

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE
Ministère de L'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique
Université Mouloud Mammeri de Tizi-Ouzou
Faculté des Sciences Biologiques et des Sciences Agronomiques
Département des Sciences Biologiques



De fin d'étude en vue d'obtention
du diplôme de Master Académique en sciences biologiques
Spécialité : Génétique et amélioration des plantes.

THEME

Contribution à l'isolement et culture de protoplastes à partir de suspensions cellulaires de trois cultivars de Palmier Dattier (Phœnix dactylifera L.) Tegaza, Takerbucht et Deglet Nour.

Présenté et soutenu publiquement le :

Par : **BOUAMRA Lydia**

SAAL Taous

Devant le jury :

Promoteur:	Mme D. YATTA	Chargée de la recherche à l'INRAA
Co-promoteur :	Mme S. YAKOUB-BOUGDAL	Professeur à l'UMMTO
Président de jury :	Mme K. TALEB	M.A.A l'UMMTO
Examineur :	Mme L. LAKABI-AHMANACHE	M.A.A à l'UMMTO
Examineur :	Mme H. BOUAZIZ- YEHIETENE	M.A.A à l'UMMTO

Promotion : 2013/2014

Remerciements

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

Les travaux de recherche présentés dans ce manuscrit ont été réalisés dans le cadre du projet de recherche **PNR4** et la collaboration avec l'AIEA (Agence International de l'Energie Atomique) lancé par la division Biotechnologie et Amélioration des Plantes de l'Institut National de la Recherche Agronomique d'Algérie (INRAA).

Nous tenons vivement à exprimer notre profonde reconnaissance et gratitude à Notre promotrice Madame **D. YATTA**, chargée de recherche et chef de projet, qui a bien voulu, par son aimable bienveillance, diriger ce travail, qui a fait preuve d'une grande patience. Ses conseils, ses orientations ainsi que, ses qualités humaines et ses intérêts portés pour notre sujet de recherche nous ont permis de mener à terme ce travail. Son encadrement était des plus exemplaires.

Nous exprimons également nos remerciements particuliers à Madame **S. YAKOUB BOUGDAL** professeur au département de biologie végétale et Directrice du laboratoire de recherche **PSEMRVC** à l'université MOULOUD MAMMARI 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.A.A à l'université MOULOUD MAMMARI de TIZI-OUZOU pour l'honneur qu'elle nous a fait de présider notre jury.

Nous somme très reconnaissants a Madame **L. LAKABI AHMANACHE** et Madame à **H. BOUAZIZ YEHEITENE** M.A.A à l'université MOULOUD MAMMARI de TIZI-OUZOU qui, malgré leurs nombreuses obligations ont accepté de juger ce travail. Qu'elles 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'INRAA pour leur sympathie et leur gentillesse. Nous avons passé vraiment un séjour inoubliable au sein de ce laboratoire.

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

Dédicace

A mes chers parents qui m'ont beaucoup aidé pour accomplir mon travail, et qui ont veillé pour que je mène à bien mes études, Tout ce que je dis n'est qu'une

petite goutte dans l'océan que sont leur amour et bienveillance

J'espère avoir réalisé une partie de leurs rêves

A mon frère « Abdeslam » et ma petite sœur « Mylissa » qui sont tous le temps-là pour moi

A mon très cher ami « Md Amine » qui à force de croire en moi,

J'ai cru en moi-même

A tous mes amis de la Team Basket « Ninjas de biologie »

Et ma chère amie et Binôme Taous

Lydia

Dédicace

Rien n'est aussi beau à offrir que le fruit d'un labeur qu'on dédie du fond du
Cœur à ceux

Que j'aime infiniment

A ma chère mère, mon cher père sans eux je n'aurais pas abouti à ce stade
d'étude, que Dieu puisse m'aider à les honorer, les servir et les combler

A mon frère Hocine et mes deux sœurs Kenza et Hanane qui sont mes bons
compagnons

A mes très chers amis Merzouk et Sonia pour leur soutien

A ma copine et mon binôme Lydia

A tous les personnes qui de près et de loin m'ont apporté leur aide

Tous

2,4-D : Acide 2,4-Dichlorophenoxyacetique

DN : Deglet-Nour

FAO : Food and Agriculture Organisation

INPV : Institut National de la Protection des Végétaux

INRAA : Institut National de Recherche Agronomique d'Algérie

IPA : Diméthylallylamino-purine

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

MS : Murachige et skoog (1962)

P_{12.5} : Milieu liquide contenant 12.5mg/l de picloram

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

pH : Potentiel d'hydrogène

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

TGZ : Tegaza

TKB : Takerbucht

Liste des figures

N°	Titre de la figure	Page
Figure 01	Répartition de la distribution des différentes espèces du genre <i>Phoenix</i> dans le monde (Barrow, 1998 ; Henderson, 2009).	02
Figure 02	Représentation schématique du palmier dattier (MUNIER, 1973).	10
Figure 03	Inflorescences femelle (a) et mâle (b) du palmier-dattier (Bezato, 2013).	13
Figure 04	(a)- Premiers symptômes du Bayoud (b)- Stade final de la maladie.	15
Figure 05	Repiquage des cals sous la hotte à flux laminaire.	30
Figure 06	Distribution et stérilisation du milieu de culture.	32
Figure 07	Les différentes étapes de la suspension cellulaire.	32
Figure 08	Stérilisation des solutions enzymatiques sous la hotte à l'aide d'une pompe millipore (0,22µm).	35
Figure 09	Les différentes étapes de la macération enzymatique.	36
Figure 10	Les différentes étapes de la purification.	37
Figure 11	Etapes de la fusion avec le PEG	39
Figure 12	Etablissement de la suspension cellulaire (a), (b) Mise en culture de cal en milieu liquide agité, (c) suspension cellulaire, (d) microcals de classe I.	41
Figure 13	Courbe de croissance de la suspension cellulaire de cultivar Tegaza, Takerbucht et Deglet-Nour.	43
Figure 14	Type de cellules retrouvées dans la suspension cellulaire (GX40).	44
Figure 15	Differents Types de cellules colorées par la Fluorescéine Di Acétate (FDA) avec le microscope inversé (G×40).	45
Figure 16	Suspension de protoplastes chez les cultivars Deglet-Nour, Takerboucht et Tegaza (Gx40).	51
Figure 17	Cal issu de la culture de protoplastes sur couche nourrice.	52
Figure 18	Fusion de protoplastes chez le palmier dattier.	53

Liste des Tableaux

N°	Titre des tableaux	Page
Tableau 01	Le nombre de palmiers dattiers en Algérie. (FAOSTAT, 2012).	03
Tableau 02	Les principaux travaux de culture in vitro (embryogenèse somatique) sur le palmier dattier.	21
Tableau 03	origine et nature du matériel végétale	33
Tableau 04	Composition des solutions enzymatiques testées (mg/l qsp 100ml)	35
Tableau 05	Différentes étapes appliquées tout au long de la période de culture et prolifération des cals.	40
Tableau 06	Variation du poids frais des suspensions cellulaires en fonction du repiquage.	42
Tableau 07	Influence du génotype, du matériel de base et de la solution enzymatique sur le rendement en protoplastes ($\times 10^5$) chez Deglet-Nour, Takerbucht et Tegaza.	49

INTRODUCTION
CHAPITRE I : DONNEES BIBLIOGRAPHIQUE

1. Origine et répartition géographique	1
1.1 Origine.....	1
1.2. Répartition géographique dans le monde	2
1.3. Répartition géographique en Algérie	3
2. Importance socio-économique	5
3. Importance écologique.....	5
4. Taxonomie du palmier dattier	6
4.1. Position systématique.....	6
• Classification de MUNIER 1973.	7
• Classification de CRONQUIST 1981.	7
• Classification phylogénétique 2009.	7
4.2. Diversité Variétale	8
4.2.1 Genre <i>Phoenix</i>	8
4.2.2. Espèce <i>Phoenix dactylifera</i> L	8
5. Morphologie du Palmier Dattier	10
5.1. Appareil Végétatif.....	10
5.1.1. Le système racinaire.....	10
5.1.2. Le stipe	11
5.1.3. Le rejet.....	11
5.1.4. Les gourmands	11
5.1.5. Les palmes	12

5.2. L'appareil reproducteur	12
5.2.1. Organes floraux	12
5.2.2. Le fruit	13
6. Le Bayoud	13
7. Mode de multiplication Palmier Dattier	16
7.1. Multiplication par semis	16
7.2. Multiplication par rejet	16
7.3. Multiplication in vitro	17
7.3.1. L'organogenèse	19
7.3.2. Embryogenèse somatique	19
7.3.2.1. Variation Somaclonale	22
8. Culture de cellules et de protoplastes.....	23
8.1. Suspension cellulaire.....	23
8.2. Culture de protoplastes.....	25
8.3. Isolement de protoplastes	26
8.4. Fusion de protoplastes.....	28
8.4.1. Méthode chimique.....	29
8.4.2. Méthode électrique.....	29

CHAPITRE II : MATERIEL ET METHODES

1. Méthodologie.....	30
1.1. Entretien et condition de culture.....	30
1.2. Protocole expérimental.....	31
1.2.1 Stérilisation du matériel de culture	31

1.2.2. Préparation des milieux de culture (M_{100} , $P_{12,5}$, P_5).....	31
• Les éléments minéraux	31
• Les éléments organiques.....	31
• Les régulateurs de croissance.....	32
• Agent gélifiant.....	32
1.2.3. Stérilisation du milieu de culture (M_{100} , $P_{12,5}$, P_5).....	32
2. Initiation des suspensions cellulaires	33
2.1. Matériel végétal	33
2.2. Protocole expérimental.....	33
2.2.1. Préparation de milieu de culture liquide.....	33
2.2.2. Conditions de culture.....	33
3. Isolement des protoplastes	34
3.1. Matériel végétal	34
3.2. Protocole expérimental.....	34
3.2.1. Préparation de la solution de la macération.....	34
3.2.2. Macération enzymatique.....	34
3.2.3 Purification des protoplastes.....	35
5. Culture des protoplastes	36
6. Fusion des protoplastes	38

CHAPITRE III : RESULTATS ET DISCUSSION

1. Résultat des suspensions cellulaires.....	40
1.1. Production des suspensions cellulaires	40
1.1.1. Etablissement et évolution des cultures.....	40

1.1.3. Les observations microscopiques.....	43
1.1.4. Mesure de la viabilité par la coloration (FDA).....	44
2. Discussion.....	45
2. Résultat de l'isolement des protoplastes.....	47
2.1. Source du matériel végétal	47
2.2. Effet de la solution enzymatique.....	47
2.3. Effet des conditions d'incubation	48
2.3.1. Effet de l'agitation.....	48
2.3.2 Effet de temps d'incubation.....	48
2.4. Variation du rendement des protoplastes	49
2.5. Purification	50
2.6. Observation des protoplastes.....	50
2.7. Culture de protoplastes.....	51
2.8. Fusion de protoplastes.....	52
3. Discussion.....	54

CONCLUSION**REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES****ANNEXES****RESUME**

Introduction

Le palmier dattier (*Phoenix dactylifera* L.) fait partie des premières espèces fruitières cultivées dont la culture existe depuis la plus haute antiquité (Munier, 1973 ; Denis, 2013). C'est un arbre d'un grand intérêt non seulement par sa productivité élevée et la qualité de ses fruits très recherchés, mais également grâce à ses facultés d'adaptation aux régions sahariennes, où il permet de créer, au milieu du désert des oasis à méso-climat favorables à la culture de plusieurs espèces arboricoles, céréalières, fourragères et maraichères, qui lui sont associées chaque fois que les disponibilités en eau le permettent.

En Algérie cet écosystème oasien est affecté en premier lieu par l'érosion génétique suivie par la pression démographique, la désertification, la salinisation, et le vieillissement des palmeraies (Bouguedoura et al., 2008).

Le dattier présente une importance économique considérable dans les pays arabes et ceux du Maghreb, en particulier en Algérie et en Tunisie qui possèdent les plantations de la meilleure variété mondiale « Deglet Nour ».

Le monde arabo-musulman constitue 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 ; Yatta and Bougdoura, 2013).

La culture du palmier dattier est sujette à divers problèmes phytosanitaires qui entravent son développement et son extension. Le Bayoud : fusariose vasculaire causée par *Fusarium oxysporum* fsp *albedinis* (Killian et Maire 1930), est la maladie la plus destructive et la plus menaçante dans l'Afrique du nord. Elle est répandue surtout au Maroc et dans une grande partie des palmeraies de l'Algérie (Pereau Leroy, 1958 ; Djerbi, 1982 ; Brac et Benkhalifa, 1991). En effet, au cours d'un siècle, elle a détruit plus de dix millions de palmiers au Maroc (Sedra, 2005) et trois millions en Algérie (Djerbi, 1982 ; Sedra, 2005).

Depuis que cette maladie fut connue, toutes les recherches ont été axées sur la lutte contre la fusariose afin de protéger cette plante et d'assurer son développement normal : pratiques culturales, techniques de luttés biologiques, chimiques ou intégrées. Ces méthodes ne feront que ralentir la maladie mais ne pourrons jamais l'arrêter (Djebri, 1988), en plus certaines sont non seulement coûteuses mais risquent d'engendrer des problèmes environnementaux.

La lutte génétique, qui consiste en l'utilisation de variétés résistantes reste le moyen de lutte le moins astreignant, le plus économique et le moins polluant (Messiaen, 1981). Par ailleurs l'utilisation de l'outil biotechnologique fondé sur les techniques de culture *in vitro* constitue sans doute le moyen le plus prometteur pour la reconstitution des palmerais dévastés via une multiplication massive du palmier dattier. Le principal intérêt de la multiplication *in vitro* du palmier dattier est de répondre aux besoins en plants beaucoup plus rapidement que par le recours aux rejets (Ferry, 2008). La culture *in vitro* permet donc, soit la multiplication conforme, soit la

création de variétés nouvelles (Yakoub-Bougdal, 1987; Bouguedoura, 1991 ; Yakoub-Bougdal, 2005 ; Yatta, 2007).

Notre travail s'inscrit dans le cadre d'un projet de recherche de la division du palmier dattier de l'Institut National de la Recherche Agronomique d'Alger (INRA-A) qui a pour objectif l'amélioration génétique du Palmier Dattier par voie biotechnologique.

La production de plantules in vitro par fusion de protoplaste issus de trois cultivars Tegaza, Takerbucht, et Deglet Nour, pourrait résoudre le problème posé, il serait donc intéressant d'obtenir des palmiers résistants au bayoud, avec une bonne qualité dattière.

Ainsi notre travail comporte les parties suivantes :

- L'établissement de la suspension cellulaire à partir des cals embryogènes de trois cultivars (Deglet Nour, Tegaza, Tkarbouchet)
- Isolement des protoplastes.

*Données
bibliographiques*

1. Origine et répartition géographique

1.1 Origine

Le palmier dattier a une origine ancienne. Il est connu depuis l'antiquité : considéré par les égyptiens comme un symbole de fertilité, il est représenté par les carthaginois sur les pièces de monnaies et monuments, et utilisé par les grecs et latins comme ornements lors de célébrations triomphales (Ouennoughi, 2005).

Les fossiles de palmiers à feuilles pennées ne remontent qu'au début du tertiaire. Ces palmiers ont été rattachés par Brondniart au genre *Phoenicites*, qui peut être considéré comme l'ancêtre de genre *phoenix* actuel. C'est dans la roche datée du Miocène inférieur, qu'ont été trouvés les premiers vestiges du palmier fossile qui peuvent être considérés réellement, comme l'ancêtre du dattier. Il fut décrit sous le nom de *Phoenix pallavicinii*. Au début de quaternaire un fossile a été trouvé dans le dépôt de pléistocène et a été décrit sous le nom *Phoenix dactylifera* (Munier, 1973).

Le dattier (*Phoenix dactylifera* L.) est exploité puis cultivé depuis plusieurs millénaires au Moyen-Orient et dans le nord de l'Afrique (Barrow, 1998 ; Zohary *et al.*, 2012). Inférer la distribution naturelle peut se faire sur la base de restes végétaux antérieurs à la domestication et à la diffusion de la culture. Il est généralement admis qu'elle se trouve au Moyen-Orient (Zohary *et al.* 2012). Il s'agit d'une plante pérenne dioïque, dont les pieds femelles sont pollinisées à la main en culture. C'est « l'arbre » emblématique des régions arides et semi-arides de l'Ancien Monde.

L'hypothèse prépondérante sur l'origine du dattier est aujourd'hui celle d'une origine située autour du golfe Persique suivie d'une diffusion à travers le nord de l'Afrique jusqu'au Sud de l'Espagne et vers l'Est pour atteindre la vallée de l'Indus et le Nord-Ouest de l'Inde. Plusieurs espèces de *Phoenix* se trouvent dans les zones de culture du dattier (Henderson, 2009) (Figure 1). Bien qu'elles ne soient pas des progénitures sauvages, il n'est pas exclu qu'elles aient contribué à l'amélioration variétale du dattier par le biais de l'hybridation interspécifique, c'est-à-dire via l'introggression intentionnelle ou fortuite du dattier cultivé par des gènes d'une autre espèce affine (Gros et Balthazard, 2013).

L'origine du Palmier Dattier en Algérie, vient de la « péninsule arabique » ; à travers les commerçants qui ont propagé le Palmier autour de la Méditerranée, il était introduit spécialement dans les lieux disposants d'eau dans le Sahara (Toutain, 1967). C'est ainsi que sont apparues les premières palmeraies de Oued Righ et des Ziban par le biais des bédouins nomades arabes, venus d'Orient, pour le commerce (Jaradat, 2011).

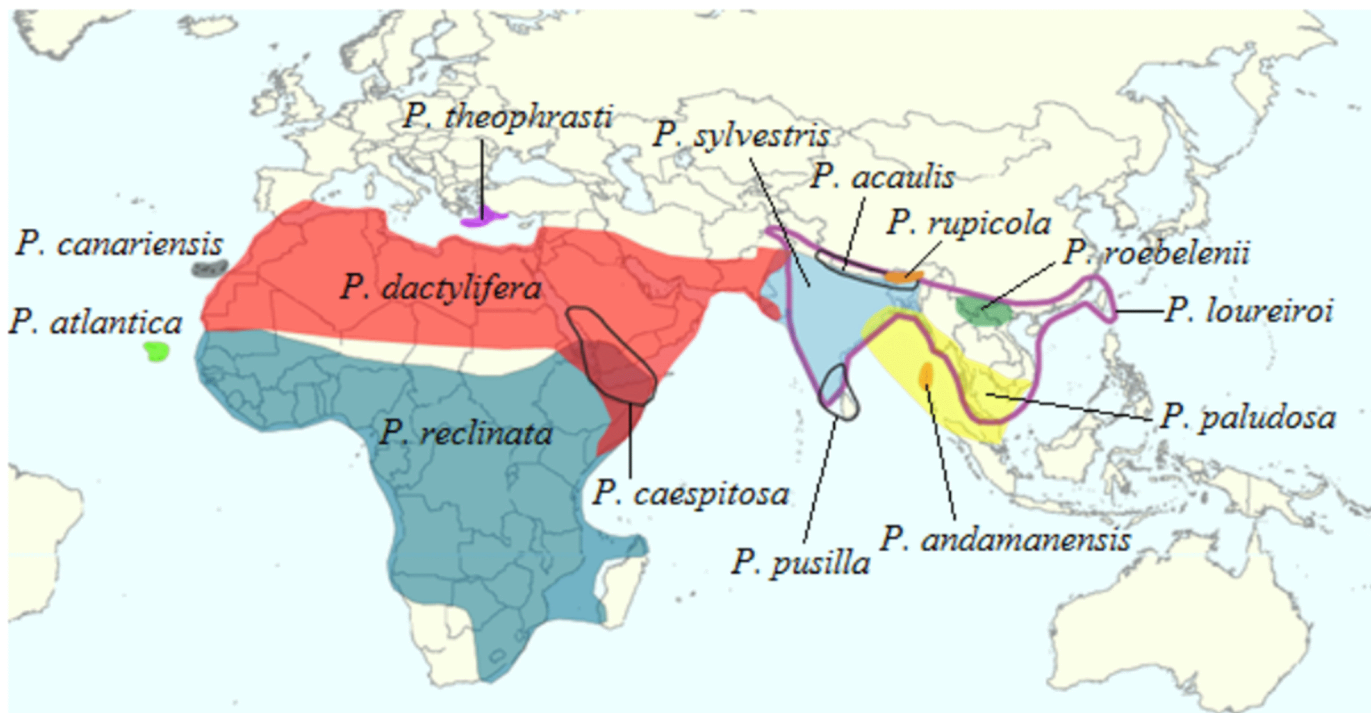


Figure 1 : Répartition de la distribution des différentes espèces du genre *Phoenix* dans le monde (Barrow, 1998 ; Henderson, 2009).

1.2. Répartition géographique dans le monde

L'aire de culture traditionnelle ou historique du palmier dattier potentielle se trouve dans les zones arides et semi arides chaudes de l'Ancien Monde, à une latitude comprise entre 15°N et 35°N (Figure1) (Zohary et al. 2012). L'Espagne reste le seul pays d'Europe à produire des dattes principalement dans la célèbre palmeraie d'Elche, située à l'Ouest d'Alicante à 39° Nord. Le palmier dattier est également cultivé à plus faible échelle au Mexique, en Argentine, en Australie (Matallah, 2004), 'ainsi qu'au Niger (Jahiel, 1996).

Aux Etats-Unis d'Amérique, le palmier dattier fut introduit au *XVIII^{ème}* siècle mais sa culture n'a débuté réellement que vers les années 1900 avec l'importation des variétés algériennes, en particulier Deglet Nour, et des variétés Irakiennes (Hilgeman, 1972 ; Bouguedoura, 1991 ; Matallah, 2004).

1.3. Répartition géographique en Algérie

Le Palmier dattier constitue une particularité écologique et agronomique très importante pour les régions du Sud Algérien, où les autres cultures sont difficiles à pratiquer en absence de cette arbre. Il est une source fondamentale pour l'alimentation des populations oasiennes (Djouab, 2007).

Le Palmier dattier en Algérie est cultivé au niveau de 17 wilayas seulement, pour une superficie de 170000 hectares (FAOSTAT; 2012). Cependant 04 principales wilayas représentent 83,6% du patrimoine phoenicicole national : Biskra 23%, Adrar 22%, El-oued 21% et Ouargla 15%.

Ce tableau montre que sur un nombre de 13.50 millions de plantes cultivées, 69,4% sont productives.

Tableau 1: Le nombre de palmiers dattiers en Algérie. (FAOSTAT, 2012).

Wilayas	Deglet Nour (dattes finies)	Ghars et analogue (dattes molles)	Deglat Beida et analogues (dattes sèches)	Total Palmier dattier	Nombres de palmier
Adrar	0	0	2 150 904	2 904 150	2 860 071
Laghouat	87 470	7 650	11 580	27 700	12 580
Batna	700	3 900	21 270	25 870	25 330
Biskra	1 964 640	436 530	748 200	3 149 190	5 802 012
Bechar	5 650	0	0	770 030	360 150
Tamanras	2 940	0	0	417 140	167 760
Tebessa	49 550	49 550	10 650	68 970	25 200
Djelfa	2 610	860	210	03 680	1 610
M'sila	0	0	18 000	018 000	14 000
Ouargla	1 092 330	783 850	193 130	2 310 069	1 130 667
Illizi	2 250	16 340	73 030	91 620	49 930
Tindouf	350	24 340	0	24 600	3 200
El- Oued	1 884 030	703 330	296 300	2 660 883	2 580 238
Khenchla	21 290	44 800	7 370	73 460	51 040
Naâma	0	19 600	2 600	22 200	15 250
Ghardaia	377 100	154 400	378 900	910 400	631 600
El- Bayadh	0	45 900	0	193 130	22 500
Total	3 559 930	1 660 761	4 048 710	1 350 588	9 300 330

2. Importance socio-économique

Le Sahara représente 90% de la superficie d'Algérie. Le secteur palmier dattier joue un rôle très important dans les oasis des régions désertiques tant sur le plan socio-économique que sur le plan écologique. En conséquence, il est en quelque sorte l'axe principal de l'agriculture et assure la principale ressource financière des oasiens. En effet les dattes ont représenté un fruit providentiel pour l'alimentation aussi bien humaine qu'animal. Leur succès sur une aussi longue période s'explique par les qualités nutritionnelles de ces fruits particulièrement riches en sucre et en minéraux (Benchelah et Maka, 2008). Plusieurs produits sont confectionnés à base de dattes telles que la farine, le sucre, la confiture, le vinaigre et l'alcool...

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). Les matières grasses des noyaux ont été testés pour l'activité bactérienne contre certaines bactéries pathogènes à gram négative et à gram positive (Metaoui et *al.*, 2013).

Les palmes (sèches ou vertes) sont utilisées pour la confection des corbeilles, ou comme palissades pour la délimitation des concessions. Pour lutter contre l'ensablement des cuvettes des phoeniculteurs utilisent les palmes pour la réalisation de brises vent dans les zones menacées (El Oued).

Aujourd'hui, le potentiel phoenicicole est évalué à plus de 18 millions de palmiers dattiers sur une superficie de plus de 150 000 ha, assurant une production annuelle qui dépasse les 7 millions de quintaux, sans oublier les produits dérivés du palmier qui contribuent également au développement de l'économie (INPV, 2014).

3. Importance écologique

Dans le Sahara Algérien, les écosystèmes oasiens englobent une multitude de formes de vies animales et végétales indispensables pour le maintien et la survie des populations dont le palmier dattier (*Phoenix dactylifera* L.) qui est une espèce arborescente connue pour son

adaptation aux conditions climatiques très sévères des régions chaudes et sèches (Ghazi et Sahraoui, 2005).

L'importance qu'occupe le palmier dattier dans la société est dû au rôle que joue cette plante dans le système oasien, elle favorise le développement d'un microclimat propice à la culture d'arbres fruitiers, maraichère, fourragère et céréalière. Le palmier dattier constitue ainsi, le pilier sur lequel repose tout le système oasien.

Le système de production phoenicole permet de conserver les vallées en tant qu'espace vivable pour les êtres humains et pour les animaux grâce à la capacité du palmier de créer un ombrage et de protéger le sol d'un très fort ensoleillement.

4. Taxonomie du palmier dattier

4.1. Position systématique

Le genre *Phoenix* appartient à la famille des *Arecaceae* (anciennement, *Palmaceae*) comprend environ 2500 espèces (Dransfield et al., 2008). Le Palmier Dattier est une espèce appartenant au genre *Phoenix* qui comprend douze (12) espèces botaniques selon (Munier, 1973) et (Moore, 1973). Sa position systématique était donnée comme suit :

Le palmier dattier a été dénommé *Phoenix dactylifera* par Linné en 1734 (Munier, 1973). Le terme *Phoenix* proviendrait de *phoinix*, nom du dattier chez les Grecs de l'Antiquité qui le considéraient comme l'arbre des Phéniciens (Munier, 1973 ; Linné, 1753). Le terme *dactylifera* L. fait référence au doigt, *dactylus* en latin, dérivant de *dachel* en hébreu, (Popenoe, 1938) en raison de la forme des fruits et à *fero*, « qui porte » en latin.

La classification botanique du palmier dattier d'après Munier (1973), Cronquist (1981) et L'APG III.:

• **Classification de MUNIER 1973**

Embranchement	Phanérogame.
Sous-embranchement	Angiosperme.
Classe	Monocotylédones.
Groupe	Phoenocoides.
Famille	Arecaceae.
Sous-famille	Coryphoideae.
Genre	<i>Phoenix</i> .
Espèce	<i>Phoenix dactylifera L.</i>

• **Classification de CRONQUIST 1981**

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

• **Classification phylogénétique 2009**

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

4.2. Diversité Variétale

4.2.1 Genre *Phoenix*

Le Palmier dattier, bien que souvent considéré comme un arbre, est une monocotylédone arborescente de la famille des Arecaceae (Palmae). Le genre *Phoenix* comprend 14 espèces réparties dans les régions tropicales et subtropicales de l’Ancien Monde (Figure 1) (Barrow, 1998 ; Govaerts and Dransfield, 2005 ; Henderson, 2009). Le dattier est la seule espèce du genre à être cultivée pour ses fruits. *Phoenix sylvestris* est cultivé pour sa sève transformée en sirop ou sucre (Chowdhury *et al.*, 2008 ; Newton *et al.*, 2013) et d’autres espèces sont cultivées par l’industrie horticole (notamment *P. canariensis* et *P. roebelenii*) ; toutes les autres sont exploitées pour l’alimentation humaine et animale et la construction (Barrow, 1998).

Les espèces du genre *Phoenix* sont proches morphologiquement, parfois difficiles à distinguer (Pintaud *et al.*, 2010). Par exemple, il existe peu de caractères permettant de différencier *P. dactylifera* de *P. theophrasti* (Barrow 1998) et de *P. atlantica* (Henderson *et al.*, 2006). Il n’existe pas ou peu de barrières reproductives entre les espèces, leur intégrité ayant été maintenue par isolation géographique ou écologique. Le genre *Phoenix* forme donc un complexe d’espèces qui peuvent s’hybrider entre elles comme c’est souvent le cas chez les arbres fruitiers le cerisier (Tavaud, 2004, amandier ; Kester, 1991). En culture, la plupart des hybrides existent. Dans les zones de sympatrie, il existe également des hybrides interspécifiques (Munier, 1973). Le dattier s’hybride en effet avec *P. sylvestris* en Inde et au Pakistan, avec *P. reclinata* au Sénégal (Munier, 1973) et avec *P. canariensis* dans les îles Canaries (González et Pérez, 2004). Cependant, ces zones de sympatrie ne sont peut-être pas naturelles, mais plutôt anthropiques du fait de la diffusion du dattier en dehors de son aire de distribution originelle. Ainsi, on ne sait en fait que peu de choses sur l’hybridation interspécifique dans les zones de sympatrie naturelle (Gros et Balthazard, 2013).

4.2.2. Espèce *Phoenix dactylifera* L

Le Palmier dattier est une espèce hybride en effet, ce que l’on appelle variétés ne sont en réalité que des races non fixées ou phénotypes (Munier, 1973). Plusieurs définitions ont été abordées sur la notion variété. Selon Bouguedoura (1991), la notion de variété repose

essentiellement sur les caractéristiques du fruit, le concept ne peut s'appliquer qu'aux individus femelles puisqu'ils sont les seuls à en produire.

Par contre Toutain (1972), définit le palmier comme une espèce dioïque comportant des sujets mâles et femelles ne se reproduisant pas fidèlement par graine ; les semis de noyaux donnent des sujets femelles, les qualités du fruit, principalement, caractérisant la variété, par contre le mâle ne portant pas de fruit, sa classification variétale est impossible. Par ailleurs, Gaunand et Ndjondo (2009) ont défini la variété, comme la subdivision naturelle d'une espèce avec des caractères morphologiques distincts sélectionnés sur la base de l'homogénéité phénotypique (Absi, 2013).

Les travaux d'inventaire variétal, réalisés sur 70 zones auprès 14 régions, ont montré que les palmeraies algériennes conservent encore une diversité importante (Douani et Khengaoui, 2007 in Absi, 2013).

Les variétés les plus importantes, sur le plan économique, sont :

A l'Est la variété « Deglet Nour » dont la qualité des dattes dépasse les frontières. D'autres variétés dites communes sont de moindres importances « Ghars », « Degla Beida » et « Méch-Degla » (Absi, 2013).

A l'Ouest la variété « Takkerbucht », est la plus résistante à la fusariose de dattier ou bayoud. A côté des cultivars femelles reconnus, il existe de nombreux francs issus de semis. On leur donne le nom de khalt (mélange), Sair ou Dgouls selon la zone phoenicicole (Bousdira, 2007 in Absi 2013).

5. Morphologie palmier Dattier

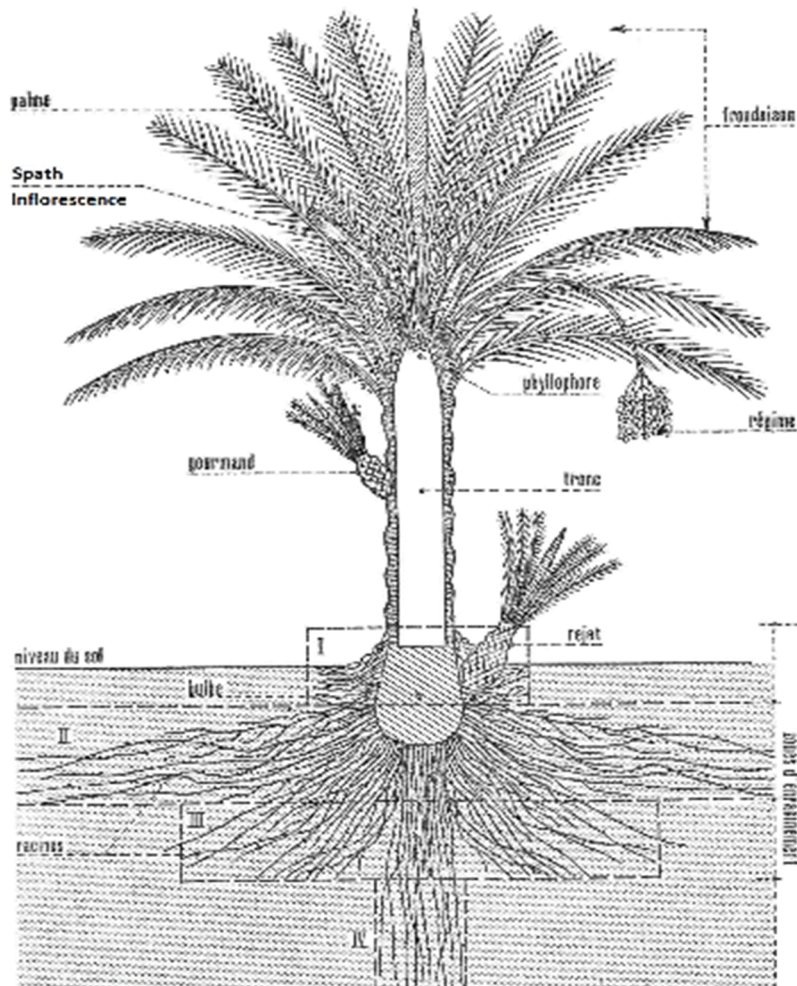


Figure 2 : Représentation schématique du palmier dattier (Munier, 1973).

5.1. Appareil Végétatif

5.1.1. Système racinaire

Le système racinaire du dattier fasciculé (Figure 2), les racines ne se ramifient pas et n'ont relativement que peu de radicelles. Le bulbe, ou plateau racinal, est volumineux et émerge en partie au-dessus du niveau du sol (Munier, 1973). Selon Djerbi (1994), le système racinaire du palmier dattier présente, en fonction de leur diamètre, trois types de racines :

Racines de 1er ordre : ont un diamètre entre 7 et 12.5mm.

Racines de 2eme ordre : la moyenne de leur diamètre est de 3.5mm.

Racines de 3eme ordre : leur diamètre est de quelques dixièmes de millimètres à 1.5mm.

Mais, selon Peyron (2000), les racines du palmier dattier sont divisés en quatre zones selon la profondeur :

Zone 1 : Racine respiratoire (0-20cm). -

Zone 2 : Racine de nutrition (20-100cm). -

Zone 3: Racine d'absorption, qui peut atteindre une grande profondeur de 1 à 2 mètres. -

Zone4 : Racine du faisceau pivotant qui va au-delà de 2 mètres.

5.1.2. Le stipe

Le tronc cylindrique appelé stipe est vertical de longueur variable, pouvant atteindre 30m de haut .Il est composé de paquets vasculaires durs et fibreux cimentés ensemble dans une matrice de tissu cellulaire qui est beaucoup plus lignifié près de la partie externe du tronc, sa circonférence moyenne est comprise entre 1 et 1.10 m (Zaid et *al.*, 2002).

5.1.3. Le rejet

Le rejet est une jeune pousse du végétal, qu'il est possible de planter pour obtenir un nouveau palmier conforme au plant mère. Celui-ci sera choisi par l'homme parmi une sélection des meilleurs palmiers (Sbiaia ,2011 in Berrichi, Azzoug, 2014).

5.1.4. Les gourmands

Un gourmand est une branche secondaire qui se développe sur la branche principale d'une plante. Il faut généralement les supprimer car comme leur nom l'indique, ils sont gourmands et épuisent inutilement la plante.

5.1.5. Les palmes

Ce sont des feuilles composées pennées. Les folioles sont régulièrement disposées en position oblique le long du rachis, les segments inférieurs sont transformés en épines. En général, les premières folioles situées au-dessus des épines sont plus longues que celles situées à l'extrémité supérieure de la palme. A l'extrémité inférieure de la palme, le rachis s'élargit pour former le pétiole s'insérant directement sur le tronc. Les palmes sont issus du bourgeon terminal chaque année, les palmes en apparaissent de 10 à 20 jusqu'à 30 palmes. Un palmier adulte, en bon état de végétation, peut avoir de 100 à 125 palmes (Munier, 1973). Selon Djerbi (1994). Ce nombre peut arriver jusqu'à 150 palmes. Durant la vie du palmier dattier, on divise les feuilles en trois types : feuilles juvéniles, semi juvéniles et adultes (Bouguedoura, 1991).

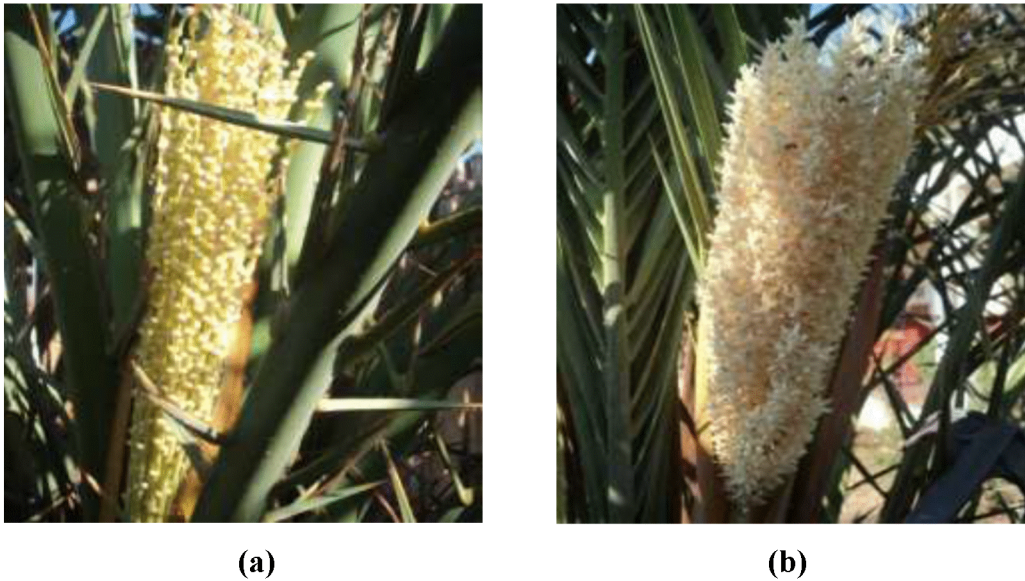
5.2. Appareil reproducteur

5.2.1. Organes floraux

Le palmier dattier étant dioïque, les fleurs mâles et femelles sont portées par des individus différents, il est nécessaire d'attendre 6 à 8 ans l'induction des premières floraisons pour connaître le sexe des plantes (Aberlenc-Bertossi, 2012). La différenciation morphologique entre ces organes est extrêmement précoce puisque celle-ci est déjà marquée lorsque l'inflorescence ne mesure que 10 mm de longueur, avant même que n'intervienne la différenciation sexuelle des fleurs (Daher, 2010). La différence entre pieds mâles et femelles pourrait être remarquée morphologiquement.

L'inflorescence femelle présente une élongation marquée du pédoncule ainsi qu'une bilatéralisation. L'inflorescence et les épillet sont plus longs. (Figure 3).

L'inflorescence mâle a une forme conique (Figure 3) et le nombre de méristèmes floraux est plus élevé sur les épillets.



Figures 3 : Inflorescences femelle (a) et mâle (b) du palmier-dattier (Bezato, 2013).

5.2.2. Le fruit

Ce sont des baies à une seule graine « noyau ». Il est constitué d'un mésocarpe épais et charnu recouvert d'un épicarpe très fin. Après fécondation un seul carpelle se développe pour donner le fruit. Ce dernier appelé dattes est une barre à baie à une seule graine « Noyau ». La maturation est longue, elle débute vers les mois de mars-avril, tandis que la récolte commence en octobre, dans le nord du Sahara. Dans les oasis du Sahara central on cueille les premières dattes, dès le mois d'aout, et même en juillet. (Benchelah et Maka, 2006).

6. Bayoud

Le palmier dattier (*Phoenix dactylifera L.*), malgré sa résistance à tous les facteurs abiotiques, est menacé par la fusariose vasculaire (le Bayoud), une maladie cryptogamique causée par le champignon tellurique *Fusarium oxysporum* f. sp. *Albedinis* (Killian et Maire, 1930). Cette maladie existe depuis plus d'un siècle en Afrique du nord, elle est apparue avant 1870 dans la Draa, une grande palmeraie qui s'étend sur 300 km dans le sud du Maroc. Les données épidémiologiques (Toutain, 1965) montrent de nouvelles occurrences de la maladie tant dans les parties occidentales et orientales du Maroc quelques années plus tard, l'oasis occidentale de l'Algérie a été atteinte dès 1898 (Tantaoui et *al.*, 1996). Elle a détruit plus de

12 millions de palmiers au Maroc, parmi les variétés les plus nobles de bonne qualité dattière destinées essentiellement à la commercialisation (Tantaoui et Fernandez, 1993). En Algérie, elle a ravagé 3 millions d'individus (Djerbi, 1998) et se propage d'Ouest à l'Est d'une façon inexorable. Ce fléau épidémique continue toujours de sévir et touche 4% à 8% de la population phoenicicole (Djerbi, 1982 ; Djerbi et *al.*, 1985 ; Hakkou et Bouakka, 2004).

Les palmeraies de l'Est Algérien et de la Tunisie se trouvent aujourd'hui menacées d'autant plus que ce sont les centres de production de la Deglet Nour (Idder-Ighlil et *al.*, 2013).

Un des premiers symptômes externes typiques d'une attaque de Bayoud est un dessèchement et un blanchiment unilatéral d'une ou plusieurs palmes (Figure 4 a), (folioles et rachis) au niveau de la couronne moyenne du palmier. Ce symptôme est à l'origine du nom de la maladie, Bayoud dérivant du mot arabe abyed qui veut dire blanc, et de la 'forme spéciale du *Fusarium oxysporum* qui en est responsable, *albedinis*, tiré du latin albus (blanc). Le dessèchement se généralise ensuite à toute la palme qui prend un aspect typique de « plume mouillée » et s'incline vers le stipe. Les mêmes symptômes apparaissent ensuite sur les palmes voisines, puis l'attaque se généralise à l'ensemble du palmier qui dépérit rapidement (Figure 4 b). Mais les symptômes ne sont pas toujours aussi typiques et il est déjà arrivé de confondre une attaque de Bayoud avec un dessèchement dû à un stress hydrique. Il faut donc procéder à l'examen approfondi des plants malades pour localiser et identifier le parasite.



Figure 4 : Les ravages du Bayoud sur le palmier dattier

(a) - Premiers symptômes du Bayoud.

(b)- Stade final de la maladie.

L'agent responsable est le *Fusarium oxysporum* f.sp *albedinis*, champignon imparfait. Il se trouve dans le sol et fait partie de la mycoflore. Il pénètre dans la plante et migre dans les vaisseaux libéro-ligneux. Il se maintient très longtemps dans les palmiers bayoudés, même morts. Il n'a pas de traitement curatif (Bounaga et Djerbi, 2009).

Les méthodes de lutte, qu'elles soient chimiques (traitement par des fongicides systémiques) ou culturales, sont révélées inefficaces. Seules des mesures prophylactiques et une surveillance phytosanitaire ont permis de ralentir la progression de la maladie (Aid et al 1994 ; Tirichine, 2006). ainsi que l'utilisation de cultivars résistants pour le repeuplement des palmeraies décimées (Benkhalifa, 2006) mais des études ont montré que la plupart des variétés présentant un niveau élevé de résistance produisent, hélas, des dattes de qualité médiocre. Un très important travail de sélection doit donc être entrepris afin d'obtenir des palmiers réunissant à la fois de bonnes aptitudes agronomiques, une production dattière de qualité et une résistance au Bayoud satisfaisante.

7. Mode de multiplication du palmier dattier

Le palmier dattier peut être propagé naturellement par deux manières : la multiplication par semis (voie sexuée) et la plantation de rejets (voie asexuée). L'utilisation des techniques de culture de tissu est une troisième méthode récemment développée, qui est maintenant adoptée par les laboratoires commerciaux avancés (R. Raj Bhansail, 2010).

7.1. Multiplication par semis

La technique de multiplication par semis est la méthode ancestrale, utilisées par les phoeniculteurs qui a permis d'obtenir les variétés existantes, cependant cette multiplication est infidèle vu que il y a disjonction des caractères des parents, donc elle ne permet pas de reproduire les qualités du pied mère (Bouguédoura, 1991).

La culture de semis donne une même proportion de descendants mâles et femelles. Indiscernable avant la floraison soit 10 ans de culture après le premier semis (Nixon et fur, 1965, Tisserat, 1979 ; Barton et Blake, 1989) alors on sait que dans une palmeraie en production, un seul arbre mâle suffit pour féconder 50 arbres femelles (Bouguédoura, 1991).

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.

7.2. Multiplication par rejet

La multiplication des palmiers dans une palmeraie se fait presque exclusivement de façon végétative, par bouturage à partir des rejets qui se forment spontanément à la base des stipes. Ces rejets sont identiques aux palmiers mères du point de vue génétique – ils en constituent des clones et sont par conséquent choisis selon les caractéristiques des premiers. Naturellement, les critères de sélection concernent le plus souvent la qualité des fruits mais peut également considérer d'autres traits comme la résistance aux maladies ou l'adaptation aux conditions agro-écologiques locales. Une palmeraie traditionnelle constitue de nouveaux cultivars et ainsi augmente la diversité génétique de la plantation.

7.3. Multiplication de la phœncultur in vitro

C'est le botaniste autrichien. Haberlandt qui en 1902 formule le premier les idées sur lesquelles reposent les cultures de tissus. Il s'est demandé si les cellules somatiques étaient véritablement vouées à la mort ou si celles-ci n'étaient pas dues à une sorte d'intoxication que les cellules subissent à l'intérieur de l'organisme. Il était donc nécessaire d'isoler les cellules et de rechercher si on pouvait ainsi leur permettre de survivre et même de se multiplier.

La multiplication in vitro trouve son fondement dans le concept de totipotence cellulaire, énoncé par Haberlandt : la cellule, unité morphologique et physiologique de l'être vivant est capable d'autonomie. Elle possède toute l'information génétique nécessaire pour régénérer la plante entière, à condition de créer les conditions favorables à son développement.

En 1902, Haberlandt avait mis en culture des cellules végétales (quelques petits amas) mais il avait échoué à les faire se diviser. Il faudra attendre 1935 pour que, grâce aux travaux de Went et Thiman sur l'auxine, le professeur Gautheret obtienne en France pendant quelques mois la multiplication de cellules cambiales de saule en introduisant des auxines dans le milieu. En 1939, White aux Etats-Unis obtient des cultures indéfinies de tabac, de même Gautheret (1945) d'une part et Nobecourt (1943) d'autre part, publiaient en France leurs travaux sur les cultures de tissus indéfinies, c'est-à-dire de cals non différenciés en organes, sur les tissus de carotte.

Une nouvelle étape, très importante, de la multiplication végétative in vitro consistera ensuite à régénérer des plantules à partir d'apex mis en culture. En 1946, partant d'apex, Ball (Ball, 1949) aux Etats-Unis obtient quelques plants de lupin et de capucine, tandis que Wetmore et Morel régénèrent des fougères en 1949. A la même époque, les travaux de Limasset et Cornuet (1949) en France démontrent l'absence de particules virales dans les méristèmes d'apex de tabac virosé. En 1952, Morel et Martin (1952) réussissent la culture de méristèmes apicaux de tiges leur permettant d'obtenir la régénération de plantes entières saines. Ils travaillent sur le dahlia. Ce premier succès sera confirmé peu après par Morel sur la pomme de terre en 1955.

Une troisième étape de la multiplication *in vitro* est franchie lorsqu'en 1958, Steward et ses collaborateurs obtiennent des plantes entières à partir de suspension cellulaire de carotte et signalent également l'initiation et le développement d'embryons somatiques à partir de cellules de carotte cultivées *in vitro*.

Une meilleure connaissance du rôle des hormones de croissance dans les phénomènes d'organisation de cultures cellulaires permettra aux techniques de multiplication *in vitro* d'acquiescer d'importants développements (Went, 1927 ; Sussex, 2008). Grâce à une balance hormonale adaptée. Il est possible d'induire une organogenèse déterminée à partir d'explants très différents.

La preuve irréfutable de la possibilité de régénération à partir de cellules végétales somatiques fut, sans aucun doute l'obtention en 1965 d'une plante entière à partir d'une cellule isolée de culture de tissus par Vasil et Hildebrandt. En 1971, Takebe, Labib et Melchers obtiennent une plante entière à partir d'un protoplaste isolé de mésophile de feuilles.

Dès lors, toutes les données de base sont connues ou du moins maîtrisées, pour multiplier à l'infini n'importe quelle plante. Ainsi peu avant 1970, les premiers laboratoires commerciaux voient le jour aux Etats-Unis et en Europe. Leur capacité de quelques dizaines de milliers de plantes par an suffit pour satisfaire les besoins horticoles. Ces premiers laboratoires artisanaux consacrés à des plantes de haute valeur ajoutée, se transformeront quelques années plus tard en usines à fabriquer des plants de faible valeur. Le rôle de l'Europe dans cette évolution fut primordial. La technique représente donc sans contexte un outil puissant aux perspectives industrielles et économiques importantes (Margara, 1982 ; Boxus, 1995; Semal, 1998; Skirvin et *al.*, 2000) .

Actuellement de nombreux laboratoires privés de micropropagation existent principalement dans les pays d'Amérique latine et d'Asie. La multiplication végétative par culture *in-vitro* ou micropropagation présente plusieurs avantages sur les méthodes classiques dites " conventionnelles "de propagation. Cette technique a rendu possible la multiplication d'espèces chez lesquelles les semences sont rares, où présentant des difficultés de germination et/ou dont les techniques de bouturage ou de greffage sont inapplicables, ce qui a conduit à une plus grande diversité des plantes commercialisées.

Drira (1983) est le premier auteur obtenant une organogenèse directe par développement des bourgeons adventifs et des bourgeons auxiliaires en plantules mais le taux demeure extrêmement faible: puis viennent d'autres travaux dont ceux de Drira et Benbadis (1985) et Lotfi (1989) sur les jeunes feuilles scoarnec (1991) sur les jeunes feuilles et les bourgeons végétatifs ainsi que les travaux d'Anjarne et Ziad (1993) sur les bases des jeunes feuilles.

Deux méthodes sont utilisées à l'échelle internationale pour la propagation végétative des espèces végétales notamment le palmier dattier:

7.3.1. L'organogenèse

C'est une voie qui permet la production de bourgeons qui sont multipliés et enracinés. Cette technique est décrite dans les travaux de poulain et *al.*, avec Rhiss (1979).

Elle consiste à induire la formation et le développement des bourgeons et pousses adventives sur les tissus de plusieurs types d'explants, elle peut être directe ou indirecte (El Hadrami, 1997).

Selon Ait chitt (1989), l'organogenèse donne des grevarieter quant à la conformité génétique de plantes obtenues par rapport à la plante mère.

Cependant elle demeure une technique inefficace sur le faible taux de conformité et la difficulté d'obtenir des bourgeons sans passer par le cal (Rhiss et *al.*, 1979) Obtiennent les premiers plantules par organogenèse à partir du cœur de rejet.

7.3.2. Embryogenèse somatique

L'embryogenèse somatique est l'induction des cellules ou des agrégats de cellules somatique à se développer en une structure semblable à un embryon a partir duquel se développe une pousse et une racine (John E et Smith, 2004).

Il existe deux voies pour l'embryogenèse somatique:

La première est l'embryogenèse dite directe où les embryons sont initiés à partir de tissus en absence de prolifération de cal. Ceux-ci se produisent à partir des cellules pré-embryogéniques déterminées (P.E.D.C) où les cellules sont déjà engagées dans un développement embryogène et elles ont besoin seulement d'être libérées (Piatti, 1988 ; Rouget, 1989). Elles semblent préexister dans les tissus de certains explants comme les embryons immatures ou les fragments de très jeunes plantes (Saadi, 1991).

La seconde est l'embryogenèse somatique dite indirecte, qui est induite après une phase de multiplication cellulaire. Cette prolifération permet la formation de cals ou de suspensions cellulaires embryogènes qui induiront la néoformation des embryons somatiques. Se sont ces derniers qui se développent en plants (Khelifi, 2012).

Chez le palmier dattier la recherche entreprise dans les années 70; Schroeder (1970), Reuveni et al 1972, Bougdoura (1979) sur les fragments de cœur de rejet n'ont pas permis la formation d'embryons somatiques. Ce n'est qu'à partir de l'année 1979 que Lissernd obtient les premiers résultats d'embryogenèse somatique à partir de bourgeons latéraux de cœurs de rejets. Puis de nombreux travaux utilisant divers méthodes furent rapporté (Shorma et al., 1984 ; Yakoub- Bougdal, 1984 ; Abotnil, 1986 ; Mater, 1986 ; Lachqer Sillou, 1989 ; Saka et Abed, 1989 ; Fergani, 1998 ; Yatta, 2007 ; Mousouni, 2008) sur le fragment de cœur de rejet, le tableau 2 représente les travaux les plus importants :

Tableau 2 : Les principaux travaux de culture in vitro (embryogenèse somatique) sur le palmier dattier

Auteurs	Explants	Résultats
Reuveni <i>et al.</i> , 1979	Embryons zygotiques entiers	Obtention de cals embryogènes
Bouguedoura, 1979	Apex, bourgeons axillaires, stipe, et rachis	Formation de plantules
Reynolds et murachige, 1979	Embryons excisés de noyaux immatures	Proembryon
Tisserat, 1979	Embryons excisés de graines apex, bourgeons axillaires, fragment de rachis ainsi que des inflorescences	Formation de plantules
Mater, 1986	Embryons zygotiques immatures, fragments, de cœur de rejets	Formation de plantules
Sharma <i>et al.</i> , 1984 et 1987	Apex, bourgeons axillaires, explants foliaires de vitro plants	Formation de plantules
Yakoub-bougdal 1984 et 1986	Apex, bourgeons axillaires Meritèmes, Apex, bourgeons axillaires	Formation d'inflorescences et étude des phytochromes, dosage de l'ADN
Daikh et demarly, 1987	Explants foliaires de vitro-plants	Formation de plantules
Daguin et letouze, 1987	Tissus de cœur de rejet	Formation de plantules
Lachqer sillou, 1989	Tissus de cœur de rejets, Embryons zygotiques	Formation de plantules
Loutfi, 1989	Jeunes inflorescence mâle et femelles	Formation de plantules
Scoarnec, 1991	Tissus de cœurs de rejets	Formation de plantules
Chabane, 1995	Apex, bourgeons axillaire, 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 de plantules
Fergani, 1998	Apex, bourgoens axillaire, stipe, jeunes feuilles	Formation de plantules
Yakoub-bougdal, 2005	Apex, bourgeons axillaires	Formation d'inflorescences et étude comparative entre le Palmier Dattier voir Deglet Nour et une dicotylédone l'olivier Chamlal
Chukwuemeka <i>et al.</i> , 2005	Tissus de cœur de rejets	Formation de plantules
Yatta, 2007	Tissus de cœur de rejets	Formation de plantules
Moussouni, 2008	Etude de l'embryogénèse zygotique	Formation de plantules

7.3.2.1 Variation Somaclonale

Le terme de variation somaclonale a été évoqué pour la première fois par Larkin et Scowcroft (1981). Ces deux auteurs, lors de la mise au point d'un test de résistance de la canne à sucre à un pathogène, faute de plants sensibles disponibles, utilisèrent des clones régénérés *in vitro* à partir de parents sensibles. Ils constatèrent alors que certains des plants s'avéraient résistants, alors qu'ils n'avaient précédemment pas été en contact avec le pathogène. Après avoir remis en cause la fiabilité de leur test, puis, à la suite de nombreux contrôles, ils durent admettre que la résistance des vitroplants avait été acquise au cours du processus de régénération à partir de cultures cellulaires. Ils démontrèrent ainsi que la culture de tissus végétaux induisait des modifications phénotypiques à une fréquence beaucoup plus élevée que celle observée naturellement et baptisèrent ce phénomène variation somaclonale. Depuis, ce concept a été élargi à l'ensemble des altérations génotypiques et phénotypiques intervenant lors des processus de propagation tissulaire (Kaepler *et al.*, 2000).

De tels phénomènes ont été décrits chez la plupart des espèces régénérées par culture *in vitro*, comme le café (Etienne et Bertrand, 2003), la pomme de terre (Joyce et Cassells, 2002), le bégonia (Bouman et De Kler K, 2001), la banane (Peraza-Echeverria *et al.*, 2001) ou bien encore le pin de Norvège (Fourré *et al.*, 1997) ou le concombre (Filipecki *et al.*, 2006 ; Ladyzynski *et al.*, 2002). En effet, la régénération d'individu complet à partir d'un simple échantillon tissulaire (l'explant) est une caractéristique des plantes. Cette " totipotence " des cellules végétales (concept proposé par Haberlandt au début du 20ème siècle) a largement été employée par l'homme depuis l'apparition de l'agriculture (bouturage, greffage...), mais la maîtrise des procédés biotechnologiques a permis de l'exploiter sur un très grand nombre d'espèces jusque-là réfractaires. Cependant, ces techniques, en réorientant la destinée cellulaire entraînent des dérèglements d'ordre génétique, cytogénétique ou bien moléculaire (Peschke et Phillips, 1992), se traduisant généralement par des altérations phénotypiques chez les individus régénérés ou plus tardivement dans la descendance.

Dans un contexte d'amélioration variétale, ces mutants peuvent, s'ils s'avèrent stables dans le temps, présenter de nouvelles caractéristiques pouvant intéresser les sélectionneurs, comme une meilleure adaptation à des conditions environnementales extrêmes (sécheresse, basses températures, salinité) ou bien encore des résistances à certains pathogènes (insectes, champignons, bactéries), (Jain, 2001 ; Duncan, 1997). Cependant l'utilisation des variations

somaclonales comme source de diversité reste limitée, du fait de la rareté des variantes à performance agronomique accrue.

8. Culture de cellules et de protoplastes

8.1. Suspension cellulaire

Le terme suspension cellulaire est souvent utilisé pour décrire les cultures en suspension de cellules individuelles et d'agrégats cellulaires (Augé et *al.*, 1989).

Les suspensions constituent un outil de choix : pour toutes les études physiologiques biochimiques et enzymologiques sur la nutrition et le métabolisme de cellules privées de corrélation, pour la production de métabolites secondaires (Steck et Pétiard, 1985) et pour la micropropagation des espèces.

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*.

Les suspensions cellulaires en milieu liquide furent l'objet d'une description précise pour la première fois dont le brevet est déposé par l'entreprise Pfizer et Co, en 1956, sur l'obtention de suspensions cellulaires végétales à partir de différents types d'explants et de différentes espèces (Donnez et *al.*, 2010).

C'est à partir d'une suspension de carotte que Steward et *al.*, (1958) et Reinert (1958) ont mis en évidence le phénomène d'embryogenèse somatique. Cette voie permet maintenant de régénérer de nombreuses espèces d'angiospermes et de gymnospermes en milieu liquide et/ou en milieu gélosé (revues d'Ammirato (1983a) et de Thorpe (1988)). Parmi les monocotylédones dont la régénération à partir de suspensions a été réalisée avec succès, on peut citer l'asperge (*Asparagus ossicimalis*) (Steward et Mapes, 1971) l'igname (*Dioscorea spp*) (Ammirato, 1978) et le lys (*Lilium arboricola*) (Krikorian et Kann, 1981) ; chez les graminées : le millet (*Fennistum americanum*) (Vasil et Vasil, 1981), le Panicum (*Panicum maximum*) (Lu et Vasil, 1981) la canne à sucre (*Saccharum officinarum L.*) (Ho et Vasil,

1983) le dactyle (*Dactylis glomefata*) (Gray et al., 1984), le maïs (*Zea mays*) (Vasil et Vasil, 1986), le riz (*Oryza sativa L.*) (Ozawa et Komamine, 1989) la fêtuque (Zaghmout et Torello, 1989) et le blé (*Triticum aestivum*) (Vasil et al., 1999) ; et chez les monocotylédones pérennes : le bananier (Novak et al., 1989) et le palmier à huile (*Elaeis guineensis*) (Touchet et al., 1990 ; Sondhal, 1991).

L'initiation de ces suspensions cellulaires est difficile et requiert beaucoup de temps, quel que soit le matériel de départ utilisé (fleurs mâles immatures, embryons zygotiques immatures ou méristèmes en prolifération active in vitro). Une fois établies, ces précieuses suspensions cellulaires sont sujettes à la variation somaclonale et aux contaminations microbiennes. De plus, une durée de culture prolongée peut résulter en une diminution, voire la perte totale, des capacités morphogénétiques des suspensions (Strosse et al., 2003 ; Strosse et al., 2006). En 1990, une technique de cryoconservation pour des suspensions cellulaires "idéales" a été mise au point, comprenant un traitement cryoprotecteur avec 7,5% (v/v) de DMSO (diméthyl sulfoxyde) pendant 1 heure à 0°C, suivi d'un refroidissement lent (1°C/min jusqu'à atteindre -40°C) puis de l'immersion dans l'azote liquide. Une suspension cellulaire "idéale" contient une proportion élevée de cellules isodiamétriques, caractérisées par un noyau relativement grand, de multiples petites vacuoles et de petits granules protéiques et amylacés. Les suspensions moins "idéales" sont plus hétérogènes et contiennent, en plus des massifs embryogènes, des cellules très vacuolisées et allongées, ou des cellules à cytoplasme très dense mais granuleux ou des cellules avec de gros grains d'amidon et des globules organisés. Elles sont à fort pouvoir de régénération (Panis et al., 2000a).

De nombreuses suspensions, notamment de monocotylédones, ont été initiées en vue de développer les techniques de génie génétique. Vasil et Vasil (1981 et 1991) affirment que les suspensions embryogènes fournissent les seules cellules dont les protoplastes sont totipotents chez les graminées, et que les plantes régénérées à partir de protoplastes proviennent des espèces pour lesquelles une suspension embryogène a été préalablement établie. D'autre part, la souplesse du système et la promesse de rendements élevés d'individus génétiquement identiques ont permis d'envisager la production à grande échelle d'embryons de plantes difficiles à reproduire par voie sexuée ou pour lesquelles le coût de la micropropagation in vitro classique est trop élevé (Lutz et al., 1985 ; Nouaille et Pétiard, 1988). Des embryons somatiques de luzerne ont été produits en bioréacteur, mais leur taux de conversion en plante

est dix fois plus faible que lorsqu'ils sont issus d'une culture en erlenmeyer (Stuart et *al.*, 1987). Preil (1991) a cultivé une suspension embryogène de Poinsettia en bioréacteur. Un nombre important d'embryons d'aspect normal a été produit et la conversion des embryons a été réalisée avec succès. Toutefois, l'auteur constate que le manque de reproductibilité de la plupart des procédés de micropropagation embryogène en milieu liquide implique que les recherches doivent continuer pour leur mise au point.

Les suspensions cellulaires embryogènes sont toutefois d'ores et déjà utilisées pour la transformation génétique ou la fusion de protoplastes de Bananiers (Hannelore Strosse et *al.*, 2003). De même chez le palmier dattier, des plantes ont été obtenues par fusion de protoplastes de deux cultivars issus des suspensions cellulaires (Chabane et *al.*, 2007).

8.2. Culture de protoplastes

Un protoplaste est une cellule végétale, ou bactérienne, dont la paroi a disparu. Chez les végétaux, une cellule est normalement composée d'une paroi pecto-cellulosique. Le protoplaste en lui-même est limité par sa seule membrane plasmique. Les protoplastes sont souvent utilisés en expérimentation végétale. Ils conservent les potentialités des cellules végétales entières, en particulier la capacité de reformer la paroi cellulaire voir de régénérer des plantes par culture *in vitro*, l'absence de la paroi facilite les manipulations impossibles à réaliser avec des cellules entières (Ducreux, 2002). Ils participent activement à la mise en œuvre de protocoles visant à élargir la viabilité (Haicour et Sihachakr 1996). L'intérêt des protoplastes, réside dans le fait que ce sont des cellules libres isolées pouvant être soumises à des traitements mutagènes permettant de réaliser des modifications génétiques, en vue de l'amélioration de plantes.

De plus ils ont des domaines d'application très divers car ils sont obtenus facilement et l'absence de paroi permet une grande variété de traitements. Toutefois, il est souvent très difficile de régénérer une plante complète à partir de protoplastes.

L'obtention de protoplastes se fait habituellement par digestion enzymatique de la paroi, grâce notamment à des enzymes telles que la pectinase, la cellulase l'hémicellulase. Du fait de la pression osmotique, les cellules végétales ont normalement une forme sphérique. La suppression de la paroi permet aux protoplastes d'adopter une forme sphérique.

La digestion a lieu en milieu hypertonique car les cellules végétales, privées de leur "armature" pecto-cellulosique risquent l'éclatement. Le milieu d'obtention (liquide) est donc généralement enrichi en glucides non-métabolisables tels que le mannitol ou l'inositol. D'autres glucides ou sels minéraux peuvent être utilisés pour diminuer l'activité de l'eau (voir également osmose) du milieu extra-cellulaire avec le milieu intracellulaire. La plasmolyse des cellules végétales permet également de "détacher" la membrane plasmique des cellules de la paroi. Ceci protège les cellules des fragments de cellulose pouvant perforer le protoplaste pendant la digestion.

Les cellules ainsi obtenues sont excessivement fragiles. La suspension de protoplastes est manipulée avec beaucoup de délicatesse car le simple fait d'appliquer un choc sur la boîte ou d'en aspirer le contenu avec une pipette provoque la mort des cellules par déchirement de la membrane plasmique. Il est possible d'estimer le nombre de protoplastes obtenus dans la solution grâce à un comptage au microscope optique à l'aide d'une cellule de Malassez.

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

Les potentialités de l'outil protoplastes sont immenses. L'intérêt des protoplastes le plus cité est leur possibilité de fusionner, de produire des hybrides et des cybrides (Haicour et Sihachkr, 1996). Ils ont aussi l'avantage de produire des fusions asymétriques (Sihachkr et *al.*, 1993). C'est-à-dire des hybrides par transfert de génomes cytoplasmiques (mitochondries et/ou chloroplastes) pour la production des plantes mâles stériles cytoplasmiques ou pour la correction d'une déficience chloroplastique. En plus, les protoplastes sont un excellent système pour des études sur la génétique des cellules et même pour la virologie végétale (Haicour et *al.*, 2004).

8.3. Isolement de protoplastes

Elle a été mise en point en 1960 sur les racines de plantules de Tomate (*Lycopersicon esculentum*). Néanmoins, c'est en 1968 que l'isolement des protoplastes à partir des plantes a été réalisé sur les parenchymes foliaires du Tabac (Takebe et *al.*, 1968).

Nagata et Takebe, (1970) ont pu induire la division des protoplastes en culture chez *Nicotiana*.

Ultérieurement (Takebe et *al.*, 1971) ont pu obtenir la néoformation de plantes issues de protoplastes de feuille de Tabac. Ils ont pu ainsi démontré que le fait de priver momentanément la cellule végétale de sa paroi n'altère aucune de ses capacités totipotentes, puisqu'il était possible de régénérer des plantes à partir de protoplastes. Depuis cette obtention s'élargit à d'autres modèles : la Pomme de terre (*Lycopersicum esculentum*) (Shepard et Toutain 1977 ; Binding et *al.*, 1978).

En ce qui concerne les monocotylédones herbacées, des protoplastes ont été obtenus à partir de suspensions embryogènes de cellules de riz (*Oryza sativa L*) (Kyojuka et *al.*, 1987) de maïs (*Zea mays*) (Prioli et Sondahl, 1989) et de Blé (*Triticum aestivum*) (Vasil et *al.*, 1990 ; Chang et *al.*, 1991).

Pour les Bananiers, la première tentative d'isolement de protoplastes a été réalisée par Bakery (1984) ; chen et ku (1985). Ce n'est qu'en 1992 que Megia et *al.*, obtiennent une callogénèse et la régénération de plantes de Bananier à partir de protoplastes isolés d'une suspension cellulaire est issue d'embryons zygotiques.

En ce qui concerne, la famille des Arecaceae, des protoplastes de cocotier sont isolés pour la première fois par Eeuwens et Blake, 1977. En 1982 Haibon et Kovoov ont réussi à isoler des protoplastes et à obtenir de micro cals. Ces derniers n'ont pas survécu.

Chez le Palmier à huile (*Elaeis guineensis*), des protoplastes issus des fragments de feuilles et des rachis jeunes ou adultes sont isolés pour la première fois par Vouyouklis (1981). Il a obtenu des protoplastes de bonne qualité sur les rachis et un faible rendement sur les fragments de feuilles. Cependant il n'a pas obtenu de régénération. Bass et Huges (1984) ont isolé des protoplastes à partir de suspensions cellulaires de Palmier à huile. Ils ont mentionné la formation de colonies cellulaires mais n'ont pas parlé de morphogénèse.

Quant au palmier dattier (*Phoenix dactylifera L.*), des protoplastes ont été isolés à partir d'apex de tiges, de méristèmes apicaux ainsi que de cals embryogènes. Les protoplastes issus

de ces cals ont formé des colonies sur milieu gélosé. Ces dernières ont redonné naissance à des cals, qui n'ont pas survécus (Gabr et Tisserat, 1984).

Chabane et Bougedoura, (2006) ont isolé des protoplastes à partir des suspensions cellulaires et de cals nodulaires. Leur étude a permis la production de protoplastes viables en quantité significative: le rendement moyen et la taille des protoplastes varient selon les explants et les génotypes.

En Egypte, Aida. Rizkalla et *al.*, (2007) ont isolé des protoplastes à partir des jeunes feuilles issues de ramifications des génotypes du cultivar Barhee et Zagloul, à l'issues de ces travaux ils ont induit les premières divisions cellulaires, la formation de micro-cals, l'effet de tolérance à la salinité et la formation de cals avec un meilleur rendement à partir du palmier dattier. Bougedoura et *al.*, 2008, ont également obtenu des protoplastes viables, qui se sont divisés en micro cals et en cals mais avec un faible taux de fusion. Yatta D et *al.*, (2013, 2014) ont isolé et cultivé des protoplastes de deux cultivars du palmier dattier.

8.4. Fusion de protoplastes

Ils permettent par exemple de faire fusionner des cellules issues de deux variétés différentes de la même espèce. Une telle opération permet d'obtenir des hybrides. Par exemple, la fusion d'une espèce sauvage dite "rustique" (résistante à un stress) avec une espèce d'intérêt agronomique permet d'obtenir des individus regroupant les caractéristiques de résistance et de productivité. Cette stratégie est très souvent réalisée chez les plantes de la famille des Solanacées et des Brassicacées. La fusion peut être favorisée par des agents chimiques (par exemple le PEG) qui permettent de réduire les répulsions électrostatiques entre les protoplastes ou par application d'un champ électrique à la suspension de cellules.

La fusion de deux ou de plusieurs protoplastes aboutit à l'addition totale de trois compartiments héréditaires : nucléaire, mitochondrial et chloroplastique. Cette addition accroît le niveau de ploïdie (Gleba et *al.*, 1980 ; Melchers et *al.*, 1978 in Demerly, 1985). Il existe deux stratégies efficaces de fusion des protoplastes: les méthodes chimiques et la méthode électrique. La PEG est la substance chimique la plus utilisée pour réaliser la fusion des protoplastes (Sihachakr, 2002).

La fusion de protoplastes permet donc la création d'une nouvelle variabilité après réaménagement ou recombinaison des génomes d'espèces différentes, parfois très éloignées ou incapables de se croiser. Cette méthode est particulièrement intéressante dans le cas des bananiers puisqu'elle permet de contourner les barrières de fertilité existantes chez cette plante.

8.4.1. Méthode chimique

La fusion des protoplastes est réalisée par des agents de nature chimique tels que les sels minéraux ou le polyéthylène glycol: (PEG). La capacité du polyéthylène glycol (PEG) à induire la fusion cellulaire a été simultanément découverte par deux groupes de chercheurs en 1974: Kao et Michayluk (1974) au Canada et l'équipe du professeur Erickson (Wallin et *al.*, 1974) en Suède (Haicour, 2004). Cette substance « surface active » non ionisée provoque l'accolement des protoplastes en neutralisant les charges négatives présentes à la surface de la membrane, conduisant ainsi au contact membranaire. La dilution de cette substance induit des perturbations au niveau moléculaire provoquant ainsi la fusion des protoplastes (Haicour et Sihachakr, 1996; Sihachakr, 2002).

Cette méthode est la plus utilisée car elle est simple et efficace ne nécessitant aucun équipement sophistiqué. Le PEG induit la fusion des cellules d'une manière non spécifique.

8.4.2. Méthode électrique

L'accolement des protoplastes par voie électrique a été mis au point par le groupe Zimmermann (Zimmermann et Scheurich, 1981). Les protoplastes, placés dans un milieu de très faible conductivité, sont soumis par un champ électrique induit par un courant sinusoïdal de haute fréquence (0,5 à 1,5 MHz) et non uniforme crée entre deux électrodes asymétriques, la répulsion naturelle qui s'exerce entre les protoplastes en raison de leurs charges négatives de surface, est levée. D'autre part, dans un champ électrique non uniforme les protoplastes se comportent comme des dipôles électriques et migrent vers les régions de plus forte intensité, c'est-à-dire au voisinage des électrodes. Cet effet appelé dielectrophorese, provoque leur attraction mutuelle et la formation de chaînes de protoplaste entre les électrodes, ensuite la fusion est obtenue par l'application d'un champ électrique, qui est induit par l'envoi

d'impulsion de courant continu de fort voltage (1 à 3 Kv/cm), mais pendant une très brève durée de l'ordre de la microseconde (Sihachakr et *al.*, 1994)

Matériels et Méthodes

1. Méthodologie

1.1. Entretien et conditions de culture

Durant notre expérimentation, nous avons entretenu des cals embryogène par des repiquages dans les milieux $P_{12,5}$ et M_{100} . (Figure 5).

Ces cals issus des explants de cœur de rejets déjà mis en culture des cultivars Deglet Nour, Tegaza et Takerboucht, sont utilisés comme matériel végétal (Figure 6). Ces cultivars ont été sélectionnés par rapport à leur comportement vis-à-vis de la maladie du bayoud:

- Le cultivar «Deglet Nour» sensible au bayoud et réputé dans le marché mondial pour sa qualité organoleptique. Il est originaire de Touggourt.
- Le cultivar «Takerboucht» résistant au bayoud et de qualité dattière moyenne, provenant de la station INRAA d'Adrar.
- Le cultivar «Tegaza» sensible au bayoud et de bonne qualité dattière, provenant de la station INRAA d'Adrar.

L'entretien des cals embryogènes s'effectue sur les milieux nutritifs de base MS (1962) modifié et additionnés de substances de croissance dont la concentration en 2,4-D est de 100 mg.l^{-1} , et de picloram à $P_{12,5} \text{ mg.l}^{-1}$. Le charbon actif est associé à des concentrations de 200 à 3 g.l^{-1} . Ces deux milieux ($P_{12,5}$ et M_{100}) ont été mis au point par l'équipe palmier dattier du laboratoire de physiologie végétale de l'INRAA.



(a)

(b)

Figure 5: Repiquage des cals sous la hotte à flux laminaire.

a : Repiquage dans les tubes à essais.

b : Mise en culture dans la chambre de culture.

1.2. Protocole expérimental

1.2.1 Stérilisation du matériel de culture

Lavage de la verrerie (tube à essai, Erlenmeyer, Eprouvette) avec de l'eau et à l'aide des produits hygiéniques (détergent, eau de javel), puis rinçage avec de l'eau distillée. Ils sont ensuite stérilisés à l'autoclave à 120°C pendant 20 minutes.

Les instruments à utiliser au cours de la manipulation (pinces, bistouri, scalpel, spatule) sont stérilisés dans l'étuve à 180°C pendant 24h puis dans le stérilisateur à bille.

1.2.2 Préparation des milieux de culture (M_{100} , $P_{12,5}$, P_5)

Les milieux de culture contiennent les éléments nécessaires au développement des tissus végétaux comme les éléments minéraux, éléments organiques, des régulateurs de croissance (hormones) et du charbon actif (Annexe 4).

- **Les éléments minéraux**

Les macroéléments: Il s'agit de six éléments qui interviennent à des concentrations élevées tels que l'azote (N), le calcium (Ca), le potassium (K), le soufre (S), le magnésium (Mg) et le phosphore (P). Ils interviennent dans le maintien de l'équilibre entre les anions et cations. L'ion F^+ joue un rôle important dans la pression osmotique et l'équilibre acido-basique de la plante. Le Mg^{2+} entre dans la composition de la chlorophylle. Le Ca^+ est un antagoniste des ions K^+ et F^{2+} .

Les microéléments: Appelés parfois les oligo-éléments, leur rôle est essentiel dans les mécanismes enzymatiques. Les principaux d'entre eux sont le fer (Fe), le cuivre (Cu), le zinc (Zn), le manganèse (Mn), le molybdène (Mo), le bore (B) et le chlore (Cl), le cobalt (Co), le nickel (Ni), etc...

- **Les éléments organiques**

Le sucre : Dans le cas des tissus végétaux placés en culture in vitro, l'assimilation chlorophyllienne est insuffisante pour assurer la survie et le développement de l'explant. Dès lors, on rajoute des sucres, le plus souvent du saccharose aux milieux de culture pour fournir à l'explant une source de carbone. Ces sucres ont une forte action sur l'embryogenèse somatique de même que sur la rhizogénèse.

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

Les acides aminés : la glutamine et l'adénine sont ajoutés au milieu de culture. Ils ont un effet sur la prolifération des cals embryogènes et la germination des embryons somatiques.

Le charbon actif: il a la propriété d'absorber les composés phénoliques excrétés par l'explant et diffusés dans le milieu.

- **Les régulateurs de croissance**

Appelés généralement hormones végétales, ils induisent les phénomènes de croissance et de néoformation des organes. La réussite de la culture *in vitro* est basée essentiellement sur un bon équilibre entre les cytokinines et les auxines dans le milieu.

- **Agent gélifiant**

Les milieux de culture sont solidifiés par l'ajout d'un gélifiant tel que l'agar et le phytigel qui jouent un rôle dans l'évolution de la culture.

1.2.3. Stérilisation de milieu de culture (M_{100} et $P_{12,5}$)

Les milieux de culture sont distribués dans des tubes de pyrex de 25×160 mm à raison de 15 ml de milieu nutritif par tube avec un distributeur automatique (Figure 6) et le P_5 (liquide) s'effectue de la même manière que les milieux solides mais dans des erlens de 250 ml à raison de 25 ml de milieu pour chaque erlenmeyer. Le pH des milieux est ajusté à 5,8 avant leur stérilisation par autoclavage à une température de 120°C et une pression de 1 bar pendant 20 min.



(a)

(b)

(c)

Figure 6 : Distribution et stérilisation de milieu de culture.

- a** : Préparation du milieu de culture.
- b** : Distribution du milieu de culture.
- c** : Stérilisation du milieu de culture.

2. Initiation des suspensions cellulaires

2.1. Matériel végétal

Des souches de cals embryogènes de trois cultivars Tegaza (Tgz), Takerbucht (TKB) et Deglet-Nour (DN) de cals issus des explants de cœur de rejets prélevées des milieux d'induction ($P_{12,5}$ et M_{100}), sont utilisées comme une source végétale pour l'obtention de la suspension cellulaire.

Tableau 3 : Origine et nature du matériel végétal.

Nombre de souche	Origine	Milieu de culture	Nature des cals		
			Aspect et texture	Couleur	prolifération
DN_{f10}	Touggourt	M100	Compact	Beige brin	++
DN_{f11}	Touggourt	P12.5	Compact	Brun foncé	+
DN_{f12}	Touggourt	M 100	Compact	Beige	+++
Tgz_{S6}	Adrar	M 100	Compact	Beige	+
Tgz_{S8}	Adrar	P 12.5	Compact	Blanche	+
Tgz_{S10}	Adrar	P 12.5	Compact	Blanche	+++
TKB_{S6}	Adrar	M 100	Compact	Beige	+
TKB_{S7}	Adrar	M 100	Compact	Blanche	++
TKB_{S8}	Adrar	P 12.5	Compact	Beige	+++
TKB_{S1}	Adrar	P 12.5	Compact	Blanche	++

Prolifération : + faible ++ moyenne +++ rapide.

DN : Deglet Nour, Tgz : Tegaza, TKB : Takerbucht

2.2. Protocole expérimental

2.2.1. Préparation de milieu de culture liquide

L'établissement de la suspension cellulaire nécessite la préparation du milieu liquide P_5 (annexe 4) de base MS contenant l'auxine picloram à une concentration 5mg/l associée à 1mg/l de thiamine (vitamine), IPA (cytokinine) et l'ajustement du pH du milieu à 5,8.

2.2.2. Conditions de culture

La suspension cellulaire est réalisée sous la hotte à flux laminaire dont les cals sélectionnés sont écrasés à l'aide d'un pilon stérile (Figure7) puis repiqués dans le milieu liquide. Les érlens sont ensuite placés à l'obscurité à une température de 27°C sur un agitateur rotatif horizontal à 100 rotations /min. Les cultures sont repiquées tous les 7 à 10 jours sur un milieu liquide frais jusqu'à l'obtention de la suspension.



(a)

(b)

(c)

Figure 7 : Les différentes étapes de la Suspensions cellulaires.

a : Mise en culture des suspensions.

b : Placement des cultures sous agitateur et dans l'obscurité à 28°C.

c : Suspension après 15 jours de mise en culture.

3. Isolement des protoplastes

Le procédé d'isolement de protoplastes suivi, est celui du bananier avec certaines modifications (Assani et *al.*, 2002). Après macération enzymatique du matériel végétal utilisé, les protoplastes libérés sont purifiés puis cultivés pour leur régénération en plantes.

3.1. Matériel végétal

Durant notre expérimentation, la suspension cellulaire de trois cultivars Tegaza, Tekerbucht et Deglet Nour constitue le matériel végétal pour l'isolement de protoplastes.

3.2. Protocole expérimental

3.2.1. Préparation de la solution de la macération

Nous avons entrepris de définir un complexe enzymatique à différentes concentrations spécifiquement adapté au matériel végétal expérimenté, cela nous a conduit à tester l'influence de différentes enzymes (cellulase, pectolyase, pectinase, et Hémicellulase) dans deux solutions enzymatiques à différentes concentrations (SE1, SE2,) afin de solubiliser la paroi pectocellulosique. Les enzymes sont conservées sous forme de solution congelée à (-20°C).

Sachant que la paroi des cellules végétales est constituée de pectine et cellulose, la solution enzymatique doit renfermer au moins une pectinase et une cellulase.

Nous avons préparé deux solutions enzymatiques. Le tableau 4 résume la composition de ces solutions et met en exergue la concentration des différentes enzymes employées.

Chaque solution est agitée, et ajustée à pH 5,6 puis stérilisée sous la hotte à l'aide d'un filtre millipore (0,22 μ m) (Figure 8).

Tableau 4 :Composition des solutions enzymatiques testées (mg/l qsp 100ml).

Produits	SE1	SE2
Cellulase RS	1,5%	-----
Hémicellulase	2%	3%
Pectinase	-----	2%
Pectolyase Y23	0,5%	-----
CaCl ₂	0,05%	0.05%
Kcl	3%	3%
MES	0,5g/l	0,5g /l

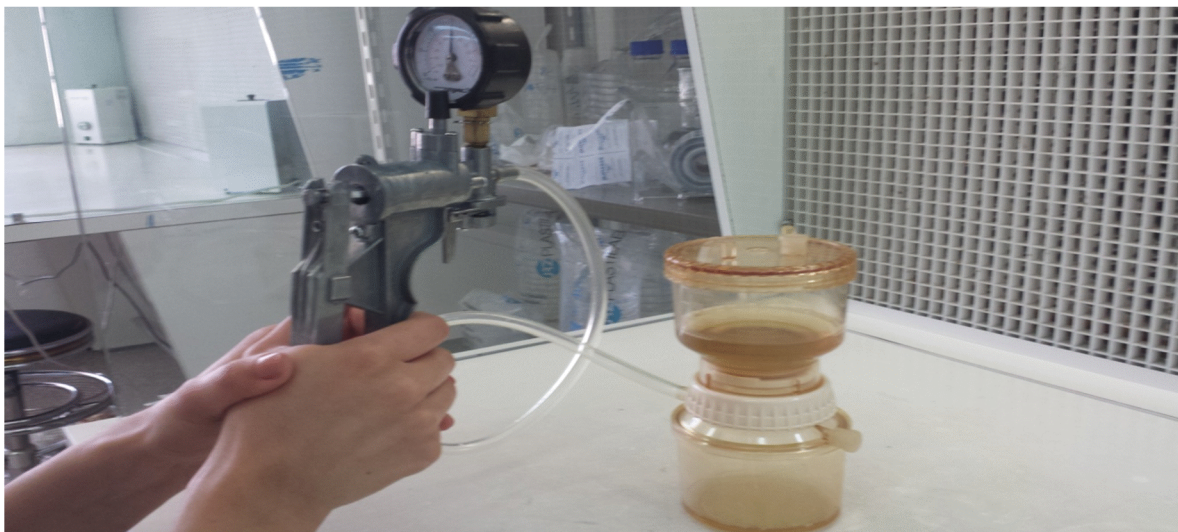


Figure 8 : Stérilisation de la solution enzymatique sous la hotte à l'aide d'une pompe millipore (0,22 μ m).

3.2.2. Macération enzymatique

La macération enzymatique est réalisée sous la hotte à flux laminaire. Nous avons pris 15 ml de chaque solution enzymatique à l'aide d'une pipette, additionnée de 5ml de suspension cellulaire des trois cultivars dans des erlenmeyer fermés avec de l'aluminium stérile et entourés de parafilm ensuite elles sont incubées à l'obscurité à 27°C à différents temps (20 h, 36h) avec et sans agitation.

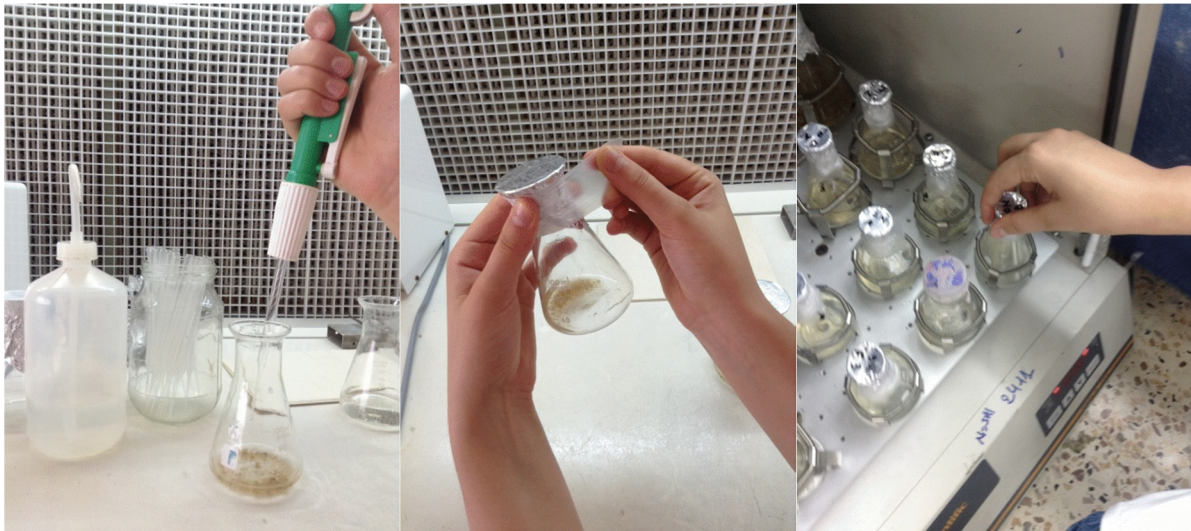


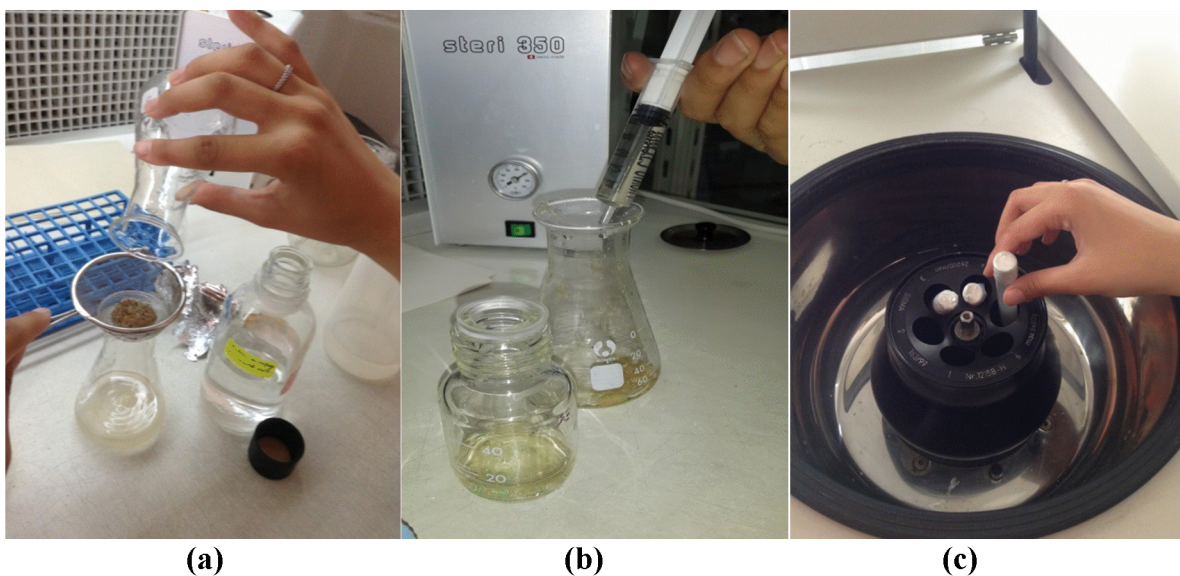
Figure 9: Les différentes étapes de la macération enzymatique.

3.2.3. Purification des protoplastes

Après macération enzymatique le contenu des erlenmeyers est filtré sur une passoire stérile à travers un tamis métallique (80 μ m). Le filtrat contenant les protoplastes est rincé avec 15 ml de solution CPW Man-NaCl (annexe 6).

La suspension de protoplastes est ensuite transférée dans des tubes coniques et centrifugés à 50 g pendant 5 minutes. Le surnageant est jeté, le culot est repris dans 2ml (10ml) de solution de rinçage CPW Man-NaCl. Après la centrifugation à 50g pendant 5 minutes, le surnageant est éliminé, le culot est repris dans 12 ml de solution de rinçage de saccharose 21%.

Après la centrifugation à 100g pendant 10 minutes, le ménisque est récupéré en l'aspirant à l'aide d'une pipette. Après avoir rincé le culot dans (15ml) de solution de rinçage nous centrifugeons à 50g pendant 5 minutes pour récupérer le culot, ce dernier sera mis dans 1ml de milieu liquide (P_5).



(a)

(b)

(c)

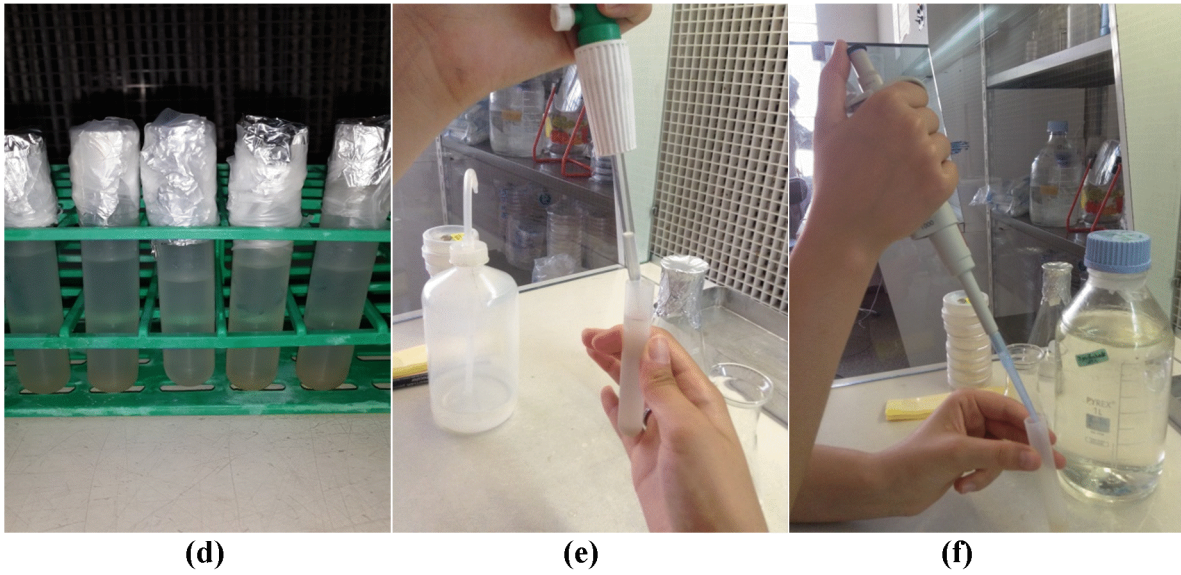


Figure 10: Les différentes étapes de la purification.

a : Filtration des suspensions à travers un tamis métallique (80 μ m).

b : Rinçage des suspensions.

c : Centrifugation à 50 g pendant 5 minutes

d : Formation du culot de protoplastes.

e : Pipetages du surnageant.

f : Rajout de rinçage de saccharose 21%.

g : Centrifugation à 100g pendant 10 minutes.

4. Culture des protoplastes

Les protoplastes sont mis en culture dans un milieu nutritif à une concentration de 5 à $8 \cdot 10^5$ protoplastes/ml. Les protoplastes sont des structures fragiles qui nécessitent des conditions particulières pour leur culture. Les protoplastes ainsi isolés sont cultivés sur un milieu solide Pc M_2 (couche nourrice).

La préparation de la couche nourrice se fait de la même manière que celui du P5 (annexe 7). Le milieu liquide MS modifié est stérilisé par filtration sous la hotte puis on ajoute le phytigel à 2g/l après stérilisation par autoclave (120°C pendant 20min). Après homogénéisation doucement par agitation manuelle et ajustement du pH à 5,7 le mélange est coulé dans des boîtes de Pétri (5,5cm de diamètre) à raison de 15ml par boîte. La couche nourricière se prépare 1 à 2 jours avant la mise en culture des protoplastes. Elle est conservée à 26 °C à l'obscurité.

5. Fusion des protoplastes

Pour réaliser la fusion des protoplastes, nous avons utilisé la méthode chimique au PEG car elle est simple, efficace, et ne nécessite pas un équipement sophistiqué. L'addition du PEG provoque une adhérence mutuelle et une agglutination intense.

Un mélange de 150 μ l de chaque suspension de protoplaste des trois cultivars est déposé dans des eppendorf, on ajoute 15 μ l de solution de fusion PEG (Annexe 7) (a). Après décantation de 15 minutes, on rajoute 50 μ l de solution de mannitol, on centrifuge à 100 rpm pendant 2min et enfin on dispose le contenu des eppendorf sur couche nourrice.



(a)

(c)

(d)



(d)

Figure 11 : Etapes de la fusion avec le PEG.

a : Ajout du PEG.

b : Décantation de 15 minutes.

c : Rajoute 50 μ l de solution de mannitol.

d : Centrifuge à 100 rpm pendant 2min.

Résultat et discussion

1. Résultats des suspensions cellulaires

1.1. Production de suspensions cellulaires

1.1.1. Etablissement et évolution des cultures

Les suspensions cellulaires sont établies en milieu liquide P₅ (5mg.l⁻¹ de picloram associé à 1 mg.l⁻¹ d'IPA) sous agitation continue à une vitesse de 100 tour/min. Les cultures consistent alors en une suspension de petits agrégats cellulaires ou de cellules isolées de couleur blanche chez les trois cultivars Tegaza, Deglet-Nour et Takerbucht.

Les cultures sont repiquées tous les 08 jours sur un milieu liquide frais jusqu'à l'obtention de la suspension. Des pesées sont effectuées régulièrement avant et après chaque subculture; nous ont permis de suivre et d'estimer l'accroissement de la matière fraîche des suspensions (tableau 5).

Tableau 5 : Différentes étapes appliquées tout au long de la période de culture et prolifération des cals.

Souches	Nombre de semaines										Poids au départ	Poids après 9 semaines
	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8	S9	S10		
<i>DN₆</i>		+				X	-	-		SC	2g	15
<i>DN₂</i>		+				X				+	2g	14
<i>DN₃</i>			+			X	-			+	2g	15,30
<i>DN₄</i>		+				X	-	-		+	2g	12,5
<i>TKB₄</i>		+				X				+	2g	11
<i>TKB₁</i>		+				X	-			+	2g	14
<i>TKB₇</i>			+			X	-	-		+	2g	15
<i>TKB₉</i>		+				X	-			+	2g	13
<i>Tgz₂</i>		+				X			-	+	2g	14,27
<i>Tgz₃</i>		+				X				+	2g	11,33
<i>Tgz₇</i>			+			X	-			+	2g	5,20
<i>Tgz₈</i>			+			X	-			+	2g	11,33

+ : apparition de cals secondaires, X : répartition des classes I et II, - : première filtration sur tamis de 380µm, SC : obtention de suspension cellulaire de taille (comprise entre 50 et 100 µm), S : semaine

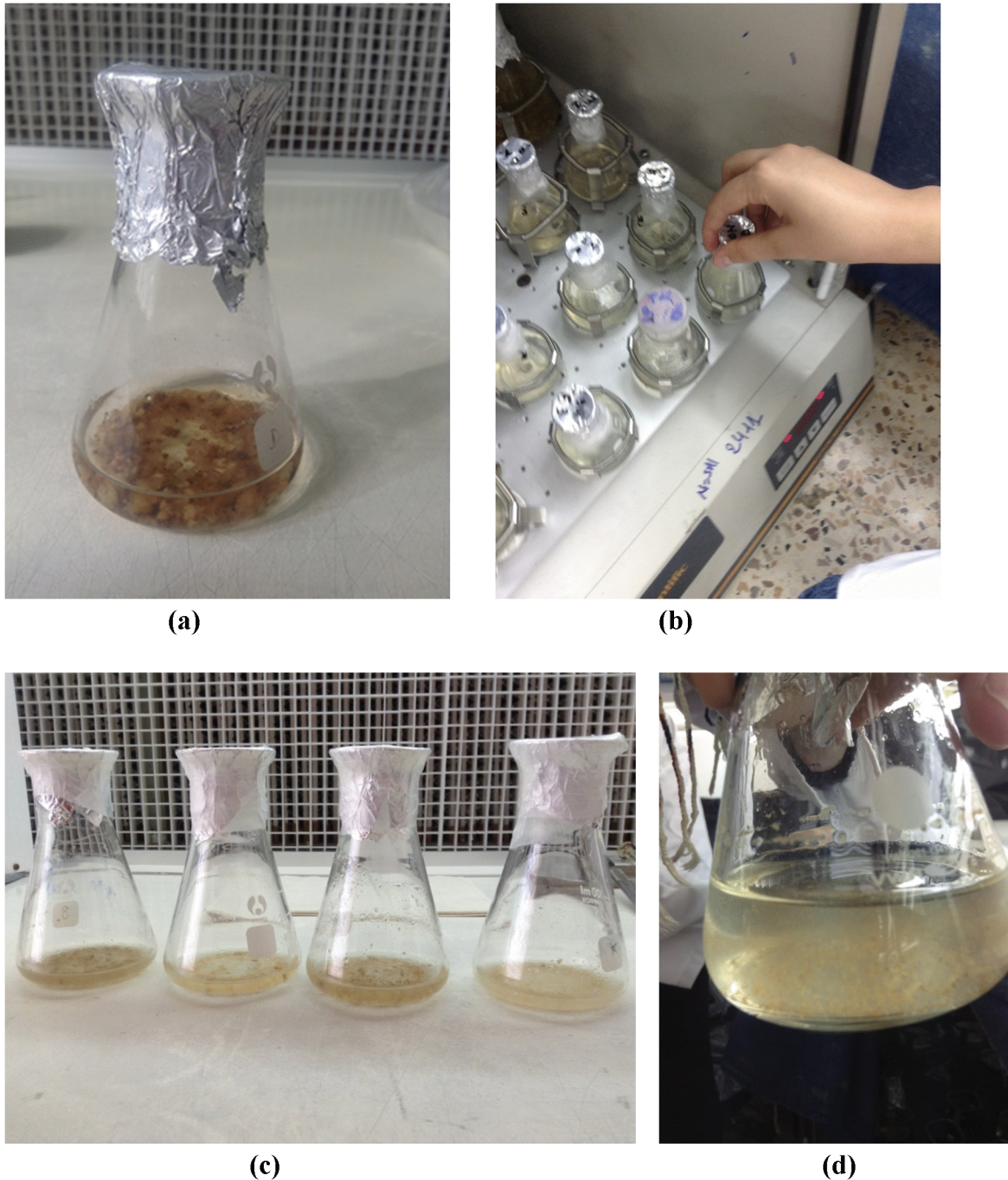


Figure 12: Etablissement de suspensions cellulaires.

(a) et (b) mises en culture de cal en milieu liquide agité, (c) suspension cellulaire, (d) Microcals.

Il ressort du tableau (5) que toutes les souches ont été retenues pour l'établissement des différentes classes des cals sauf Tgz₃ et Tgz₈ qui montrent une diminution dans le taux de multiplication des agrégats cellulaires et Tgz₇ qui ne présente aucune prolifération.

A la huitième semaine, l'ensemble des souches sauf DN_6 , DN_4 et TKB_7 sont filtrées à travers un filtre de 380 μm .

Les souches ont une bonne prolifération pour la souche DN_3 est passé de 2 g à 15,30g après neuf semaines ainsi que pour les souches DN_6 et TKB_7 , le poids des cals est passé de 2g à 15g.

Pour pouvoir étudier les différentes étapes de prolifération de la suspension cellulaire des cultivars de Tegaza, Takerbucht et Deglet-Nour, nous avons établi une courbe de croissance et en fonction du poids frais des suspensions cellulaires, nous avons pris des mesures au cours des repiquages (Tableau 6).

Tableau 6 : Variation du poids frais des suspensions cellulaires en fonction du repiquage.

Semaines	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
DN_1	2	6	8	10	12	13,90	14	13,5	13,8	14
TKB_8	2	6	9	12	14	15,66	15,9	16	16.25	17
Tgz_1	2	5	9	9,5	12	12,94	13	13.5	14	15

La figure 13 montre des courbes de croissance de suspension cellulaire de trois souches DN_1 , TKB_8 et Tgz_1 qui se traduit essentiellement par trois phases :

- La phase de latence: celle-ci n'est pas observable en raison du temps de repiquage.
- La phase exponentielle de croissance: comprise entre la 1^{ère} et 5^{ème} subculture ou la multiplication cellulaire est à son maximum.
- La phase stationnaire : débute à partir de la 5^{ème} semaine pour le cultivar Tegaza, et pour les cultivars Takarbucht et Deglet-Nour à partir de la 6^{ème} subculture. A ce stade la croissance apparait nulle, cela est dû à une perte d'activité ou le taux de multiplication équivaut à celui de la mortalité.

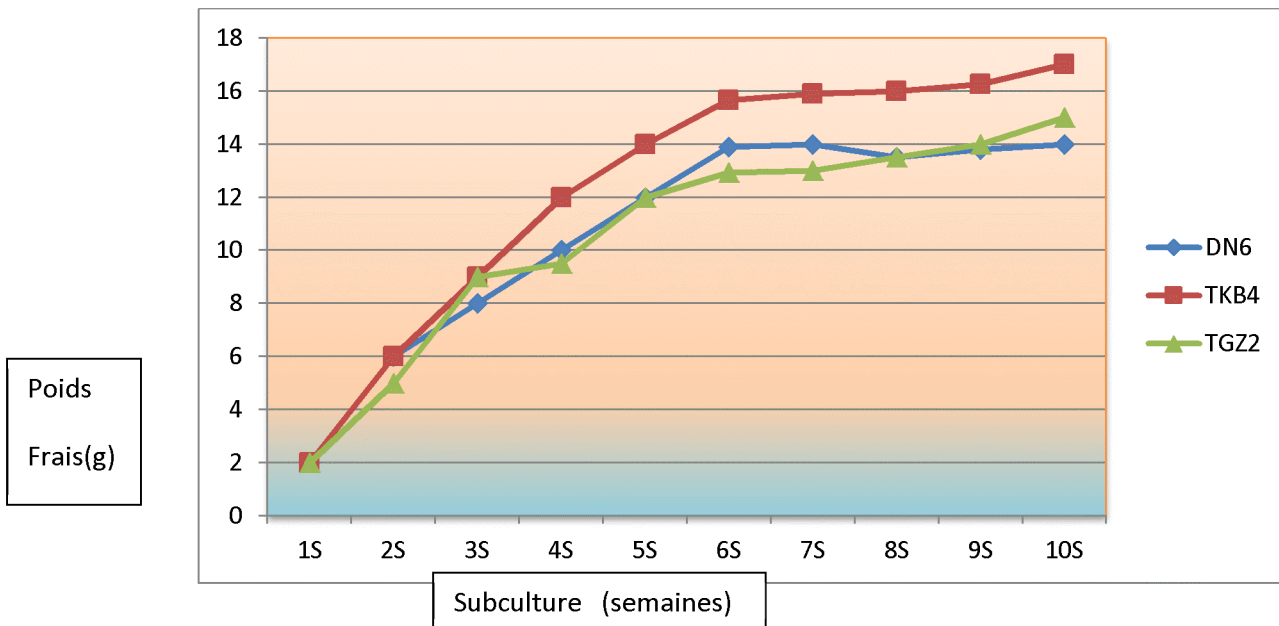


Figure 13: Courbe de croissance de la suspension cellulaire des cultivars Tegaza, Takerbucht et Deglet-Nour.

Nous notons également que les suspensions cellulaires du cultivar Takerbucht présente une plus forte prolifération par rapport à celles de Tegaza et Deglet-Nour. Nous observons qu'après la 5^{ème} semaine, le poids frais de la suspension cellulaire est multiplié par 7 chez le cultivar Takerbucht, et 5 chez le cultivar Tegaza et Deglet-Nour.

1.1.3. Les observations microscopiques

En premier lieu, nous observons que cette suspension est granulaire fine de couleur jaunâtre (Figure 14). Examinée directement sous microscope avec camera intégrée, cette suspension montre de rares cellules isolées vacuolisées. Ces cellules sont généralement allongées, en forme de « banane » (Figure 14 C). On observe aussi un grand nombre de massifs cellulaires de taille variable formés de petites cellules isodiamétriques à cytoplasme très denses et cohérentes. Ces cellules qui ont des caractères typiquement embryogènes (Figure 14 A et B) sont toujours agrégées en colonies compactes. Ces agrégats se multiplient en formant à leur périphérie des petits bourgeonnements capables de s'individualiser, puis de croître en produisant à leur tour d'autres bourgeonnements (Figure. 14 A et B).

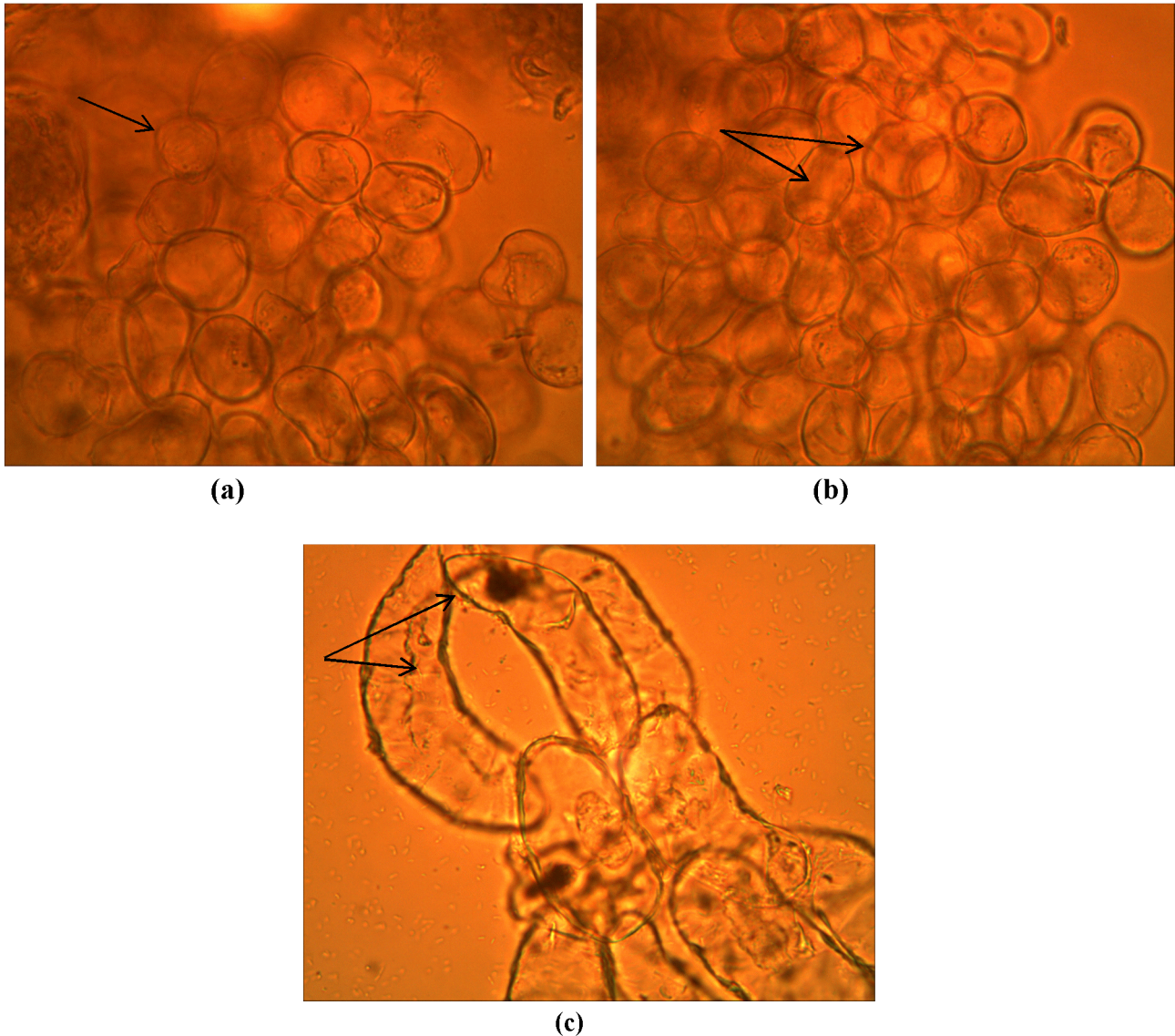


Figure 14 : Type de cellules retrouvées dans la suspension cellulaire (GX40).

A et B : Cellules embryogènes. **C** : Cellules vacuolisées allongées, en forme de « banane ».

1.1.4. Mesure de la viabilité par la coloration à la Fluorescéine Di Acétate (FDA)

Les tests de viabilité par la coloration au FDA reposent sur la détection de l'activité estérase spécifiquement présente dans les cellules vivantes. Le FDA pénètre dans la cellule, les résidus acétates sont coupés par l'activité estérase et la fluorescéine est libérée, conférant aux cellules vivantes une coloration verte sous excitation bleue.

L'observation microscopique des suspensions cellulaires par l'ajout du FDA sous microscope avec camera intégrée, montre des massifs cellulaires de taille variable forme de

cellules isodiamétriques (Figure 15), on observe aussi des cellules isolées de forme allongée non amyliées (Figure 15).

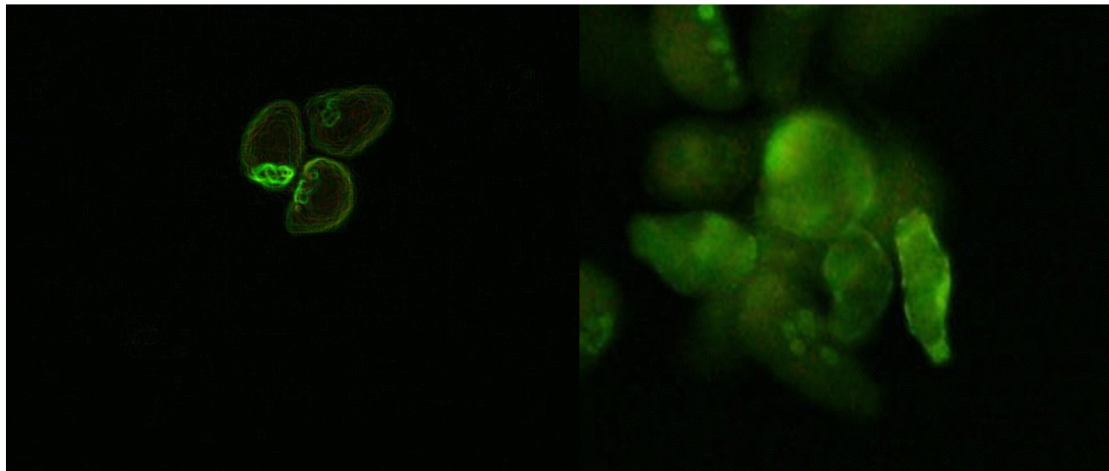


Figure 15 : Different Type de cellules colorees par la Fluorescéine Di Acétate (FDA) avec le microscope a camera intégrée (G×40).

2. Discussion

La bonne qualité des cals de départ est la première garantie pour la croissance et l'évolution des suspensions. Au cours de notre expérimentation, nous avons observé des cals de texture plus ou moins compacte, qui ont donné naissance à des agrégats de cellules amylières capables de se diviser, mêlées à des cellules allongées non amylières. Notons que 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 trois cultivars. Ces observations concordent avec celles de (Fki et *al.*, 2003);(Sane et *al.*, 2006);(Chabane et *al.*, 2007); (Yatta et *al.*, 2013) chez d'autre cultivars. On a constaté qu'après sept semaines de culture dans un milieu liquide (P₅) les cals embryogènes se sont multipliées, la capacité de multiplication varie selon le type du cultivar dont le taux de multiplication était de 7 fois chez le cultivar Takerbucht, et de 5 fois chez le cultivar Tegeza et Deglet-Nour. Ce résultat est constaté par Yatta et *al.*, 2006 et Yatta 2007 qui ont obtenu un taux de multiplication des cals après 6 mois de subculture, de vingt-neuf fois dans le milieu M₁₀₀ et de trente-quatre fois dans le milieu P_{12,5}. La mutiplication des cals est différente suivant le cultivar et le milieu de culture. Plusieurs auteurs ont remarqué cette spécifité de comportement en culture in-vitro (Mater, 1986 ; Daguin et Letouzé, 1988 ; Saka et *al.*, 1997 ; Abed et *al.*, 2006 ; Yatta et *al.*, 2006).

Le suivi de la croissance cellulaire est arrêté après dix semaines de culture. Ce résultat concorde avec ceux de Fki et *al.*, 2003; Yatta et *al.*, 2013 et 2014. Après 3 mois à 4 mois de culture ces auteurs ont tracé des courbes de croissance pour déterminer les paramètres essentiels de la croissance de suspension 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.

Les suspensions cellulaires en milieu liquide furent l'objet d'une description précise pour la première fois dans le brevet déposé qu'est par l'entreprise Pfizer et Co, en 1956, sur l'obtention de suspensions cellulaires végétales à partir de différents types d'explants et de différentes espèces. Pour maintenir une suspension cellulaire, plusieurs facteurs entrent en jeu dont la nature du génotype testé, le temps de repiquage et la nature du cal de départ. La compétence morphogène des suspensions diminue habituellement après une période prolongée de subcultures successives (Abe, et Futsuhara, 1991), dans notre étude nous l'avons observé à partir de la 7^{ème} semaine ou débute la phase stationnaire de même elle nous a permis de déterminer une phase exponentielle de croissance et de la localiser dans le temps; de suivre la croissance des cultures et d'établir des suspensions cellulaires et de les maintenir en culture.

La température d'incubation des tissus dans le milieu conditionne le maintien de la suspension cellulaire. 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. Les cellules demeurent petites et rondes et conservent leurs propriétés embryogènes, ce qui est de la plus grande importance pour le maintien de leur capacité de régénération (Panis et Swennen R., 2003).

L'une des étapes cruciales pour l'obtention d'une suspension cellulaire stable chez le palmier dattier est le temps de repiquage. Lors de notre expérimentation nous avons constaté que la suspension repiquée une fois par mois, les agrégats blancs de cellules produites paraissent bruns, le milieu brunit par la libération des polyphénols, la croissance de la suspension est plus lente, par rapport à celles repiquées chaque deux semaines. Ces dernières montrent une croissance rapide et conservent une couleur blanche.

La maintenance du stock de culture peut être assurée par un repiquage régulier d'une culture de prolifération sur un milieu frais. Ce mode de maintenance impliquant des subcultures fréquentes au désavantage d'être laborieux et peut entraîner à un grand risque de variation somaclonale Lakrin et *al.*, (1981), Scowcroft et *al.*, (1987), Hannelore Strosse et *al.*, (2003) ont démontré la conséquence de cette variation somaclonale son incidence sur le matériel est si élevée qu'elle peut devenir un obstacle sur la régénération ultérieure des plantes.

Pour réduire les problèmes liés aux repiquages, un protocole de cryoconservation a été développé afin de stocker les suspensions durant une période infinie (Panis et Thinh, 2001).

L'établissement de la suspension cellulaire à partir des cals friables nécessite une longue période pour la dissociation des cals et le degré de multiplication des agrégats cellulaires élevé. La suspension cellulaire âgée de 6 à 7 semaines peut être le matériel de base pour l'isolement des protoplastes. Ces résultats concordent avec ceux obtenus par Chabane et *al.*, (2007) Yatta et *al.*, (2009). Le rapport volume cytoplasme /volume noyau nous renseigne sur l'âge des cellules. En effet, chez les cellules arrondies la présence de noyau volumineux dénote leur état juvénile

tandis que pour les cellules allongées la petite taille du noyaux et le volume important du cytoplasme indique qu'elles sont plus âgées (Panis *et al.*, 1993).

D'après Georges *et al.*, 2002, La qualité d'une suspension cellulaire diminue avec le nombre de repiquage. Ceci se traduit par un risque plus élevé de contaminations et une diminution de taux de croissance et du potentiel de régénération, en raison, par exemple, de la prédominance de cellules denses riches en amidon dont la croissance est rapide.

La suspension cellulaire est le matériel nécessaire pour la biotechnologie de la plupart des monocotylédones. Elle a servi à l'obtention des protoplastes avec succès chez de nombreuses plantes en particulier le bananier (Megia *et al.*, 1992 ; Assani *et al.*, 2005) , ainsi, elle est très utilisée en culture *in vitro* du palmier pour l'isolement des protoplastes. Certains auteurs (Assani *et al.*, 2005), (Chabane *et al.*, 2007), (Yatta *et al.*, 2012), (Yatta *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.

2. Résultats de l'isolement des protoplastes

Le terme protoplaste désigne la partie de la cellule qui se trouve entourée par la paroi pectocellulosique et que l'on peut plasmolyser et isoler par de moyens mécaniques ou enzymatiques. L'absence de la paroi cellulaire dans les protoplastes est le motif essentiel dans leur emploi comme modèle et outil de travail en amélioration génétique des plantes. Le succès de l'isolement des protoplastes dépend spécialement des conditions de culture des tissus et de la combinaison des enzymes utilisées.

Le but de notre étude est de déterminer les meilleures conditions en terme de solution enzymatique et de condition d'incubation pour l'isolement de protoplastes à partir de suspensions cellulaires âgées de trois semaines à sept semaines. Le cal friable et les suspensions cellulaires constituent le matériel de choix pour l'isolement de protoplastes chez les monocotylédones comme chez le bananier (Assani *et al.*, 2002).

2.1. Source du matériel végétal

L'obtention d'un meilleur rendement et d'un plus grand pourcentage de viabilité chez les prtoplastes est liée au matériel végétal utilisé et les conditions, dans lesquelles il a été entretenu. L'importance de ces derniers (l'âge, la nature du matériel, son stade de développement et sa vitesse de croissance) joue un rôle très important dans l'isolement de protoplastes.

2.2. Effet de la solution enzymatique

L'obtention de protoplaste nécessite l'élimination des parois pectocellulosique tout en préservant l'intégrité de la cellule. Cet objectif ne sera atteint qu'en optimisant les choix des enzymes et leurs concentrations. La paroi des cellules végétales est divisée en trois composantes structurellement et fonctionnellement indépendantes : la lamelle mitoyenne (formée

principalement de pectines), la paroi primaire (formée de pectines et de celluloses) et la paroi secondaire (formée de cellulose) (Noat *et al.*, 1996). La complexité de la structure de la paroi végétale et la multiplicité des liaisons covalentes qu'il faut rompre pour libérer le protoplaste, rendent souvent difficile l'optimisation des combinaisons d'enzymes aptes à la dégrader.

Afin de produire des protoplastes à partir de suspension cellulaire ou de cal friable nous avons déterminé deux différentes combinaisons d'enzymes; Cellulase RS, Pectolyase Y-23, Hémicellulase, et Pectinase à différentes concentrations.

2.3. Effet des conditions d'incubation

En vue d'avoir une meilleur rentabilité en protoplastes et avoir un meilleur taux de viabilité, nous avons entrepris d'étudier l'effet et l'influence de certains facteurs de l'environnement physique notamment l'agitation et le temps d'incubation.

2.3.1. Effet de l'agitation

L'agitation joue un rôle très important et influence de manière très forte sur le rendement en protoplaste et ceci quel que soit la nature et la concentration de la solution enzymatique et le temps d'incubation.

Des incubations à l'état agité ou non ont été conduites aux fréquences de va et vient suivant : 0,50 100 tours/minutes. Il ressort qu'une forte agitation conduit à un éclatement des protoplastes libérés. En effet, leur sensibilité à l'égard de l'agitation est telle qu'à partir de 100 tour/minutes, on observe pratiquement plus de protoplastes intacts et structurés à cause de la forte pression de l'agitation.

2.3.2 Effet de temps d'incubation

Le temps d'incubation des tissus dans un milieu enzymatique conditionne le rendement en protoplastes.

Dans notre cas l'influence de la durée d'incubation est en fonction de la solution enzymatique utilisée, pour la première solution enzymatique SE1 (Cellulase RS 1,5%, Pectolyase Y-23 0,5% et Hémicellulase 2%) la réponse optimal est obtenue après un temps d'incubation de 21h. En ce qui concerne la solution enzymatique ES2 (Hémicellulase 3% et Pectinase 2%) il s'avère que la réponse optimale est obtenue après une durée d'incubation de 36h.

2.4. Variation du rendement des protoplastes

Au cours de notre expérimentation nous avons constaté que le rendement en protoplaste varie en fonction du cultivar, de la solution enzymatique employée ainsi que les conditions d'incubation mais surtout du matériel de base utilisé.

L'analyse du tableau 7 a permis de constater que les meilleurs rendements sont obtenus chez le cultivar Deglet Nour aussi bien chez les suspensions cellulaires que les cals par rapport au cultivar Takerbucht.

Tableau 7: Influence du génotype, du matériel de base et de la solution enzymatique sur le rendement en protoplastes ($\times 10^5$) chez Deglet-Nour ; Takerbucht et Tegaza.

Génotype	Matériel de base	SE1	SE2
DegletNour	Cals friables	$3,9 \times 10^5$	$0,70 \times 10^5$
	Suspension cellulaire	$5,2 \times 10^5$	$2,80 \times 10^5$
Takerbucht	Cals friables	$3,1 \times 10^5$	$0,62 \times 10^5$
	Suspension cellulaire	5×10^5	$2,20 \times 10^5$
Tegaza	Cals friables	$3,2 \times 10^5$	$0,70 \times 10^5$
	Suspension cellulaire	5×10^5	$2,30 \times 10^5$

En ce qui concerne l'influence du matériel de base (suspension cellulaire, cal friable) sur le rendement en protoplastes, le rendement le plus élevé a été obtenu chez les suspensions cellulaires, soit $5,2 \times 10^5$ par gramme de cellule chez le génotype Deglet Nour, de même pour les génotypes Takerbucht et Tegaza, un haut rendement en protoplastes a été obtenu avec les suspensions cellulaires à savoir 5×10^5 par gramme de cellule. Nous notons aussi un fort taux de protoplastes chez les cals friables, il est de $3,9 \times 10^5$ par gramme de cal chez Deglet-Nour, $3,1 \times 10^5$ par gramme de cal chez le cultivar Takerbucht et $3,2 \times 10^5$ chez le Tegaza.

Cependant, en ce qui concerne l'influence de la solution enzymatique sur le matériel de base chez les trois génotypes, nous constatons un rendement plus élevé en protoplastes avec la solution enzymatique ES1. La combinaison enzymatique qui s'est révélée la plus efficace pour l'isolement d'un nombre important de protoplastes que ce soit avec la suspension cellulaire ou bien les cals fiables des deux cultivars est la solution contenant 1,5% de Cellulase RS, 0,5% de Pectolyase Y-23 et 2% d'Hémicellulase. Les rendements respectifs obtenus chez les suspensions cellulaires sont de $5,2 \times 10^5$ protoplaste chez Deglet Nour et de 5×10^5 protoplaste chez Takerbucht et Tegaza.

En ce qui concerne la solution enzymatique ES2 qui est composée de 3% Hémicellulase et 2% de Pectinase, le taux de protoplastes obtenu est faible chez les trois génotypes car il y'a absence de cellulase.

Concernant la durée de l'incubation de la macération enzymatique, il s'avère que chaque solution a une réponse optimale avec une durée d'incubation spécifique pour chaque solution pour la première solution enzymatique SE1 est de 21h. Cependant la deuxième solution enzymatique ES2 le meilleur temps d'incubation de la macération est de 36h. Le nombre de protoplastes libérés diminue en fonction du temps chez la solution enzymatique SE1 par contre chez la solution enzymatique ES2 le nombre de protoplastes libérés augmente en fonction du temps.

2.5. Purification

A la fin de la macération, après une dissociation mécanique ménagée la suspension composée de protoplastes et de débris cellulaires est tamisée successivement sur des filtres dont les mailles mesurent 80µm, dans le but d'éliminer les gros débris et ne laisser passer que les protoplastes.

Le filtrat obtenue est rincé par une solution de rinçage ($CaCl_2$ - Mannitol). Après la centrifugation à 50g pendant 5min, le culot est mis dans une solution contenant le saccharose à 21%, pour l'élimination des débris qui sont plus denses que le saccharose et qui sédimentent au fond du tube. Une autre centrifugation est effectuée pour accélérer la formation du ménisque de protoplastes purifiés à la surface de la solution de saccharose.

2.6. Observation des protoplastes

Au cours de la digestion dans le milieu concentré en Mannitol, les cellules se plasmolysent. Puis les parois sont progressivement digérées. Les protoplastes se détachent du tissu et sont libérés dans le milieu. En absence de tout reste de paroi, ils prennent une forme absolument sphérique, de tailles différentes avec un rendement variable d'un génotype à un autre et d'un matériel de base à un autre.

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

La suspension cellulaire de Deglet Nour a donné plus de protoplastes de petite taille avec un cytoplasme dense. On note aussi que les protoplastes du cultivar Tegaza ont le plus souvent une taille plus grande et un cytoplasme plus vacuolisé. Par contre celle du cultivar Takerbucht font apparaître les deux types. Une quantité importante de protoplastes est observée chez le cultivar Takerbucht (Figure16).

Il paraît donc que la morphologie des protoplastes dépend du génotype. Notons qu'à l'exception des tailles qui diffèrent, les protoplastes isolés sont caractérisés par des couleurs

différentes, les protoplastes du cultivar Deglet Nour sont de couleur jaune pâle par rapport à ceux du cultivar Takerbucht, qui sont de couleur marron foncé.

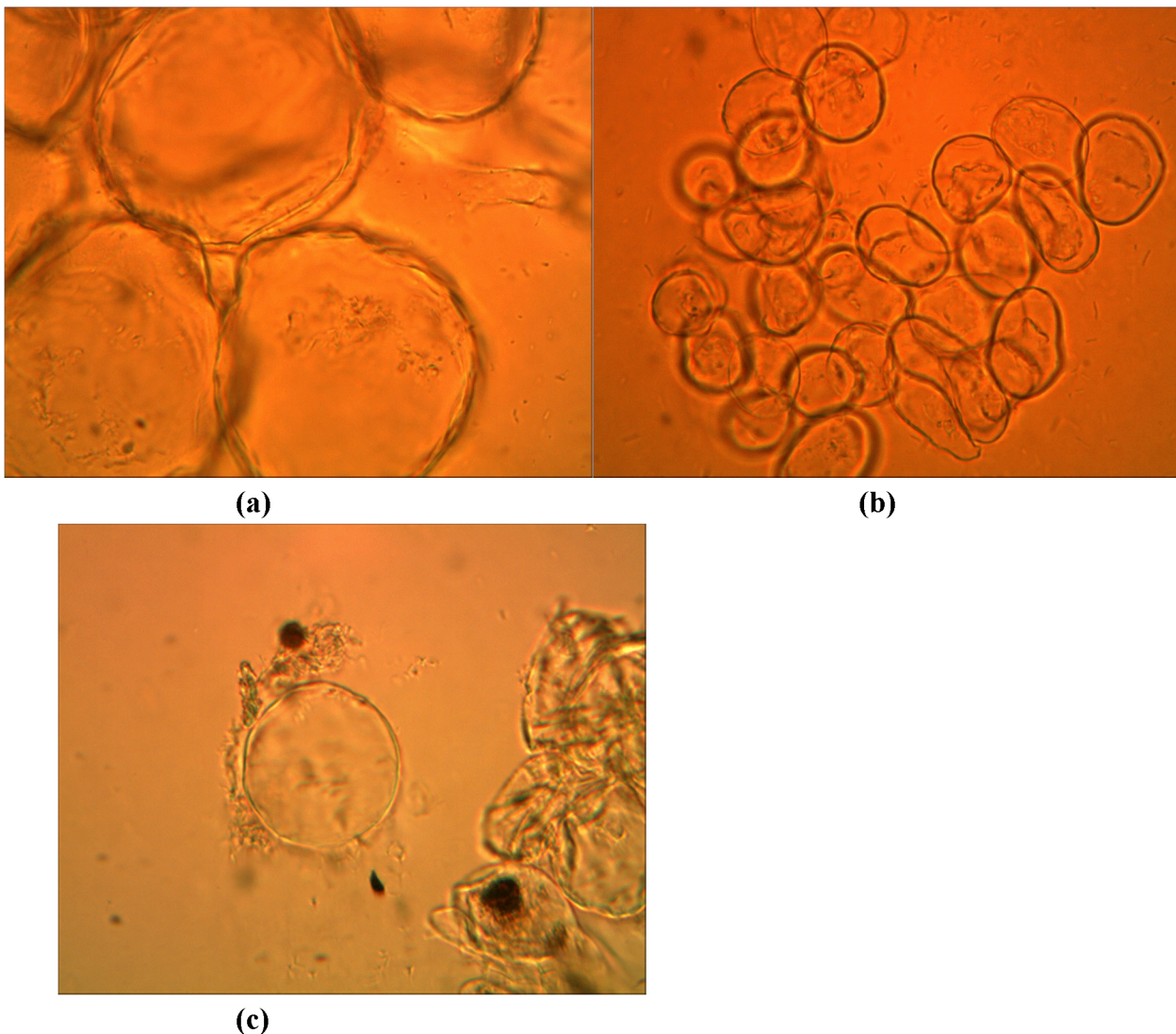


Figure 16 : Suspension de protoplastes chez les cultivars Deglet-Nour, Takerboucht et Tegaza (Gx40).

2.7. Culture de protoplaste

La culture de protoplastes nécessite un milieu qui va stimuler la division cellulaire et la régénération de la paroi pectocelulosique, chez plusieurs espèces dicotylédones le développement des protoplastes est assuré dans un milieu liquide (Ellouz, 1995) par contre chez les monocotylédones cette méthode n'a pas permis la régénération des protoplastes. La culture des protoplastes issus de chaque cultivar indépendamment les uns des autres sur la couche nourrice permet la régénération de leur paroi dès 24h de culture.

La composition de la couche nourrice est identique au milieu de culture de la suspension cellulaire source de protoplastes à base de MS, mais elle est solidifiée avec 2g de phytigel, elle

contient également des cals embryogènes. Les protoplastes régénèrent leur paroi sur la couche nourrice.

Au cours de la formation de la paroi, les cellules perdent la forme sphérique et deviennent ovales. Après trois à 4 jours de culture sur couche nourrice la paroi cellulaire est formée et les divisions cellulaires sont intenses de ce fait elles engendrent des micro-cals qui donneront ensuite de gros cals (Figure 17).

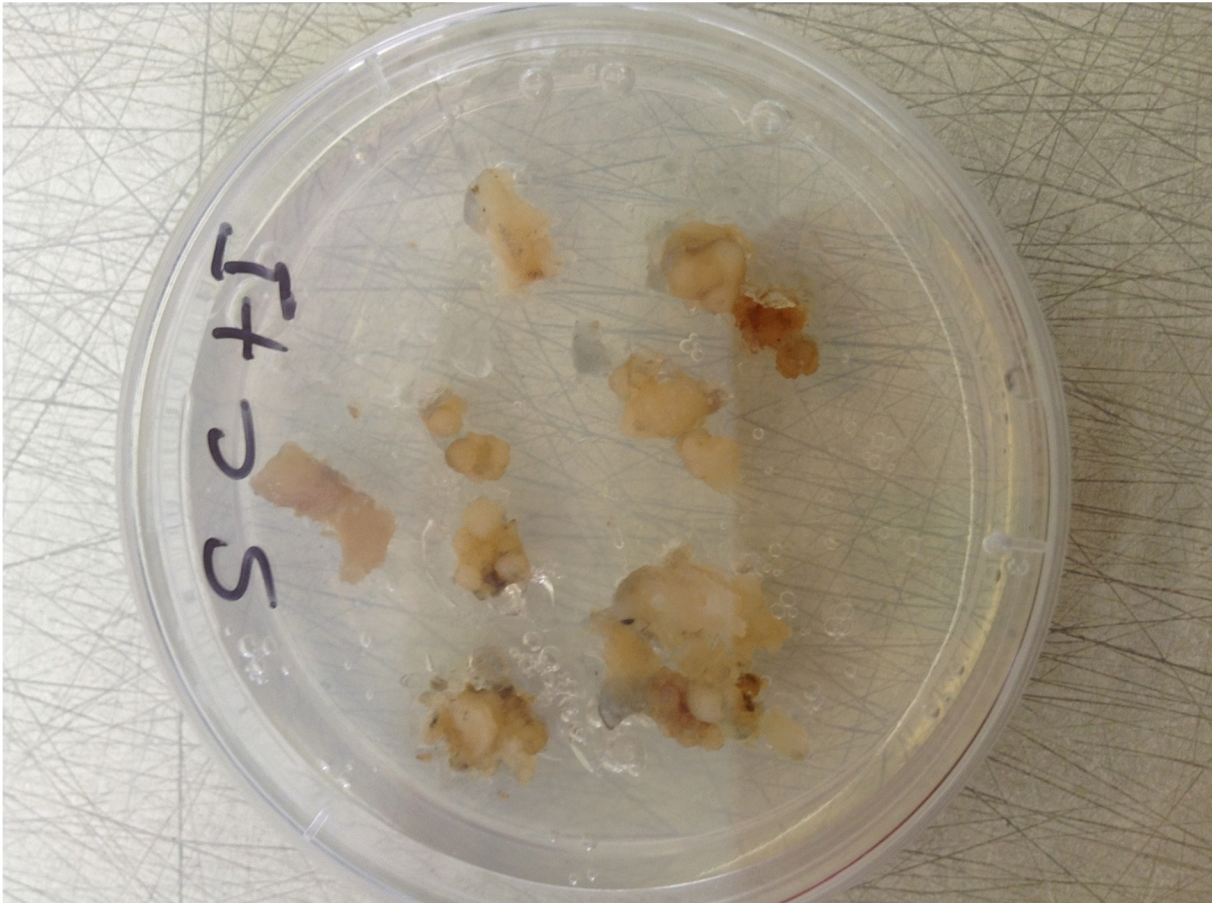


Figure 17: Cals issus de la culture de protoplastes sur couche nourrice.

2.8. Fusion de protoplaste

Dans notre expérimentation, nous avons utilisé la méthode chimique au PEG pour réaliser la fusion de protoplastes des trois cultivars du palmier dattier (*Phoenix dactylifera* L.). Nous avons effectué les hétéro-fusions suivantes :

- DegletNour x Takerbucht issue de la suspension.
- Tegaza x Takerbucht issue de la suspension.

En présence de la solution de PEG, les protoplastes s'attirent et se déplacent les uns vers les autres puis s'agglutinent avant de se fusionner deux par deux ou en groupe (Figure 18 : a, b, c

et d). Le PEG provoque une adhérence mutuelle et une agglutination de ces protoplastes ; qui s'accolent et fusionnent.

Grace au microscope à camera intégrée, nous avons suivi la fusion de deux protoplastes. Le temps nécessaires pour observer les fusions peuvent durer quelques minutes voire à une demi-heure (Figure18).

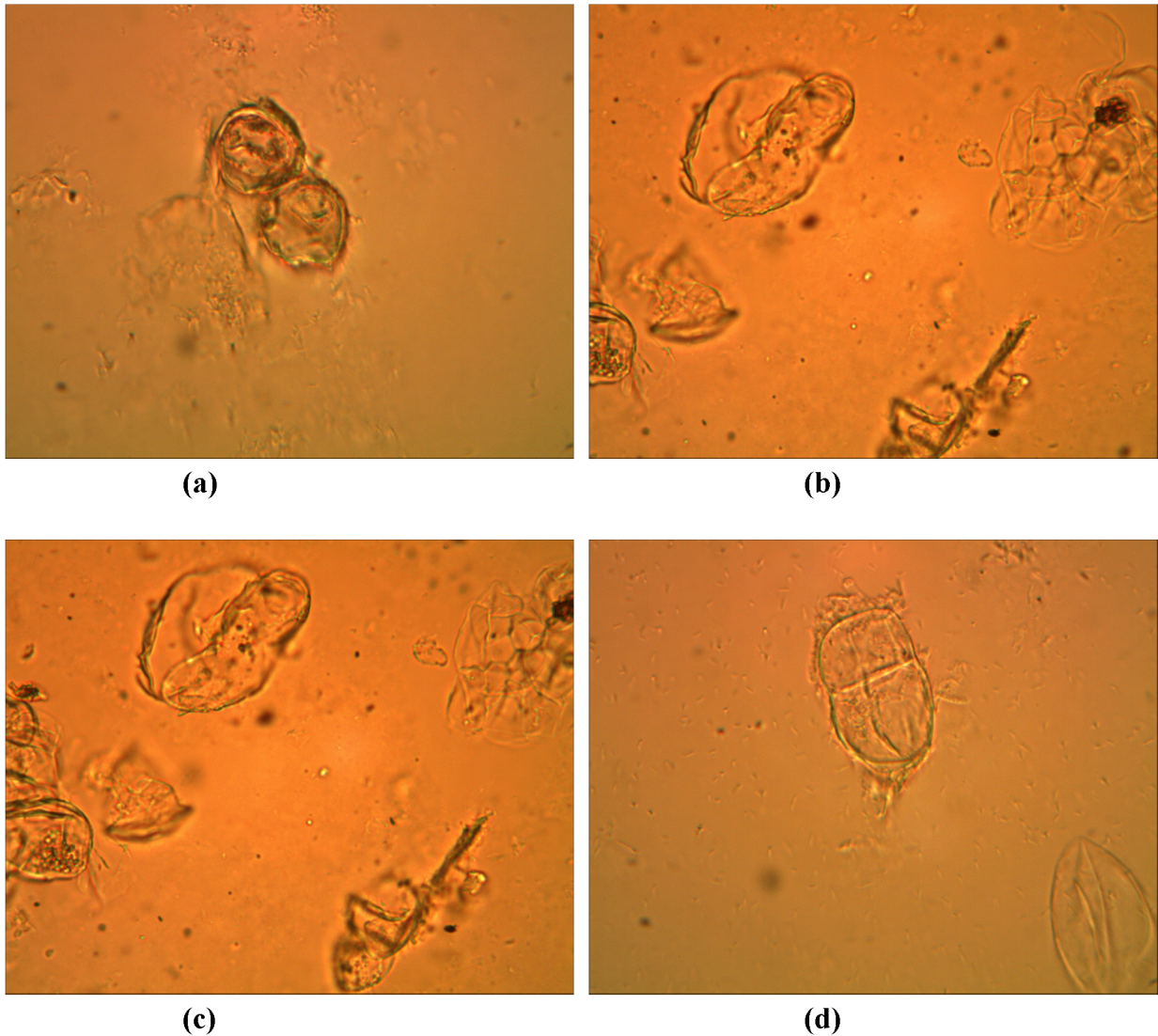


Figure 18 : Fusion de protoplastes chez le palmier dattier.

(a) : Deux protoplastes qui s'attirent. **(b) et (c)** : Pénétration de l'un des deux protoplastes dans l'autre. **(d)** : Deux protoplastes fusionnés.

3. Discussion

Dans le but d'isoler des protoplastes à partir de suspensions cellulaires et de cals friables, nous avons essayé de déterminer les combinaisons optimales d'enzymes (Cellulase, Pectolyase Y23, Hémicellulase et Pectinase) et les conditions expérimentales optimales (temps, agitation), afin d'obtenir un meilleur rendement et un plus grand pourcentage de viabilité en protoplastes.

L'isolement de protoplastes a été réalisé à partir de cals de texture friable ainsi que de jeunes suspensions cellulaires âgées de trois semaines à sept semaines maintenues en milieu liquide agité. Le type du matériel d'origine des protoplastes est crucial pour l'organogenèse et l'embryogenèse somatique. Les tissus de cal contiennent moins de cellules embryogènes ou d'agrégats de cellules par rapport aux suspensions cellulaires (Assani *et al.*, 2006).

Nos résultats montrent que le rendement en protoplastes dépend du matériel végétal utilisé. Lorsque les suspensions cellulaires sont utilisées comme source d'isolement de protoplastes le rendement est élevé. Par contre, ce rendement est faible quand les protoplastes sont issus de cal. Ce résultat est en accord avec les travaux réalisés chez le bananier par plusieurs chercheurs cités par Haïcour *et al.*, (2004) et Guedira, (2006). Dans le cas du matériel végétal récalcitrant (arbres, monocotylédones), les suspensions cellulaires constituent le matériel idéal pour l'obtention de protoplastes (Brent et Mc Cown, 1988 ; Haïcour *et al.*, 2002) ceci a été démontré chez plusieurs espèces comme le Riz (Datta *et al.*, 1992 ; Jain *et al.*, 1995), le Maïs (Prioli et Söndahl, 1989) le Blé (Vasil *et al.*, 1990) et l'Orge (Funatsuki *et al.*, 1992).

La pureté des enzymes représente un facteur important à prendre en compte dans l'isolement des protoplastes pour éviter d'altérer la cellule et plus particulièrement le plasmalemme (Pilet, 1972 ; Patnaik *et al.*, 1982 ; Bengochea et Dodds, 1986; chabane *et al.*, 1997. yatta *et al.*, 2013) afin de maintenir la viabilité des protoplastes, leur capacité à synthétiser une paroi et à entrer en division, une fois mis sur milieu de culture approprié (Imbrie-Milligan et Hodges, 1986 ; Dugas *et al.*, 1989 ; Shea *et al.*, 1989; Zhang *et al.*, 2011; Mohan Jain, 2011; Mohan Jain, 2012). Certains auteurs recommandent d'utiliser le minimum de solution enzymatique pour l'isolement de protoplastes d'une part en raison de leur coût très élevé, afin de minimiser les effets qui pouvant être nocifs de part certains composants qui leur sont associés (cocking, 1972 ; Mohan Jain *et al.*, 1988; Mohan Jain, 2012).

L'utilisation d'une cellulase associée à une pectinase est indispensable pour obtenir un meilleur rendement en protoplastes. L'absence ou une faible dose de cellulase ne donne pas un nombre important de protoplastes.

De ce fait le meilleur rendement est obtenu avec la solution enzymatique ES1 (Cellulase 1%, Pectolyase Y23 0,5%, Hémicellulase 2%). Ces différentes concentrations ont permis l'obtention d'un bon rendement chez le palmier dattier (Aida A. *et al.*, 2007, Yatta *et al.*, 2013) ainsi que chez d'autres monocotylédones comme le maïs (Prioli et sondahl, 1989), le blé (Vasil *et al.*, 1990) à partir de suspensions cellulaires, et aussi chez le bananier en utilisant la graine des jeunes feuilles de plantes *in vitro* (Guedira, 2006).

Concernant la solution enzymatique ES2 qui est constituée de 2% Pectinase et de 3% d'Hémicellulase le rendement en protoplastes est beaucoup moins important que celui obtenu avec la solution enzymatique ES1 constituée de 1% Cellulase, Pectolyase Y23 0,5%, et 2% Hémicellulase la différence de rendement est due à l'absence de cellulase. En effet ces résultats sont en concordance, avec les travaux réalisés sur les protoplastes du palmier dattier (Yatta et Fergani 2007 ; Rizkalla et al., 2007 ; Chabane et al., 2007 ; Yatta et al., 2009) et qui ont obtenu un rendement élevé en protoplastes grâce à la combinaison de trois enzymes. De même les travaux réalisés par Assani et al., (b) 2001 sur la régénération de protoplastes du bananier où ils ont utilisé une concentration de cellulase de 1,5% et 1% aboutissant à un meilleur rendement.

De ce fait une faible concentration de la Cellulase (moins de 1%) où son absence ne permet pas la libération d'un nombre élevé de protoplastes (Haïcour et al., 2004, Zhu et al., 2005, Khatri et al., 2004). Ceci également confirme nos résultats obtenus avec la combinaison de Hémicellulase 3% et Pictinase 2% (SE2), dont le rendement est moins important que celui obtenu avec 1,5% de Cellulase (SE1), et ceux des travaux effectués par Bassiro et Nassirou, 2010, ayant utilisé des solutions en absence de la Cellulase, le résultat s'est avéré qu'il n'y a pas eu de libération de protoplastes.

Lorsque la concentration de cellulase est supérieur à 2%, ceci peut provoquer la digestion du matériel végétal de départ (Koster et al., 2003; Monteiro et al., 2003; Haïcour et al., 2004, Guedira, 2006). Cette hypothèse peut être soutenue en la rapprochant aux travaux réalisés par Aida A. et al., 2007, au cours desquels l'utilisation de cellulase à 4% dans cinq essais, n'ont donné qu'un seul meilleur résultat.

Dans notre étude nous avons abouti à un meilleur rendement avec la solution SE2 (Hémicellulase 3%, Pectinase 2%) après 36h d'incubation, plus le temps d'incubation est long plus on obtient plus de rendement avec l'Hémicellulase. Alors que avec la solution enzymatique SE1 (Cellulase 1%, Pectolyase Y23 0,5%, Hémicellulase 2%) le rendement optimal est obtenu après 21h. Au-delà de ce temps les protoplastes éclatent et s'abiment. Aida. et al., 2007 ont abouti à un meilleur résultat avec 4% de Cellulase, 2% de Pectinase et 1% d'Hémicellulase après 48 heures d'incubation.

Lors de notre expérimentation nous avons testé l'effet de l'agitation (avec et sans agitation) sur le rendement des protoplastes. En effet les meilleurs rendements sont obtenus dans les milieux non agités, ceci est en accord avec ceux trouvés par Aida et al., 2007 qui ont pu isoler $4,53.10^5$ à $6,4.10^5$ Protoplastes par gramme de poids frais de mésophylles de deux cultivars de palmier dattier (Barhee et Zaghoul) sans agitation après 48 heures. Assani et al., ont pu obtenir chez le bananier des rendements pouvant atteindre 23.10^6 Protoplastes/ml de suspension cellulaire à 0 rpm. Quant au milieu agité nous avons obtenu des rendements faibles ou pratiquement nuls en protoplastes. Ces taux nuls de protoplastes résultent de l'éclatement des protoplastes sous l'effet de la pression. Ceci est en accord avec Haïcour et al., 2004, Aida A. et al., 2007. Nous déduisons aussi que, quelque soit la nature et la concentration de la solution

enzymatique et du temps d'incubation, il n'y a pas de libération des protoplastes sur une forte agitation.

A travers ce travail nous avons constaté que le génotype influence sur le rendement en protoplastes, en effet les plus hauts rendements de protoplastes sont obtenus à partir de cals friables et de suspensions cellulaires issues de cultivars Deglet Nour et ceci quelque soit la solution enzymatique utilisée. Ces résultats sont en accord avec ceux obtenus par Si-Dehbi et *al.*, (2013).

Notre étude a permis la production de protoplastes viables de formes arrondie de taille variable. Ceci est en accord avec Chabane et *al.*, 2006; Chabane, 2007qwx; Yatta et *al.*, 2013).

Conclusion

Le palmier dattier *Phoenix dactylifera* L est une espèce dioïque considérée comme une culture majeure dans les régions arides et semi-arides du Proche Orient et de l'Afrique du Nord. Notamment en Algérie, où la phoeniculture est une composante primordiale de l'agriculture nationale. Néanmoins cette culture est fragilisée par le vieillissement, la culture monovariétale ainsi que d'autres maladies dont la plus redoutable est le bayoud causé par un champignon vivant dans le sol *Fusarium oxysporum* fs *palbedinis*. Pour pallier à ces différentes menaces, il est important d'accélérer les programmes d'amélioration génétique.

D'après Michaux-Ferrière et al., (1987), l'utilisation de l'outil biotechnologique fondé sur les techniques de culture *in vitro* par embryogenèse somatique constitue sans doute le moyen le plus promoteur pour la reconstitution des palmeraies via une multiplication massive du palmier dattier.

Dans ce travail, nous avons fixé comme objectif la mise au point de la suspension cellulaire ainsi que l'isolement de protoplastes à partir de cals embryogènes de palmier dattier en vue d'obtenir des plantes résistantes au bayoud ayant une bonne qualité dattière.

Nous avons étudié, dans la première partie l'établissement des suspensions cellulaires à partir de cals embryogènes chez les trois cultivars de palmier dattier (Deglet Nour et Tegeza sensibles au bayoud et de bonne qualité dattière et Takerbucht résistante à la fusariose et de qualité moyenne). Ces suspensions sont utilisées comme matériel de base pour l'isolement de protoplastes. 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.

Au cours de ce travail, nous avons entretenu les cals embryogènes des trois cultivars dans les deux milieux d'induction ($P_{12,5}$ et M_{100}). Les hormones de croissance utilisées dans ces milieux de culture, ont un effet important sur le maintien et la multiplication des cals.

Ces cals embryogènes sont ensuite employés pour établir les suspensions cellulaires. Les suspensions obtenues ont été multipliées pendant 5 à 6 semaines sans perdre leurs potentialités de régénération.

Les résultats obtenus chez les trois génotypes différents ont 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.

Nous avons comparé aussi la suspension que nous avons obtenue à celle décrite sur d'autres plantes monocotylédones. Il ressort que la multiplication d'amas embryogènes en suspension est un phénomène fréquemment rapporté dans la bibliographie mais la taille des agrégats cellulaires est plus grande que ceux que nous avons obtenus. Nos résultats sont similaires au bananier et au palmier à huile.

La taille des amas est variable selon les espèces étudiées et les conditions de culture de la suspension (fréquence de repiquage, mode d'agitation, milieu de culture).

Les suspensions cellulaires ont une dynamique de croissance conventionnelle qui se caractérise par trois phases : une phase de latence, une phase de croissance où bien exponentielle où la multiplication cellulaire est à son maximum et une phase stationnaire où le taux de multiplication équivaut à celui de la mortalité. La compétence morphogène des suspensions diminue habituellement après la 7^{ème} semaine prolongée de subcultures successives où débute la phase stationnaire. L'optimisation de ces paramètres est très bien maîtrisée au cours de ce travail, ce qui permettrait la réalisation d'une suspension de bonne qualité pouvant être utilisée dans la micropropagation par embryogénèse somatique et la callogénèse dans la production des protoplastes, pour les travaux de fusion de protoplaste et transformation génétique.

L'étude microscopique des suspensions cellulaires a révélé l'hétérogénéité du matériel composant les suspensions obtenues. Elles sont constituées de cellules isolées, de petits agrégats cellulaires non jointifs, d'agrégats de cellules isodiamétriques jointives à cytoplasme dense et de nodules. La présence dans les suspensions cellulaires de cellules à cytoplasme dense et non vacuolisées a permis d'avancer l'hypothèse qu'il s'agissait de cellules embryogènes. Ces suspensions cellulaires constituent un matériel de choix pour la culture des protoplastes et la manipulation génétique du palmier dattier en vue de la résistance au bayoud.

A travers ce travail, nous avons appliqué un protocole expérimental pour la production de protoplastes. De ce travail, il ressort que l'isolement et la purification des protoplastes à partir de la suspension cellulaire et de cals friables de géotypes Takerbucht, Tegaza et Deglet Nour sont possibles et relativement simples. Une multitude de facteurs de l'environnement physico-chimique (état préalable des cultures, nature et proportion des enzymes, agents plasmolysants, temps d'incubation) influencent d'une façon notable le taux et la qualité des protoplastes libérés. Cette étape détermine et conditionne l'ensemble des événements ultérieurs de nature physiologique (survie, formation de la paroi, division).

L'utilisation des suspensions cellulaires comme source de protoplastes nous a permis d'obtenir un meilleur rendement en protoplastes. En revanche, la suspension cellulaire des cultivars Deglet Nour libère plus de protoplastes que celles des géotypes Takerbucht et Tegeza. D'autre part, le rendement en protoplastes semble être lié à la composition de la solution enzymatique: la solution enzymatique constituée de 1.5% de Cellulase, 0.5 de Pectolyase Y23, 2% Hémicellulase, donne plus de protoplastes que la solution enzymatique qui contient 3% Hémicellulase et 2% Pectinase.

Nos travaux ont permis de révéler l'importance de la couche nourrice et son efficacité pour l'induction de l'activité mitotique des protoplastes. La couche nourrice paraît être un outil crucial pour la résolution des problèmes de régénération des protoplastes récalcitrants

(Horita et *al.*, 2002 ; Assani et *al.*, 2006 ; Komai et *al.*, 2006). Celle-ci permet l'obtention d'un nombre considérable de microcals.

Les protoplastes isolés sont cultivés sur des couches nourrices qui se développent en microcals après seulement 3 semaines, comme elles peuvent subir des fusions grâce à l'utilisation du polyéthylène glycol, qui est un composé chimique très efficace pour la fusion des protoplastes.

La culture de protoplastes et l'hybridation somatique constituent une voie prometteuse pour la création de variétés intéressantes chez le dattier. De ce fait, la maîtrise des différentes étapes de cette technique est l'objectif essentiel de nos travaux qui ont donc porté sur l'isolement, la culture de trois cultivars de palmier dattier Takerbucht Tegeza et Deglet Nour.

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

- ✓ Recherche de combinaisons hormonales actives sur les protoplastes capables d'induire des divisions et le développement de cals.
- ✓ Etude de fusion de protoplastes dans le but d'obtenir des embryogenèses somatiques de bonne qualité dattière et résistants au bayoud.
- ✓ Etude cytofluométrique pour déterminer le niveau diploïdie.
- ✓ Utilisation des marqueurs moléculaires pour déterminer le succès de l'hybridation somatique.

Références
Bibliographiques

- Abdullah, K., Muhammad, U.D., Imtiaz, A.K., Ghulam, S.N. (2010)** An efficient method of protoplast isolation in banana (*Musa spp*). Pak. J. Bot., 42(2): 1267-1271.
- Abe, T., Fustsuhara, Y., (1991).** Regeneration of rice plants from suspensions cultures, in Biotechnology in forestry and agriculture, vol 14, Rice (Bajaj, Y.P S., ed), Springer-Verlag, Heidelberg, pp 38-46.
- Aberlence-Bertossi, F. (2012).** La détermination du sexe du palmier dattier. Diade newsletters 3: 1-8.
- Abo El Nil, M. (1986).** Refining methods for date palm propagation. In second Symposium on date palm in Saudi Arabia. March 3-6.
- Absi, R. (2013).** Analyse de la diversité variétale du Palmier Dattier (*Phoenix dactylifera L.*) : Cas des Ziban (Region de Sidi Okba). En vue de l'obtention du diplôme de Magister en Sciences agronomiques .Université Mohamed Khider Biskra. P 105.
- Aida, A., Rizkalla, Awatef, M., Badr-Elden, Ahmed, A., Nower, A. (2007).** Protoplast Isolation, Salt Stress and Callus Formation of Two Date Palm Genotypes. Journal of Applied Sciences Research, 3(10): 1186-1194.
- Ait-Chitt, M. (1989).** Multiplication in vitro du palmier dattier par organogenèse (embranchement axillaire) : Problèmes rencontrés. FAO PNUD RABI 081024. INRA, Marrakech, 912 October 1989. 141p.
- Ammirato, P.V. (1978).** Somatic embryogenesis and plantlet development in suspension cultures of the medicinal yam, *Dioscorea floribunda*. Am. J. Bot. 65,89 p.
- Anjarne, M., Zaid, A. (1993).** Effet de certains équilibres hormonaux sur l'enracinement précoce des tissus de palmier dattier (*Phoenix dactylifera L.*) Al Awamia. 82: 197-210.
- Assani, A., Haicour, R., Wenzel, G., Côte, F.X., Bakry, F., Foroughi-Wehr, B., Ducreux, G., Aguillar, M.E. (2001).** Plant regeneration from protoplasts of dessert Banana cv. Grande naine (*Musa spp.*, Cavendish sub-group AAA) via somatic embryogenesis. Plant Cell Reports, 20: 482-488.
- 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.
- Assani, A., Chabane D., Haïcour, R., Bakry, F., Wenzel, G., Foroughi-Wehr, B. (2005).** Protoplast fusion in banana (*Musa spp.*): comparison of chemical (PEG: polyethylene glycol) and electrical procedure. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 145-151.
- Augé, R., et Boccon –Gibod, J. (1989).** La culture in vitro et ses applications horticoles .3^{ème} édition Revue .22 Technique et Documentation Lavoisier, 225p.
- Bakry, F. (1984b).** Choix du matériel à utiliser pour l'isolement des protoplastes du Bananier (*Musa spp.*), Musacées. Fruits, 39: 449-452.
- Banat, F., Al Ashed, S., Al Makhadmeh, L. (2003).** Evaluation of the use of the raw and activated date pits as potential adsorbents for containing waters. proc .Biochem.39:193-202.

- Barreveld, W.H. (1993).** Date palm products. FAO Agricultural Services Bulletin No. 101.
- Barrow, S. (1998).** A monograph of *Phoenix* L. (Palmae: *Coryphoideae*). *Kew bulletin* 53 : 513-575.
- Barton, R.L., Blake, J. (1989).** Date palm (*Phoenix dactylifera* L). In biotechnology in agriculture and forestry .BADJAJ, Y.P.S, ed. SpringerVerlag, Berlin, Heidelberg, vol.5:161-175.
- Bass, A., Hughes, W., (1984).** Conditions for isolation and regeneration of viable protoplasts of oilpalm (*Elaeis guineensis*). *Plant Cell Reports* 3, p. 169 - 171.
- Benchelah, A.C., Maka, M. (2008).** Les Dattes, intérêt et nutrition. *Phytothérapie (ethnobotanique)* Springer, vol N°6, pp. 117-121.
- Bengochea, T., Dodds, J.H. (1986).** Isolation, culture and regeneration of plants .In Brammar W.J., Edition M. (Eds). *Plant protoplasts: A biotechnological tool for plant improvement* London: CHAPMAN and HAL, p.1-43.
- Benkhalifa, A. (2006).** Un système d'information au service des ressources génétiques du palmier dattier et de la lutte contre la fusariose. *Journées Internationales sur la Désertification et le Développement Durable* .Biskra-10 et 12 Juin.
- Bezato, T.Z.F. (2013).** Les Palmiers Dattiers « *Phoenix dactylifera* » À Toliara : Étude de la filière, utilisation et diversité variétal. p 22 ; 23.
- Binding, H., Nehls, R., Schieder, O., Sopory, SK., Wenzel, G. (1978).** Regeneration of mesophyll protoplasts isolated from diploid clones of *Solanum tuberosum* .*Physiol plant*, 43:52-54.
- 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.
- Bougedoura, N. (1991).** Connaissance de la morphogenèse du palmier dattier (*Phoenix dactylifera* L). Etudes in situ et in vitro du développement morphogénétique des appareils végétatif et reproducteur. Thèse Doctorat d'état. USTHB.Alger.201p.
- Bougedoura, N. (1979).** Contribution à la connaissance du palmier dattier (*Phoenix dactylifera* L). Étude des productions axillaires. Thèse 3^{eme} cycle, Université des sciences et de la Technologie d'Alger, Alger, 64p.
- Bougdoura, N., Benkhalifa, A., Bennaceur. M. (2008).** Le palmier dattier en Algérie Situation : contraintes et apports de la recherche. In : Actes du 3^e Séminaires du réseau AUF-BIOVEG « Biotechnologie du palmier dattier » Montpellier (France), 18-20 novembre 2008. Pp. 16-23.

- Bouman, H., De Klerk, G.J. (2001).** Measurement of the extent of somaclonal variation in begonia plants regenerated under various conditions. Comparison of three assays. *Theoretical and Applied Genetics* **102**: 111-117.
- Bounaga, N., Djerbi, M. (2009).** Pathologie du Palmier Dattier, Unite de Recherche sur les Zones Arides. URZA (Algérie : Institut National de Recherche Agronomique, INRA, El Harrach (Algérie).
- Boxus, P. (1995).** La culture de méristèmes. In : Multiplication végétative: micropropagation Embryogenèse somatique. UNISAT Université audiovisuelle francophone AUPELF-UREF, Boxus P. eds, pp. 17-22.
- Cassells, A.C., Curry, R. F. (2001).** Oxidative stress and physiological, epigenetic and genetic variability in plant tissue culture: implications for micropropagators and genetic engineers. *Plant Cell Tissue and Organ Culture* **64**: 145-157.
- Chabane, D., Assani, A., Bouguedoura, N., Haicour, R., Ducreux, G. (2007).** Induction of callus formation from difficile date palm protoplasts by means of nurse culture. *CR Biology's* **330**:329-401
- Chabane, D., Bouguedoura, N. (2006).** Contribution à la lutte contre le bayoud par les biotechnologies: Production de protoplastes de la variété Deglet Nour (sensible) et de la variété Takerboucht (résistante) en vue de leur fusion et la production d'hybrides somatiques, p.45-48.
- Chang, Y.Y., Cronan, J.E. Li, S.J., Reed, K., Vanden, T., Boom, A.Y., Wang, (1991).** Locations of the lip, poxB, and ilvBN genes on the physical map of *Escherichia coli*. *J.Bacteriol.* **173**:5258-4259.
- Chen, W., Ku, Z. (1985).** Isolation of mesophyll cells and protoplasts, and protoplast fusion and culture in bananas. *J. Agric. Assoc. China*, **129**: 56-67.
- Chapman, J.B., Johnson, E.A., Kootsey, J.M., (1983).** Electrical and biochemical properties of an enzyme model of the sodium pump. *J Membr Biol* **74**:139-53.
- Chowdhury, M.S.H., Halim, M.A., Haque, F., Koike, M. (2008).** Traditional utilization of wild date palm (*Phoenix sylvestris*) in rural Bangladesh: an approach to sustainable biodiversity management. *Journal of forestry research* **19** (3) : 245-251.
- Cocking, E.C. (1972).** Plant cell protoplasts. Isolation and developpement. *Annu. Rev. Plant physiol*, **23**, 29-50.
- Cronquist, A. (1981).** An Integrated System of Classification of Flowering Plants. Columbia University Press, New York.

- Daguin, F., Letouz, R. (1988).** Biotechnologie du palmier dattier (*Phoenix dactylifera L*) .Nouvelles approches des conditions de post in vitro et de la conservation de génotypes sélectionnés .C.R. 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 ,27 Décembre 1989(sous presse).
- Daher, A.M. (2010).** Détermination du sexe chez le palmier dattier : approches histocytologiques et moléculaires. Thèse de doctorat en Biologie cellulaire. Université Montpellier 2.
- Demarly, Y. (1985).** L'épigénétique. Bull. Soc. Bot. Fr.132. Actual. Bot (314), pp 79- 94.
- Djerbi M. (1994).** Précis de phoeniciculture .FAO.ROME, pp139, 146,147.
- Djerbi, M., Aouad, L., Filali, H., Sedra, M. H., Saaidi, M., Tantaoui, A. (1985).** Résultats préliminaires sur la recherche de Khats de haute qualité dattiers et résistance au Bayoud.
- Djerbi, M. (1982b).** Bayoud disease in North Africa: history, distribution, diagnosis and control. Date palm Journal, 1 (2): 153-97.
- Djouab, A. (2007).** Préparation et incorporation dans la margarine d'un extrait de dattes des variétés sèche. Mémoire de magistère. Département technologie alimentaire. Boumerdes. 102p.
- Donnez, D., Kim, K.H., Conreux, A., Jeandet, P., Clément, C., De Luca, V., Courrot, E. (2010)** Resveratrol and viniferins production using grapevine cells in flasks and in a 2L stirred bioreactor, Resveratrol. P 279-51.
- Dransfield, J., Uhl, N.W., Asmussen, C.B. (2008).** Genera Palmarum: The Evolution and Classification of Palms. Kew: Kew Publishing.
- Drira, N. (1983).** Multiplication végétative du palmier dattier *Phoenix dactylifira L* par la culture in vitro de bourgeons axillaires et feuilles qui en dérivent. C. R. Acad. Sc. Paris. 296.
- Drira, N., Benbadis, A. (1985).** Multiplication végétative du palmier dattier *Phoenix dactylifira L*. par la réversion en culture *in vitro*, d'ébauches florales de pieds femelles. J. physiol 119, 227. 235.
- Ducreux G. (2002).** Introduction à la botanique. Edition Belin –Sup 256p.
- Duncan, R.R. (1997).** Tissue culture-induced Variation and Crop Improvement Advances in Agronomy.
- 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.
- El Hadrami, A., El Idrissi-Tourane, A., El Hassni, M., Daayf, F., El Hadrami, I. (2005).** Toxin-based in vitro selection and its potential application to date palm for resistance to the bayoud *Fusarium* wilt. C. R. Biol. 328:732- 744.

- Ellouz, O. (1995).** Amélioration de la pomme de terre par hybridation somatique. Thèse de spécialité, E.N.S, 125 pp.
- Etienne, H., Bertrand, B. (2003).** Somaclonal variation in *Coffea arabica*: effects of genotype and embryogenic cell suspension age on frequency and phenotype of variants. *Tree Physiology* 23: 419-426.
- FAOSTAT, (2012).** United Nations Food and Agriculture Organisation FAO Stat, 2012-<http://faostat.Fao.org/>
- FAOSTAT, (2013).** United Nations Food and Agriculture Organisation FAO Stat, 2013-<http://faostat.Fao.org/>
- Fki, L., Masoudi, R., Drira, N., Rival, A. (2003).** An optimized protocol for plant regeneration from embryogenic suspension cultures of dates palm (*Phoenix dactylifera* L.), cv. Deglet Nour. *plant cell Rep.*21:517-524.
- Fergani, K. (1998).** Embryogenèse somatique du palmier dattier *Phoenix dactylifera* L; cultivar Deglet Nour. Thèse de Magistère en Biologie, U.S.T.H.B; Alger, 131p.
- Ferry, M. (2012).** Intérêts, limites et perspectives de la multiplication in vitro du dattier pour le développement de cette culture. In : Actes du 3^e Séminaire du réseau AUF-BIOVEG « Biotechnologies du palmier dattier' ». Montpellier (France), 18- 20novembre 2008. Pp. 178-187.
- Khelafi, H. (2012).** Propagation *in vitro* de 07 cultivars de palmier dattier (*Phoenix dactylifera* L). Evaluation des leur résistance vis-à-vis de *Fusarium oxysporum* f.sp *albedinis*, agent causal du bayoud. Thèse. ENSA, Alger. 80p.
- Filipecki, M., Yin, Z.M., Wisniewska, A., Smiech, M., Malinowski, R., Malepszy, S. (2006).** Tissue culture-responsive and autotetraploidy-responsive changes in metabolic profiles of cucumber (*Cucumis sativus* L.). *Journal of Applied Genetics* 47: 17-21.
- Fourré, J.L., Berger, P., Niquet, L., André, P. (1997).** Somatic embryogenesis and somaclonal variation in Norway spruce: morphogenetic, cytogenetic and molecular approaches. *Theoretical and Applied Genetics* 94:159-169.
- Gaber, F. et Tissera, B. (1984).** Parametres involved in the isolation, culture, cell wall regeneration and callus formationn from palm and carrot protoplastes. *Date Palm J.* 3(2) :359-365.
- Ghazi, F., Sahraoui, S. (2005).** Evolution des composés phénoliques et des caroténoïdes totaux au cours de la maturation de deux variétés de dattes communes : Tantboucht et Hamraïa. Mémoire d'ingénieur .Institut national d'agronomie. Alger, 81 p.
- Gonzáles-Pérez, M., Caujapé-Castells, J., Sosa, P. (2004).** Allozyme variation and structure of the Canarian endemic palm tree *Phoenix canariensis* (*Arecaceae*): implications for conservation. *Heredity* 93 : 307-315.

- George, R., Walsh, P., Beddoe, T., Lithgow, T. (2002).** The nascent polypeptide-associated complex (NAC) promotes interaction of ribosomes with the mitochondrial surface in vivo. *FEBS Lett* 516(1-3):213-6
- Georget, R., Domergue, K., Ferrière, N., Cote, F X. (2000).** Morpho-histological study of the different constituents of a banana (*Mussa* AAB, cv.Grande naine) embryogenic cell suspension. *Plant cell Report* 19:748-754.
- Govaerts, R., Dransfield, J. (2005).** World checklist of palms. Kew, Royal Botanic Gardens, 240 p.
- Gray, D.J., Conger, B.V., Hanning, G.E. (1984).** Somatic embryogenesis in suspension and suspension derived callus cultures of *Dacylis glomefata* - *Protoplasm* 122, p. 196 - 202.
- Gros-Balthazard, M. (2013).** Hybridization in the genus *Phoenix*: A review. *Emirates Journal of Food and Agriculture* 25: 831–842
- Guédira, A. (2006).** Mise en œuvre des biotechnologies : suspensions cellulaires, protoplastes, en vue de l'amélioration des bananiers à la résistance aux nématodes au Maroc. Thèse d'état, Université Mohammed V, Faculté des Sciences de Rabat, 203 p.
- Haïcour, R., Assani, A., Matsumoto, K., Guédira, A. (2004).** Banana protoplasts. In: *Banana improvement: cellular, molecular biology and induced mutations*. Mohan Jain S. et Swennen R. eds., INIBAP, pp. 111-125.
- Haïcour, R., Zouine, J., Guédira, A., J'Aiti, F., El Hadrami, I. (2002).** Les suspensions cellulaires embryogènes du palmier dattier (*Phoenix dactylifera* L.) et du bananier (*Musa spp.*) : Des outils pour l'amélioration de ces plantes par voies biotechnologiques. In: *Biotechnologies végétales : valorisations pour une agriculture durable. VIIIèmes Journées scientifiques du réseau ' Biotechnologies, Amélioration des plantes et sécurités alimentaire' de l'Agence Universitaire de la Francophonie, octo. 2002, El Hadrami I. Eds., pp. 23-26.*
- Haïcour, R., Sihachakr, D. (1996).** Les protoplastes. In: *Protoplastes, fusion somatique et métabolisme secondaire*. Demarly Y. et Picard E., UNISAT Université audiovisuelle francophone AUPELF-UREF, Demarly Y. et Picard E. eds., pp. 127-164.
- Hakkou, A., Bouakka, M. (2004).** Oasis de Figuig : 1 Etat actuel de la palmeraie et incidence de la fusariose vasculaire (Bayoud). *Secberesse*, 15(02) : 147-158.
- Henderson, A. (2009).** *Palms of Southern Asia*. Princeton, Princeton University Press.
- Henderson, S., Billotte N., & Pintaud J. C., 2006.** Genetic isolation of Cape Verde Island *Phoenix atlantica* (*Arecaceae*) revealed by microsatellite markers. *Conservation Genetics* 7 (2): 213-223.
- Hillgeman, C. (1972). Cité in Bouguedoura, N. (1991).** Connaissance de la morphogenèse du palmier dattier. Etude in situ et in vitro du développement morphogénétiques des appareils végétatifs et reproducteurs. Thèse de doctorat. U.S.T.H.B., ALGER, 201p.

Ho W.J., Vasil, K. (1983). Somatic embryogenesis in sugarcane (*Saccharum officinarum* L.): growth and plant regeneration from embryogenic cell suspension cultures - Ann. Bot 51, p.719- 726.

INPV, (2014). Le Palmier Dattier : Un Patrimoine à Préserver. Institut National de la Protection des Végétaux. Bulletin d'informations phytosanitaires. N° 34

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

Jain, S.M. (2001). Tissue culture-derived variation in crop improvement. Euphytica 118: 153-166.

Jain, R.K., Khehra, G.S., Lee, S.H., Blackhall, N.W., Marchant, R., Davey, M.R., Power, J.B., Cocking, E.C., Gosal, S.S. (1995). An improvement procedure for plant regeneration from indica and japonica rice protoplasts. Plant Cell Reports, 4: 515-519.

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.

Imbrie-Milligan, C., Hodges, T.K. (1986). Microcallus formation from maize protoplasts prepared from embryogenic callus. Planta, 168:395-401.

Ishii, (1989). Enzymes for the isolation of protoplasts.

Kaeppler, S.M., Kaeppler, H.F., Rhee, Y. (2000). Epigenetic aspects of somaclonal variation in plants. Plant Molecular Biology 43: 179-188.

Kao, K.N., Michayluk, M.R. (1974). A method for high frequency intergeneric fusion of plant protoplasts. Planta, 115: 355-367.

Kester, D., Gradziel, T., Grassely, C. (1991). Almonds (*Prunus*). *Acta Horticulturae (ISHS)* 290 :701-760.

Killian, C., Maire, R. (1930). Le Bayoud, maladie du dattier. Bull. Soc. Hist. Nat. Agr., 21: 89-101.

Krikorian, A.D., Kann, R.P. (1981). Plantlet production from morphogenetically competent cell suspensions of Daylily. Am. J. Bot., 47: 679-686.

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

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

- Ladyzynski, M., Burza, W., Malepszy, S. (2002).** Relationship between somaclonal variation and type of culture in cucumber. *Euphytica* **125**: 349-356.
- Linné, C., (von), (1753).** *Species Plantarum*, tome 2. Stockholm, Impensis Laurentii Salvii.
- Lotfi, K. (1989).** La multiplication végétative du palmier dattier (*Phoenix dactylifera* L.) à partir des tissus de cœurs de rejets. Thèse de 3^{ème} cycle, Université Cad Ayyad Marrakech, 120 p.
- Lu, C., Vasil I.K. (1981).** Somatic embryogenesis and plant regeneration from freely-suspended cells and cell groups of *Panicum maximum* Jacq. - *Ann. Bot.* **48**, p. 543 - 548.
- Margara, J. (1982).** Bases de la multiplication végétative les méristèmes et l'organogénèse. Eds. INRA. Paris. 262p.
- Matallah, M.A.A. (2004).** Contribution à l'étude de la conservation des dates de variété Deglet-Nour : Isotherme d'adsorption et de désorption. Mémoire d'Ingenieur, INA. El-Harrach, 79p.
- Mater, A.A. (1986).** In vitro propagation of *Phoenix dactylifera* L. *Date Palm J.*, **4**: 137-152.
- Megia, R., Haichour, R., Rossignol, Sihashakr, (1992).** Callus formation from cultivated protoplasts of banana (*Musa sp.*). *plant science*, **85**, 91-98.
- Megia, R., Haicour, R., Tizroutine, S., Bui Trang, V., Rossignol, L., Sihachakr, D., Schwendiman, J. (1993).** Plant regeneration from cultured protoplasts of the cooking banana cv. Bluggoe (*Musa spp.*, ABB group). *Plant Cell Reports*, **13**: 41-44.
- Monteiro, A., Prijs, J., Bax, M., Hakkaart T., Brakefield P.M. (2003).** Mutants highlight the modular control of butterfly eyespot patterns. *Evolution & Development* **5**: 180-187.
- Moore, G.A. (2001).** Oranges and lemons: clues to the taxonomy of Citrus from molecular markers. *Trends in Genetics* **17**: 536-540.
- Munier, P. (1973).** Le palmier-dattier. Paris, Maisonneuve et Larose, 221 p.
- Murashige, T., Skoog, F. (1962).** A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.*, **15**: 473-497.
- Newton, C., Gros-Balthazard, M., Ivorra, S., Paradis, L., Pintaud, J.C., Terral, J.F. (2013).** *Phoenix dactylifera* and *P. sylvestris* in Northwestern India: A glimpse into their complex relationships. *Palms* **57**: 37-50.
- Nixon, R.W., Fur, J.R. (1965).** Problems and progress in the date breeding. *Grower's Institute Reports.*, 2-5.
- Noat, G., Nari, J., Moustacas, AM., Borel, M. (1996).** Propriétés des parois cellulaires végétales et interaction matrice-enzymes. *Bull. Soc. Bot. Fr. Actual. Bot.* **138**, (3/4), p. 263-277.

- Novac, F.J., Afza, R., Van Duren, M., Perea-Dallos, M., Conger, B.V., Xiaolang, T. (1989).** Somatic embryogenesis and plant regeneration in suspension cultures of dessert (AA and AAA) and cooking (ABB) bananas (*Musa spp.*). *Bio/Technology*, 7: 154 -159.
- Ouennoughi, M., Dubost, D. (2005).** Le voyage forcé des dattiers en Nouvelle-Calédonie. *Sécheresse* 16 (4) : 241-246
- Ozawa, K., Komamine, A. (1989).** Establishment of a system of high-frequency embryogenesis from long-term cell suspension cultures of rice (*Oryza sativa* L.). *Theor. Appl. Genet.* 77, p. 205211.
- Panis, B; Wauwe, AW., Swenen, R. (1993).** Plant regeneration through direct somatic embryogenesis from protoplasts of banana. (*Musa spp.*). *Plant cell rep.* 12,p 403-407.
- Panis, B., Thith, N.T. (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 .
- Peraza-Echeverria, S., Herrera-Valencia, V.A., Kay, .A. (2001).** Detection of DNA methylation changes in micropropagated banana plants using methylation-sensitive amplification polymorphism (MSAP). *Plant Sci.* 161: 359-367.
- Peschke, V., Phillips, R.L. (1992).** Genetic implications of somaclonal variation in plants. *Advances in Genetics* : 41-75.
- Peyron, G. (2000).** Cultiver le palmier dattier. Mont pelliez, gridao.107 p.
- Piatti, M.F. (1988).** Embryogenèse somatique et synchronisation du développement embryonnaire. Thèse de doctorat d'état en pharmacie. Paris VI 130p
- Popenoe, W. (1938).** The Date. Ch. 6. In: *Manual of tropical and subtropical fruits*. New-York: The Mc Millan Company.
- Preil, W. (1991).** Application of bioreactors in plant propagation. In: *Micropropagation Technology and Application*, Debergh P. C. ET Zimmerman R.H. (Eds), Kluwer Academic Publisher Dordrecht. P 425 - 445.
- Prioli, L.M., Söndahl, M.L., (1989).** Plant regeneration and recovery of fertile plants from protoplasts of maize (*Zea mays* L.). *Bio/Technology*, 7: 589-594.
- Raj, R., Bhansali, (2010).** Date palm Cultivation in the Changing Scenario of Indian Arid Zones: Challenges and prospects .In: *Desert Plants*, K.G. Ramawat (ed), Springer, pp.423-459.
- Reinert, J. (1958).** Morphogenesis undihre kontrolle an Gewebekulturen aus carotten - *Natutwissenschaft* 45, p. 344 - 345.
- Rhiss, A., Poulain, C., Beauchesne, G. (1979).** La culture in vitro appliquée à la multiplication végétative du palmier dattier (*Phoenix dactylifera* L.). *Fruits* 34, p. 551 - 554.

- Rouget, Y. (1989).** Embryogenèse somatique de la laitue *Lactuca sativum* L. Thèse doctorat d'Université d'Orsay 147p.
- Saadi, A. (1991).** Régénération de plantes de pois *Pisum sativum* L par embryogenèse somatique. Hamdani Fatma Zohra, 2001. Régénération via l'organogenèse ou l'embryogenèse somatique chez le *scorpiorus*. Mémoire magister Sciences, Chlef, Université Hassiba Ben Bouali, 110p.
- Saka, H., Abed, F. (1989).** La multiplication végétative *in vitro* du palmier dattier par embryogenèse somatique projet de lutte contre le bayoud. F.A.O/ PNUD/ RAB, Marrakech 9-12 Octobre 1989.
- Saka, H., Abed, F., Amara, B., Kermiche, A. (1997).** Embryogenèse somatique du palmier dattier (*phoenix dactylifera* L.). I- Induction de la callogenèse à partir d'organes de rejets de quelques cultivars. Recherche Agronomique, p. 1-8.
- Saka, H., Abed, F. (1989)** La multiplication végétative *in vitro* du palmier dattier (*Phoenix dactylifera* L) par embryogenèse somatique .Compte rendu du 2^{ème} séminaire Maghrébin du palmier dattier par les techniques de culture *in vitro*.
- Sbiai, A. (2011).** Matériaux composites à matrice époxyde charger par des fibres de palmier dattier ; effet de l'oxydation au tempo, thèse de doctorat, INSA de Lyon, 2011.
- Scoarnec, A. (1991).** La régénération du palmier dattier (*phoenix dactylifera* L) par organogenèse et embryogenèse somatique indirectes .Caractéristique du matériel végétal en culture de tissus et en acclimatation .Thèse de doctorat D'état, Université d'Angers, France 150 p.
- Shepard, J.F., Totten, R.E. (1977).** Mesophyll cell protoplasts of potato-isolation, of somatic embryogenesis from leaf explants of the palm *Elaeis guineensis* Jacq. Annals of bot.62 : 43-52.
- Shea, E.M., Gibeaut, D.M., Carpitan, C. (1989).** Structural analysis of the cell walls regenerated by carrot protoplasts. *Planta*, 179:296-308.
- Si-Dehbi, F., Chabane, D., Bougdoura, N. (2013).** Improvement of Date Palm (*phoenix dactylifera* L.) by Using Cell Suspension. In Proc. First IS on Date Palm Eds. : Bougdoura et al, Acta Hort.994. p303.
- Sihachkr, D., Ducreux, G. (1993).** Regeneration of plants from protoplasts of sweet potato (*Ipomoea batatas* L. Lam). In: YPS Bajaj (ed) Biotechnology in agriculture and forestry, Vol 23, Plant protoplasts and genetic engineering IV, Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, pp43-59.
- Sihachkr, D., Daunay, M.C., Serraf, I., Chaput, M.H., Haïcour, R., Rossignol, L., Ducreux, G. (1994).** Somatic hybridisation of eggplant (*Solanum melongena* L) - with its close and wild relatives. In: Biotechnology in Agriculture and Forestry, Somatic hybridization in crop improvement I, Bajaj YPS ed., pp. 255-278.

- Sihachakr, D. (2002).** Protoplastes: isolement, culture, régénération et fusion au polyéthylène glycol. In: Biotechnologies végétales, technique de laboratoire. Tec et Doc eds., pp. 177-199.
- Sondahl, M. (1991).** Tissue culture of cacao, coffee and oil palm - Proceedings of the fourth conference Int. Plant Biotechnology Network San Jose, Costa Rica, 14-18 Janvier 1991. p. 98,99.
- Steward, F.C., Reinert, J. (1958).** Growth and division of freely suspended cells. *Am. J. Bot.*, 45: 693-695.
- Steward, F.C., Mapes, M.O. (1971).** Morphogenesis and plant propagation in aseptic cultures of asparagus - *Bot. Gaz.* 132, p. 70-79.
- Steck, P., et Petiard, V. (1985).** Applications industrielles des cultures végétales : la production de métabolites secondaires In : Aspects industriels des cultures cellulaires d'origine animale et végétale - Actes du IOème Colloque de la Section de Microbiologie Industrielle et Biotechnologie de la S.F.M. p.275 - 303.
- Stuart, D.A., Nelsen, J., Mc Call., Strickland, S., Walker, K.A. (1987).** Physiology of the development of somatic embryos in cell cultures of alfalfa and celery. *Biotechnology in science Academic press.* Pp 35-47.
- Strosse, H., Domergue, R., Panis, B., Escalant, J.V., Côte, F. (2003).** Banana and plantain embryogenic cell suspensions. Technical Guidelines N° 8, INIBAP, 36 p.
- Sun, Y., Zhang, X., Huang, C., Nie, Y., Gue, X. (2006).** Plant regeneration via somatic embryogenesis from protoplasts of six explants in Coker 201 (*Gossypium hirsutum*). *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* .Vol 82, N° 3 pp309-315.
- Sussex, I.M. (2008).** The Scientific Roots of Modern Plant Biotechnology. *Plant Cell* 20: 1189- 1198.
- Takebe, I., Labib, G., Melchers, G. (1971).** Regeneration of whole plants from isolated mesophyll protoplasts of tobacco. *Naturwissenschaften*, 58:318-320.
- Takebe, I., Otsuki, Y., Aoki, S. (1968).** Isolation of tobacco mesophyll protoplasts in intact and active state. *Plant Cell Physiol.*9:115-124.
- Tantaoui, A., Quinten, M., Geiger, J. P., et Fernandez, D. (1996).** Characterization of a signale clonal lineage of *fusarium oxysporum* f. sp. *Albedinis* causing Bayoud disease of date palm in Morocco. *Phytopathol.*, 86(07) : pp. 787.
- Tantaoui, A., Fernandez, D., (1993).** Comparaison entre *Fusarium oxysporum* f. sp. *Albetinis* et *Fusarium oxysporum* des sols de palmeraies par L'étude du polymorphisme de longueur des fragments de restriction (RFLP). *Phytopath. medit.*, 32 :235- 244.
- Tavaud, M., Zanetto, A., David, J.L., Laigret, F., Dirlwanger, E. (2004).** Genetic relationships between diploid and allotetraploid cherry species (*Prunus avium*, *Prunus x gondouinii* and *Prunus cerasus*). *Heredity* 93 : 631-638.
- Thorpe, T.A. (1988).** In vitro somatic embryogenesis. *ISI Atlas Science* 1, p. 81-88.

- Thibault, J.F. (1980).** Les substances pectiques. *In* Monties B. (éd.) Les polymères végétaux, polymères pariétaux et alimentaires non azotés, p 233–251. Paris : Gauthier-Villars (éd.).
- Tisserat, B. (1979).** Propagation of date palm « in vitro » .*J exe bot* 30:1275-1283.
- Touchet, B., Duval, Y., Pannetier, C. (1998).** Oil Palm (*Elaeis guineensis* Jacq.) regeneration from embryogenic suspension culture - VII IAPTC Congress of Plant tissue and Cell Culture, Amsterdam, Abstracts p. 249.
- Toutain, G., (1965).** Note sur l'épidémiologie du Bayoud en Afrique du Nord. *Al Awamia* Rabat, 15, 35-45.
- Toutain, G., (1967).** Le palmier dattier. Culture et production. *In* : *Al Awamia*, 25, pp. 83-151.
- Toutain, G. (1972).** L'élément d'agronomie saharienne. De la recherche au développement. Marrakeh, Maroc, 276 p.
- Tregear, J., Billotte, N. (2010).** Species delimitation in the genus *Phoenix* (*Areaceae*) based on SSR markers, with emphasis on the identity of the date palm (*Phoenix dactylifera* L.). *In* Seberg O., Petersen G., Barfod A. & Davis J. (Ed.), Diversity, phylogeny and evolution in the Monocotyledons, Aarhus University Press : 267-286.
- Triqui, Z., Guédira, A., Chlyah, A., Chlyah, H., Souvannavong, V., Haïcour, R., Sihachakr, D. (2008).** Effect of genotype, gelling agent, and auxin on the induction of somatic embryogenesis in sweet potato (*Ipomoea batatas* Lam.). *C. R. Biologies* 331 (2008) 198– 205.
- Vasil, I.K., Vasil, V., Redway, F. (1999).** Plant regeneration from embryogenic calli, cell suspension cultures and protoplasts of *Triticum aestivum* L. (wheat). VII International Congress of Plant Tissue and Cell Culture, Amsterdam. Abstracts p. 33-37.
- Vasil, I.K., Vasil, V. (1991).** Advances in plant regeneration and genetic transformation of cereals. *Eucarpia symposium* on genetic manipulation in plant breeding molecular biology breeding interface. Rens/Salori (Tarragone), 26 - 30 Mai.
- Vasil, I.K., Vasil, V., Redway, F. (1990).** Plant regeneration from embryogenic calli, cell suspension cultures and protoplasts of *triticum aestivum* L. (Wheat). Progress in plant cellular and molecular biology proceeding of the VIIth international congers on plant tissue and cell culture. Amsterdam, klawer Academic publishers Dordrecht, 33-37.
- Vasil, V., Vasil, I.K. (1986).** Plant regeneration from friable embryogenic callus and cell suspensions cultures of *Zea mays* L. *J. Plant Physiol.* 127, p. 399 - 408.
- Vasil, V., Vasil, I.K. (1981).** Somatic embryogenesis and plant regeneration from suspension cultures of Pearl millet (*fennisetum americanum*) - *Ann. Bot.* 47, p. 669 - 678.
- Wallin, A., Glimeluis, K., Erikson, T. (1974).** The induction of aggregation and fusion of *Daucus carota* protoplasts by polyethylene glycol. *Z. Pflanzenphysiol.*, 74: 64-80.

Went, F.W. (1927). Growth, auxin, and tropisms in decapited *Avena coleopiles*. *Plant. Physiol.* 17: 230. 1942.

Yakooub-Bougdal, S. (1984). Etudes des radiations rouges sur des méristèmes et sur des embryons en culture *in vitro* chez le palmier dattier (*Phoenix dactylifera* L.). Approches quantitatives. DEA. Université Pierre et Marie Curie, Paris VI. pp 58.

Yakoub-Bougdal, S. (1987). Etude des inductions morphogénétique chez le palmier dattier (*Phoenix dactylifera* L.) Cv Degtelt Nour en culture *in vitro*. Analyses cytophotométrique et autoradiographique. Thèse de doctorat de l'Université Paris VI. pp 100.

Yakoub-Bougdal, S. (2005). Morphogenèse *in vitro* du palmier dattier (*Phoenix dactylifera* L.) et l'olivier (*Olea europea* L) var Chemlal. Thèse de doctorat d'état et sciences Biologie végétale Université de Tizi Ouzou. Mouloud Mammeri, p190.

Yatta, D., Abed, F., Boufis, N., Belloued, D., Amara, B., Yakhou, M.S., Benhafsi, F.S., Bouguedoura, N. (2014). Présentation d'une communication orale sur «culture cellulaire et protoplaste : situation actuelle et perspectives pour l'amélioration génétique du palmier dattier» au 10 Salon de l'Agriculture Saharienne et Steppique, SUDAGRAL: Sahara, Terre d'Avenir, 15/17 Décembre 2014 Complexe sportif de TIKSEBT et l'université d' El Oued.

Yatta, D., Abed, F., Saka, H., Amara, B., Djellal, L., Yakhou, M.S., Bouguedoura, N., Bennaceur, M. (2006). Régénération de quelques variétés de palmier dattier *Phoenix dactylifera* L; par embryogenèse somatique: évaluation de conformité des vitroplants par les marqueurs RAPD et AFLP. In ABED F; Conférence régional: Mutagenèse induite et Biotechnologies d'Appui pour la protection du palmier dattier contre le Bayoud, Alger, p.26-27.

Yatta, et Fergani, (2007). Multiplication et amélioration du palmier dattier (*Phoenix dactylifera* L.) par les biotechnologies. Atelier National de recherche sur le palmier dattier et le bayoud : Préservation et valorisation. INRAA Alger 09 juillet 2007.

Yatta, D., Abed, F., Amara, B., Yakhou., M.S. (2009). Isolement et culture de protoplaste de palmier dattier *Phoenix dactylifera* L. Séminaire international sur « la protection et la préservation des écosystèmes sahariens »./ ECO-SYS09 Ouargla, les 13, 14 et 15 décembre 2009.

Yatta, D., Abed, F., Amara, B., Yakhou, M.S, Bohafsi, F.S. (2012). Participation à la manifestation sur la la recherche scientifique et le développement technologique. Célébration du 50^{ème} anniversaire de l'indépendance nationale.

Yatta, D., Bouguedoura, N. (2013). The Date palm in Algeria. Participation à un congrès sur dies Palmarum 2013 –Vlle biennale européenne des palmiers. CSRP (Study and Research center for the palm)

Yatta, D.,Abed, F., Amara, B., Yakhou, M.S., Benhafsi, F.S. (2013 a). Participation à la manifestation sur la recherche scientifique et le développement technologique. Célébration du 50^{ème} anniversaire de l'indépendance

Zaid, A. (2002). Date palm cultivation. Food and agricultural organization of the United Nations, Rome, (en ligne) URL : <http://www.fao.org/docrep/006/y4360e/y4360e00.htm>.

Zango, (2011). Étude comparative de l'architecture et de la géométrie de l'inflorescence mâle et femelle du palmier dattier. Biodiversité Végétale Tropicale (BVT). Pp. 1-47.

Zaghmout, O.M.F., Torello, W.A. (1989). Somatic embryogenesis and plant regeneration from suspension cultures of Red Fescue - Crop Sci. 29, p. 815 - 817.

Zhu, L.Q., Wang, B.C., Zhou, J., Chen, L. X., Dai, C.Y., Duan, C.R. (2005). Protoplast isolation of callus in *Echinacea augustifolia*. Colloids Surfaces B-Bio interfaces, 44: 1-5.

Zimmermann, U., Scheurich, P. (1981). High frequency fusion of plant protoplasts by electric field. Planta, 151: 26-32.

Zohary, D., Hopf, M., Weiss, E. (2012). Domestication of plants in the Old World. 3e édition. New York, Oxford University Press, 264 p.

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

Annexes

Annexe 1

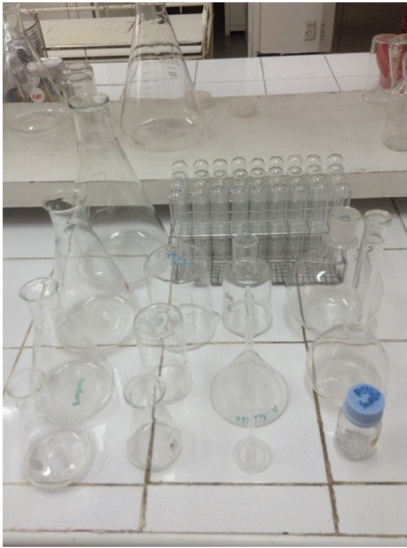


Figure 01 : Verreries.



Figure 02 : Tube de mesure.



Figure 03 : Pipettes et Micropipettes.

Annexe 2



Figure 04 : Autoclave.



Figure 05 : Distributeur automatique.



Figure 06 : pH mètre.

Annexe 03



Figure 07: Hotte à flux laminaire.

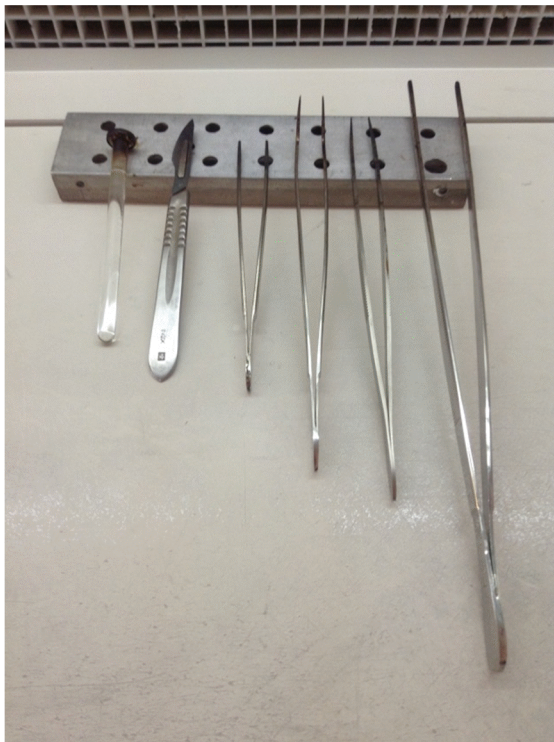


Figure 08: Matériel de repiquage.



Figure 09: stérilisateur à billes.



Figure 10 : Centrifugeuses.

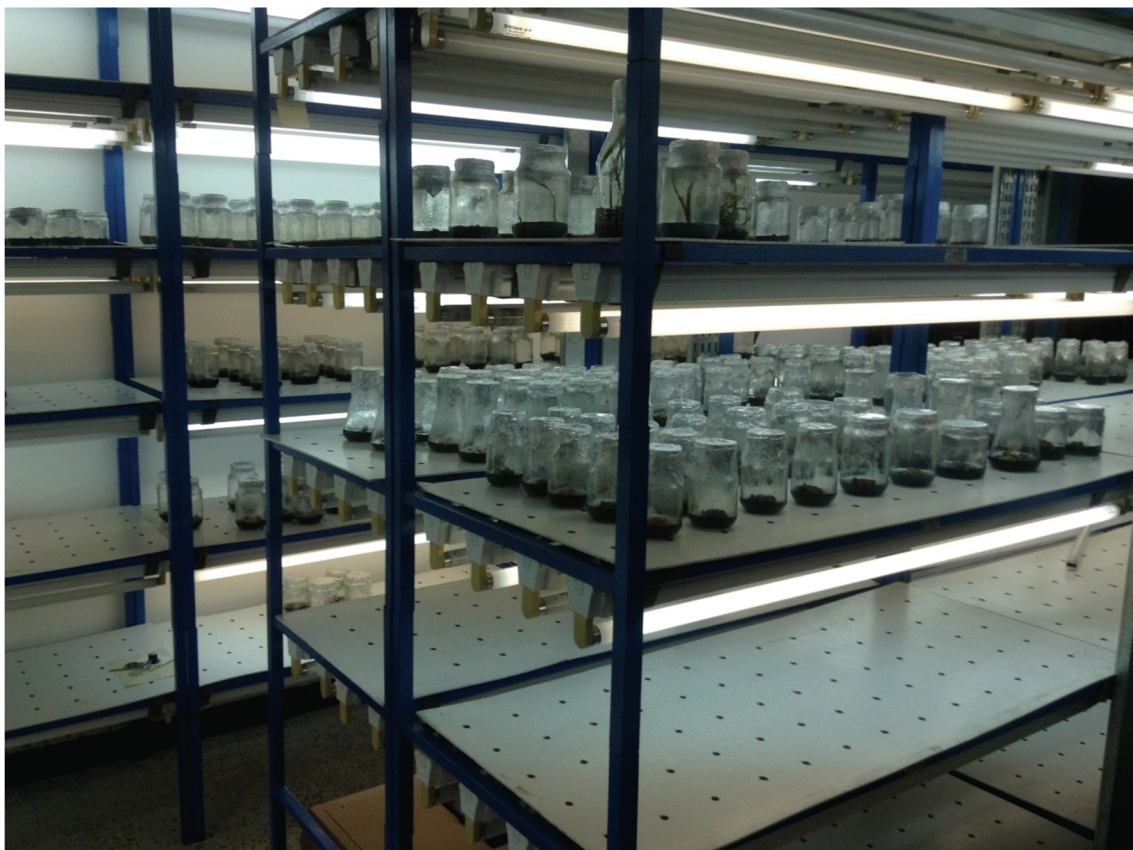


Figure 11 : Chambre de culture.

Annexe 04

Tableau 01 : Milieux solides pour l'induction et la multiplication des cals.

Eléments	Milieu P _{12,5}	Milieu M ₁₀₀
Macro MS	40ml	40 ml
Micro MS	10ml	10ml
Fe MS	10ml	10ml
KH_2PO_4	100mg	100ml
$Na_2H_2PO_4$	170mg	170ml
Adenine	40mg	40mg
Citrata d'ammonium	200mg	200mg
L-GLUTAMINE	100mg	100mg
Charbon actif	200mg	3g
Piclorame	12,5mg	/
IPA (soude)	1mg /ml	3mg /ml
Saccharose	45g	45g
Agar /Phytigel	7g /2g	7g/2g
Thiamine	1mg/ml	1mg /ml
Myoinisitol	100mg	100mg
2-4-D	/	100mg

Tableau 2: Milieu liquide pour la suspension cellulaire (P_5).

Eléments	Quantité
MACRO MS	40ml/ L
MIRO MS	10ml/L
Fe MS	10ml/L
Myoinisitol	100mg/L
Adenine	40mg /L
L-Glutamine	200mg/L
$MnSO_4$	40mg/L
KH_2PO_4	100g/L
NaH_2PO_4	170mg/L
Saccharose	45mg/L
PVP	2g/L
Thiamine	1mg
IPA (soude)	1mg
Picloram	5mg

Annexe 05

Tableau 3 : Les composants de la solution mère des MACRO MS.

Produits	Concentration du milieu	(n) fois concentration	Concentration solution mère
KNO_3	1.9g/L	X25	45.5g
NH_4NO_3	1.65g/L	X25	41.25g
$CaCl_2 \cdot 2H_2O$	0.44g/L	X25	11g
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0.37g/L	X25	9.25g
KH_2PO_4	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
H_3BO_3	6.2mg /l	X100	620mg
$MnSO_4 \cdot 7H_2O$	16.9mg/l	X100	1690mg
$ZnSO_4 \cdot 7H_2O$	8.6mg/l	X100	860mg
$CuSO_4 \cdot 5H_2O$	0.025mg/l	X100	2.5mg
$CaCl_2 \cdot 6H_2O$	0.025mg/l	X100	2.5mg
$NaMoO_4 \cdot 2H_2O$	0.25mg/l	X100	25mg
KI	0.83mg/l	X100	83mg

Tableau 5 : Les composants de la solution mère FER MS

Produits	Concentration du milieu	(n) fois concentration	Concentration solution mère
$Na_2 EDTA$	0.03735g/l	X100	3.73g
$Fe SO_4 \cdot 7H_2O$	0.02785g/l	X100	2.78g

Annexe 06

Tableau 06 : La première solution enzymatique SE1.

produits	Concentrations dans 100 ml
KCl	1,5g
CaCl ₂	0,25g
MES	25mg
Cellulase RS	0,25g
Hemicellulase (Sigma)	1g
Pectolyase Y-23	0,25g
pH=5,6	

Tableau 07 : La deuxième solution enzymatique SE2 (Solution B à KCl 13 % et CaCl₂0,5%).

Produits	Concentrations dans 100ml
KCl	2,5mg
CaCl ₂	0,25g
MES	25mg
Hemicellulase (Sigma)	3mg
Pectinase (Sigma)	2,5 mg
pH=5,6	

Tableau 08 : PWC (FREARSON et al., 1973).

Produits	concentrations
Stock A : KH ₂ PO ₄	1360 mg
KNO ₃	5050 mg
MgSO ₄	12300 mg
KI	8mg
CuSO ₄	2,5 mg
Stock B : CaCl ₂	148

Annexe 07

Tableau 09 : Milieu Pc M₂ (couche nourrice).

Produit	Concentrations
Macroéléments	80 ml
Microéléments	20 ml
Fer	20 ml
Vitamine Morel	1 ml
2-4 D	2,5 ml
Glucose	500 mg
Maltose	10 mg
Saccharose	45 g
Mannitol	45 g
Phytigel / Agarose	2 g/ 8g

Tableau 10 : Solution de fusion PEG à 30%.

Produits	concentrations
PEG	7,5 mg
Solution de CaCl ₂	25 ml

Tableau 11 : Solution de rinçage et fusion mannitol-Cl-Ca²⁺.

Produits	Concentrations dans 500 ml
Mannitol (0,5M)	45,5g
CaCl ₂	37mg

Résumé

La maîtrise des techniques de suspensions cellulaires et des cultures de protoplastes chez le palmier dattier, présente un grand intérêt tant sur le plan agronomique, peut être intégrée dans le schéma d'amélioration et de la résistance au bayoud, qu'au plan fondamental pour une meilleure connaissance de l'espèce. Les suspensions cellulaires, sont à l'origine du développement de l'embryogenèse somatique, des transformations génétiques et constituent le matériel le plus utilisé comme source de protoplastes.

Le but de cette étude est l'établissement de suspensions cellulaires afin de disposer du matériel indispensable pour l'isolement de protoplastes dans l'objectif d'obtenir des hybrides somatiques résistants au Bayoud par le biais de l'isolement et la fusion de protoplastes.

Pour cela, des cals embryogènes issus des trois cultivars Deglet Nour, Takerbucht et Tegaza 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. Les observations au cours des subcultures montrent que les cals se dissocient et libèrent des cellules de différentes formes (arrondies, ovales et allongées). Après 7 semaines de subculture, le poids frais de la suspension cellulaire est multiplié par 7 chez le cultivar Takerbucht et par 5 chez les deux cultivars Tegaza et Deglet Nour.

L'utilisation des suspensions cellulaires comme source de protoplastes a permis d'obtenir un nombre élevé de protoplastes de forme sphérique contenant de gros noyaux.

La quantité de protoplastes obtenue par gramme de suspension cellulaire initiale en fin de macération varie en fonction du cultivar, de plus les meilleurs rendements sont obtenus avec la solution enzymatique SE1 (Cellulase 1,5%, 0,5% Pectolyase Y23, Hémicellulase 2%) et leur viabilité est évaluée par fluorescence di acétate (FDA).

Mots clés : Palmier dattier, embryogenèse somatique, cal embryogène, suspension cellulaire, protoplastes, Cellulase, Pectolyase Y23, Hémicellulase.

Abstract

The control of cell suspensions techniques and protoplast cultures in the date palm, is of great interest both agronomically can be integrated in the scheme of improvement and resistance bayoud, that basic plan for a better knowledge of the species. Cell suspensions are at the origin of development of somatic embryogenesis, genetic transformation and constitute the most material used as a source of protoplast.

The purpose of this study is the establishment of cell suspensions in order to have the materiel necessary for the isolation of protoplasts with the aim of obtaining somatic hybrids resistant to bayoud through protoplast fusion.

For this, embryogenic callus from three cultivars Deglet Noor, Takerbucht and Tegaza were used to initiate cell suspension in liquid medium P5 (5mg/l de picloram associated with 1mg/l d'IPA and 1mg/l de thiamine) and under continuous stirring at a speed 100 rounds/min.

The observations in the subcultures showed that callus dissociate and liberate cellulars structures oval, rounded and elongated shape of varying size. After 7 weeks of subculture, fresh weight of the cell suspension is multiplied by 7 in the Taquerbucht cultivar and by 5 in both Tegaza and Deglet Nour cultivars.

The use of cell suspensions as a protoplasts source was obtained a large number of spherical protoplast containing large nuclei. The protoplasts quantity obtained per gram of initial cell suspension at the maceration end varies on cultivar. The best yields also were obtained with the enzyme solution SE1 (1.5% cellulase, 0.5% Pectolyase Y23, Hemicellulase 2%). Their counting of cells was performed using Bürker cell (Marienfeld, United Kingdom) and viability was evaluted by fluorescein diacetate (FDA) under inverted microscope.

Keywords: Date palm, somatic embryogenesis, embryogenic callus, cell suspension protoplasts, cellulase, Pectolyase Y23, Hemicellulase.