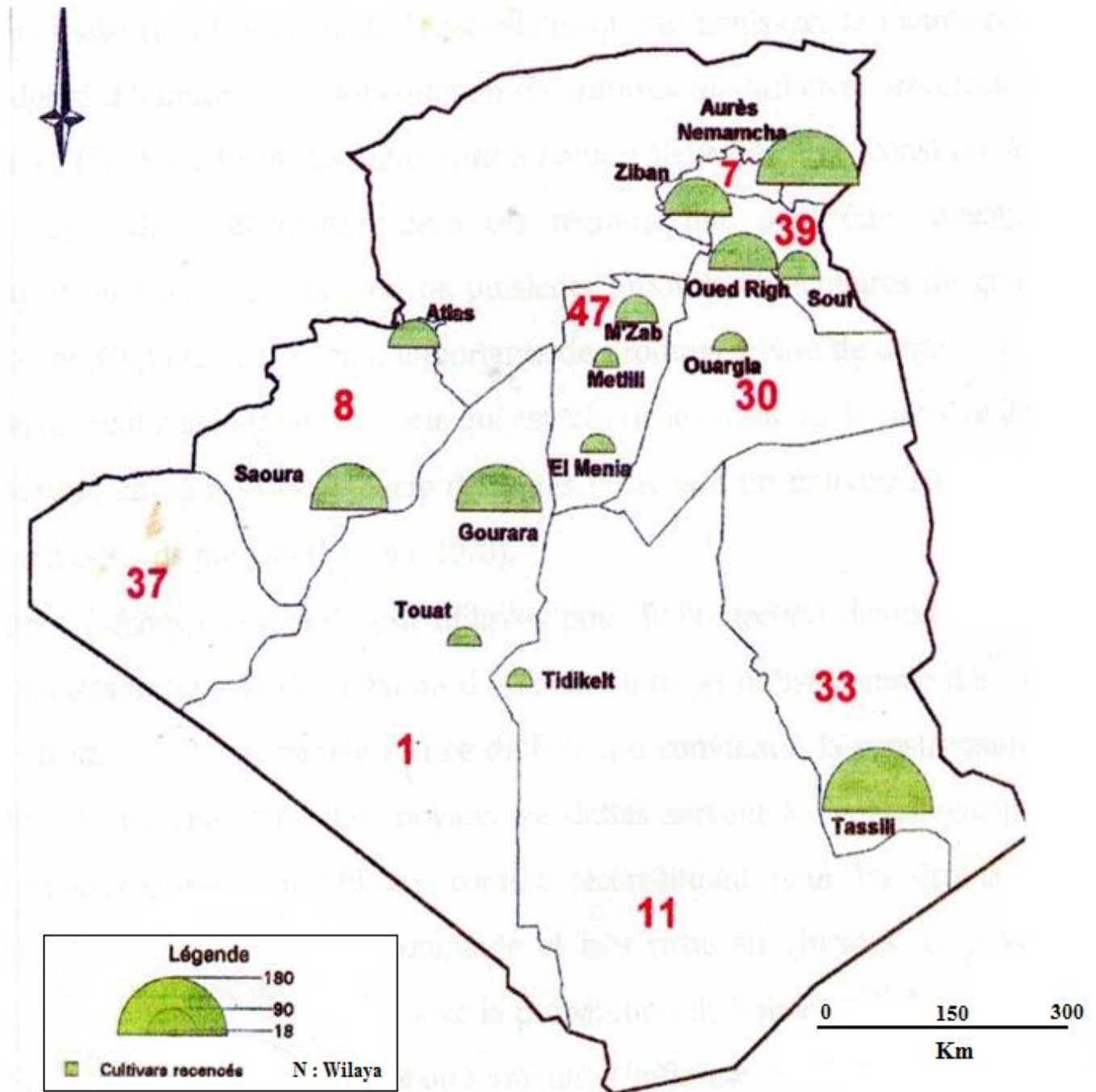


Figure 5 : Distribution du palmier dattier en Algérie (d'après HANNACHI et *al.*, 1998).

2. Taxonomie

Le palmier dattier a été dénommé *Phœnix dactylifera* L. par LINNE en 1734. *Phœnix* dérive de Phœnix, nom du dattier chez les Grecs de l'antiquité, qui le considéraient comme l'arbre des phéniciens ; *dactylifera* vient du latin *dactylus* dérivant du grec “dactulos” signifiant doigt, en raison de la forme du fruit (MUNIER, 1973).

La classification botanique du palmier dattier d'après MUNIER (1973), CRONQUIST (1981) et l'APG III (2009) est comme suit :

- **La classification de MUNIER**

Selon MUNIER (1973), la classification du palmier dattier est

Embranchement	Phanérogames.
Sous-embranchement	Angiospermes.
Classe	Monocotylédones.
Groupe	Phoenocoides.
Famille	Arecaceae.
Sous-famille	Coryphoideae.
Genre	<i>Phœnix</i> .
Espèce	<i>Phœnix dactylifera</i> L.

- **La classification de CRONQUIST**

Selon CRONQUIST (1981), la classification du palmier dattier est

Règne	Plantae.
Sous-règne	Tracheobionta.
Division	Magnoliophyta.
Classe	Liliopsida.
Sous-classe	Arecidae.
Ordre	Arecales.
Famille	Arecaceae.
Sous-famille	Coryphoideae.
Genre	<i>Phœnix</i> .
Espèce	<i>Phœnix dactylifera</i> L.

- **La classification phylogénétique**

La classification APG III (2009) est

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

2.1. Distribution de l'espèce phœnix dans le monde

Le genre *Phoenix* est constitué de 14 espèces distribuées, des îles de l'Atlantique à travers l'Afrique (Tab.1 et Fig.3), le Sud de l'Europe, le Moyen-Orient, et l'Asie du Sud jusqu'aux Philippines. *Phoenix dactylifera* L. se distingue des autres espèces du même genre par un tronc long et grêle et par des feuilles glauques (DJERBI, 1992).

Tableau I : Les quatorze espèces du genre "Phoenix", ainsi que leur répartition, (CHEVALIER, 1952) modifiée par AZZOUG et BERRICHI, 2013.

L'espèce	Le nom commun	La distribution
<i>Phoenix acaulis</i> Roxb (1820)	Palmier nain	Bengladesh et Inde
<i>Phoenix andamanensis</i> Barrow (1998)		Les Iles Andaman (Bengale)
<i>Phoenix atlantica</i> Chev (1935)	Palmier Dattier des Îles Cap-Vert ou Tamareira	Afrique occidentale et Iles Canaries
<i>Phoenix caespitosa</i> Chiov (1929)		Péninsule arabe et le désert somalien
<i>Phoenix canariensis</i> Chabaud (1882)	Palmier des îles Canaries	Iles Canaries et Cap-Vert
<i>Phoenix dactylifera</i> L. (1753)	Palmier dattier	Pays Méditerranéens, l'Afrique et une partie de l'Asie; «introduit en Amérique du Nord et en Australie»
<i>Phoenix loureiroi</i> Kunth (1841)	Palmier dattier des montagnes	S'étend de l'Indonésie à l'Asie du sud
<i>Phoenix paludosa</i> Roxb., Ind(1832)	Palmier Juliana	Bangladesh, Tenasserim, Andaman, Iles Nicobar et Thailand
<i>Phoenix pusilla</i> Gaertn (1788)	Palmier dattier du Sri- Lanka	Sri-Lanka et sud de l'inde
<i>Phoenix reclinata</i> Jacq (1801)	Palmier nain	Afrique tropical (Sénégal et Ouganda) Asie (Yémen)
<i>Phoenix roebelenii</i> O'Brien (1889)	Palmier dattier pygmée	Sud-ouest de la chine au nord du Vietnam et Laos
<i>Phoenix rupicola</i> Anderson., Linn. Soc. (1869)	Palmier dattier rocheux	Inde
<i>Phoenix sylvestris</i> (L.) Roxb (1832)	Palmier dattier sauvage ou Palmier sucre	Inde et Pakistan
<i>Phoenix theophrasti</i> Greuter (1967)	Palmier dattier de Crète	Grèce du sud, chypre et Turquie

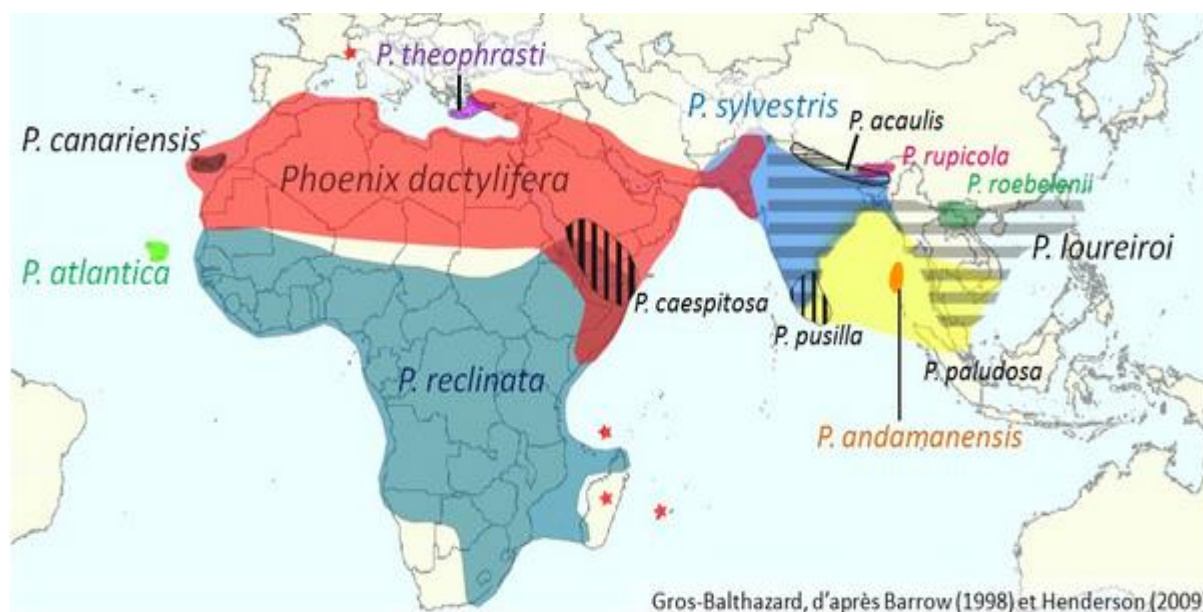


Figure 6 : Représentation de la distribution des différentes espèces de *phoenix* dans le monde (D'après BARROW, 1998 ; HENDERSON, 2009).

2.2. Diversité variétale

La notion de « variété » est à utiliser avec précaution pour les palmiers dattiers. Il s'agit plus de cultivars primitifs qui par usage commercial ont reçu le vocabulaire de variétés. Il existe des centaines de « variétés » qui sont des clones.

En Algérie le patrimoine génétique du palmier dattier est exceptionnel car plus de 940 cultivars ont été inventoriés dont les principaux sont Takerbucht, Feggous, à l'ouest et le Deglet Nour à l'est (BEN KHALIFA, 2004). En Tunisie, on compte plus de 300 cultivars et 150 sont comptabilisées au Maroc.

Les caractères morphologiques du palmier adulte et des fruits sont les critères habituellement utilisés pour distinguer les variétés. Aujourd'hui, sur la base d'une proposition maghrébine, « Bioversity International » a édité les descripteurs du palmier dattier, ce qui permettra de décrire les variétés selon un standard commun. Il est évidemment possible de facilement caractériser ces variétés par analyse génétique.

En plus des cultivars identifiés, il existe dans les oasis des palmiers à catégorie intermédiaire, des palmiers multipliés issus de semis, qui n'ont donc pas les mêmes caractéristiques qu'un arbre greffé ce qui augmente le nombre de cultivars à environ 1 300.

Cependant cette diversité variétale du palmier dattier, reste méconnue et marginalisée. Pour cela, l'inventaire et la caractérisation des cultivars de dattes sont des actions qui s'imposent.

Tableau II : Les principales variétés de dattes algériennes et leur localisation (AMRANI, 2002).

Variétés	Nombre de palmiers	Localisation
Ghars	2.500.000	OuedRigh, Zibens, Ouedsouf, Ouargla, M'zab, El golia.
Deglet Nour	1.500.000	OuedRigh, Zibens, Ouedsouf, Ouargla, M'zab, El golia.
Mech Degla	1.500.000	OuedRigh, Zibens, Ouedsouf.
Tilemson	500.000	Touat, El Boléa, Gourara, Tidikelt.
Tin-Nacer	400.000	Touat, El golia, Tidikelt.
Degla Beida	300.000	OuedRigh, Zibens, Ouedsouf.
Tazerzait	100.000	M'zab, Tidikelt, Saoura.
Tegaza	70.000	Tidikelt, Touat, El golia, Hoggar.
Temjouhart	50.000	El golia, Gourara, M'zab.
Takerboucht	42.000	Tidikelt, Touat.
Tafezouine	35.000	M'zab, Ouedsouf, OuedRigh,
Tanteboucht	10.000	Oued Righ, Ouargla, Tidikelt.
Timedouel	8.000	M'zab, El golia.
Total des palmiers	7.015.000	Algérie

3. Description morphologique

3.1. L'appareil végétatif

L'appareil végétatif est composé des parties décrites ci-dessous.

3.1.1. Le système racinaire

Le système racinaire du palmier est dense de type fasciculé, formé de plusieurs types de racines dont le diamètre ne dépasse pas 1,5 cm et profondes jusqu'à 20 mètres ; elles sont capables d'aspirer des centaines de litres d'eau par jour. Il y aurait quatre zones d'enracinement chez les palmiers dattiers (MUNIER, 1973). L'extension de ces quatre zones d'enracinement est en fonction de la nature du sol, du mode de culture, de la profondeur de la nappe phréatique, de la variété cultivée et de l'origine de la plante.

a) La zone de respiration

Cette zone est appelé aussi zone à radicle qui est localisée dans la partie superficielle du sol, près de la base du tronc et ne dépassant pas 0,25 mètre. Ces racines jouent un rôle de respiration, grâce à la présence de plusieurs méats aérifères permettant un échange gazeux avec l'air de l'atmosphère ambiante.

b) La zone à racine de nutrition

Cette zone est étendue et renferme la plus forte proportion des racines. Ces racines présentent une faible inclinaison au fur et mesure de l'éloignement du stipe. Elles se développent dans un horizon allant de 40 cm à 100 cm de profondeur.

c) La zone supérieure à racine d'absorption

Cette zone est plus ou moins importante selon le mode de culture et la profondeur de la nappe phréatique. Elle se situe dans un horizon qui va de 100 cm à 180 cm de profondeur.

d) La zone inférieure à racine d'absorption

L'importance de cette zone dépend de la profondeur de la nappe phréatique. Si celle-ci est peu profonde, cette zone se confond avec la précédente. Par contre, si la nappe phréatique est profonde, les racines de cette zone peuvent atteindre 3 à 6 m de profondeur. Ces racines présentent généralement un géotropisme positif très prononcé et sont en forme de faisceaux (DJERBI, 1992).

3.1.2. Le rejet

Le rejet est une jeune pousse du végétal, qu'il est possible de planter pour obtenir un nouveau palmier. Celui-ci sera choisi par l'homme parmi une sélection des meilleurs palmiers (SBIAIA, 2011).

3.1.3. Le stipe ou tige

Le stipe du palmier, équivalent du tronc des arbres est cylindrique sans ramifications, lignifié et de couleur marron brun. Le stipe est généralement, monopodique et recouvert à sa surface par les fibres végétales de la base des palmes coupées « cornafs » depuis 10-20 ans (BOUNA, 2002). La hauteur de l'arbre peut atteindre 10 à 30 m (OZENDA, 1958).

3.1.4. Le gourmand

Un gourmand est une branche secondaire qui se développe sur le stipe du palmier. Il doit généralement être enlevé car il épuise inutilement les ressources de l'arbre.

3.1.5. Les palmes

Les palmes sont les feuilles du palmier, elles sont longues de 4 à 7 mètres. Les feuilles demeurent en activité sur le stipe pendant 4 à 7 ans; puis elles jaunissent, se dessèchent et meurent. Un palmier adulte peut produire de 20 à 30 palmes par an et porter 50 à 150 palmes

actives (MUNIER, 1973 ; DJERBI, 1992). L'ensemble des feuilles au sommet du stipe disposées en hélice constitue une couronne qui peut faire 6 à 10 mètres d'envergure.

Les jeunes palmes sont pliées sur elles-mêmes; puis en se développant, le limbe se déchire aux plissements, chaque élément se sépare pour former une palme.

3.1.6. Les bourgeons

A l'aisselle de chaque palme, se trouve un bourgeon axillaire qui peut se développer pour donner naissance à un rejet, à la base du stipe ou aérien attaché au tronc.

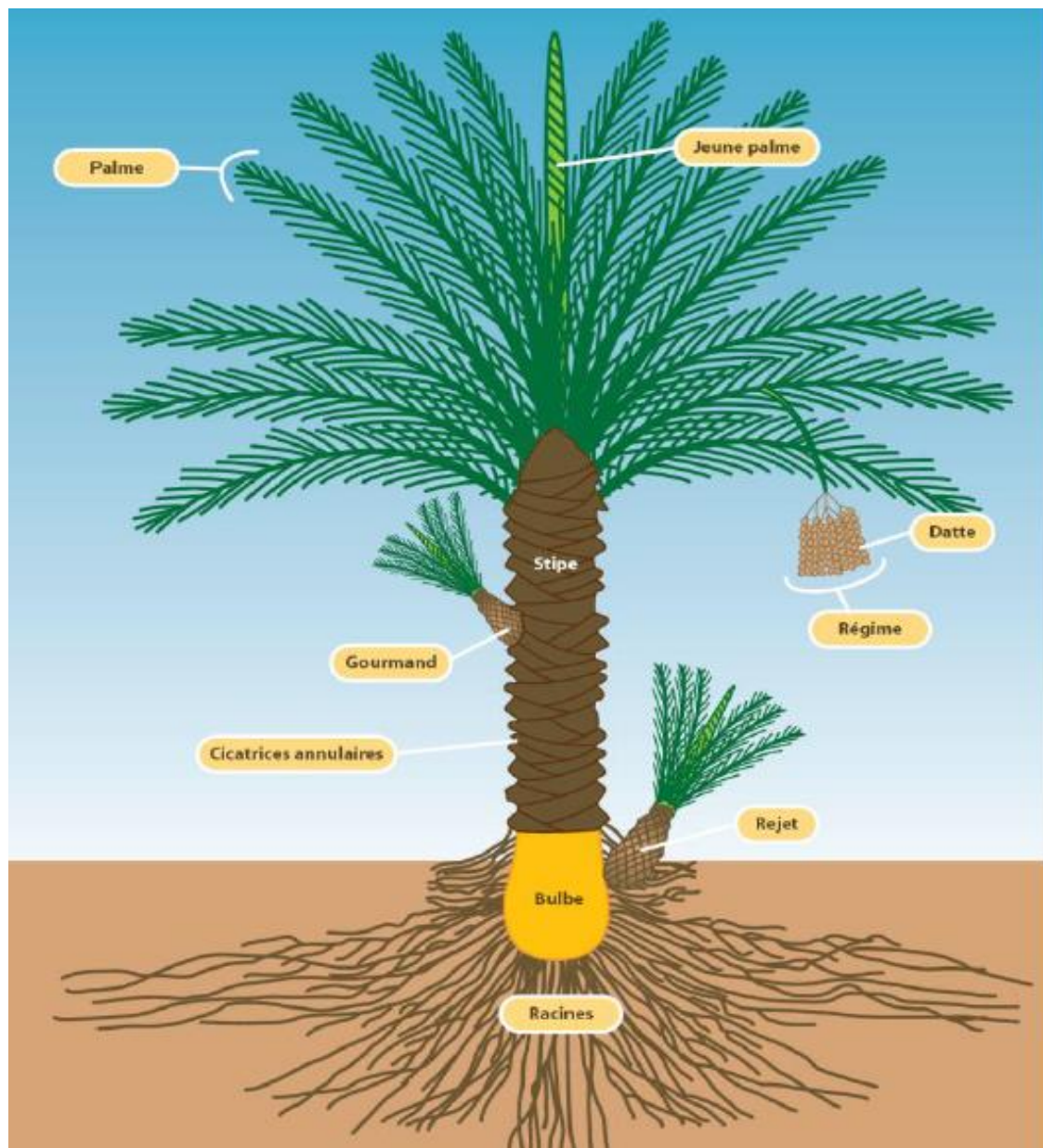


Figure 7 : Représentation schématique des parties composantes du palmier dattier (D'après MUNIER, 1973).

3.2. L'appareil de reproduction

Le palmier dattier étant dioïque, il est nécessaire d'attendre 6 à 8 ans l'induction des premières floraisons pour connaître le sexe des plantes (ABERLENC-BERTOSSI, 2012). Les inflorescences naissent du développement des bourgeons axillaires situés à l'aisselle des palmes dans la région coronaire du tronc (AMORCI, 1975; PEYRON, 2000; ZAID et *al.*, 2002).

3.2.1. L'inflorescence

Formées à partir de bourgeons, l'inflorescence est une grappe d'épis (spadices ou régimes) de couleur vert-jaunâtre, chaque régime ne porte que des fleurs de même sexe. (AMORCI, 1975; PEYRON, 2000; ZAID et *al.*, 2002).

3.2.2. Les fleurs

Les fleurs sont unisexuées à pédoncule très court. Elles sont de couleur jaune-verdâtre selon le sexe et le cultivar. En période de pollinisation, les inflorescences s'ouvrent d'elles-mêmes. La fécondation d'un ovule aboutit au développement d'un carpelle qui s'évolue pour donner à maturité le fruit.

3.2.3. Le fruit

L'évolution des fruits peut durer 100 à 250 jours en fonction des variétés et des conditions du milieu. Le fruit est constitué de : La peau externe (épicarpe), la pulpe ou chaire (mésocarpe), l'enveloppe interne (endocarpe), le péricarpe et la graine ou le noyau.

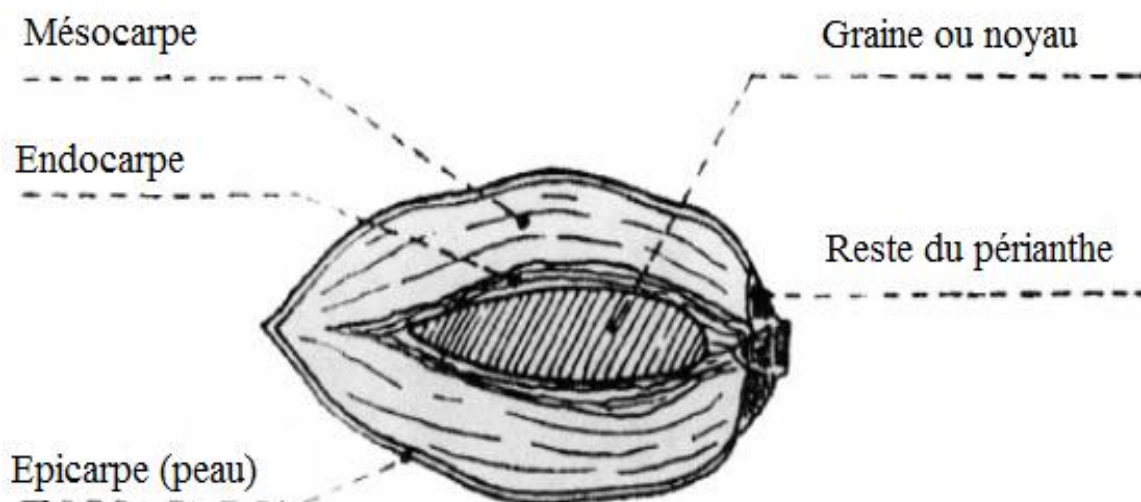


Figure 8 : Schéma d'une coupe transversale d'une datte (éléments constitutifs d'une datte)
(D'après MUNIER, 1973).

- **Valeur nutritive de la datte**

Fraîches ou séchées, les dattes constituent une bonne source de fibres alimentaires. Leur contenu élevé en glucides en fait des fruits à haute teneur énergétique.

Les dattes sont surtout commercialisées et consommées sèches, c'est-à-dire partiellement déshydratées. Elles ne renferment que de 15 % à 20 % d'eau. Les dattes séchées sont parfois enduites de sirop afin qu'elles conservent une certaine humidité, ce qui augmente leur teneur en sucre (Tab.III).

Tableau III : Les composants nutritifs de la datte (Anonyme).

	Datte séchée dénoyautée, 25 g (3 petits fruits)	Datte fraîche "Medjool" dénoyautée, 1 gros fruit, 24 g
Calories	70	66
Protéines	0,6 g	0,4 g
Glucides	18,7 g	18,0 g
Lipides	0,1 g	0,0 g
Fibres alimentaires	2,0 g	1,6 g

a) Antioxydants

Les dattes fraîches renferment une forte concentration d'antioxydants, principalement des caroténoïdes et des composés phénoliques.

b) Fibres alimentaires

Les dattes sont constituées à 57 % de fibres insolubles et à 43 % de fibres solubles. Les fibres insolubles jouent un rôle important dans la régularité intestinale. Par ailleurs, les fibres solubles jouent un rôle dans la réduction du taux de cholestérol ainsi que dans la normalisation des taux de glucose et d'insuline.

c) Glucides

L'index glycémique des dattes sèches va de modéré à élevé. Comme les glucides constituent un bon carburant pour les muscles, les dattes sont utiles durant les activités sportives intenses.

4. Intérêt économique

Le palmier dattier est vénéré par les populations des régions sahariennes. Son utilité ne s'arrête pas à la production des dattes ; aliment essentiel et vital pour les hommes et les animaux. Transformées, elles produisent un grand nombre de sous- produits divers (pâtes, pâtisseries et confiseries, farine, vinaigre, levure) (DJERBI, 1991).

Les dattes, fruits de palmier dattier, sont de sources d'alimentation principale dans les régions arides de l'Afrique du nord et le Moyen-Orient (Fig.9) Elles jouent un rôle important dans l'économie et la vie sociale dans ces régions (BOTES et *al.*, 2002; EL-DEEK et *al.*, 2010 in ECOCROP, 2011; JANICK et *al.*, 2008).

Les graines de dattes sont utilisées pour l'alimentation de bétail. Elles peuvent être utilisées comme source d'huile (qui a des propriétés antioxydantes de valeur en cosmétiques), comme un substitut du café (BANAT et *al.*, 2003; BARREVELT, 1993; LECHEB, 2010).

En outre, le palmier dattier, de par sa résistance aux conditions défavorables du milieu, peut constituer une candidature particulièrement crédible pour la lutte contre la désertification.

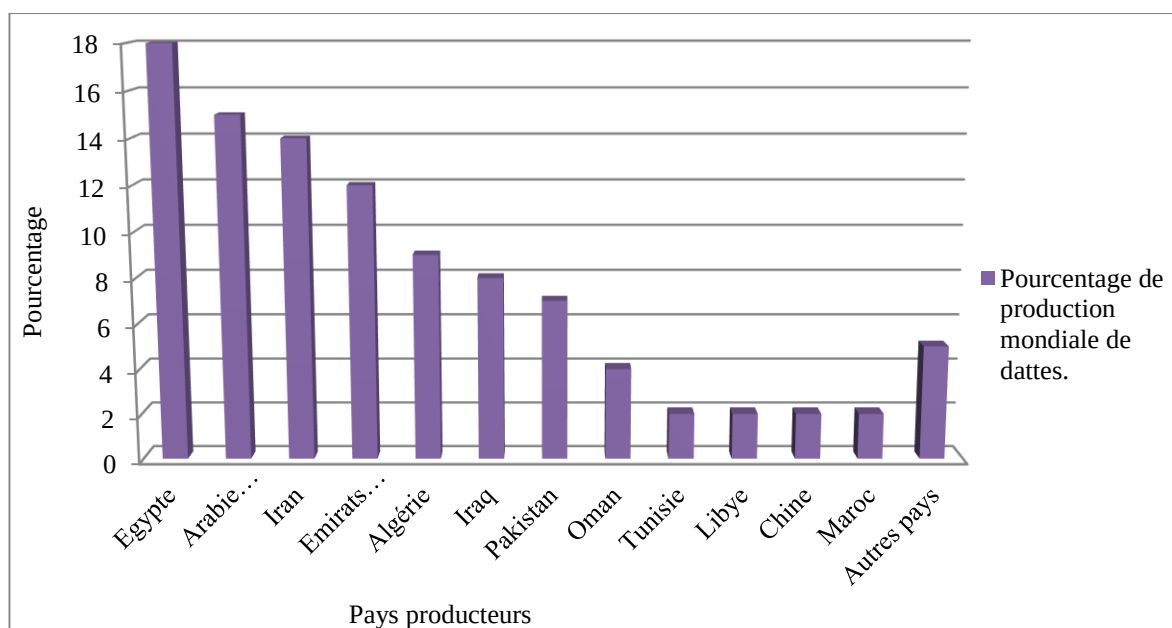


Figure 9 : Répartition de la production mondiale de dattes.

Toutes les parties du palmier dattier sont employées de manière très variée:

- Les dattes servent à l'alimentation de l'homme.
- Les folioles des palmes et les noyaux alimentent les animaux domestiques.
- Le bois du stipe, ainsi que la nervure principale et le pétiole des palmes, servent de matériaux de construction.

Les produits qu'on peut tirer du palmier dattier peuvent participer au développement économique grâce à leur diversité et leur champ d'application dans l'agriculture, l'agroalimentaire et l'artisanat. Insistant également sur l'opportunité offerte aux scientifiques d'entreprendre des recherches dans un domaine pratiquement vierge.

En investissant dans les dérivés du palmier et de son fruit, on participe au développement économique, au plan mondial et national et on crée de nombreux emplois.

- **En Algérie**

Après des années de vaches maigres, le patrimoine phœnicicole national se développe de plus en plus. Ainsi, le nombre de palmiers a doublé passant de 7 millions à 17 millions de plants actuellement (LAKHDARI, 2011).

La production de dattes en Algérie est une culture qui occupe une place prépondérante dans l'agriculture saharienne, principalement par son intérêt économique. L'Algérie, par son effectif de plus de 17 millions de palmiers, occupe une place importante parmi les pays producteurs et exportateurs de dattes dans le monde. Plus encore, elle occupe le premier rang du point de vue qualité, grâce à la fameuse variété «Deglet Nour».

L'Algérie occupe une place importante dans la production mondiale de dattes. Elle exporte 15 000 tonnes chaque année dans tous les pays du monde via la France. C'est en effet par là, que 90% de la production algérienne est acheminée pour être réexportée. Pourtant les algériens sont les véritables consommateurs de toutes variétés confondues, estimée à 200 000 tonnes par année.

La production de dattes en Algérie a connu une hausse avec plus de 8,5 millions de quintaux marqués pour l'année 2012-2013, contre 7,8 millions lors de la campagne 2010-2011, ainsi que 6,5 millions durant la saison 2009-2010.

5. Importance écologique

Le Palmier dattier exige des étés chauds, sans pluie ni humidité élevée pour 5 à 7 mois, depuis la pollinisation jusqu'à la récolte. Il tolère bien la sécheresse mais il est très exigeant en eau d'irrigation pour son développement et une production convenable. Les principales exigences écologiques et culturelles du palmier dattier, pour donner une production normale, sont :

- **Température** : Le Palmier dattier est une espèce thermophile héliophile (MUNIER, 1973).
- **Densité de plantation** : La disposition des folioles sur les palmes facilite la photosynthèse.
- **Action des vents** : Le palmier résiste bien aux vents si l'alimentation hydrique est suffisante.

- **Humidité** : Le palmier dattier est une espèce très sensible à l'humidité (ne tolère pas plus de 40%).
- **Sol** : Léger avec une concentration adéquate en sel (15% à 30%).
- **Eau** : Un manque peut causer des ravages, mais l'arbre peut survivre longtemps en absence de précipitations.

6. Contraintes du développement de la phœniciculture

6.1. Contraintes agronomiques

Le palmier dattier est cultivé avec une densité de 100 à 120 pieds par hectare dans les exploitations organisées. En Algérie, cette densité est respectée dans les plantations industrielles, alors que dans les jardins traditionnels, elle est beaucoup plus élevée ; elle atteint 350 palmiers par hectare dans les jardins du M'zab et 500 palmiers par hectare dans les palmeraies du Touat et du Gourara.

La durée de vie du palmier dattier peut dépasser 70 ans, mais la période maximale d'exploitation en milieu oasien est en moyenne de 50 ans. La limite d'exploitation est souvent due à la difficulté d'entretien des palmiers dont les tissus du stipe sont détériorés et/ou présentant un très faible diamètre (30 à 35 cm) et une hauteur très importante (plus de 15 mètres) (OUINTEN, 1999).

6.2. Autres contraintes de développement

La culture du palmier dattier est sujette à divers problèmes qui entravent son développement et son extension (ABDELKADER H et *al.*, 2010).

Plusieurs facteurs (naturels et humains) causent la dégradation des palmerais. Aujourd'hui plusieurs variétés de palmier sont menacées d'extinction.

L'exploitation insouciante des palmiers, la récolte anarchique des dattes et leurs dégradations durant la période de stockage constituent une barrière au développement de la phœniciculture. Une meilleure organisation du domaine phœnicicole devrait suffire pour remédier à ces problèmes mineurs.

Le vieillissement du palmier dattier est l'une des contraintes les plus graves ; puisque 30% des palmiers en Algérie ont dépassé l'âge de production (MESSAR, 1996), d'où l'indispensabilité de cultiver et de protéger de jeunes arbres.

Les pluies ont une action néfaste sur la période de floraison, surtout lorsqu'elles sont violentes. Elles entraînent le pollen, abaissent la température et nuisent à une bonne fécondation des fleurs. Elles provoquent également des phénomènes de coulure et favorisent les maladies cryptogamiques.

Elles causent de nombreux dégâts sur les fruits plus âgés: éclatement de l'épiderme, noircissements, fermentations, moisissures.

Le véritable problème que rencontre la phoeniciculture reste d'ordre naturel (Tab.IV et Tab V), car les insectes et les maladies sont un fléau pour les palmiers. Au niveau mondial, les ennemis de la culture du palmier dattier sont nombreux et diversifiés. On compte : 17 maladies, 58 ravageurs et plus de 16 herbes concurrentes, des oiseaux, des rongeurs et d'autres petits animaux (SEDRA, 2005).

Tableau IV : L'importance relative et la distribution des principaux ravageurs du palmier dattier.

Noms	Agents causaux	Importance	Distribution
Ravageurs			
La cochenille blanche	<i>Parlatoria blanchardii</i>	+++	++++
La cochenille rouge	<i>Phoenicoccus marlatti</i>	++	++
'Boufaroua' ou acariose des dattes	<i>Paratetranychus (Oligotetranychus) afrasiaticus</i>	++	++
La pyrale des dattes	<i>Ectomyelois ceratonia</i> Et autres	+++	++++
Les termites blancs	<i>Microtermes diversus</i> <i>Amitermes</i> et <i>Reticulotermes</i>	++**	++**

** : Ce ravageur commence à se développer sur les jeunes plantations dans les nouvelles zones d'extension des palmeraies.

Tableau V : L'importance relative et la distribution des principales maladies du palmier dattier.

Noms	Agents causaux	Importance	Distribution
Maladies fongiques			
Bayoud ou fusariose vasculaire	<i>Fusarium oxysporum</i> f.sp. <i>albedinis</i>	++++	++++
Khamedj ou Pourriture des inflorescences	<i>Mauginiella scaetae</i> <i>Fusarium moniliforme</i>	++	++
Pourriture sèche des inflorescences	<i>Thielaviopsis paradoxa</i>	+	++
Dépérissement noir de l'organe végétatif	<i>Thielaviopsis paradoxa</i> (forme parfaite : <i>Ceratocystis paradoxa</i>)	++	+++
Pourriture du cœur et du stipe	<i>Thielaviopsis paradoxa</i> <i>Gliogladium vermoeseni</i>	++	++
Maladie à <i>Diplodia</i>	<i>Diplodia phoenicum</i> <i>Diplodia natalensis</i>	+	+
Taches brunes des palmes	<i>Cladosporium herbarum</i> (forme parfaite : <i>Mycosphaerella tassiana</i>)	+	++
'Bélâat' ou avalement du cœur	<i>Phytophthora palmivora</i> , <i>Phytophthora</i> sp. ou + <i>G. vermoeseni</i> + <i>T. paradoxa</i>	+	+
Le cœur qui penche	<i>Thielaviopsis paradoxa</i> et/ou autres	++	++
Faux charbon sur folioles	<i>Graphiola phoenicis</i> *	+/-	+
Dessèchement apical des palmes	<i>Altenaria</i> sp <i>Chalara</i> sp.	+	++
Pourriture molle des dattes molles dégageant une odeur aromatique (maladie des dattes entreposées)	<i>Acetobacter</i> , <i>Sacharomyces</i> , <i>Torula</i> sp., <i>Mauginiella scaetae</i>	+	++

+ : Présence et importance ; +/- : Plus ou moins important,

* : Maladie importante surtout dans les zones tempérées et humides (à influence maritime) et sur jeunes palmiers dans les pépinières, tunnels plastiques et les serres vitrées.

On observe sur les deux tableaux que le Bayoud est la maladie la plus dangereuse et la plus répandue. Due au *Fusarium oxysporum* f.sp. *albedinis* elle est la plus redoutable dans les oasis. Le Bayoud fait partie des maladies d'origine tellurique contre laquelle il est difficile

de lutter (SEDRA in MEGUELLATI, 2005). Afin de limiter son développement, de nombreuses mesures de lutte sont préconisées.

Le Bayoud fut observé pour la première fois vers 1870 dans la vallée du Drâa au nord de Zagora (Maroc). Il a ensuite progressé vers l'ouest et surtout vers l'est en suivant les cordons des palmeraies. En 1898, ce fléau atteint les palmeraies de Figuig et Béni Onif situées côte à côte des deux côtés de la frontière Algéro-marocaine (PEREAU-LEROY, 1958). Entre 1920 et 1950, la maladie a contaminé les palmeraies du sud algérien, puis durant la période 1960-1978, elle a gagné des palmeraies du centre au sud algérien, la région du M'zab et El Goléa (KADA et DUBOST, 1975; DJERBI, 1982).

7. Mode de multiplication chez le palmier dattier

7.1. Méthodes classiques

7.1.1. Multiplication par graine (par semis)

Cette technique offre l'intérêt du maintien d'un certain brassage génétique qui peut être à l'origine de génotypes de qualité et/ou adapté à des contextes écologiques particuliers.

Les fruits mûrs germent rapidement, parfois quelque jour après le semis, le plus souvent un à deux mois plus tard (Fig.10). Malgré cela les jeunes plantes se développent assez lentement les trois premières années puis la croissance s'accélère grandement comme pour la plupart des palmiers.



Figure 10 : Plantules obtenus d'une multiplication par graines (Original).

- La multiplication du palmier par graine est infidèle puisqu'il y a disjonction des caractères des parents (qualité, sexe, résistance.)
- Ce type de multiplication permet la production de population de palmiers, composée de 40 à 60% de palmiers mâles, qui entrent généralement en floraison plus précocement que les palmiers femelles.
- Les palmiers issus de semis des graines ne forment pas de palmes pennées qu'à partir de 2 à 3 ans après le semis.
- Cette technique de multiplication est utilisée comme méthode traditionnelle dans les programmes d'amélioration génétique, en vue de créer de nouveaux hybrides, et comme outil pour étudier les descendants des croisements et évaluer l'hérédité des caractères agronomiques et morphologique.

Elle est également utilisée lorsque l'obtention de dattes ne constitue pas l'objectif premier de la culture du palmier dattier. En Egypte, 50% des pieds sont issus de graines mais, cette population de dattier est à la base d'une exploitation artisanale extrêmement importante (FERRY et *al.*, 1991).

7.1.2. Multiplication par rejet

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

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

Le matériel utilisé est le rejet prélevé de la partie basale du stipe (Fig.11) ou se développe le tronc lui-même (MUNIER, 1973). Les rejets sont produits pendant la phase de jeunesse de l'arbre.



Figure 11 : Rejets à la base des stipes (Original).

Le nombre de rejets varie selon les cultivars. Certains cultivars algériens tel que la Takerbucht ne donne que 1 à 3 rejets ; d'autres produisent jusqu'à 30 rejet c'est le cas de la Deglet Nour.

La réussite de cette méthode nécessite certaines conditions dont le diamètre du rejet (au moins 30 cm) et le poids de chaque rejet doit être entre 15 et 20 Kg (MEZOUANE L., 2012) Le rejet n'a pas une bonne reprise que lorsqu'il présente 12 à 25 Kg soit à environ 10 années d'âge (TAUTAIN, 1966 ; MUNIER, 1973). Au sud algérien et dans la région de Biskra les rejets entre 20 à 22 Kg donnent de meilleurs résultats (SAHNOUN, 2007).

7.2. Multiplication in vitro

La multiplication in-vitro trouve son fondement dans le concept de "totipotence cellulaire" énoncé au début du siècle : la cellule, unité morphologique et physiologique de l'être vivant est capable d'autonomie. Elle possède toute l'information génétique nécessaire à régénérer la plante entière, à condition bien sûr de créer les conditions favorables à ce développement. Ce concept énoncé des 1902 par HABERLANDT, ne sera finalement démontré par Steward et son équipe qu'en 1958, lorsque ces chercheurs obtiendront les premiers " embryons artificiels" appelés " embryons somatiques" à partir de cellules de carotte qui évolueront par la suite en jeunes plantules (ZRYD, 1988; MARGARA, 1989; AUGÉ *et al.*, 1989; BOXUS, 1995 TOUTE, 1998).

En effet le botaniste HABERLANDT fut le premier, en 1902, à définir exactement le problème de la culture des tissus et l'a tenté avec des fragments de plantes très diverses. Il obtenait une survie des cellules de quelque mois mais jamais de multiplication (SCHMID et KELLER, 1981).

L'année 1955 été marqué par la découverte de la Kinétine par SKOOG (substance dotée d'un grand pouvoir caulogène) a permis de provoquer, presque à volonté, la néoformation de bourgeons adventifs qui, traités par de l'acide gibbérellique et des auxines, s'enracinaient pour donner des plantes entières (TOUTE, 1998).

La reconstitution des palmeraies détruites par le Bayoud, la reconversion des zones menacées, la réhabilitation des palmeraies senescentes (plus de 45% des palmiers de l'est algérien dépassent un siècle) et la création de nouveaux périmètres, nécessitent un nombre important de rejets évalués pour la prochaine décennie à environ 7 millions d'arbres (Algérie, Maroc et Tunisie) (DJEGBRI, 1988).

La production naturelle de rejets par un palmier ne dépasse guère 20 à 40 rejets durant toute sa vie; la méthode traditionnelle reste donc lente et limitée en raison du nombre restreint de rejets produits et ne peut répondre par conséquent aux besoins importants exigés par l'extension rapide des palmeraies.

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 sont représentés par un nombre faible d'individus. Cette technique permet également la production de vitroplants indemnes de *Fusarium*, permettant ainsi d'éviter la dispersion de la maladie (DJERBI, 1988 ; LETOUZE et DAGUIN, 1989) (Fig.12).

D'après (PAYRON, 2000), il existe trois méthodes de multiplication *in vitro* :

- La prolifération par bourgeonnement axillaire qui est depuis 1989, la seule méthode ayant prouvé la conformité des plants produits.
- La réversion des ébauches florales, encore au stade de travaux de recherche.
- L'embryogenèse somatique (Fig.12).

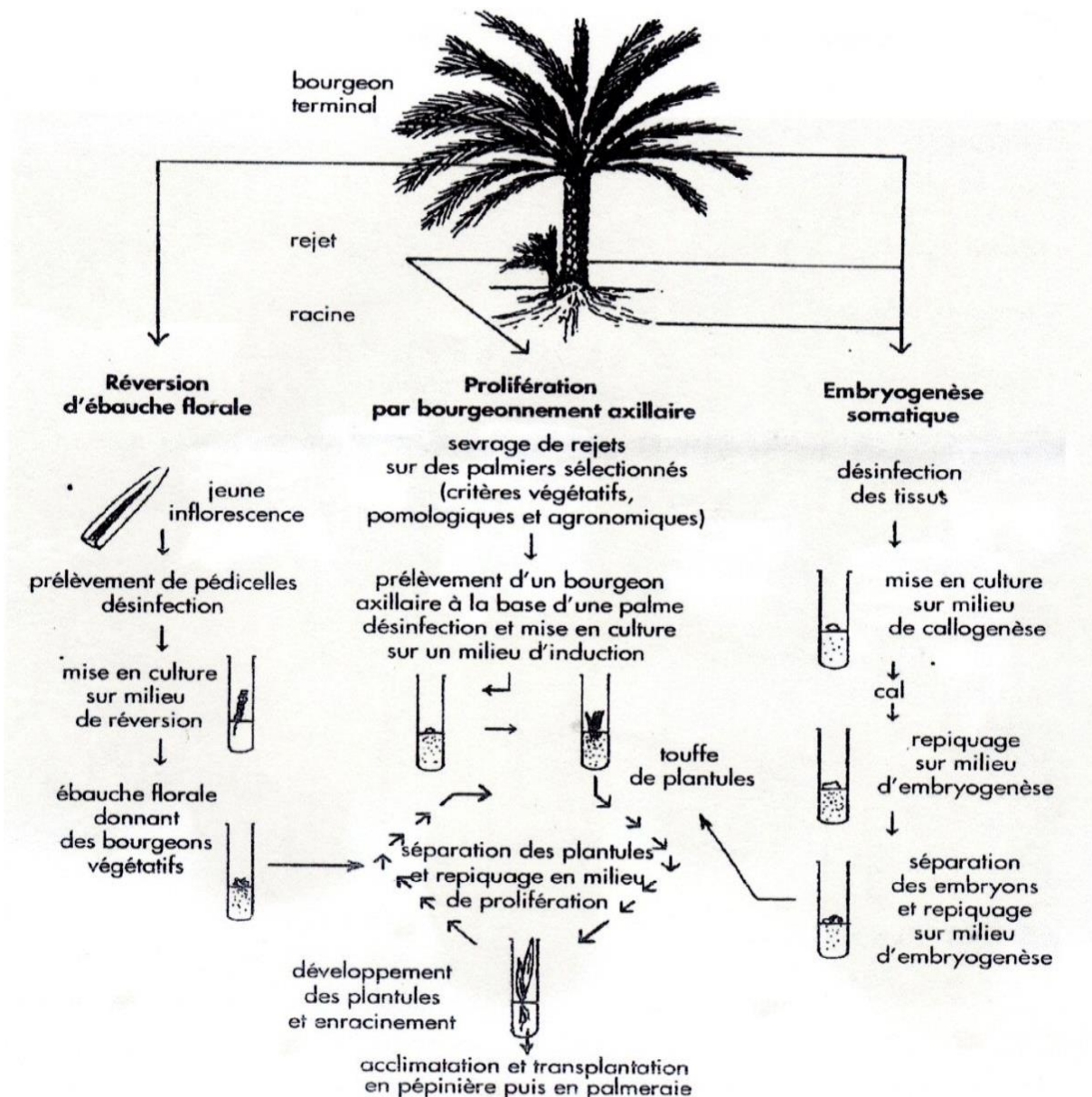


Figure 12 : Les trois modes de reproductions *in vitro* (D'après PEYRON, 2000).

Tableau VI : Les principaux travaux de culture in vitro (embryogenèse somatique) sur palmier dattier.

Auteurs	Explants	Résultats
Reuveni et <i>al.</i> , 1972	Embryons zygotiques entiers.	Obtention de cals embryogènes
Bouguedoura, 1979	Apex, bourgeons axillaires, stipe, et rachis	Formation de plantule
Reynolds et Murachige, 1979	Embryons excisés de noyaux immatures	Proembryons
Tisserat, 1979	Embryons excisés de graines apex, bourgeons axillaires, fragments de rachis ainsi que des inflorescences	Formation des plantules
Mater, 1986	Embryons zygotiques immatures, fragments, de cœurs de rejets	Formation des plantules
Sharma et <i>al.</i> , 1984 et 1986	Apex, bourgeons axillaires, explants foliaires de vitro-plants	Formation des plantules
Yakoub-Bougdal 1984 et 1987	Apex, bourgeons axillaires	Formation d'inflorescences et étude des phytochromes, dosage de l'ADN
Daikh et Demarly, 1987	explants foliaires de vitro-plants	Formation des plantules
Daguin et Letouze, 1987	Tissus de cœur de rejets	Formation des plantules
Saka et Abed , 1989	Tissus de cœur de rejets	Formation des plantules
Lachqer sillou, 1989	Tissus de cœur de rejets, Embryons zygotiques	Formation des plantules
Loutfi, 1989	Jeunes inflorescences mâles et femelles	Formation des plantules
Scoarnec, 1991	Tissus de cœur de rejets	Formation des plantules
Chabane, 1995	Apex, bourgeons axillaires, stipe, et rachis, feuilles de cœur de rejets	Formation des plantules à partir d'apex, et de feuilles de cœur de rejets
El Hadrami et Baaziz, 1995	Tissus de cœur de rejets	Formation des plantules
Fergani, 1998	Apex, bourgeons axillaires, stipe, jeunes feuilles	Formation des plantules
Yakoub-Bougdal 2005	Apex, bourgeons axillaires	Formation d'inflorescences et étude comparative entre les monocotylédones et les dicotylédones
Chukwuemeka et <i>al.</i> , 2005	Tissus de cœur de rejets	Formation des plantules
Yata, 2007	Tissus de cœur de rejets	Formation des plantules
Moussouni, 2008	Etude de l'embryogenèse zygotique	Formation des plantules

8. La suspension cellulaire

Cellules en culture dans un milieu liquide maintenues en mouvement ou en agitation. Le terme est souvent utilisé pour décrire les cultures en suspension de cellules individuelles et d'agrégats cellulaires (AUGE et *al.*, 1989).

La suspension cellulaire est utilisée pour faire croître des cellules hors de leur organisme (*ex vivo*) ou de leur milieu d'origine, mais de manière à conserver les fonctions spécifiques de chaque tissu, dans un but d'expérimentation scientifique ou de fécondation *in vitro*.

Trois périodes vont marquer le développement de la culture cellulaire.

La période des précurseurs (1885, 1900) par professeur ROSS.

La période de la culture de tissus (à partir de 1902) CARREL.

La culture cellulaire proprement dite (Des cellules isolées ou des amas de cellules capables de se diviser *in-vitro*) n'apparaît qu'à partir de 1952 par MOSCONA et *al.*

Le perfectionnement des techniques de culture *in vitro* a permis à MUIR et *al.* en Allemagne, d'établir en 1954, les premières cultures de cellules en suspension, comparables à celles pratiquées pour les micro-organismes (MUIR et *al.*, 1958).

8.1. Initiation d'une suspension cellulaire

L'initiation d'une suspension cellulaire embryogène (SCE) de bonne qualité dépend de la qualité et du volume du cal embryogène sélectionné. Une observation attentive et régulière du cal idéal est nécessaire pour la sélection du cal embryogène qui est à l'équilibre entre la bonne taille et la bonne phase de développement (PANIS et THINEH, 2001).

Différents types de récipients peuvent être utilisés du moment que la densité d'inoculation minimale est respectée. Exemple : Erlenmeyer : un complexe embryogène par flacon.

8.2. Maintenance d'une suspension cellulaire

Bien que les cellules se multiplient facilement dans un milieu liquide, les suspensions qui en résultent peuvent avoir des potentiels de régénération variables (GEORGET et *al.*, 2000).

Une culture cellulaire de bonne qualité est caractérisée par :

- La présence d'une grande proportion (>80%) d'agrégats de cellules embryogènes en prolifération.

- Une couleur qui peut aller d'un jaune vif à pâle (des suspensions blanchâtres ne sont pas désirables car celles-ci sont souvent une indication de la présence d'une forte proportion de cellules non régénératrices).
- Une précipitation rapide des cellules lorsque la suspension est retirée de l'agitateur orbital, indiquant une faible proportion de débris et cellules vides.

Il a été démontré qu'il n'existe pas de suspensions cellulaires constituées entièrement de cellules isolées, mais d'un mélange de cellules isolées et d'agrégats cellulaires de dimensions variables (D'HED'A et *al.*, 1991; GRAPIN, 1995)

Il existe deux conditions majeures pour éviter les contaminations :

- Premièrement, un entraînement correct à la mise en œuvre de techniques de bonne asepsie de la part de la personne qui cultive les cellules.
- Deuxièmement, un équipement, matériel en plastique, en verre et des milieux correctement conçus, entretenus et stérilisés.

Les suspensions cellulaires sont la source de matériel pour l'isolement des protoplastes, le développement de l'embryogenèse somatique et les améliorations génétiques.

Les suspensions cellulaires permettent la bioproduction de métabolites, mais leur utilisation ne se limite pas à ce champ d'investigation.

Ces cultures présentent un intérêt majeur dans l'étude de mécanismes au niveau fondamental. Même si les cellules qui composent les suspensions, par leur nature dédifférenciée, n'ont pas leur équivalent au niveau de la plante entière. Ce système reste un excellent modèle afin de comprendre à l'échelle cellulaire des mécanismes complexes. Le travail sur suspension de *Rauvolfia canescens* a, par exemple, montré que lors de l'élitation par un extrait de paroi de levure, une accumulation temporaire d'acide jasmonique était obtenue, permettant de montrer que cette molécule était un messenger impliqué dans l'induction de la synthèse des benzophénanthridines (GUNDLARCH et *al.*, 1992).

Le système cellulaire est également très utile pour purifier des enzymes afin d'étudier leurs caractéristiques, comme cela a été montré avec la STS qui a pu être purifiée à partir de suspensions cellulaires d'arachide (SCHÖPPNER et KINDL, 1984).

Avec les suspensions cellulaires il est possible de produire des métabolites secondaires de même caractéristique que celles de la plante d'origine comme l'Alcaloïdes indolique chez *Catharanthus, roseus* (TABATA, 1988).

Les suspensions cellulaires végétales peuvent être des agents de bioconversion (PRAS, 1992).

9. Histologie

« Histologie » signifie étymologiquement « science des tissus ». Autrefois appelée anatomie microscopique, Elle étudie la structure des organismes vivants, les rapports constitutifs et fonctionnels entre leurs éléments, ainsi que le renouvellement des tissus. La procédure jointe à l'histologie a pour but, à partir de coupes à la paraffine, de mener l'ensemble des opérations nécessaires pour obtenir *in fine* des préparations microscopiques durables (LOUIS MANDL, 1857).

L'histologie s'est constituée vers le milieu du XIX^{ème} siècle à partir de la conjonction de deux événements, en particulier grâce à l'évènement de la théorie cellulaire (1838), établie à partir des travaux de THEODORE Schwann et de SCHLEIDEN. Cette théorie postule que tout organisme est constitué de cellules et elle est complétée par VIRCHOW en 1858. Lorsque ce dernier affirme que toute cellule provient d'une autre cellule, l'unité élémentaire de la vie est donc la cellule.

L'histologie s'intéresse à la morphologie des cellules, mais aussi à leur fonctionnement et à la conception des tissus. Au début des années 1960, la création du microscope électronique permet d'améliorer le grandissement et introduit une nouvelle façon de voir les cellules et les tissus. Aujourd'hui, l'histologie a pour but de mettre en évidence au sein de la cellule, *in situ* (contrairement à la biochimie), les protéines, l'ADN et l'ARNm.

L'histologie a fait l'objet d'une longue utilisation en médecine, en anatomie humaine, animale et végétale.

Ainsi, cette dernière constitue une étude importante dans le domaine végétal en permettant la localisation et la distinction des différents types de tissus végétaux.

En culture *in vitro* l'histologie est employée comme un guide permettant d'apprécier l'évolution bonne ou mauvaise des cultures au cours du temps.

La difficulté d'obtenir les embryons somatiques chez les monocotylédones a incité de nombreux chercheurs à essayer de mieux comprendre les mécanismes de ce processus (BAJAJ, 1989).

Michaux FERRIERE et *al.* (1987) ont utilisé l'histologie comme complément des techniques de culture *in vitro* pour mieux comprendre les phénomènes cytologiques qui se déroulent tout au long du processus d'évolution allant de la mise en place de l'explant jusqu'à la formation d'embryons somatiques capables de germer.

Cependant les travaux de TISSERAT et MASON (1980) et de MATER 1986, sur l'embryogenèse somatique de la phase adulte du palmier dattier et de ZAID 1989 sur la phase

juvénile méritent d'être mentionnés. Ils illustrent l'origine histologique du cal ainsi que les différentes étapes de la formation d'un embryon somatique.

Pour le palmier à huile, l'embryogenèse somatique est d'une origine pluricellulaire (SCHEWENDIMEN et *al.*, 1990). En 1991, ces chercheurs ont montré aussi que la voie de l'origine unicellulaire n'aboutit pas à la formation d'embryons somatiques viables.

1. Matériel végétal

1.1. Multiplication de cals

La multiplication de cals est une étape nécessaire afin d'augmenter le nombre de cals initiés et d'améliorer la capacité de production en embryogenèse somatique.

Les cals qui prolifèrent sont subdivisés au cours de subcultures, en deux parties ou plus, selon leur taille (0.5 cm à 4 cm).

Nous avons utilisé pour la multiplication, des cals (Fig.13) de trois cultivars de palmier dattier ; Deglet Nour, Takerbucht et Tagaza, qui ont été choisis par rapport à leur comportement vis-à-vis de la maladie du Bayoud.

- Deglet Nour : Sensible à la Fusariose, considérée comme étant la meilleure variété pour ses qualités gustatives.
- Takerbucht : Résistante au Bayoud, mais de qualité peu appréciée.
- Tagaza : Sensible à la Fusariose, de bonne qualité dattière.

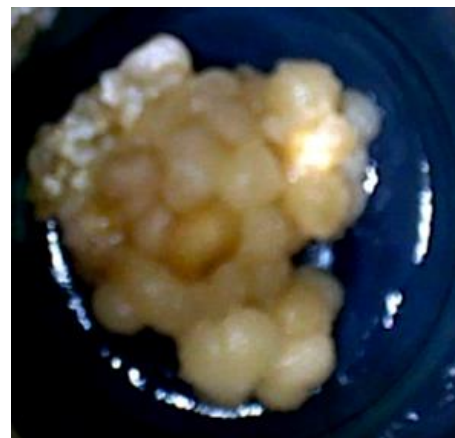


Figure 13 : Cals friable du cultivar Deglet Nour en culture sur milieu solide M₁₀₀.

1.2. Suspension cellulaire

Des souches de cals embryogènes issues des deux cultivars Deglet Nour et Takerbucht sont utilisées comme une source végétale pour l'obtention de la suspension cellulaire.

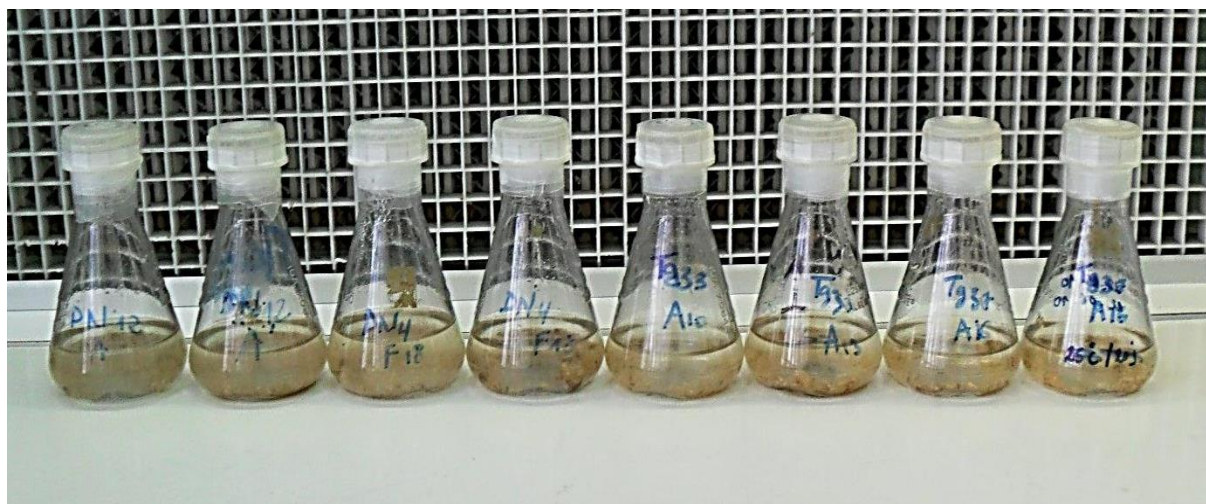


Figure 14: Cals en culture dans un milieu liquide.

1.3. Histologie

Des cals friables issus de deux variétés Deglet Nour et Tagaza constituent la source végétale de l'étude histologique.

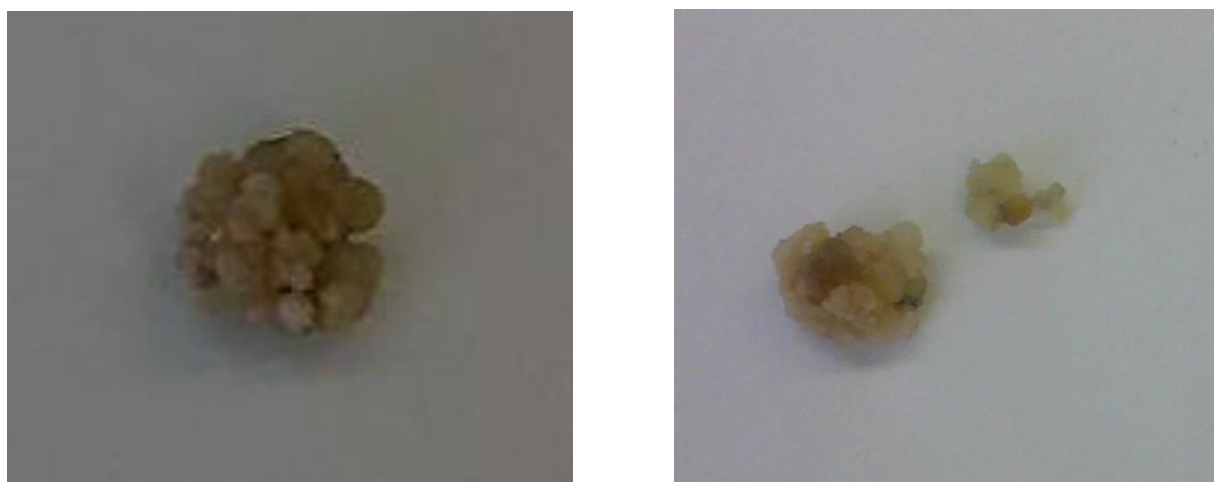


Figure 15 : Cals destinés à l'étude histologique.

2. Méthodologie

2.1. Multiplication de cals

2.1.1. Stérilisation du matériel de culture

Lavage de la verrerie (Tube à essai, Erlen Mayer, Epprouvettes) (An.1 ; Fig.3) avec de l'eau et des produits hygiéniques (Omo, eau de javel) (An.1 ; Fig1), puis rincé à l'eau distillée. La stérilisation est achevée après un passage dans l'autoclave (An.2 ; Fig.1) à 120°C durant 20minutes.

Stérilisation des instruments à utiliser au cours de la manipulation (pince, bistouri, scalpel, spatule) (An.1 ; Fig.2) dans l'étuve (An.2 ; Fig.2) à 180°C durant 1heure puis dans le stérilisateur à billes (An.2 ; Fig.3).

2.1.2. Préparation des milieux solides (M_{100} , $P_{12,5}$)

Les milieux de cultures contiennent les éléments indispensables au développement des tissus végétaux tels que les éléments minéraux, les substances organiques, les régulateurs de croissance et charbon actif.

- Les macroéléments : chaque composant est préparé seul dans une solution.

L'Azote et le Phosphore entrent dans la composition des protéines et des acides nucléiques. Le Potassium Magnésium et calcium maintiennent l'équilibre ionique. Le K^+ la régulation osmotique. Le Mg^{++} fait partie des composants chlorophylliens. Ca^{++} régule le taux de C^+ et Fe^{++} . Une source d'oligo-éléments Cu, Zn, Co, Ni, B, Ti : ont un rôle dans les mécanismes enzymatiques.

- Les microéléments : sont préparés ensembles dans une solution mère.
- Une source de carbone : le saccharose est une source d'énergie.
- Les Acides Aminées : ont un rôle dans la prolifération des cals embryogènes.
- Charbon actif : son rôle est d'absorber les composés phénoliques excrétés par l'explant et diffusés dans le milieu.
- Les vitamines : leur rôle est de favoriser la prolifération des tissus et leur croissance.
- Les régulateurs de croissances : permettent de réguler la croissance des tissus par un équilibre parfait entre les cytokinines et auxines dans le milieu.
- Agent gélifiant : il permet la solidification du milieu. La quantité de l'agent gélifiant tel que l'agar ou le phytigel ajouté dans le milieu joue un rôle dans l'évolution des cultures.

Les deux milieux nutritifs utilisés pour nos cultures sont : Le milieu M_{100} (charbon actif 3 g/l, IPA 3mg/ml, 2,4-D 100mg/l) et $P_{12,5}$ (charbon actif 200mg/l, picloram 12.5mg /l, IPA 1 mg/ml) (An.3 ; Tab.1) qui sont nécessaires pour le développement des tissus végétaux.

2.1.3. Stérilisation du milieu

Après une diminution de la température, le pH est régulé à 5,80. Le milieu est distribué dans des tubes en pyrex (25 x 160mm), à raison de 15ml de milieu nutritif par tube, avec un distributeur automatique (Fig.16-A). Le milieu est stérilisé par autoclavage (20minutes à 120°C) (Fig.16-B). Nous pouvons utiliser les milieux après refroidissement et solidification.



(A)



(B)

Figure 16 : Distributeur de milieux de culture. (A)
Stérilisation du milieu M₁₀₀ solide dans l'autoclave. (B)

2.1.4. Entretien et conditions de culture

Les cals sont déjà dans les milieux d'induction quand ils ont été mis à notre disposition. Nous avons assuré la prolifération des souches.

Le repiquage des cals est réalisé sous la hotte à flux laminaire. Les cals sont repiqués dans les tubes puis transférés dans la chambre de culture à l'obscurité à 27°C. Les repiquages sont réalisés toutes les 4 à 5 semaines sur un milieu neuf, de composition identique au milieu initial. Notons que les cultures contaminées sont retirées à chaque fois.

Après trois subcultures, les cals friables sont sélectionnés puis transférés sur milieu P5 (An.3) pour l'établissement de la suspension cellulaire.



Figure 17 : Repiquage des cals sous la hotte à flux laminaire

2.2. Suspension cellulaire

2.2.1. Stérilisation du matériel de culture

Pour la suspension cellulaire, le matériel utilisé (An.1) est stérilisé avec les mêmes conditions que celles de la multiplication des cals.

2.2.2. Préparation du milieu liquide

Les suspensions cellulaires sont réalisées dans un milieu liquide (P₅) (Tab.2 An.3) contenant 5mg /l de picloram et dépourvu d'agent gélifiant.

2.2.3. Stérilisation du milieu

La distribution et la stérilisation du milieu liquide s'effectuent de la même manière que les milieux solides mais dans des Erlen de 250 ml à raison de 25 ml de milieu pour chaque Erlen.

2.2.4. Protocole expérimental suivi

La suspension est réalisée sous la hotte à flux laminaire. On a pris des tubes et bocaux de deux variétés de palmier dattier ; Deglet Nour et Tagaza desquels on a pesé 2g de chaque variétés à l'aide d'une balance de précision.

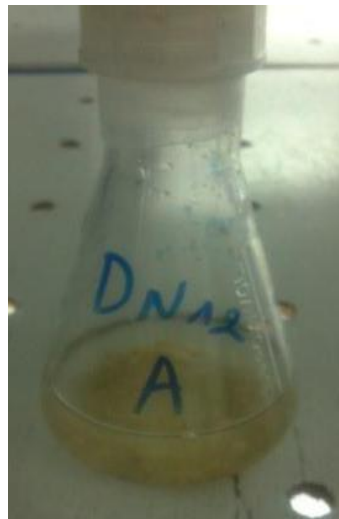
Des cals compactes sont écrasés à l'aide d'un pilon stérilisé (Fig.18-A). Les cals friables quant à eux sont mis en culture directement dans des Erlen Meyer fermés avec des bouchons et entourés de papier-film (Fig.18-B) sous hotte à flux laminaire. Les Erlen Meyer sont mis dans une chambre de culture à l'obscurité à une température de 28°C sur un agitateur horizontal à 100 rotations/min (An.2). Les repiquages sont effectués tous les 7 à 10 jours.



(A)



(B)



(C)

Figure 18 : Les différentes étapes de mise en culture dans un milieu liquide.

2.3. Histologie

Durant l'étude histologique les étapes suivantes ont été suivies

2.3.1. Le prélèvement

Il doit être pratiqué le plus précisément possible, éviter de triturer ou malaxer le cal. Avec un instrument bien tranchant, découper les gros échantillons en tenant compte de l'orientation générale de ces derniers.

Ces prélèvements doivent être mis immédiatement dans une assez grande quantité de liquide fixateur. Effectuer un lavage dans un bain d'eau distillée d'une durée de 5 à 10 minutes.

2.3.2. La fixation

Consiste à protéger les tissus prélevés de toute hydrolyse. Les fragments de cals sont fixés durant 48h dans 200 mL de solution, constituée d'éthanol à 95% (100 ml), d'eau distillée (70 ml), d'une solution de formaldéhyde pure (20 mL), d'acide acétique glacial (10 ml). Cependant un passage sous vide de 2 heures est indispensable pour faciliter la pénétration du fixateur et éliminer l'air que contiennent les tissus.



Figure 19 : Fixation des cals dans le fixateur F.A.A.



(A)



(B)

Figure 20 : (A) Pompe à vide (B) Désoxygénation des cals par la pompe à vide

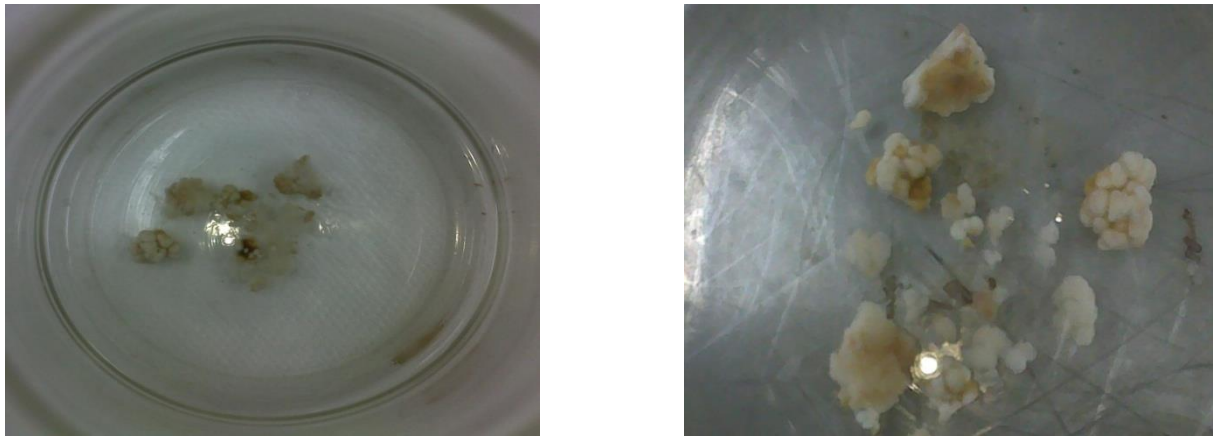


Figure 21 : Les cals après un passage sous vide.

2.3.3. Le lavage

Effectuer un lavage dans un bain d'eau distillée d'une durée d'une heure .

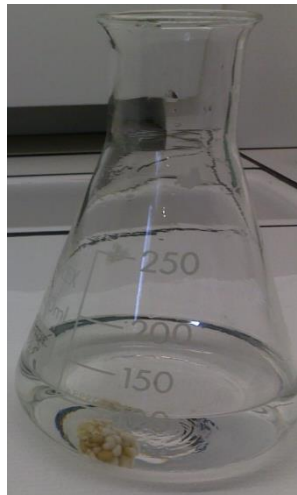


Figure 22 : Passage dans l'eau distillée.

2.3.4. La deshydratation

La paraffine n'est pas miscible à l'eau, le cal doit être entièrement déshydraté par des passages progressifs dans des bains d'alcools à concentrations croissantes :

- Durent 30 minutes dans de l'alcool 25%,50%,70%,90%,100%(1).
- Puis 30 minutes à 2heures dans de l'alcool 100 %(2).
- Enfin 12 heures (toute la nuit) dans de l'alcool 100%(3).



Figure 23 : Déshydratation dans les alcools à différentes concentrations.

2.3.5. L'imprégnation (la substitution)

Elle se fait par passage des cals dans trois bains successifs de solvant (Xylol) (Fig.24-B,C,D). Un passage dans un mélange d'imprégnation alcool-xylol pendant 45 minutes est réalisé pour ne pas brusquer les cals (Fig.24-A).

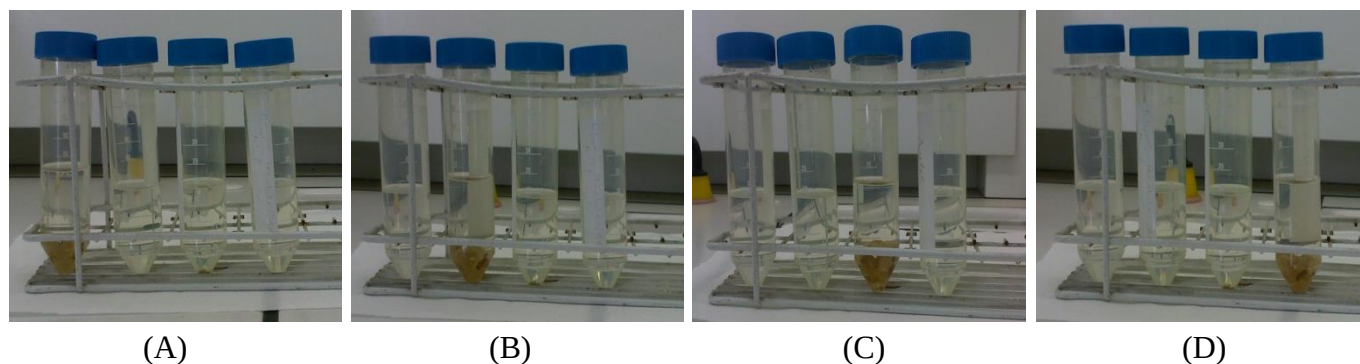


Figure 24 : Passage des cals dans les bains successifs de solvant(xylol).

2.3.6. L'inclusion

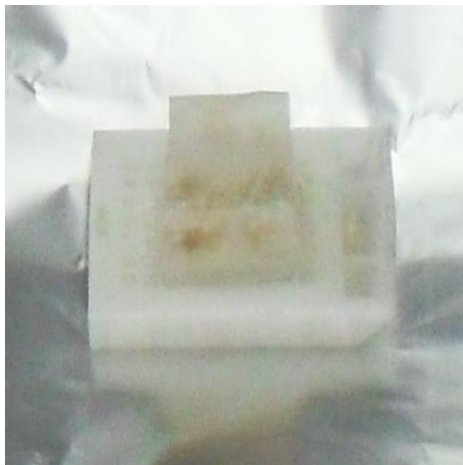
Deux barres métalliques (barres de LEUKARTES) et des parallélépipèdes en plastique (Fig.25) constituent un moule qui sera coulé à moitié avec de la paraffine. L'échantillon est mis sur la paraffine puis on coule la seconde moitié. La polymérisation se fait à température ambiante pendant une nuit (12 heures).



Figure 25 : Blocques de paraffine contenant des cals.

2.3.7. La réalisation des coupes

Monter le bloc obtenu après l'inclusion dans le porte-bloc du microtome (Fig.26-A). Régler le couteau et l'épaisseur de coupe définitive (10 μm) de manière à dresser une face de coupe nette et procéder à la confection du ruban de coupes (Fig.26-B).



(A)



(B)

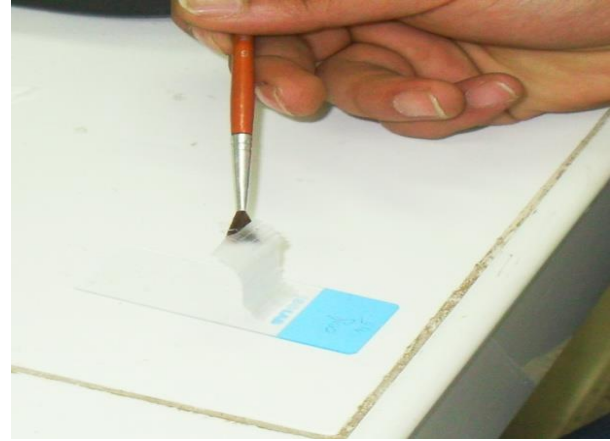
Figure 26 : Echantillon sur porte block. (A)
Réalisation des coupes sur microtomes. (B)

2.3.8. Confection des lames

Étaler la coupe sur une lame déjà enduite de gélatine (Fig.27-A). A l'aide d'un pinceau, déplier le ruban côté brillant sur le verre (Fig.27-B). Le collage et séchage se font par chauffage de la lame sur une plaque chauffante à 60° (Fig.28-A) (faire attention à ne pas abimer le ruban avec une température élevée). Laisser les lames séchées à température ambiante (Fig.28-B).



(A)



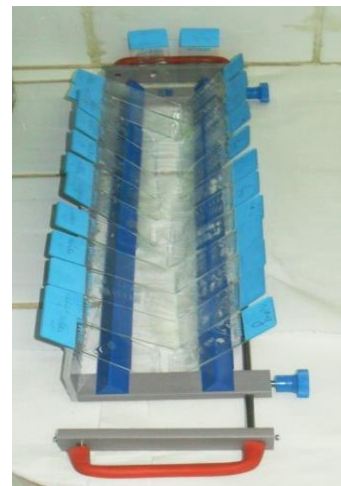
(B)

Figure 27 : Étalement de la gélatine sur les lames. (A)

Dépôts d'un ruban sur une lame. (B)



(A)



(B)

Figure 28 : Collage des lames sur plaque chauffante à 60°. (A)

Séchage des lames à température ambiante. (B)

2.3.9. La coloration

Après un passage de 5 minutes dans de l'acide périodique, une double coloration est nécessaire. D'abord à la fushine basique (Acid Schiff) durant 20 minutes à l'obscurité pour colorer les polysaccharides des parois, le mucus et les réserves amylacées en rouge, puis au Naphthol Blue Black (NBB) durant 5 minutes pour colorer les noyaux, les nucléoles et les réserves de protéines en bleu, en bleu foncé et bleu noir (Fig.29).

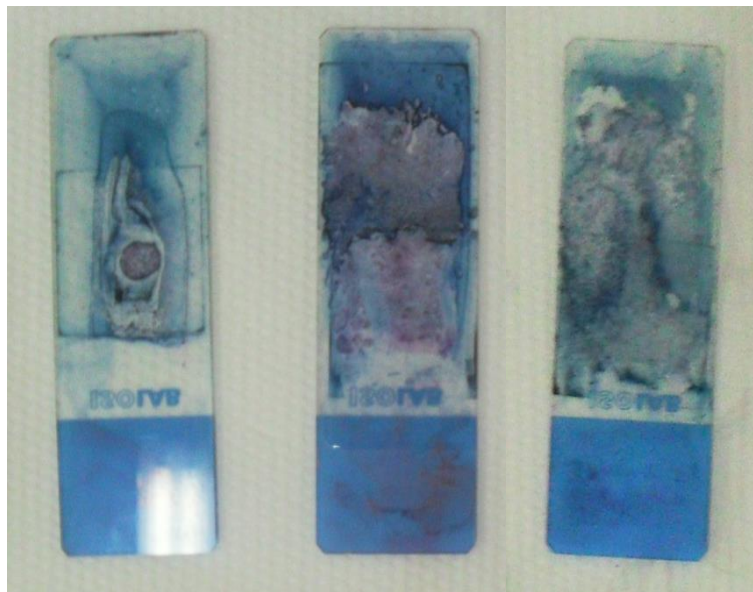


Figure 29: Lames obtenues après coloration.

2.3.10. La lecture des lames

Le montage se fait classiquement entre lame et lamelle. La lecture se fait sur microscope photonique au grossissement 40x100.

1. Multiplication de cals

La multiplication des cals est une étape nécessaire, afin d'augmenter le nombre de cals initiés et d'améliorer la capacité de production d'embryons somatiques. Les cals qui prolifèrent sont subdivisés au cours des subcultures en deux parties ou plus, selon leur taille. La multiplication intense de cals formés se fait soit directement soit après hachage du cal initial.

Nous avons utilisé les mêmes milieux qu'à l'étape d'induction pour la multiplication des cals et qui sont le M₁₀₀ et P_{12,5}.

Dans nos conditions expérimentales, deux types d'auxines ont été utilisés : le 2,4 diclorophénoxyacétique (2,4-D), l'acide 4-amino-3, 5, 6 trichloropicolinique (le picloram), chacune combinée à une cytokinine (IPA).

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

Dans notre expérimentation, cette auxine a été utilisée à une concentration de 12,5 mg/l, combinée avec 200mg/l de charbon actif.

L'association auxines /cytokinines (2,4-D 100mg/l, IPA 3mg/l pour le M₁₀₀ et picloram 12.5mg/l, IPA 1 mg/l pour le P_{12,5}), les rendent encore plus efficaces et avantageuses dans la dissociation des tissus en groupes cellulaires séparés et dans le développement des cals pour l'induction de l'embryogenèse somatique (LAZZERI et *al.*, 1987).

1.1. Analyse comparative de la multiplication sur les deux milieux

Les résultats obtenus sur les deux milieux sont inscrits dans la (Fig.30). Elle montre que les milieux d'initiation et de multiplication testés (M₁₀₀ et P_{12,5}) se sont révélés stimulateurs d'une multiplication intense de la callogenèse.

Les cals obtenus sont bien développés et présentent un aspect compact granuleux, ou friable de couleur blanche beige. Leur taille varie de 0,5 cm à 4,5 cm. En outre l'aspect morphologique est le même.

Le repiquage des cals friables est très délicat. Ils ont une croissance rapide et leur masse double en un mois. Ils peuvent produire secondairement des cals noduleux. Les cals compacts ont une croissance lente et certains d'entre eux peuvent acquérir le pouvoir de multiplication après 9 mois de culture. La substitution du 2,4-D par l'IPA (1 mg/l) paraît avoir un pouvoir de multiplication considérable sur les différents cals. De plus le picloram associé à l'IPA possède un pouvoir inducteur et multiplicateur non négligeable.



Figure 30 : Induction de la callogenèse. (A)

Multiplication de cals. (B)

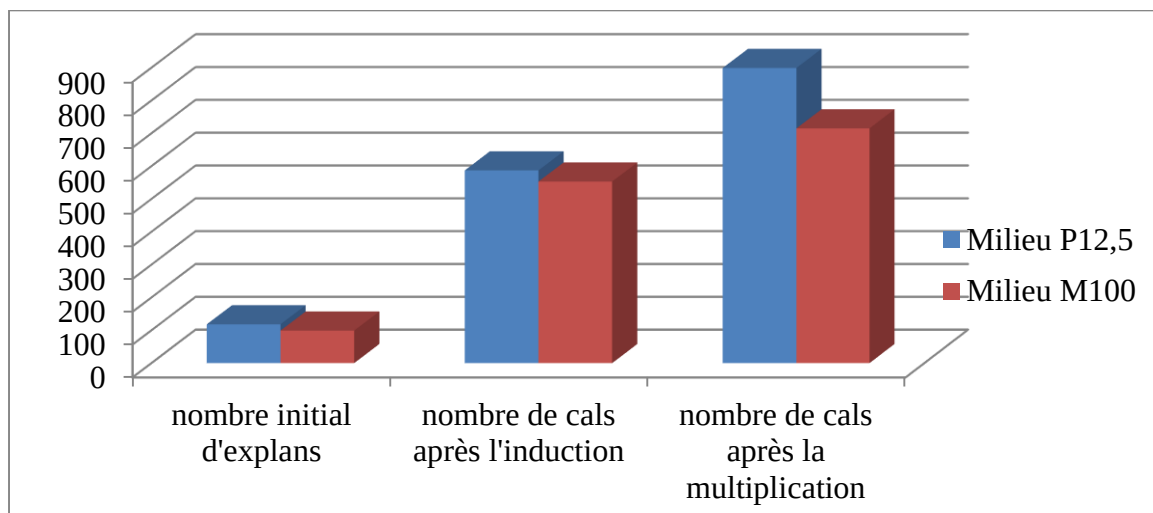


Figure 31: Effet de la concentration et de la nature des régulateurs de croissance sur le nombre de souches obtenues chez les trois cultivars après 4 mois de subculture.

L'analyse de la figure 31 détermine que dans le milieu M₁₀₀, le nombre total d'explants mis en culture est de 99. Le nombre de cals obtenu est de 553 après six mois d'induction. Ce nombre a été multiplié 1,29 fois pour atteindre 715 cals après quatre mois de culture (Fig.31). Par contre, le nombre initial d'explants sur le milieu P_{12,5} est de 118 et le nombre de cals obtenus après six mois d'induction est de 587. Ce dernier a été multiplié 1,53 fois pour atteindre 899 cals après 2 subcultures (Fig.31).

Tableau VII : Etude de la callogenèse et de la prolifération des souches embryogènes sur les deux milieux de culture M₁₀₀ et P_{12.5}.

Phase d'induction et phase de multiplication					
Code du cultivar	Milieu	Nombre initial d'explants	Nombre de souches (6 mois)	Nombre de souches finales (10 mois)	Taux de multiplication des souches (Les 4 derniers mois)
DN1	P _{12.5}	13	57	92	1,61
DN4	P _{12.5}	15	78	83	1,06
DN7	P _{12.5}	13	46	102	2,22
DN10	M ₁₀₀	10	52	161	3,1
DN12	M ₁₀₀	15	97	108	1,11
Total		66	330	546	1,65
TKB1	P _{12.5}	12	70	80	1,14
TKB2	P _{12.5}	11	83	182	2,19
TKB3	P _{12.5}	10	76	172	2,26
TKB4	P _{12.5}	12	32	35	1,09
TKB9	M ₁₀₀	15	138	164	1,19
Total		50	402	630	1,57
Teg1	P _{12.5}	13	44	49	1,11
Teg3	P _{12.5}	19	101	104	1,03
Teg7	M ₁₀₀	20	102	104	1,02
Teg9	M ₁₀₀	11	55	56	1,02
Teg10	M ₁₀₀	13	48	58	1,21
Teg11	M ₁₀₀	15	61	64	1,05
Total		91	417	429	1,03

1.2. Analyse comparative de la callogenèse chez les trois cultivars

Les trois cultivars ont réagi positivement aux deux milieux de culture (Tab.VII) avec une prolifération de structures callogènes petites, de couleur blanches-beige facilement dissociables qui grandissent avec le temps (Cals friables). D'autres sont noduleuses de couleur beige (Cals compacts). Les différents explants sont dotés d'une capacité de multiplication remarquable.

Les résultats du tableau VII indiquent une légère variabilité de réponse selon les cultivars, la composition et la concentration du milieu en régulateurs de croissance.

- Pour le cultivar Deglet Nour, le taux de multiplication varie de 1,06 à 3,10. Le nombre initial d'explants est de 66. Après six mois d'induction, 330 cals ont été obtenus et après trois mois, ce nombre est passé à 546 cals (Fig.32). La multiplication est optimale sur le milieu M₁₀₀ où les masses callogènes sont intensifiées et amplifiées en particulier chez les cals friables initiés sur les fragments d'apex, bases de feuilles, et les bourgeons végétatifs.

- Pour le cultivar Takerbucht, le taux de multiplication des cals varie de 1,09 à 2,26. Le nombre initial d'explants est de 50. Après six mois, 402 cals ont été obtenus. Après deux subcultures le nombre de cals est de 630 (Fig.32). La multiplication est optimale sur le milieu P_{12,5}.

- Le taux de multiplication des cals varie de 1,02 à 1,21 pour Tagaza. Après six mois d'induction le nombre de cals obtenu est de 417 cals à partir de 91 explants, puis 429 après quatre mois de culture (Fig.33). La multiplication est faible au cours des deux subcultures. On n'a pas pu subdiviser les cals car ils étaient de petite taille (0,5 à 1 cm).

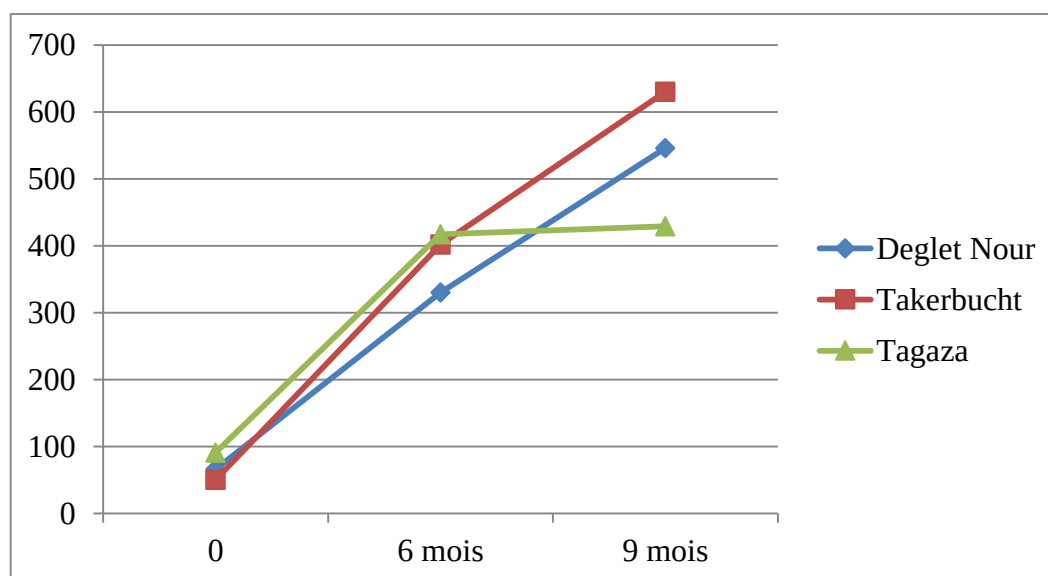


Figure 32: Evolution du nombre de cals des trois cultivars durant la phase d'induction et de multiplication.

Les résultats présentés sur la figure 33 (A et B) indiquent que :

- Le nombre de cals du cultivar Deglet Nour en culture sur le milieu M_{100} est passé de 149 à 269: soit, multiplié 1,8 fois (Fig.33-B).

Le nombre de cals en culture sur le milieu $P_{12,5}$ est passé de 181 à 277 : soit, multiplié 1,53 fois (Fig.33-A).

- Le nombre de cals du cultivar Takerbucht en culture sur le milieu M_{100} s'est élevé de 138 à 164 : soit, multiplié 1,19 fois (Fig.33-B)

Le nombre de cals en culture sur le milieu $P_{12,5}$ s'est élevé de 261 à 469 : soit, multiplié 1,8 fois (Fig.33-A).

- Le nombre de cals du cultivar Tagaza en culture sur le milieu M_{100} a augmenté de 266 à 282 (Fig.33-B).

Le nombre de cals en culture sur le milieu $P_{12,5}$ a augmenté de 145 à 153 : soit, multiplié 1,06 fois sur les deux milieux (Fig.33-A).

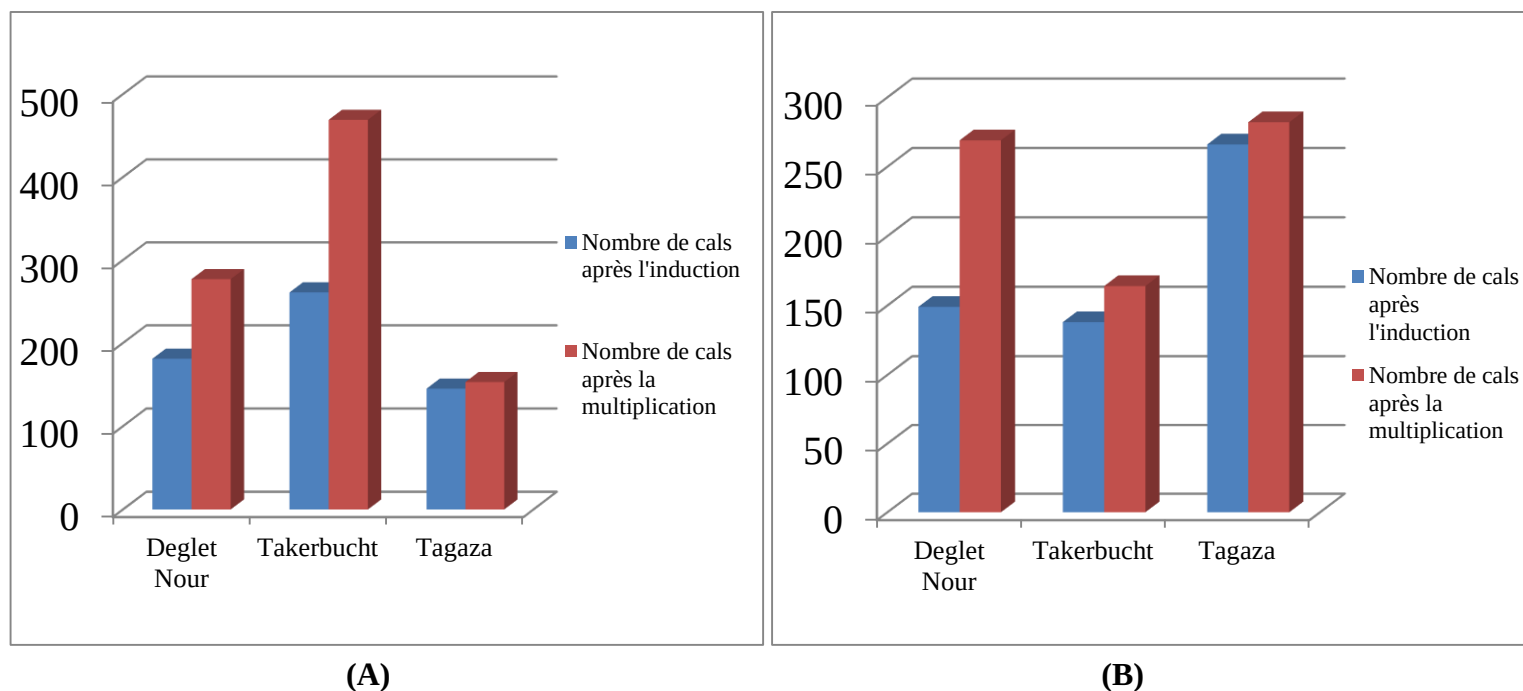


Figure 33: Nombre de cals des trois cultivars en multiplication sur milieux $P_{12,5}$. **(A)**
Nombre de cals des trois cultivars en multiplication sur milieu M_{100} . **(B)**

1.3. Les contraintes de la multiplication

Au cours des repiquages, l'évolution de la multiplication rencontre généralement les difficultés énumérées ci-dessous :

- L'infection : Deux types majeurs de contaminations ont été détectés. La contamination chimique qui est causée par des agents invisibles, donc difficilement détectables.

La contamination biologique qui est due à des levures, des bactéries et des champignons est facilement détectable (Changement de couleur de l'explant qui devient blanc velouté et de turbidité).

- La nécrose (Brunissement): C'est une entrave récurrente et difficile à éviter. Elle se manifeste par un changement de couleur du cal qui atteint d'abord la surface de la coupe en contact avec le milieu, puis s'étend sur la totalité du cal.
- La vitrification : Les cals atteints sont gorgés d'eau, présentent un aspect translucide et ne croient plus même sur un milieu frais.

Le contrôle des cultures, trois à quatre jours après chaque subculture, a permis de déterminer le pourcentage d'infections correspondant à chaque cultivar et cela indépendamment du type de milieu de culture. Il ressort de la figure 34 que le taux de contamination obtenu durant toute l'expérimentation pour les trois cultivars varie de 8 à 17%. Notons que le nombre le plus élevé de contaminations a été observé à la première subculture. En effet ces infections ont baissé avec une bonne maîtrise des conditions d'asepsie et une manipulation minutieuse.

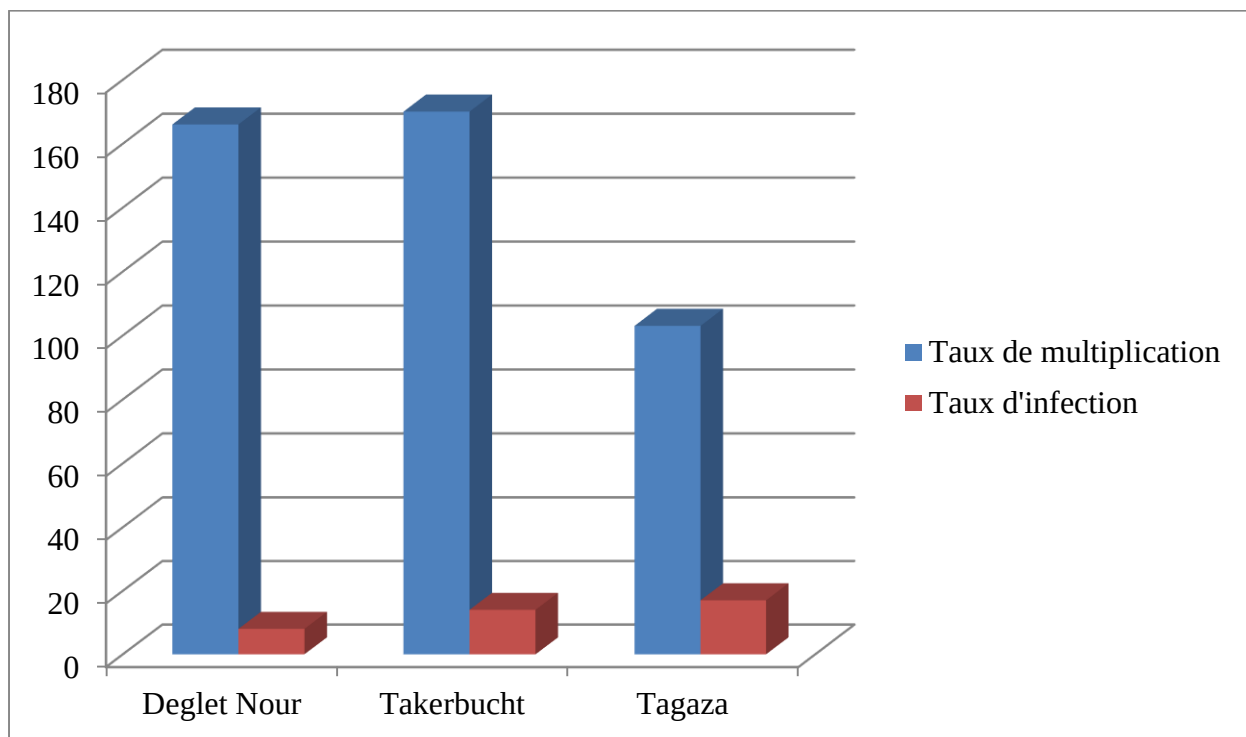


Figure 34: Taux de multiplications et d'infections des trois cultivars.

1.4. Analyse statistique

En présence des résultats obtenus sur la multiplication des cals, nous avons cherché à évaluer le sens de l'information obtenue. Pour cela, nous avons utilisé une analyse descriptive qui s'avère être la mieux adaptée à nos données et grâce à laquelle nous pourrions mettre en évidence :

- Les sommes “ Σ ” pour avoir les totaux des résultats sur chaque milieu et pour chaque cultivar.
- Les moyennes “ $\bar{X}$ ” pour savoir l'augmentation moyenne du nombre sur chaque milieu et pour chaque cultivar.
- Les écarts types “ σ ”.
- Les coefficients de variation “CV %” qui détermineront si les conditions utilisées sur les deux milieux et les trois cultivars sont homogènes ou pas.
- Les erreurs relatives à la moyenne “dr %” qui indiqueront la variabilité entre les résultats obtenus.

c) Analyse descriptive selon les milieux de culture

Tableau VIII : Récapitulatif des analyses descriptives selon les milieux de culture.

Calcul Milieu	Total des cals multipliés Σ	Moyenne $\bar{X}$	Ecart type σ	Coefficient de variation CV %	Erreur relative à la moyenne dr %
M ₁₀₀	715	807	130,11	16,12	/
P _{12,5}	899				

Les résultats du tableau VIII indiquent que pour les deux milieux

- La somme des cals obtenue après la multiplication est de

$$\Sigma M_{100} = \Sigma x_i = 715.$$

$$\Sigma P_{12,5} = \Sigma x_i = 899.$$

- La moyenne $\bar{X} = \frac{\sum x_i}{n} = 807$
- L'écart type $\sigma = \sqrt{\sigma^2} = 130,11$
- Le coefficient de variation $CV \%_1 = \frac{\sigma}{\bar{X}} \times 100 = 16,12 \%$

$CV \%_1 = 16,12 \%$ étant inférieur à 20% , indique que les conditions utilisées pour les milieux de culture M_{100} et $P_{12,5}$ sont homogènes.

- Le calcul de l'erreur relative à la moyenne $dr \%_1$ a donné des résultats incohérents donc non fiables.

Cela est dû à un déséquilibre du nombre de répétitions faites sur les deux milieux.

d) Analyse descriptive selon le cultivar.

Tableau IX : Récapitulatif des analyses descriptives selon les trois cultivars.

Calcul Cultivar	Total des cals multipliés Σ	Moyenne $\bar{X}$	Ecart type σ	Coefficient de variation $CV \%$	Erreur relative à la moyenne $dr \%$
Deglet Nour	546	565,49	100,95	17,85	44,35
Takerbucht	630				
Tagaza	429				

Les résultats du tableau IX indiquent que pour les trois cultivars

- La somme des cals obtenue après la multiplication est de

$$\Sigma_{\text{Deglet Nour}} = \sum x_i = 546$$

$$\Sigma_{\text{Takerbucht}} = \sum x_i = 630$$

$$\Sigma_{\text{Tagaza}} = \sum x_i = 429$$

- La moyenne $\bar{X} = \frac{\sum x_i}{n} = 565,49$

- L'écart type $\sigma = \sqrt{\sigma^2} = 100,95$
- Le coefficient de variation $CV \%_2 = \frac{\sigma}{\bar{X}} \times 100 = 17,85 \%$
- L'erreur relative à la moyenne $dr \%_2 = \frac{d}{\bar{X}} \times 100 = 44,35 \%$.

$CV \%_2 = 17,85 \%$ est inférieur à 20% . Ce résultat indique que les conditions utilisées pour les trois cultivars sont homogènes.

L'erreur relative à la moyenne $dr \%_2 = 44,35 \%$ est largement supérieure à 12% , ce qui indique qu'il y a une grande variabilité entre les réponses des différents cultivars sur les deux milieux.

➤ Discussion et conclusion

La multiplication des cals est une étape importante qui demeure le problème fondamental dans le programme d'embryogenèse somatique du palmier dattier. Ce résultat concorde avec celui de nombreux auteurs (SCHROEDER, 1970 ; BOUGUEDOURA, 1979) qui ont rencontré une grande difficulté à maintenir les cals en survie.

BROCHARD (1978) est le premier chercheur ayant pu multiplier le poids initial des cals par un facteur de 10 en une quinzaine de jours. Le milieu contenant 5.10^{-7} M d'acide parachlorophénoxyacétique lui a permis d'obtenir les meilleurs résultats. Le pouvoir de multiplication obtenu au cours de nos travaux est qualifié excellent, vu le coefficient de multiplication et la durée des subcultures.

Nos résultats montrent que la production des cals s'est installée sur les deux milieux et présente des structures callogènes différentes (friable et compacte). En effet l'emploi des différents régulateurs de croissance (*2,4-D 100mg/l*, *IPA 3mg/l pour le M₁₀₀* et *picloram 12.5mg/l*, *IPA 1 mg/l pour le P_{12.5}*) s'est révélé très efficace pour la multiplication des cals embryogènes. Ces résultats confirment ceux obtenus par (BHASKARAN et ROBERTA 1995, MATER 1986, DAGUIN et LETOUZE 1988, ZAID et TISSERAT 1989, YATTA et FERGANI 2007, VANNESTE et FRIML 2009).

L'addition du charbon actif à des quantités différentes, respectivement 3g/l et 200mg/l pour le M₁₀₀ et le P_{12.5} révèle être efficace pour lutter contre l'effet toxique des hormones ajoutées dans les milieux. Ceci est en accord avec (VALVERDE et al., 1987 ; STEINMACHER et al., 2007) qui ont rapporté que les meilleurs résultats de l'induction de la callogenèse chez le palmier de pêche sont obtenus en présence du charbon actif combiné avec une forte concentration d'auxines (2,4-D).

Chez le palmier des îles Canaries (*phoenix canariensis*), la présence du charbon actif combiné avec une forte concentration d'auxine (2,4-D) inhibe complètement l'induction de cals embryogènes (LETHI HUANG et al., 1999).

L'adjonction de la glutamine à 100mg/l permet une rapidité dans la durée de la formation des cals (de 4 à 6 mois) et paraît contribuer à la multiplication en améliorant leur pourcentage et nature callogènes. De nombreux travaux confirment que la glutamine à 100mg/l dans le milieu de culture de MS (REUVENI 1979; REYNOLD et MURACHIGE

1979 ; SHARMA *et al.*, 1986; DAGUIN et LETOUZE 1988 ; ZAID 1989 ; CHABANE 1995; YATTA et FERGANI 2007 ; YATTA *et al.*, 2013 a et b). VANNESTE et FRIML (2009) montrent que la glutamine à 100mg/l améliore le pourcentage des cals et non pas l'aspect et la taille des cals néoformés.

Nos milieux (M₁₀₀ et P_{12,5}) ont permis la viabilité des cals ainsi qu'une bonne activité de multiplication. Les résultats que nous avons obtenus montrent une variabilité de réponse selon la composition et la concentration du milieu de culture en régulateurs de croissance. Le taux de multiplication des cals après 4 mois de subculture, varie de 1,03 à 2.26 fois dans le milieu P_{12,5} et 1,02 à 3,1 dans le milieu M₁₀₀. La multiplication est optimale sur le milieu M₁₀₀ où les masses callogènes sont intensifiées et amplifiées en particulier chez les cals friables, initiés sur les fragments d'apex, bases de feuilles, et les bourgeons végétatifs.

Nos résultats montrent que la multiplication des cals a eu lieu sur des milieux de culture ayant des compositions hormonales identiques à celles des milieux d'initiation. D'après certains auteurs (MATER 1986, DAGUIN et LETOUZE 1988, BHASKARAN et ROBERTA 1995, VANNESTE et FRIML 2009), la multiplication des cals a également donné de bons résultats sur le milieu d'induction. Ceci est contradictoire, avec les travaux de DRIRA (1980). Cet auteur a remarqué que le maintien des cals et nodules sur un milieu identique à celui de l'ensemencement, aboutit à leur nécrose après trois à six mois de culture.

FERGANI (1998) a rapporté que les cals friables et les cals nodulaires maintenus dans leurs milieux d'induction, perdent leur pouvoir de multiplication après deux à neuf mois de culture. La même remarque est rapportée par SCHROEDER (1970), AMMAR et BENBADIS (1977) qui constatent un arrêt de croissance ainsi qu'une forte mortalité des cals après repiquage.

Plusieurs auteurs (REUVENI 1979; REYNOLD et MURACHIGE 1979 ; DAGUIN et LETOUZE 1988 ; ZAID 1989 ; CHABANE 1995; YATTA 2007 et 2013 b), confirment la performance et la rapidité de ces deux hormones dans l'induction et la multiplication des cals embryogènes. Ceci est confirmé aussi par TISSERAT (1979) sur les embryons zygotiques.

Nos résultats indiquent que les taux élevés d'infections observés au cours de la première subculture sont étroitement liés à la mauvaise maîtrise des conditions d'asepsie. C'est la raison pour laquelle les contaminations ont diminué avec le temps. Le taux d'infection

révélé durant toute l'expérimentation pour les trois cultivars est non significatif par rapport au taux de multiplication obtenu.

Nos résultats montrent aussi l'effet variétal sur la multiplication des cals embryogènes. En effet les cultivars Takerbucht et Deglet Nour ont réagi au bout de quatre mois et présentent une plus grande compétence à la callogenèse que le cultivar Tagaza. Les masses callogènes sont intensifiées et amplifiées en particulier chez les cals friables initiés sur les fragments d'apex, bases de feuilles, et les bourgeons végétatifs. Nos résultats concordent avec ceux de BEN ABDALLAH (1988) qui a montré l'effet génotypique chez les cultivars tunisiens Allig, Kentichi et Deglet Nour.

Par ailleurs, l'analyse statistique des résultats indique que les conditions utilisées pour les trois cultivars sont homogènes. Elle montre qu'il y a une grande variabilité entre les réponses des différents cultivars sur les deux milieux et confirme les résultats du taux de multiplication obtenus.

2. Etablissement de la suspension cellulaire

L'initiation d'une suspension cellulaire embryogène (SCE) de bonne qualité dépend de la qualité et du volume du cal embryogène sélectionné. Une observation attentive et régulière du cal idéal est nécessaire pour la sélection du cal embryogène qui est à l'équilibre entre la bonne taille et la bonne phase de développement (PANIS et THINEH, 2001; FKI et *al.*, 2003; SANE et *al.*, 2006; SANE; 2007). Le système de culture continu et fermé permet d'obtenir des cultures en multiplication exponentielles (ASSANI et *al.*, 2002).

2.1. Entretien des suspensions en culture

Les cals embryogènes issus des deux cultivars Deglet Nour et Tagaza sont placés sur le milieu P₅ (5mg/l de Picloram associé à 1mg/l d'IPA et 1mg/l de Thiamine) sous une agitation continue à une vitesse de 100 tours/min (An.2).

La masse de tissu végétal est déterminée dans chaque erlenmeyer. Les cultures sont repiquées tous les 8 à 10 jours sur un milieu liquide frais jusqu'à l'obtention de la suspension.

Les pesées sont effectuées régulièrement avant et après chaque nouveau repiquage. Ceci nous a permis de suivre et d'estimer le grossissement et la prolifération des cals.

La dynamique de croissance des suspensions cellulaires se traduit par le comportement des agrégats cellulaires dans la suspension (Fig.35-C).

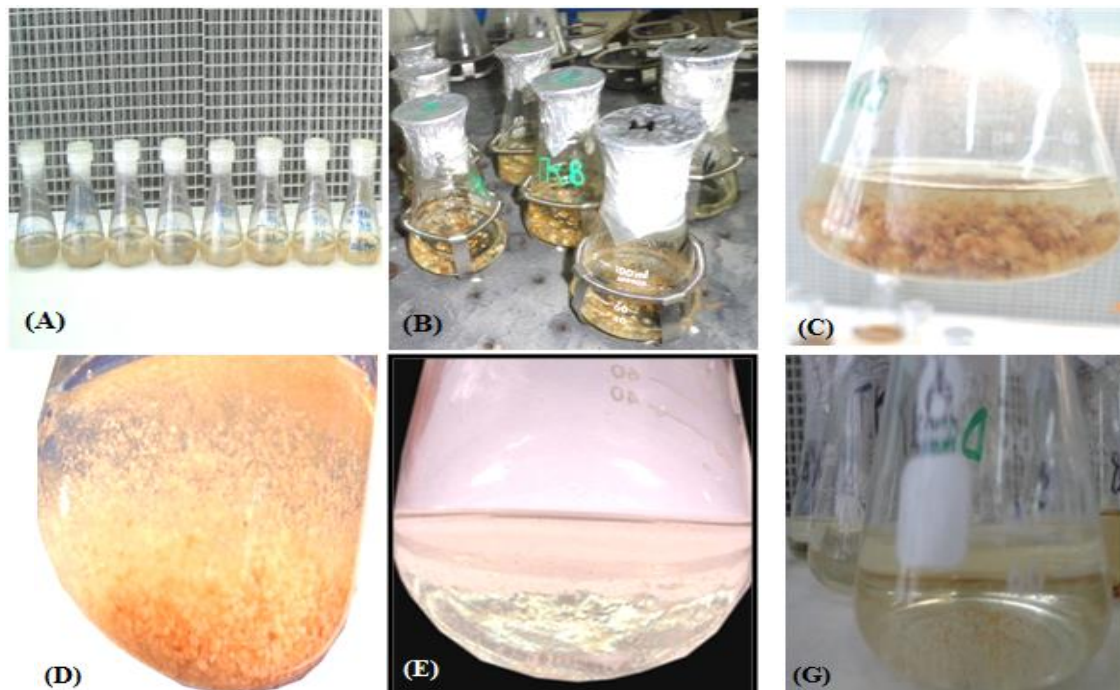


Figure 36 : Mise en culture du cal. (A et B)

Aspect du cal après trois semaines (apparition de microcals de classe I et II) (C)

Suspension cellulaire en milieu liquide agité. (D, E et G)

Un départ favorable à la constitution d'une suspension cellulaire intéressante est observé, lorsque les cellules de cal en dissociation sont constituées par des petits groupes cellulaires (mini cals) de taille plus ou moins petite (Fig.35).

Il ressort du tableau X que la croissance des cals est différente. Durant la première semaine de culture dans le milieu liquide (P₅), une prolifération élevée des suspensions est observée chez toutes les souches à l'exception DN_{12B}, TGZ_{3B} et TGZ_{7B} où l'apparition des cals secondaires a débuté au bout de la troisième semaine.

Toutes les souches ont été retenues pour l'établissement des différentes classes des cals à l'exception TGZ_{7B}

Une filtration sur tamis de 380 µm de diamètre est réalisée au bout de la septième semaine pour les souches DN_{4A}, DN_{4B}, DN_{12A}, TGZ_{3A}, TGZ_{7B} et à la huitième semaine pour les souches DN_{12B}, TGZ_{3B}, TGZ_{7A}. Cela a permis l'apparition des souches de classe III.

Toutes les souches qui se sont multipliées, ont un poids variant entre 12g (DN_{12B}) et 16,23g (DN_{4A}). Elles ont été retenues pour la suspension cellulaire à l'exception de la souche TGZ_{7B} qui n'a pas atteint ce stade (Seulement 4g), à cause d'un retard dû à un manque de prolifération.

A la dixième semaine, toutes les souches sont filtrées à travers une membrane de 100µm de diamètre, la suspension cellulaire est réalisée.

Les souches ont une bonne prolifération. Le poids est passé de 2g à 16,23g après neuf semaines pour la souche DN_{4A}. Le poids de la souche DN_{4B} est passé de 2g à 14,30. Le poids de la souche DN_{12A} est passé de 2g à 14g. Le poids de la souche DN_{12B} est passé de 2g à 12g. Le poids de la souche TGZ_{3A} est passé de 2g à 13,83. Le poids de la souche TGZ_{3B} est passé de 2g à 14,72. Le poids de la souche TGZ_{7A} est passé de 2g à 15,20. Pour la souche TGZ_{7B} la prolifération est plus faible, le taux de multiplication était de deux fois de 2g à 4g. (Tab.X).

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

Souches	Nombre de semaines										Poids de départ	Poids après 9 semaines
	W1	W2	W3	W4	W5	W6	W7	W8	W9	W10		
DN _{4A}		+				X	-			S	2g	16.23
DN _{4B}		+				X	-			+	2g	14.30
DN _{12A}		+				X	-			+	2g	14
DN _{12B}			+			X		-		+	2g	12
TGZ _{3A}			+			X	-			+	2g	13.83
TGZ _{3B}		+				X		-		+	2g	14.72
TGZ _{7A}		+				X		-		+	2g	15.20
TGZ _{7B}			+			X	-				2g	4

+ : Apparition de cals secondaires ; X : Répartition des cals I et II ; - : Première filtration sur tamis de 380 µm de diamètre (établissement de la classe III) ; S : obtention de suspension cellulaire de taille (comprise entre 50 et 100 µm) ; W : Semaine.

2.2. Les observations microscopiques

L'observation de cals friables et compacts hachés destinés à l'établissement d'une suspension cellulaire révèle les résultats suivants après agitation. Le cal se dissocie et libère des cellules de différentes formes plus ou moins groupées (Fig.36).

Une étude au microscope a permis d'observer trois types de cellules bien distinctes.

- Des cellules arrondies de petite taille avec un noyau volumineux qui occupe la majeure partie du cytoplasme.
- Des cellules ovales plus-au-moins grandes avec un noyau petit.
- Les cellules allongées sont de grande taille avec un noyau petit.

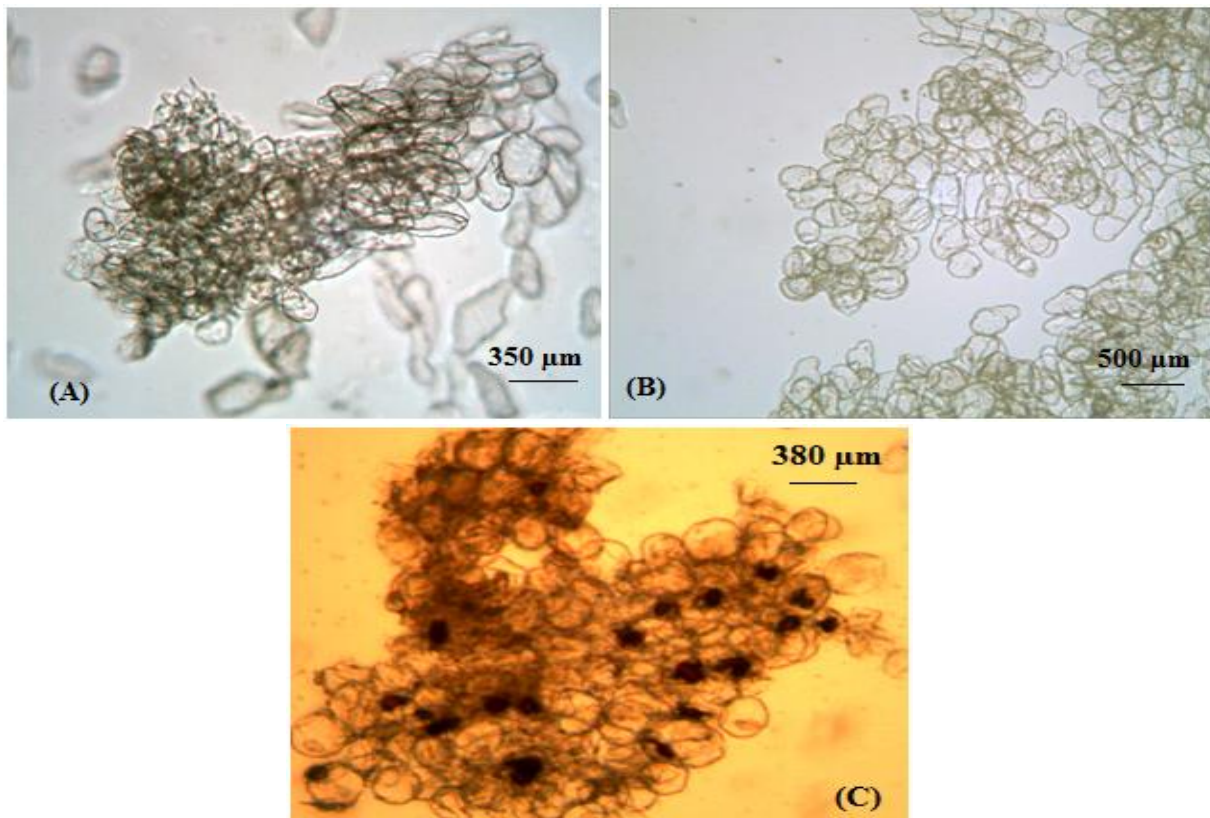


Figure 36 : Cal embryogène dissocié en petits groupes cellulaires (G x 40).

La viabilité de ces structures cellulaires a été évaluée par Fluorescéine di-acétate (FDA) sur le microscope inversé (Fig.37). L'observation d'une suspension cellulaire montre des cellules isolées et de massifs cellulaire de taille variable. Les cals de texture plus au moins compact donnent naissance à des agrégats de cellules amylofères capables de se diviser, mêlées à des cellules allongées non amylofères.

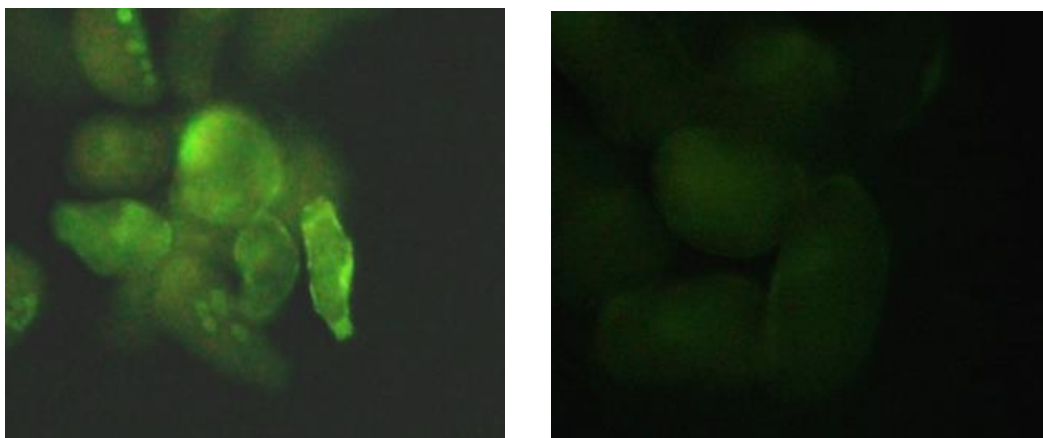


Figure 37 : Type de cellules colorées par fluorescéine di-acétate (FDA) sur le microscope inversé (G x 40).

Pour suivre les différentes étapes de prolifération de la suspension cellulaire des cultivars Deglet Nour et Tagaza, une courbe de croissance est établie en fonction du poids frais des suspensions cellulaires mesuré au cours des repiquages (Tab.XI et Fig.38).

Tableau XI : La variation du poids frais des suspensions cellulaires en fonction des repiquages durant 10 semaines.

Semaines	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
DN _{4A}	2	5	8	9,5	11	14,80	14,93	15,10	15,53	16,23
TGZ _{3B}	2	4,25	8,08	9,30	12	12,90	13,10	13,50	14	14,72

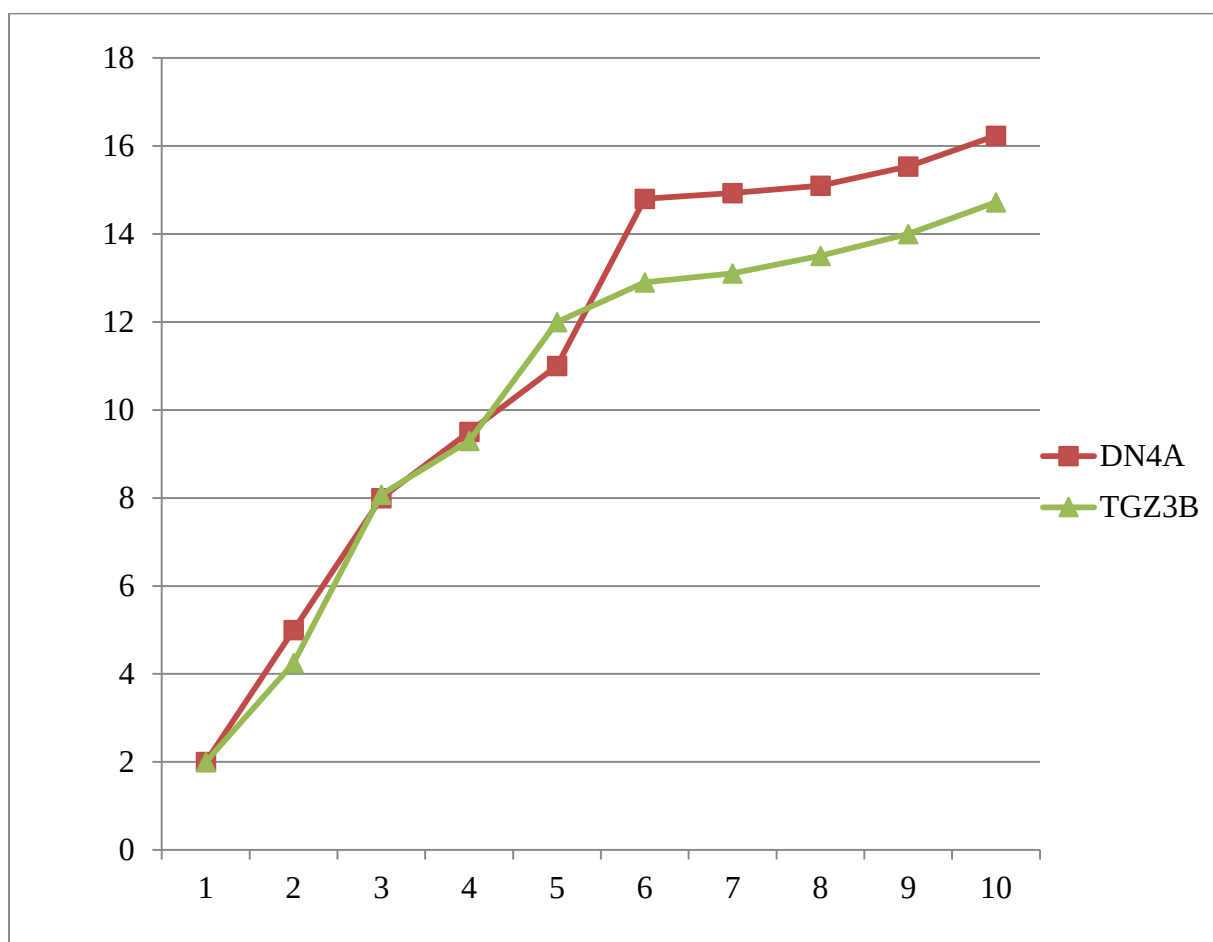


Figure 38: Courbe de croissance de la suspension cellulaire du cultivar DN_{4A} et TGZ_{3B}.

La figure ci-dessus nous permet d'observer la croissance de la suspension cellulaire des deux souches DN_{4A} et TGZ_{3B}. En effet, les deux courbes semblent être similaires avec une légère supériorité de prolifération pour la souche DN_{4A} comparée à celle de TGZ_{3B}. On peut distinguer trois phases.

La première étant la phase de latence, celle-ci n'est pas observable en raison du temps de repiquage.

La deuxième phase est caractérisée par une propagation exponentielle des deux souches. Cette phase est comprise entre la 2^{ème} et la 5^{ème} subculture (phase exponentielle).

La dernière phase débute à la 6^{ème} semaine, à ce niveau la propagation est plus au moins stable et semble être achevée. Cela est dû à un équilibre entre le taux de multiplication et le taux de mortalité (phase stationnaire).

On observe également que le poids frais de la suspension cellulaire est multiplié 8,11 fois chez le cultivar DN_{4A} et 7,36 fois pour le cultivar TGZ_{3B}.

2.3. Développement et régénération de la suspension cellulaire primaire

Trois étapes sont nécessaires pour régénérer des embryons somatiques à partir d'une suspension cellulaire. D'abord, un prétraitement sur milieu liquide sans régulateurs de croissance pendant 1 mois. Ensuite, les suspensions sont transférées sur milieu gélosé, additionné d'IPA pendant 10 jours. Ceci permet de faciliter l'installation du pôle caulinaire. Enfin, les suspensions seront transférées sur milieu solide sans régulateurs de croissance pour la différenciation des embryons somatiques.

➤ Discussion et conclusion

Les cals embryogènes constituent un matériel de choix très utile pour l'obtention de suspension cellulaire. L'observation des suspensions cellulaires au cours de ce travail montre des cellules isolées et des massifs cellulaires de taille variable. Les cals flottent librement dans le milieu, ils sont submergés totalement et sont exposés aux ingrédients du milieu de culture. Les cultures de suspension cellulaires donnent beaucoup d'avantages sur les milieux de culture solide. Al-KHAYRI (2012) a attesté cette théorie.

Selon PANIS et R. SWENNEN, 1993, une observation attentive et régulière du cal idéal est nécessaire pour la sélection des cals embryogènes qui sont à l'équilibre entre «la bonne taille» et la «bonne phase de développement». Choisir des tissus qui contiennent des cals hautement embryogènes à un stade jeune.

Concernant la nature du cal testé, nous remarquons que la suspension cellulaire qui résulte des cals friables est plus stable par rapport à celle obtenue du cal compact. Les cals friables facilitent l'obtention de cellules isolées plus ou moins rapidement. Leur multiplication est plus rapide par rapport aux cals compacts après traitement aux pectinases. Ceci concorde avec les résultats de CHABANE et *al.*, 2006. Ces auteurs confirment que l'obtention de ces cellules est le point de départ d'une suspension cellulaire viable.

Dans notre expérimentation, les cals de texture plus ou moins compacte, ont donné naissance à des agrégats de cellules amylofères capables de se diviser, mêlés à des cellules allongées non amylofères. L'efficacité des cals friables s'est révélée par la possibilité de donner facilement naissance à des agrégats de cellules et par la capacité de multiplication des suspensions obtenues chez les deux cultivars. Ces observations concordent avec celles de (FKI et *al.*, 2003) ; (SANE et *al.*, 2006) ; (CHABANE et *al.*, 2007); (YATTA et *al.*, 2013b) chez d'autres cultivars. Une suspension embryogène de bonne qualité est caractérisée par la présence d'une grande proportion d'agrégats de cellules embryogènes en prolifération. Les cellules amylofères sont capables de se diviser et de se régénérer rapidement et peuvent donc conserver leurs propriétés embryogènes (PANIS et R. SWENNEN, 1993). Les rapports volume/cytoplasme et volume/noyau nous renseignent aussi sur l'âge des cellules. En effet, pour les cellules arrondies, le noyau est très volumineux et le cytoplasme est petit : ce qui signifie que ces cellules sont à l'état juvénile (très embryogènes).

Pour les cellules ovales et allongées, la taille du noyau est nettement inférieure à celle du cytoplasme : ce qui signifie que ces cellules sont plus âgées et donc non embryogènes (PANIS *et al.*, 1993).

L'utilisation de milieu liquide augmente considérablement la productivité de l'embryogenèse somatique, qui se traduit par l'augmentation de masse des cals compacts hachés et friables. Nos résultats concordent avec ceux obtenus par FKI *et al.* (2003) et FKI, (2005), YATTA *et al.* (2009), MAHMADOU ADAMOU. N et SANI GAOH. B. (2010).

Bien que les cals friables se multiplient facilement dans un milieu liquide, les suspensions qui en résultent peuvent avoir des potentiels de régénération variables. GEORGET *et al.* (2000) donnent une description histologique détaillée des différentes parties d'une suspension embryogène, de leur développement dans le temps et de leur potentiel embryogénique.

L'établissement et l'entretien des suspensions cellulaires embryogènes est généralement difficile. La compétence morphogène des suspensions décline habituellement après une période prolongée de subcultures successives (ABE, T. et FUTSUHARA Y., 1991). Dans nos résultats, cela est observable dès la 6^{ème} semaine (phase stationnaire).

Après dix semaines de culture, la croissance cellulaire est arrêtée. Les suspensions sont réalisées à l'exception de la souche TGZ_{7B} qui n'a pas beaucoup proliféré. Ce résultat concorde avec ceux de (FKI *et al.*, 2003; YATTA *et al.*, 2009; Al-KHAYRI, 2012). Après 3 à 4 mois de culture, ces auteurs ont tracé des courbes de croissance pour déterminer les paramètres essentiels de la croissance de suspensions cellulaires (le temps de multiplication et la croissance maximum). Ces courbes montrent qu'une croissance en phase exponentielle s'arrête après 5 à 7 semaines quel que soit le milieu utilisé et quel que soit le cultivar. PANIS *et al.* (1993) montrent que les courbes de croissance ont une allure conventionnelle, une phase de latence qui dure une semaine suivie par une phase exponentielle.

Cette expérimentation nous a permis d'établir des suspensions cellulaires, de les maintenir en culture, de déterminer les différentes phases de croissance (Phase de latence, phase exponentielle, et la phase stationnaire), de les localiser dans le temps et d'observer les types de cellules (Arrondies, ovales, allongées) sous microscope photonique. Ce résultat est en accord (PANIS *et al.*, 1993; MAHMADOU ADAMOU. N et SANI GAOH. B., 2010; Al-KHAYRI, 2012, YATTA *et al.*, 2013b).

Afin de tester la viabilité de ces suspension cellulaires embryogènes, on a ajouté quelques gouttes d'une solution diluée de di-acétate de fluorescéine (FDA) (-20°C, dissout dans de l'acétone et de l'eau) à un échantillon de suspension. Les tissus viables émettent une fluorescence vert vif lorsqu'on les a observés sous une lumière ultra-violet.

Une bonne température favorise le maintien d'une suspension cellulaire. La densité d'inoculum influe de façon décisive sur le taux de croissance des suspensions.

Le repiquage régulier provoque plusieurs inconvénients tels que : la diminution du taux de croissance, du potentiel de régénération et surtout, une augmentation dans les risques de contaminations. Ceci va influencer sur la qualité des cals mis en culture (GEORGET et *al.*, 2000). Pour réduire les problèmes liés aux repiquages, un protocole de cryoconservation a été développé afin de stocker les suspensions durant une période indéfinie (PANIS et THINH, 2001).

La suspension cellulaire est très utilisée en culture *in vitro* du palmier dattier car elle constitue un matériel de choix pour l'isolement des protoplastes. Certains auteurs (ASSANI et *al.*, 2005), (CHABANE et *al.*, 2007), (YATTA et *al.*, 2012), (YATTA et *al.*, 2013b) (BERRICHI K., AZZOUG R., et *al.*, 2013) , ont rapporté que la suspension cellulaire pourrait être le point initial pour les fusions somatiques et la production de dattiers résistants aux maladies dans le futur.

3. Histologie

L'examen histologique des cals à différents moments de leur culture est très important afin de définir les cals embryogènes et leurs capacités de régénération. L'histologie est employée comme un guide permettant d'apprécier l'évolution bonne ou mauvaise des cals et des cultures au cours des temps.

La néoformation et multiplication de cals est réalisée sur milieu de culture. Cette callogenèse se traduit par une hétérogénéité des cellules. Certaines cellules grossissent sans caractère méristématique, se différencient et se vident de leur contenu cytoplasmique (Fig.39-A). Mais d'autres montrent une réaction différente qui se manifeste par un cytoplasme dense contenant un noyau volumineux (Fig.39-B).

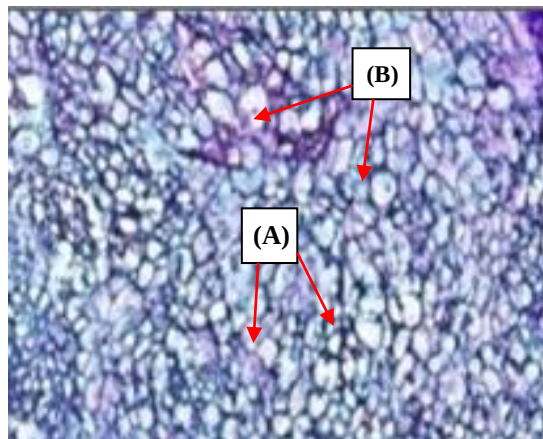


Figure 39: Grosses cellules dépourvus de cytoplasmes (G X 40). (A)
Cellules avec gros noyaux et cytoplasme dense (G X 40). (B)

Le naphтол blue black confère à ce cytoplasme une coloration qui nous indique la présence de protéines solubles et de très petites vacuoles. Elle confirme aussi que la présence du 2, 4-D dans le milieu de culture a induit l'activation de ces cellules. Il se produit donc une division des cellules, qui se multiplient de plus en plus pour former des masses calogènes importantes.

L'examen histologique montre que les cals friables sont composés d'un ensemble de cellules différenciées. Les cals initiés sur un bourgeon végétatif sont d'une nature morphologique friable. Ils sont constitués d'amas cellulaires partiellement épidermisés car le plus souvent sont initiés superficiellement à partir de cellules épidermiques et sous épidermiques des explants (Fig.40-A).

Par contre les cals compacts naissent plus profondément, au niveau des tissus péri vasculaires. Les cellules des cals nodulaires des explants d'apex paraissent méristématique à un noyau important densément coloré.

Ces cals s'isolent des explants et donnent naissance à des nodules méristématiques. Ces nodules sont constitués de cellules méristématiques et présentent en particulier une zone pseudocambiale constituée de plusieurs assises de cellules alignées qui permet la croissance des cals (Fig.40-B).

Ces masses nodulaires sont individualisées par la suite par la destruction des cellules les plus externes. En effet, les observations indiquent la présence de parois entassées (colorées en rose) des cellules détruites permettant l'isolement des nodules.

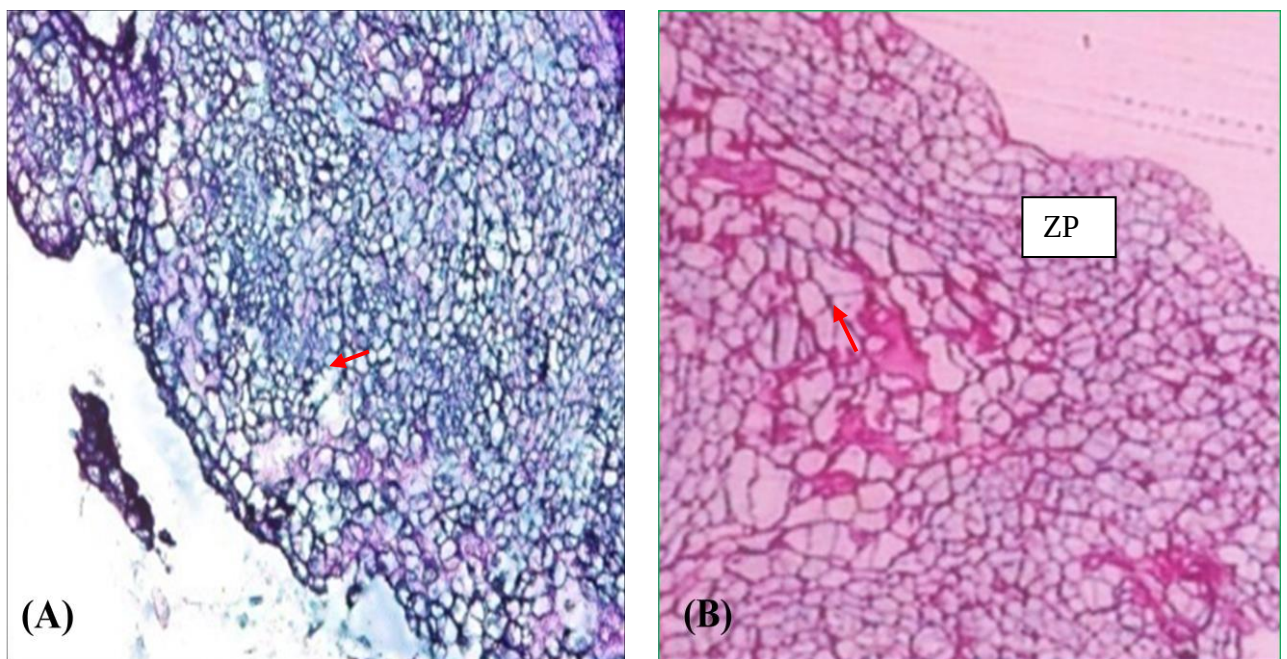


Figure 40 : Aspects histologiques de cals friables et compacts obtenus chez le cultivar Tagaza (G x 40).

ZC : Zone centrale ; **ZP :** Zone périphérique.

En présence de 2,4-D dans les milieux de culture, les coupes histologiques ont révélé la présence de tissus parenchymateux dégénérés (Fig.41).

Des cellules embryogènes de 30-40 μm de longueur ont été observées à proximité des tissus vasculaires (Fig.41). Ces cellules péri- vasculaires ont été caractérisées par de petites vacuoles et un cytoplasme dense, où les protéines solubles ont été colorées par la NBB.

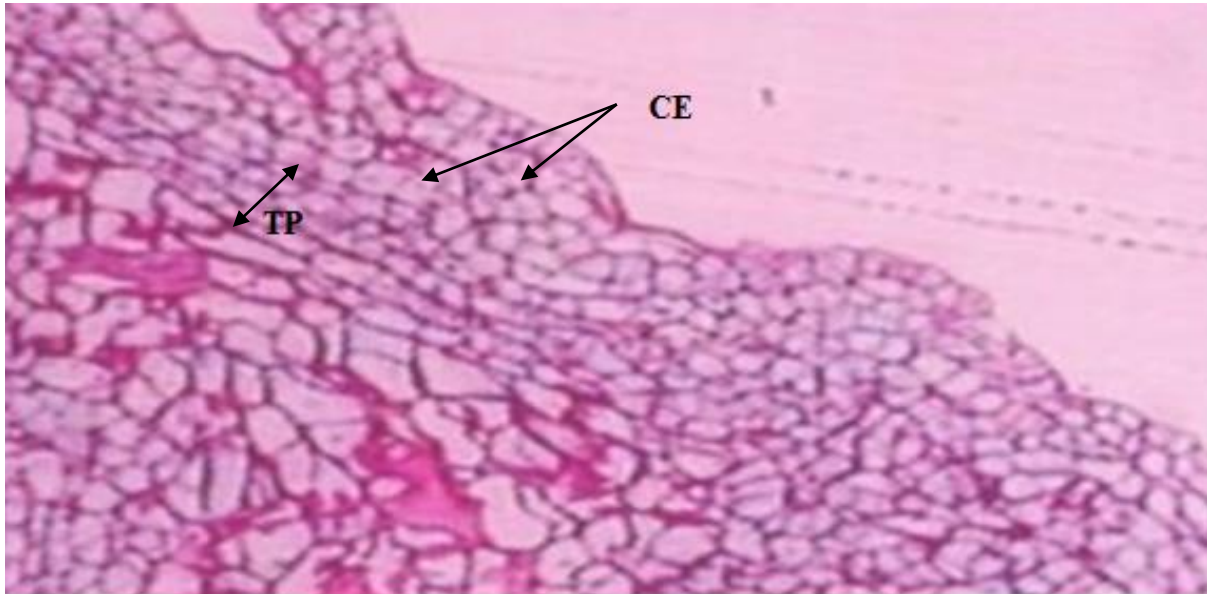


Figure 41 : Indication du tissu parenchymateux et des cellules embryogènes sur une coupe histologique.

TP : Tissu parenchymateux ; **CE :** Cellules embryogènes.

Dans une vue d'ensemble, les cals friables sont composées de petites cellules méristématiques allant de 8 à 20 μm de diamètre.

La coloration au NBB a montré le cytoplasme qui est intensément coloré et de grands et sombres noyaux.

➤ Discussion et conclusion

La réussite de la multiplication végétative in vitro par embryogenèse somatique a ouvert de nouvelles perspectives pour la culture de nombreuses plantes. Cependant, cette technique s'est révélée facile pour certaines plantes comme les céréales et difficile pour d'autres. La difficulté à obtenir des embryons somatiques pour certaines espèces, notamment les ligneuses et en particulier les Monocotylédones a incité de nombreux chercheurs à essayer de mieux comprendre les mécanismes de ce processus (BAJAJ, 1989). Ils ont utilisé l'histocytologie comme une complémentarité des techniques de culture in vitro pour mieux comprendre les phénomènes cytologiques qui se déroulent tout au long du processus d'évolution, allant de la mise en place de l'explant jusqu'à la formation d'embryons somatiques capable de germer.

Les analyses histologiques réalisées, nous ont permis de décrire la nature et l'origine de la callogenèse dans le cœur du rejet du palmier dattier de trois cultivars. Les cals friables présentent une origine superficielle à partir de cellule de l'assise épidermique et sous épidermique des explants par contre les cals compacts naissent à partir de cellules péri vasculaires.

L'assise épidermique et sous épidermique, les cellules péri vasculaires sont à l'origine des cals friables. Les cellules péri vasculaires constituent le point de départ des cals nodulaires. Ces résultats concordes avec s'elle obtenu par (MEGUELLATI, 2005).

La mise en évidence du rôle joué par les cellules périvasculaires dans la formation des cals avait déjà été observé chez le cocotier (*Cocos nucifera*) (PANNETIER et BUFFARD MOREL, 1982), le cafetier (*Coffea robusta*) (FERRIERE et al ; 1987), l'hévéa (*Hevea brasiliensis*) (FERRIERE et CARRON, 1988), le palmier à l'huile (*Elaeis guineensis* Jacq) (SCHWENDIMEN et al 1988) et le palmier dattier (*Phoenix dactylifera* L) (ZAID, 1989), (FERGANI, 1998).

Les cals nodulaires et friables révèlent un pouvoir embryogène non négligeable ceci et grâce a la présence des cellules de petite taille (à l'état juvénile) qui ont un rapport noyau/cytoplasme élevé.

De ce fait, ces deux types de cals ont été particulièrement exploités dans les travaux de production de suspensions cellulaires et de protoplastes. La détermination du cal embryogène par la petite taille des cellules, avec un cytoplasme riche en petites vacuoles avec un gros noyau est un caractère largement reporté chez le cocotier (*Cocos nucifera*) (VERDEIL et *al.*, 2001).

Le secteur phœnicicole, les oasis en particulier subissent sans cesse l'effet de facteurs d'agressions biotique et abiotique. Parmi les difficultés biotiques, l'exposition au Bayoud (*Fusarium oxysporum* f.sp. *albedinis*) qui ravage des palmeraies entières.

L'utilisation de l'outil biotechnologique fondé sur les techniques de culture *in vitro* par embryogenèse somatique constitue sans doute le moyen le plus prometteur pour la reconstitution des palmeraies dévastées via une multiplication massive du palmier dattier. D'après MICHAUX - FERRIERE et *al.*, (1987), c'est une voie qui assure un taux de multiplication élevé et un rajeunissement important du matériel végétal.

A travers ce travail, nous avons appliqué une méthodologie permettant la multiplication des cals embryogènes, l'établissement et la croissance de la suspension cellulaire à partir des cals embryogènes chez les trois cultivars Deglet Nour, Tagaza et Takerbucht.

Grace à la voie de l'embryogenèse somatique indirecte, on a pu multiplier des cals des trois cultivars Deglet Nour et Tagaza (qui sont sensibles au Bayoud) et Takerbucht (résistant au Bayoud).

Les hormones de croissance utilisées dans les deux milieux de culture (P_{12.5} et M₁₀₀) ont des effets importants sur le développement et la multiplication des cals. La prolifération des cals sur les deux milieux d'initiation était forte.

Ces milieux de culture déjà utilisés pour l'induction des cals, nous ont conférés une multiplication intense de cals friables et granuleux de couleur blanche et blanche-beige et cela après deux subcultures.

L'analyse statistique des résultats indique que les conditions utilisées pour les trois cultivars sont homogènes. Elle nous a permis de révéler qu'aucune différence significative n'existe entre le nombre de cals formés sur le milieu M₁₀₀ et ceux formés sur le milieu P_{12.5} : donc ces deux milieux sont les milieux de choix pour l'induction de la callogenèse. Elle nous a montré qu'il y a une grande variabilité entre les réponses des différents cultivars sur les deux milieux et a confirmé les résultats du taux de multiplication obtenus.

Ces cals embryogènes ont été employés pour initier les suspensions cellulaires. Ces derniers constituent un matériel idéal pour l'isolement de protoplaste. La capacité de régénération des cals embryogènes est définie par une analyse histologique.

L'initiation et la croissance de suspension cellulaire constituaient une des étapes les plus délicates. Cette expérimentation a permis de définir les paramètres essentiels de la croissance de ces suspensions (le temps de dédoublement et le rendement maximum) et de leur maintenance en culture. La suspension cellulaire est le matériel nécessaire pour les biotechnologies de la plupart des monocotylédones. Elles ont servi d'une part à l'obtention de protoplastes viables ayant de bonnes aptitudes à la division et à la régénération de nombreuses plantes et d'autre part à la confection de cultures nourrices performantes.

Quand aux perspectives de recherche, l'étude laisse apparaître les orientations suivantes

- Développer la technique de culture de suspension cellulaire vis-à-vis de la balance hormonale.
- Développer la technique de culture de protoplastes issus de cals ou de suspensions embryogènes, puis d'envisager la création d'hybrides somatiques.
- Induire des mutations sur le matériel végétal durant les phases de l'embryogenèse somatique (cals, suspensions embryogènes, embryons somatiques et vitroplants) en vue de la création de variétés résistantes.

Rechercher des marqueurs moléculaires pour déterminer le succès de l'hybridation somatique.

Abdelkader, H., Souna, F., Chafi, A., Chakroune, K., Himri, I., Bouakka, M. (2010). Effect of mycorrhization and compost on the growth and the protection of date palm (*Phoenix dactylifera* L.) against Bayouddisease. *American-Eurasian Journal of Sustainable Agriculture*. 2010, 4(2): 260-267.

Abe, T., Futsuhara, Y. (1991). Regeneration of rice plants from suspension cultures, in *Biotechnology in Forestry and Agriculture*, vol 14, Rice (Bajaj, Y. P S., ed), Springer-Verlag, Heidelberg, pp 38-46.

Aberlenc Bertossi, F. (2012). La détermination du sexe du palmier dattier. *Diade news letters* 3 : 1-8.

Amrani, Y. (2002). Contribution à l'inventaire phytosanitaire du cèdre de l'Atlas dans la forêt de Sidi M'guild- Canton de Ain Kahla. *Mémoire de 3 cycles ENFI*. 79 p.

Assani, A., Haicour, R., Wenzel, G., Foroughi-wehr, B., Bakry, F., Cote, F.X. (2002). Influence of donor material and genotype on protoplast regeneration in banana and plantain cultivars (*Musa* spp.). *Plant Sci*. 162:355-362.

Augé, R., Beauchesne., Boccon Gibod, J., Decourtyel., Digat, B., Jalouzotr., Minier, R., Morandj, CL., Reyneld, JP., Vidalie, H. (1989). La culture in vitro et ses applications horticoles. 3^{ème} édition. Revu, corrigé et augmenté 300 p. Ed. Lavoisier, J.B Billière.

Banat, F., Al Asheh, S., Al Makhadmeh, L. (2003). Evaluation of the use of raw and activated date pits as potential adsorbents for dye containing waters. *Proc. Biochem*. 39: 193-202.

Barrow, S. (1998). A monograph of *Phoenix* L. (Palmae: Coryphoideae). *Kew Bull*. 53:513-

BEECH, M. (2003). Archaeobotanical evidence for early date consumption in the Arabian Gulf. *The Date palm: from traditional resource to green wealth*. The Emirates Center for Strategic Studies and Research, Abu Dhabi : 11-31.

Beech, M., Shepherd, E. (2001). Archaeobotanical evidence for early date consumption on Dalma Island, United Arab Emirates, *Antiquity* 75: 83-9.

Ben, Aïssa I., Bouarfa, S., Perrier, A. (2008). Utilisation de la mesure thermique du flux de sève pour l'évaluation de la transpiration d'un palmier dattier. *Economies d'eau en systèmes irrigués au Maghreb, Mostaganem : Algérie*.

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

Bertossi, F. (2012). La détermination du sexe du palmier dattier. Diade news letters 3 : 1-8.

biochimique, alimentaire et diététique de 11 cultivars de dattiers, *Phoenix dactylifera* L., des palmeraies de Mauritanie. Thèse de 3^{ème} cycle, Département de biologie végétale, faculté des sciences et techniques, Université Cheikh Anta Diop de Dakar. 250 p.

Botes, A., Zaid, A. (2002). The economic importance of date production and international trade. In: Zaid, A. Arias-Jimenez, E. J. Date palm cultivation. FAO plant production and protection paper, 156 rev.1. FAO, Rome.

Bouakka, M. (2010). Effect of mycorrhization and compost on the growth and the protection of date palm (*Phoenix dactylifera* L.) against Bayoud disease. American-Eurasian Journal of Sustainable Agriculture. 2010, 4(2) : 260-267.

Bouguedoura, N. (1979). Contribution à la connaissance du palmier dattier (*Phoenix dactylifera* L.). Etude des productions axillaires. Thèse de 3^{ème} cycle, Université des Sciences et de la Technologie d'Alger, Alger, 64 p.

Bouguedoura, N. (1991). Connaissance de la morphogenèse du palmier dattier (*Phoenix dactylifera* L.). Étude in situ et in vitro du développement morphogénétique des appareils végétatifs et reproducteurs. Thèse de doctorat d'état, USTHB, Alger. 201p.

Bouna, Z.E.A.O. (2002). Contribution à l'étude biosystématique, ethnobotanique, biochimique, alimentaire et diététique de 11 cultivars de dattiers (*Phoenix dactylifera* L.) des palmeraies de Mauritanie. Thèse de 3^{ème} cycle, Département de biologie végétale, faculté des sciences et techniques, Université Cheikh Anta Diop de Dakar. 250 p.

Boxus, P. (1995). Multiplication végétative: micropropagation et embryogenèse somatique in biotechnologies végétales. BV 93, Ed CNED. AUPELF- UREF 191p.

Chabane, D. (1995) Etude des aptitudes morphogénétiques de divers explants des rejets du palmier dattier (*Phoenix dactylifera* L.). Chez deux variétés Takerbucht et Deglet Nour pour induire une embryogenèse somatique. Thèse de Magister, Univ. Sc. Tech. Alger, 201p.

- Chabane, D., Assani, A., Bouguedoura, N., Haicour, R., Ducreux, G. (2007).** Induction of callus formation from difficult date palm protoplasts by means of nurse culture. *CR Biologies* 330:392-401.
- Chevalier, A. (1952).** Deux composées permettant de lutter contre l'imperata et empêchant la dégradation des sols tropicaux qu'il faudrait introduire rapidement en Afrique noire. *Rev. Intern. De bot. Appl. Et d'Agric. Trop.* 32 :494-497.
- Daguin, F., Letouze, R. (1989).** Biotechnologie du palmier dattier. Nouvelles approches des conditions de post in vitro et de la conservation de génotypes sélectionnés. Compte rendu. Premier séminaire maghrébin sur la génétique de la résistance du palmier dattier. Projet de lutte contre le bayoud FAO/PNUD/RAB/88/024. Adrar, Algérie, 2-7 décembre.
- Dhed'a, D., Dumortier, F., Panis, B., Vuylsteke, D., De Langhe, E. (1991).** Plant regeneration in cell suspension cultures of the cooking banana, cv. Bluggoe (*Musa* spp., ABB group). *Fruits*, 46: 125-135.
- Djerbi, M. (1992).** Pollinisation et soins apportés aux régimes. In : Précis de Phoéniculture, 79 - 93, F.A.O
- Djerbi, M. (1982 a).** Le Bayoud en Algérie, Problème et Solution. F.A.O. Regional Projet for palm and Dates Research centre in the Near East and North. Africa, Baghdad Iraq, 45 p.
- Djerbi, M. (1982 b).** Bayoud disease in North Africa: history, distribution, diagnosis and control. *Date palm Journal*, 1 (2): 153-97.
- Djerbi, M. (1988).** Les maladie des palmiers dattiers : Le Bayoud (15-36). Rapport de Projet Régional de lutte contre le Bayoud (RAB/84/018).
- Djillali Z. (2008).** Régénération par embryogenèse somatique de vitroplants de palmier dattier (cultivars Deglet Nour et Takerbucht) en vue de la résistance contre le bayoud. Thèse de Magister, INA d'Alger, 98p.
- El Houmaizi, M A. (2002).** Modélisation de l'architecture du palmier dattier (*Phoenix dactylifera* L.) et application à la simulation du bilan radiatif en oasis. Thèse de fin d'étude du troisième cycle, Université Cadi-Ayyad, Marrakech au Maroc.

El-Deek, A., Attia, A., Al Harthi, M A. (2010). Whole inedible date in the grower–finisher broiler diets and the impact on productive performance, nutrient digestibility and meat quality. *Animal*, 4 (10): 1047-1052.

Ferry, M., Toutain, G., Monfort, S. (1991). La multiplication du Palmier dattier (*Phoenix dactylifera*). In : *Physiologie des Arbres et Arbustes en zones arides et semi-arides*. Groupe d'étude de l'Arbre. Paris. France. 353-363.

Fki, L., Masmoudi, R., Drira, N., Rival, A. (2003). An optimised protocol for plant regeneration from embryogenic suspension cultures of date palm (*Phoenix dactylifera* L.), cv. Deglet Nour. *Plant Cell Rep.* 21: 517-524.

Georget, R., Domergue, K., Ferrière, N., Côte, F X. (2000). Morpho-histological study of the different constituents of a banana (*Musca AAB*, cv. Grande naine) embryogenic cell suspension. *Plant Cell Report* 19:748-754.

Grapin, A. (1995). Régénération par embryogenèse somatique en milieu liquide et transformation génétique par biolistique de bananiers di et triploïdes. Thèse de Doctorat, Montpellier, 90 p.

Gundlach, H., Muller, M J., Kutchan, T M., Zenk, M H. (1992). Jasmonic acid is a signal transducer in elicitor-induced plant cell cultures. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 89(6), 2389-2393.

Hannachi, S., Khitri D., Benkhalifa A., Brac de la Perriere R.A. (1998). Inventaire variétal de la palmeraie algérienne. Ministère de l'agriculture et de la pêche, Ministère de l'enseignement supérieur et de la recherche scientifique, Ed. CDARS-URZA, Algérie. 225p.

Jahiel, M. (1996). Phénologie d'un arbre Méditerranéen acclimaté en région tropicale : le dattier du sud de Niger et son appropriation par la société Manga, Thèse de doctorat, science biologie et écologie, UM2, INRAN Niger et CIRAD - Flhor, 268p.

Janick J., Paull R. E. (2008). The encyclopedia of fruit and nuts. CABI Publishing Series.

John E Smith. (2004). Biotechnology, Cambridge University press p37-38.

Kada A., Dubost D. (1975). Le bayoud à Ghardaia. *Bull. Agron. Saharienne*, Algérie, 1(13): 29-61.

Lazzeri, P A., Hildebrand, D.F., Collins, G.B. (1987). Sobeian somatic embryogenesis. Effects of nutritional, physical and chemical factors. Plant cell tissue and organ culture 10, 209-220.

Lecheb, F. (2010). Extraction et caractérisation physico-chimique et biologique de la matière grasse du noyau des dattes: essai d'incorporation dans une crème cosmétique de soin. Mémoire de magister, Spécialité Génie alimentaire, Faculté des Sciences de l'Ingénieur, Université, M'Hamed Bougara, Boumerdès.

Louis Mandl. (1857). Anatomie microscopique : Histologie, ou recherches sur les éléments microscopiques de Tissus, des organes et des liquides, dans les animaux adultes et à l'état normal, Baillière, 100 p.

Margara, F. (1989). Bases de multiplication végétative : les méristèmes et l'organogénèse. Ed INRA Paris 262p.

Messar, E.M. (1996). Le secteur phoenicicole algérien: situation et perspectives à l'horizon 2010. Options Méditerranéennes A 28, 23-44.

Mezouane, L. (2012). Contribution à l'étude bibliographique du palmier dattier (*Phoenix dactylifera* L.) Physiologie et écologie. Mémoire de D.E.S Tizi-Ouzou.

Michaux Ferriere, N., Dublin, P., Schwendimann, J. (1987). Etude histologique de l'embryogenèse somatique à partir d'explants foliaires de (*Cofea arabica* L). Café Cacao Thé 31: 103-111.

Muir, W H., Hildebrandt, A C., Ricker, A J. (1958). The preparation,, isolation and growth in culture of single cells from higher plants. Am. J. Bot., & 589-597.

Munier, P. (1973). Le palmier dattier. Paris: Ed. Maison-neuve et Larose, 217 p.

Newton, C., Gonon, T., Uttmann, M. (2006). Un jardin d'oasis d'époque romaine à Ayn Manâwir (Kharga, Egypte) BIFAO, 105p

Ouinten, M. (1995). Le bayoud du palmier dattier, une maladie qui menace la phoeniculture. Phytoma., 469 :36-39.

Ozenda, P. (1958) Flore du Sahara septentrional et central. Ed. CNRS, Paris, 485 p.

Panis, B., N.T. Thinh. (2001). Cryoconservation de matériel génétique de bananier. Guide Technique INIBAP 5 (J.V Escalant et S. Sharrock, eds). Réseau international pour l'amélioration de la banane et de la banane plantain, Montpellier, France. 44pp.

Panis, B., Wauwe, A.W., Swennen, R. (1993). Plant regeneration through direct somatic embryogenesis from protoplasts of banana (*Musa spp.*). *Plant Cell Rep.* 12:403-407.

Pelling, N. (2005). Counsellors in Australia: Profiling the membership of the Australian Counselling Association, *Counselling, Psychotherapy, and Health*, 1(1), 1-18, July 2005.

Pereau Leroy, P. (1958). Le Palmier dattier au Maroc. Min .Agric. Maroc, Service. Rech. Agron. et Inst Français Rech. Fruit Outre Mer, (I.F.A.C), 142 p.

Peyron, G. (2000). Cultiver le palmier-dattier- 110 pages.

Sahnoun, G. (2007). Obtention de protoplastes de palmier dattier de deux cultivars Deglet Nour et Taquarbucheta partir de cals embryogènes. Mémoire de D.E.S Tizi Ouzou.

Sané, D., Aberlenc Bertossi, F., Gassama Dia, Y.K., Sagana, M., Duval, Y., Borgel, A. (2006) Histological analysis of callogenesis and somatic embryogenesis from cell suspensions of date palm (*Phoenix dactylifera* L.). *Annals of Botany* 98:301-308.

Sané, D. (2007). Régénération à partir de suspensions cellulaires embryogènes de cultivars de palmier dattier (*Phoenix dactylifera* L.) pour leur adaptation aux conditions édapho climatiques du Sahel. Thèse de Doctorat, univ Cheik Anta Diop Dakar. 167p.

Sbiai, A. (2011). Matériaux composites à matrice époxyde chargée par des fibres de palmier dattier; effet de l'oxydation au tempo, thèse de doctorat, INSA de Lyon, 2011.

Schmid, J., Keller, E. (1981). Nouvelles possibilités pour l'amélioration et la multiplication des plantes : les cultures de tissus et de cellules. *Revue Suisse Agriculture* 13(6): 265-272.

Schöppner, A., Kindl, H. (1984). Purification and Properties of a Stilbene Synthase from Induced CellSuspension Cultures of Peanut. *Journal of BiologicalChemistry*, 259, 6806-6811.

Sedra My, H. (2003). Le bayoud du palmier dattier en Afrique du nord, FAO, RNE/SNEA - Tunis. Edition FAO sur la protection des plantes. Imprimerie Signes, Tunis, Tunisie, 125p.

Sedra My, H. (2005a). la maladie du Bayoud du palmier dattier en Afrique du Nord: Diagnostic et caractérisation. Actes du symposium International sur le développement Durable des systèmes oasiens du 08 au 10 mars. Erfoud Maroc. B. .

Tengberg, M. (2003a). Research into the origins of date palm domestication. The Date palm: from traditional resource to green wealth. The Emirates Center for Strategic Studies and Research, Abu Dhabi : 33-50.

Tirichine, A., Belguedj, M., Benkhalifa, A., Guerradi, M. (2004). Gestion de la diversité génétique du palmier dattier dans les oasis du Mzab (Algérie) : cas de 03 palmeraies. Revue des régions arides, Numéro spécial:859-868.

Toute, Y. (1998). Genie génétique et biotechnologie , concepts et méthodes . Applications à l'agronomie et aux bio-industrie . Ed DUNOD 209p.

Van Den Houwe, I., Guns, J., Swennen, K. (1998). Bacterial contamination in Musa shoot tip cultures. Acta Horticulturae 490:485-492.

Van der Veen, M. (1992). Crop Husbandry Regimes. An Archaeobotanical Study of Farming in Northern England: 1000 BC - AD 500. Sheffield, JR Collis Publications.

Yasuda, T., F. Yoko., Y. Tadashi (1985). Embryogenic callus induction from coffea Arabica leaf explants by benzyladenine. Plant cell physiol, 26, 3, 395-597.

Zaid, A. (1989) Embryogenèse somatique chez le palmier dattier (phoenix dactylifera L.) Thèse de Doctorat, Université de Paris Sud. Orsay, France.92p.

Zaid, A., De Wet, P.F., Djerbi, M., Oihabi, A. (2002). Diseases and pests of date palms. In Date Palm Cultivation. Zaid A (ed). FAO. Rome-Italy.

ZRYD, J.P. (1988). Culture de cellules, tissus et organes végétaux .Ed .Press.Polytechniques Romandes Suisse 308p.

Annexe 1



Figure 1 : Produits hygiéniques.



Figure 2 : Matériel de repiquage.



Figure 3 : Verrerie utilisée en culture *in vitro*

Annexe 2



Figure 1 : Autoclave.

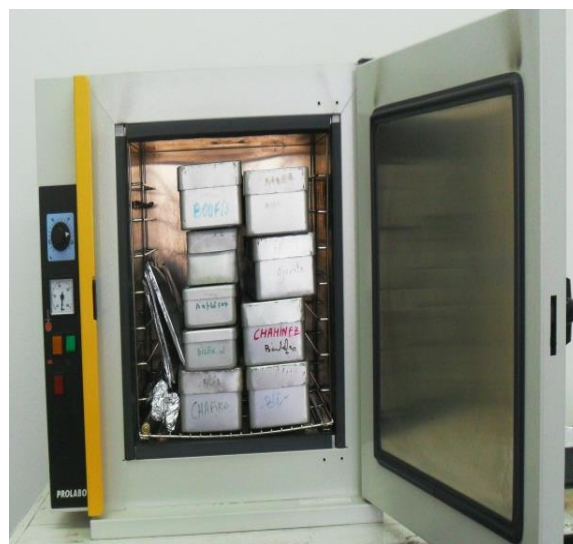


Figure 2 : Etuve.



Figure 3 : Stérilisateur à billes.

Annexe 3

Tableau 1: Milieu solide pour l'induction et la multiplication des cals.

Eléments	MILIEU P _{12,5}	MILIEU M ₁₀₀
Macro MS	40ml	40ml
MICRO MS	10ml	10ml
FER MS	10ml	10ml
KH ₂ P ₀₄	100mg	100mg
NaH ₂ P ₀₄	170mg	170mg
ADENINE	40mg	40mg
CITRATE D'AMMONIUM	200mg	200mg
L- GLUTAMINE	100mg	100mg
CHARBON ACTIF	200mg	3g
PICLORAME	12.5mg	/
IPA	1mg/ml	3mg/ml
SACHAROSE	45g	45g
Agar/Phytigel	7g/2g	7g/2g
THIAMINE	1mg/ml	1mg/ml
MYOINOSITOL	100mg	100mg
2-4-D (méthanol)	/	100mg

Tableau 2 : Milieu liquide pour la suspension cellulaire.

ELEMENTS	QUANTITE
MACRO MS	40ml/L
MICRO MS	10ml/L
FER MS	10ml/L
MYOINOSITOL	100mg/L
ADENINE	40mg/L
L-GLUTAMINE	200mg/L
MnS ₀₄	40mg/L
KH ₂ P ₀₄	100mg/L
NaH ₂ P ₀₄	170mg/L
SACHAROSE	45g/L
PVP	2g/L
THIAMINE	1mg
IPA	1mg
PICLORAM	5mg

Tableau 3 : Les solutions mères pour la confection des MACRO MS.

PRODUITS	Concentration du milieu	(n) fois concentration	Concentration solution mère
KN03	1.9g/l	X25	47.5g
NH ₄ N03	1.65g/l	X25	41.25g
CA CL ₂ 2H ₂ O	0.44g/l	X25	11g
MG S04 7h ₂ o	0.37g/l	X25	9.25g
KH ₂ P04	0.17g/l	X25	4.25g

Tableau 4 : Les composants de la solution mère des MICRO MS.

PRODUITS	Concentration du milieu	(n) fois concentration	Concentration solution mère
H3 B03	6.2mg/l	X100	620mg
MnS04 7H ₂ O	16.9mg/l	X100	1690mg
ZnS04 7H ₂ O	8.6mg/l	X100	860mg
CU S04 5H ₂ O	0.025mg/l	X100	2.5mg
CoCL ₂ 6H ₂ O	0.025mg/l	X100	2.5mg
NAM002 2H ₂ O	0.25mg/l	X100	25mg
KI	0.83mg/l	X100	83mg

Tableau 5 : Les composants de la solution mère du FER MS.

PRODUITS	Concentration du milieu	(n) fois concentration	Concentration solution mère
Na ₂ EDTA	0.03735g/l	X100	3.73g
FE S04 7H ₂ O	0.02785g/l	X100	2.78g

Résumé

L'embryogenèse somatique est largement utilisée pour les études sur le palmier dattier (*Phoenix dactylifera* L.) et cela dans le but de conserver les cultivars appréciés pour leur qualité, leur résistance aux maladies et à l'exploitation de la variation somaclonale.

L'objectif de ce travail est de multiplier les cals, de produire des suspensions cellulaires embryogènes à partir de cals des trois cultivars; Tegaza, Takerbucht et Deglet Nour à partir desquels des protoplastes seront isolés.

Deux milieux de base MS (1962) modifié sont utilisés pour la multiplication de cals embryogènes (M₁₀₀, et P_{12.5}). La callogenèse la plus importante a été observée en présence de 2,4- D et picloram à des concentrations de 100 mg/l et 12.5 mg/l associés de 1 à 3 mg/l d'IPA.

Des cals compacts et friables embryogènes de ces trois cultivars ont été utilisées pour initier les suspensions cellulaires en milieu liquide P₅. En présence de 5 mg/l de picloram et 3 mg/l d'IPA dans le milieu liquide, les suspensions cellulaires prolifèrent rapidement. Après seulement 5 semaines de subculture, la croissance des suspensions cellulaires est estimée par la pesée de poids frais en fonction du nombre de subculture.

Une étude au microscope inversé a permis la distinction des cellules arrondies avec un noyau volumineux qui occupe la majeure partie du cytoplasme, et des cellules allongées et ovale de grande taille avec un rapport noyau cytoplasme important. La viabilité de ces structures cellulaires a été évaluée par Fluorescéine di-acétate (FDA) sur le microscope inversé

En dernier lieu, une étude histologique des cals a été réalisée afin de déterminer les structures tissulaires des cals. L'examen histologique montre que les cals friables naissent à partir des cellules épidermiques et sous épidermique des explants. Les cals compacts naissent à partir des cellules périvasculaires.

Mots clés : Palmier dattier, multiplication, callogenèse, suspensions cellulaires, Fluorescéine di-acétate (FDA), histologie.

Abstract

Somatic embryogenesis is generally used for studies on date palm (*Phoenix dactylifera* L.) in order to maintain the popular cultivars for their quality, resistance to diseases and exploitation of somaclonal variation.

The objective of this work is to amplify callus quantities, to produce embryogenic cell suspensions from three cultivars; Tagaza, Takerbucht and Deglet Nour from which protoplasts are isolated.

Two different media of MS basis (1962) modified are used for multiplication of embryogenic callus (M₁₀₀, and P_{12.5}). The most important callogenesis was observed in presence of 2,4-D and picloram at concentrations of 100 mg/l and 12.5 mg/l with 1 to 3 mg/l of IPA respectively.

Compact and friable embryogenic callus of these three cultivars were used to initiate cell suspension in liquid medium P₅. In the presence 5 mg/l of picloram and 3 mg/l of IPA in the liquid medium, the cell suspensions proliferate rapidly after only five weeks of subculture, the growth of cell suspensions was estimated by weighing fresh according to the number of subculture.

These suspensions showed cellular structures elongated and rounded shape of varying size and viability was evaluated by fluorescein diacetate (FDA) under inverted microscope.

Finally, an histological study of callus was conducted to determine callus tissue structures. Histological assessment showed that the friable callus begins from epidermal cells and in epidermal explants. The compact callus begins from perivascular cells.

Keywords: Date palm, multiplication, callogenesis, cell suspensions, fluorescein diacetate (FDA), histology.