



HAL
open science

**Utilisation de la cryoconservation pour la conservation
et la production de cultures in vitro de palmier dattier
(Phoenix dactylifera L.): Impact d'un protocole de
cryoconservation sur la physiologie des cals embryogènes
de palmier dattier**

Mohammad Salma

► **To cite this version:**

Mohammad Salma. Utilisation de la cryoconservation pour la conservation et la production de cultures in vitro de palmier dattier (Phoenix dactylifera L.): Impact d'un protocole de cryoconservation sur la physiologie des cals embryogènes de palmier dattier. Autre [q-bio.OT]. Université Montpellier, 2015. Français. NNT : 2015MONT179 . tel-02044497

HAL Id: tel-02044497

<https://theses.hal.science/tel-02044497>

Submitted on 21 Feb 2019

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

THÈSE

Pour obtenir le grade de
Docteur

Délivré par l'**Université de Montpellier**

Préparée au sein de l'école doctorale SIBAGHE
Et de l'unité de recherche DIADE

Spécialité : **Biologie, Interactions, Diversité
Adaptative des Plantes**

Présentée par **Mohammad SALMA**

Utilisation de la cryoconservation pour la conservation et la production de cultures *in vitro* de palmier dattier (*Phoenix dactylifera* L.); Impact d'un protocole de cryoconservation sur la physiologie des cals embryogènes de palmier dattier



Soutenu le 8 décembre 2015 devant le jury composé de

Madame **Agnès GRAPIN**, Maître de conférences,
AGROCAMPUS-OUEST

Rapporteur

Madame **Marie-Anne LELU-WALTER**, Directeur
de recherche, INRA

Rapporteur

Monsieur **James TREGGAR**, Directeur de
recherche, IRD

Examineur

Monsieur **Florent ENGELMANN**, Directeur de
recherche, IRD

Directeur de thèse

Résumé:

Le palmier dattier (*Phoenix dactylifera* L.) a une grande importance écologique et socio-économique dans les zones arides et semi-arides du globe. Cette espèce présente une grande diversité (plus de 2.000 variétés identifiées) qui est menacée par la production à grande échelle de variétés élites. Il est nécessaire de développer des techniques permettant de conserver cette diversité et de gérer la production des variétés élites multipliées *in vitro*. La cryoconservation (azote liquide, -196°C) est la seule technique disponible à l'heure actuelle permettant la conservation à long terme, à coûts réduits et en sécurité de cette diversité. Dans ce travail, nous avons comparé l'efficacité de deux techniques de cryoconservation, la vitrification en goutte (DV) et la D cryo-plate (DP), pour la cryoconservation de masses proembryogènes (PEM) de deux variétés de palmier dattier, Sokary et Sultany. Avec la DV, la survie des PEM cryoconservées est nulle sans prétraitement au saccharose (3 jours avec 0,5M) et sans traitement avec la solution de vitrification PVS2. Après 15 à 120 min de traitement avec PVS2, la survie est comprise entre 90,9-98,6% et 85,6-88,0%, respectivement pour Sokary et Sultany. Avec un prétraitement au saccharose, 21,1% des PEM de la variété Sokary survivent à la cryoconservation sans traitement avec PVS2. Avec la DP, un effet positif du prétraitement au saccharose est observé sur la survie des PEM cryoconservés. Pour Sokary, la survie la plus importante (de 92,0 à 95,8%) après congélation est obtenue pour des durées de dessiccation comprises entre 60 et 120 min. La survie après cryoconservation est comprise entre 67,0 et 74,6% après des durées de 90 à 120 min de dessiccation pour Sultany. Avec les deux techniques expérimentées, l'intensité de croissance des PEM cryoconservées est supérieure chez Sokary par rapport à Sultany. L'étude histologique réalisée montre qu'en l'absence de prétraitement, c'est le traitement de loading qui induit la plasmolyse des cellules la plus importante, d'environ 26, 40 et 50%, respectivement pour les cellules méristématiques, les cellules embryogènes de la population I (PopI) et de la population II (PopII) par rapport à leur état initial. Le prétraitement au saccharose induit une plasmolyse d'environ 50% uniquement chez les cellules de PopII. Le traitement de loading et de vitrification n'entraîne pas de plasmolyse supplémentaire. Aucune plasmolyse n'est observée chez les cellules méristématiques et les cellules de PopI. En revanche, les mesures de la surface de l'ensemble des cellules montrent chez les cellules méristématiques une diminution significative de surface après le prétraitement au saccharose, mais aucune différence significative après le traitement de loading et de vitrification. Chez les cellules embryogènes de PopI, une diminution supplémentaire de la surface est observée après le traitement de vitrification. L'étude de la circularité des noyaux montre une déformation permanente des noyaux des cellules non prétraitées des trois types cellulaires, alors que seuls les noyaux des cellules de PopII présentent cet aspect chez les PEM prétraitées. Enfin, l'étude du degré de méthylation des PEM par immunolocalisation conclut à l'absence de différences significatives entre les PEM témoins non traitées et les autres conditions expérimentales. Cependant, les tissus différenciés présentent un pourcentage de noyaux méthylés plus important par rapport aux cellules embryogènes et aucun marquage n'est noté chez les cellules méristématiques. Nos résultats ont permis de préciser l'effet de la cryoconservation sur l'intégrité structurale et la physiologie des PEM de palmier dattier. Ils contribuent également à la sauvegarde de la biodiversité du palmier dattier.

Abstract:

The date palm (*Phoenix dactylifera*. L) has a great ecological and socioeconomic importance in arid and semi-arid areas of the globe. This species displays a great diversity, with over 2,000 identified varieties, which is threatened by the large scale production of elite varieties. It is necessary to develop techniques allowing to conserve this biodiversity and to manage the production of *in vitro* propagated elite varieties. Cryopreservation (liquid nitrogen [LN], -196°C) is currently the only technique available ensuring the safe and cost-effective long-term conservation of this diversity. In this work, we compared the efficiency of two cryopreservation techniques, droplet-vitrification (DV) and D cryo-plate (DP), for the cryopreservation of proembryonic masses (PEMs) of two varieties of date palm, Sokary and Sultany. With DV, recovery of cryopreserved PEMs was nil without sucrose pretreatment (3 days, 0.5 M) and without treatment with PVS2 vitrification solution. After 15 to 120 min of PVS2 treatment, recovery was between 90.9-98.6% and 85.6-88.0% for Sokary and Sultany, respectively. Sucrose pretreatment led to 21.1% recovery of cryopreserved PEMs of variety Sokary without PVS2 treatment. Regrowth intensity of PEMs cryopreserved was generally lower in the Sultany variety compared to the Sokary variety. With DP, a positive effect of sucrose pretreatment on recovery of cryopreserved PEMs was observed. For Sokary, the highest recovery of PEMs (92.0 to 95.8%) after LN exposure was achieved for desiccation periods between 60 and 120 min. Recovery of cryopreserved PEMs of variety Sultany was between 67.0 and 74.6% after desiccation periods between 90-120 min. With DP, the regrowth intensity of cryopreserved PEMs was higher for variety Sokary compared to Sultany. The histological study performed showed that in absence of pretreatment, it was the loading treatment which induced the highest cell plasmolysis, with values of 26, 40 and 50% for meristematic, embryogenic PopI and PopII cells, respectively, compared to their initial state. Sucrose pretreatment induced a 50% plasmolysis only in PopII cells. The loading and vitrification treatments did not cause any additional plasmolysis. No plasmolysis was observed in meristematic or PopI cells. By contrast, the measurement of the surface of all cells revealed a significant decrease in the surface of meristematic cells after pretreatment, but no significant difference after the loading or vitrification treatments. In embryogenic PopI cells, an additional decrease in the cell surface was observed after the PVS2 treatment. The study of nuclei circularity showed a permanent deformation of nuclei of non-pretreated cells of the three cell types. In pretreated PEMs, only the nuclei of PopII cells displayed deformation. Finally, the study of the methylation degree in PEMs by immunolocalization revealed the absence of significant differences between the untreated controls and other experimental conditions. However, the differentiated tissues exhibited a higher percentage of methylated nuclei compared to embryogenic cells, while no stained nuclei were observed in meristematic cells. Our results allowed clarifying the effect of cryopreservation on the structural integrity and on the physiology of date palm PEMs. They also contribute to safeguarding of date palm biodiversity.

Liste d'abréviations

ABA	Acide abscissique
AFLP	Amplified Fragment Length Polymorphism
AGPI	Acides gras polyinsaturés
AMP	Amplified DNA Methylation Polymorphism
APX	Ascorbate peroxydase
BB	Solution de blocage
BSA	Sérum albumine bovine
CAT	Catalase
DAPI	4',6'-diamidino-2-phénylindole
DHAR	Dehydroascorbate réductase
DMSO	Diméthylsulfoxyde
DP	D cryo-plate
DV	Vitrification en goutte
HNE	4-hydroxynonanal
GR	Glutathion réductase
LS	Solution de loading
MAD	Malondialdéhyde
MC	Cellules méristématiques
MDHAR	Monodehydroascorbate réductase
MS	Milieu de Murashige et Skoog
PBS	Tampon phosphate salin
PEM	Masses proembryogènes
PopI	Cellules embryogènes de la population I
PopII	Cellules embryogènes de la population II
Pré	Prétraitement sur un milieu enrichi en saccharose
PVS2	Solution de vitrification 2
PVS3	Solution de vitrification 3
PVS4	Solution de vitrification 4
RAF	Randomly Amplified DNA fingerprinting
ROS	Espèces réactives de l'oxygène
SD	Moyennes avec l'erreur standard de la moyenne
SOD	Superoxyde- dismutases
ULS	Solution d'unloading
VS	Solutions de vitrification
5mdC	5-méthyl-désoxycytidine
2,4 D	2,4-dichlorophénoxyacétique
-LN	Explants non-cryoconservés
+LN	Explants cryoconservés

Remerciements

Les travaux présentés dans cette thèse ont été réalisés, à l'IRD de Montpellier (Institut de Recherche pour le Développement) au sein de l'UMR DIADE et l'équipe de Dessitrop puis ADvEND.

Je remercie **Monsieur Serge Hamon**, Directeur de recherche, l'ancien directeur de l'UMR DIADE ainsi que **Monsieur Alain Ghesquière**, Directeur de recherche, le directeur actuel pour m'avoir accueilli au sein du laboratoire.

Mes vifs remerciements s'adressent à Monsieur **James Tregear**, Directeur de recherche, pour avoir accepté de présider mon jury de thèse. Je tiens également à le remercier pour son soutien durant ma thèse et ce en tant que membre de mon comité de thèse.

Je remercie infiniment **Madame Marie-Anne Lelu-Walter**, Directeur de recherche à l'INRA Centre Val de Loire, d'avoir accepté de juger mon travail de thèse, d'en être rapporteur ainsi que pour ses remarques constructives.

J'exprime ma gratitude envers **Madame Agnès Grapin**, Maître de conférences, AGROCAMPUS-OUEST centre d'Angers, pour avoir accepté d'être rapporteur de ce travail. Je lui exprime par la même, ma reconnaissance pour ses suggestions constructives.

Je tiens vivement à remercier mon encadrant de thèse **Monsieur Florent Engelmann**, Directeur de recherche et directeur adjoint de centre de l'IRD de Montpellier, de m'avoir guidé, encouragé et conseillé durant ces cinq années depuis mon arrivée en France pour faire mon Master. Son enthousiasme ainsi que ses compétences m'ont beaucoup apporté. Il a toujours été patient en dépit de toutes les difficultés tout d'abord avec la langue mais particulièrement après l'arrêt de mon financement en raison de la situation critique dans mon pays la Syrie. Merci pour la confiance qu'il m'a accordée. Merci pour ces années passées pendant lesquelles j'ai appris énormément de choses. Je suis profondément reconnaissant pour tout ce qu'il m'a apporté.

Je remercie profondément **Monsieur Jean-Luc Verdeil**, Directeur de recherche au CIRAD, pour l'intérêt qu'il a porté à ce sujet de recherche lors des comités de thèse. Merci pour ses discussions scientifiques, ses commentaires et ses suggestions durant ces années de thèse. Merci pour m'avoir si gentiment accueilli au sein du laboratoire, pour sa bonne humeur et son implication dans la réalisation de ce travail.

Je tiens vivement à remercier **Monsieur Lotfi Fki**, Maître de conférences à la Faculté des Sciences de Sfax, Tunisie, pour son soutien et pour m'avoir initié à la culture *in vitro* du palmier dattier. Je le remercie également pour son accueil au sein de son équipe et de sa famille durant mon stage.

Je tiens particulièrement à exprimer ma gratitude à **Madame Isabelle Engelmann-Sylvestre**, pour avoir largement contribué à mon encadrement durant ces dernières années. Merci pour tout le temps qu'elle m'a consacré afin de surmonter les différents problèmes durant mon Master et ma thèse.

Je remercie **Madame Myriam Collin**, Assistant Ingénieur à l'IRD, pour m'avoir initié à tout ce qui concerne l'histologie. Merci pour tes conseils très précieux.

Mes remerciements à tous les membres de l'équipe Dessitrop et puis ADvENS pour la bonne entente et leur collaboration durant toutes ces années passées à l'IRD.

Je remercie l'ensemble du personnel du laboratoire de CIV (Culture *in vitro*) pour leur aide et leurs conseils pour la réalisation des expériences.

Je remercie également l'ensemble des chercheurs de la plateforme PHIV au CIRAD pour leur aide et leurs conseils.

Je vous dis un grand Merci

Je souhaiterais rendre hommage aux membres de ma Famille pour leur soutien incommensurable tout au long de mes études. Je tiens particulièrement à exprimer tout mon respect et toute ma gratitude et mon amour à mes parents. Cinq ans maintenant que nous sommes séparés mais je suis conscient de toute la douleur et la nostalgie que vous endurez car j'en souffre autant. Merci infiniment à mon épouse Marwa le plus bel ange qui illumine ma vie. Chérie, je n'oublierai jamais ton soutien durant les moments très difficiles. Merci à mon frère Siraj Al-Din pour ses aides morales et financières lorsque ma bourse a été coupée. Merci Manar, Moutaman et Esraa. Alaa, ma petite sœur, je prie pour que tu reposes en paix.

Emira, Christine et Karina, comme on dit chez nous et d'ailleurs chez vous: les discours les meilleurs sont les plus brefs. LES COPINES, je vous remercie énormément pour votre soutien pendant les moments douloureux que j'ai dû traverser. J'ai eu la chance de vous avoir toujours à mes côtés pour m'encourager à continuer mon chemin. Merci du fond de mon cœur.

Je ne saurais oublier d'adresser mes vifs remerciements à mes ami(e)s et mes collègues au bâtiment des plantes particulièrement : Valérie, François, Romain, et Laurence pour leur soutien, leurs encouragements et leur convivialité.

Enfin, au terme de ces remerciements, merci à tous les doctorants anciens et actuels pour leur bonne humeur et tous les bons moments partagés ensemble.

Merci à TOUS!!!

Table des matières

CHAPITRE 1	1
1. Synthèse bibliographique	3
1.1. Morphologie.....	3
1.2. Répartition géographique et écologie du palmier dattier.....	6
1.3. Importance socio-économique.....	7
1.4. Propagation du palmier dattier.....	8
1.4.1. Propagation traditionnelle.....	8
1.4.1.1. Multiplication sexuée (par semis).....	8
1.4.1.2. Propagation végétative.....	8
1.4.2. Micropropagation.....	9
1.4.2.1. Micropropagation par organogénèse.....	10
1.4.2.2. Micropropagation par embryogenèse somatique.....	10
1.4.2.2.1. Définition.....	10
1.4.2.2.2. Facteurs affectant l'embryogenèse somatique.....	11
1.4.2.2.2.1. Nature de l'explant.....	11
1.4.2.2.2.2. Milieu de culture.....	12
1.4.2.3. Contraintes de la micropropagation du dattier.....	13
1.4.2.3.1. Brunissement des tissus.....	13
1.4.2.3.2. Contaminations endophytiques.....	13
1.5. Moyens de conservation.....	14
1.5.1. La conservation des ressources génétiques.....	14
1.5.2. Conservation <i>in situ</i>	15
1.5.3. Conservation <i>ex situ</i>	15
1.5.3.1. Conservation de graines.....	16
1.5.3.2. Collections en champ.....	17
1.5.3.3. Conservation <i>in vitro</i>	17
1.6. Cryoconservation.....	19
1.6.1. Principe de la cryoconservation.....	20
1.6.2. Les méthodes de cryoconservation.....	20
1.6.2.1. Les méthodes avec cristallisation extracellulaire.....	21
1.6.2.2. Les méthodes sans cristallisation extracellulaire.....	22
1.6.2.2.1. La vitrification.....	23
1.6.2.2.2. L'encapsulation- déshydratation.....	25
1.6.2.2.3. L'encapsulation-vitrification.....	26
1.6.2.2.4. La vitrification en goutte ou droplet-vitrification.....	26
1.6.2.2.5. Les techniques de V cryo-plate et D cryo-plate.....	27
1.6.3. Développement de la cryoconservation.....	29
1.6.4. Cryoconservation : Facteurs limitants.....	29
1.6.4.1. Choix du matériel végétal :.....	29
1.6.4.2. Cryoprotection :.....	30
1.6.5. Mécanismes de tolérance à la cryoconservation.....	31
1.6.5.1. Dommages liés aux radicaux libres.....	32
1.6.5.2. La peroxydation des lipides (oxydation lipidique).....	33
1.6.5.3. Les antioxydants.....	35
1.6.5.4. Stabilité de la membrane cellulaire.....	35
1.6.6. Le rôle des sucres.....	36
1.6.7. Impact de la cryoconservation sur la physiologie des explants.....	39
1.6.7.1. Impact de la cryoconservation sur l'intégrité structurale.....	39
1.6.7.2. Impact de la cryoconservation sur le degré de méthylation globale de l'ADN.....	42
1.6.7.2.1. La stabilité génomique.....	42
1.6.7.2.2. Modifications épigénétiques.....	43
1.6.7.3. Application de l'immunolocalisation.....	46

1.6.8. La cryoconservation chez le palmier dattier	48
1.7. Objectif de la thèse	50
CHAPITRE 2.....	52
2. Matériels et Méthodes	53
2.1. Matériel végétal.....	53
2.2. Culture <i>in vitro</i>	53
2.3. Cryoconservation	53
2.3.1. Vitrification en gouttes (DV)	53
2.3.2. D cryo-plate.....	54
2.3.3. Paramètres étudiés.....	54
2.4. Teneur en eau	58
2.5. Étude histologique.....	58
2.6. Coloration.....	58
2.7. L'immunolocalisation.....	58
2.7.1. Fixation et déshydratation	59
2.7.2. Protocole d'immunolocalisation.....	59
2.8. Observations, acquisition et traitement d'images	60
CHAPITRE 3.....	65
3. Efficacité des protocoles de DV et de D cryo-plate sur des PEM de palmier dattier 66	66
3.1. Introduction	66
3.2. Intensité de croissance des PEM	66
3.3. Cryoconservation	67
3.3.1. Vitrification en goutte (DV).....	67
3.3.1.1. Effet de la technique de DV sur la survie des PEM de la variété Sokary	67
3.3.1.2. Effet de la technique de DV sur l'intensité de croissance des PEM de la variété Sokary	68
3.3.1.3. Effet de la technique de DV sur la survie des PEM de la variété Sultany	69
3.3.1.4. Effet de la technique de DV sur l'intensité de croissance des PEM de la variété Sultany	70
3.3.2. D-cryo plate.....	71
3.3.2.1. Teneur en eau des PEM encapsulées	71
3.3.2.2. Effet de la technique de D cryo-plate sur la survie des PEM de la variété Sokary.....	72
3.3.2.3. Effet de la technique de D cryo-plate sur l'intensité de croissance des PEM de la variété Sokary	73
3.3.2.4. Effet de la technique de D cryo-plate sur la survie des PEM de la variété Sultany.....	74
3.3.2.5. Effet de la technique de D cryo-plate sur l'intensité de croissance des PEM de la variété Sultany	75
3.4. Discussion	77
CHAPITRE 4.....	82
4. Étude de l'effet des étapes successives du protocole de DV sur l'intégrité structurale des PEM	83
4.1. Introduction	83
4.2. Intégrité structurale des PEM.....	83
4.2.1. Structure des PEM	83
4.2.2. Observations qualitatives	85
4.2.2.1. Cellules méristématiques	85
4.2.2.2. Cellules embryogènes	86
4.2.2.2.1. Cellules embryogènes (Population I).....	86
4.2.2.2.2. Cellules embryogènes (Population II).....	88
4.2.3. Observations quantitatives	95
4.2.3.1. Plasmolyse	95
4.2.3.1.1. Cellules méristématiques	95
4.2.3.1.2. Cellules embryogènes (Population I).....	95

4.2.3.1.3. Cellules embryogènes (Population II).....	96
4.2.3.2. Rapport nucléocytoplasmique.....	97
4.2.3.2.1. Cellules méristématiques	97
4.2.3.2.2. Cellules embryogènes (Population I).....	98
4.2.3.2.3. Cellules embryogènes (Population II).....	99
4.2.3.3. Taille des cellules.....	100
4.2.3.4. Teneur en protéines de réserve.....	101
4.2.3.5. Forme du noyau	102
4.2.3.5.1. Cellules méristématiques	102
4.2.3.5.2. Cellules embryogènes (Population I).....	102
4.2.3.5.3. Cellules embryogènes (Population II).....	103
4.3. Discussion	104
CHAPITRE 5.....	109
5. Étude de l'effet des étapes successives du protocole de DV sur la méthylation de l'ADN des PEM.....	110
5.1. Introduction.....	110
5.2. Observations qualitatives :.....	110
5.2.1. Tissus différenciés :	110
5.2.2. Masses proembryogènes PEM :	111
5.2.2.1. Cellules méristématiques :	111
5.2.2.2. Cellules embryogènes :	111
5.3. Observations quantitatives :.....	123
5.3.1. Tissus différenciés :	123
5.3.2. Cellules embryogènes :	123
5.4. Discussion	125
CHAPITRE 6.....	129
6. Conclusions générales et perspectives:.....	130
6.1. Conclusions générales:.....	130
6.1.1. Efficacité de DV et D cryo-plate.....	130
6.1.2. L'impact du protocole de DV sur l'intégrité structurale des PEM.....	132
6.1.3. L'impact du protocole de DV sur la méthylation de l'ADN des PEM.....	133
6.2. Perspectives.....	135
7. Références bibliographiques	137
8. Annexes:	164

Figures :

Figure 1 A) Morphologie du palmier dattier (Photo : E. Cherif), B) Palmes (Photo : S. Zehdi).....	4
Figure 2 Les types de racines rencontrées chez le palmier dattier (D'après Munier 1973).....	4
Figure 3 Inflorescences du palmier dattier. A : inflorescence femelle ; B : inflorescence mâle ; C: diagramme floral (Daher Meraneh, 2010).....	5
Figure 4 Les principales causes de dommages tissulaires des plantes pendant la cryoconservation. D'après (Kaczmarczyk <i>et al.</i> , 2012).....	32
Figure 5: Oxydation des acides gras polyinsaturés (AGPI) d'après (Gill & Tuteja, 2010).....	34
Figure 6 Masse proembryogène (PEM) de palmier dattier de la variété Sokary (Échelle : 100 µm).....	55
Figure 7 Masse proembryogène (PEM) de palmier dattier de la variété Sokary encapsulée (Échelle : 100 µm). 55	
Figure 8 Étapes du protocole de vitrification en goutte (DV) sur des PEM de palmier dattier. Le milieu de prétraitement contient les mêmes composants du milieu MS standard sans hormones et avec 0,5 M de saccharose La solution de loading (LS) : C7 (2,0 M glycérol + 0,4 M saccharose). La solution de vitrification PVS2 : (3,3 M glycérol + 2,4 M éthylène glycol + 0,4 M saccharose + 1,9 M DMSO 35). La solution d'unloading (ULS) un milieu liquide contenant 1,2 M saccharose).....	56
Figure 9 Étapes du protocole de D cryo-plate sur des PEM de palmier dattier. Le milieu de prétraitement contient les mêmes composants du milieu MS standard sans hormones et avec 0,5 M de saccharose La solution de loading (LS) : C7 (2,0 M glycérol + 0,4 M saccharose). La solution d'unloading (ULS) un milieu liquide contenant 1,2 M saccharose).....	57
Figure 10 Illustration de certaines étapes du protocole de D cryo-plate sur des PEM de palmier dattier. A) Transfert des PEM sur le cryo-plate. B) Déshydratation sous hotte à flux laminaire. C) et E) PEM cryoconservées, immédiatement après le transfert sur le milieu standard de prolifération. D) et F) PEM après 15 jours de culture sur le milieu de prolifération. C) et D) PEM non-survivant. E) et F) PEM en croissance.....	60
Figure 11 Représentation schématique des différentes étapes du protocole de DV étudiées par analyse histologique. Témoin: aucun traitement. +LS: traitement avec la solution de loading. +ULS : traitement avec la solution d'unloading. +15j: observation après 15 jours de culture sur milieu de croissance. +LN: congélation dans l'azote liquide. +PVS2 : traitement avec la solution de vitrification. Les treize conditions sélectionnées sont écrites en rouge. Les conditions entourées en rouge sont celles sélectionnées pour l'étude de l'immunolocalisation.	61
Figure 12 Coupes histologiques des PEM de palmier dattier de la variété Sokary A) cellules méristématiques; B) cellules embryogènes de la population I (popI); C) cellules embryogènes de la population II (popII); D) Mesure de l'état de la plasmolyse (surface du cytoplasme en bleu, surface de la cellule en jaune). Mesure du rapport nucléocytoplasmique (surface du cytoplasme en rouge, surface du noyau en violet). E) Mesure de la teneur en protéines de réserve (SC: surface du type cellulaire étudié, PR: surface des protéines de réserve).	64
Figure 13 Intensité de croissance (% d'augmentation de la surface par rapport à la surface initiale) des PEM de deux variétés de palmier dattier, Sokary et Sultany. 7 jours: Après 7 jours de culture sur milieu standard de prolifération. 15 jours : Après 15 jours de culture sur milieu standard de prolifération.	67
Figure 14 Évolution de la teneur en eau (% matière fraîche) des PEM de palmier dattier encapsulées pendant la déshydratation sous hotte à flux laminaire. Sokary-pré : PEM de la variété Sokary non prétraitées. Sokary+pré : PEM de la variété Sokary prétraitées pendant 3 jours sur un milieu contenant 0,5 M de saccharose. Sultany-pré : PEM de la variété Sultany non prétraitées. Sultany+pré : PEM de la variété Sultany prétraitées pendant 3 jours sur un milieu contenant 0,5 M de saccharose.	72
Figure 15 Coupe histologique des PEM de palmier dattier de la variété Sokary. Mc : cellules méristématiques ; PopI : cellules embryogènes (Population I); PopII: cellules embryogènes (Population II); Pa: cellules parenchymateuses. Échelle: 100µm.	84
Figure 16 Coupes histologiques des cellules méristématiques des PEM de palmier dattier de la variété Sokary au cours des différentes étapes du protocole de cryoconservation par vitrification en gouttes. (A): témoin non traité. (B) : traitement de loading sans prétraitement (-pré+LS). (C) : -pré+LS+ congélation dans l'azote liquide (+LN). (D) : -pré+LS+LN+ traitement avec la solution d'unloading (ULS). (E) : -pré+LS+LN+ULS après 15 jours de transfert sur un milieu standard de prolifération (15jrs). (F) : Témoin prétraité pendant 3 jours sur un milieu contenant 0,5 M de saccharose. (G) : traitement de loading (+pré+LS). (H) : +pré+LS+LN. (I) : +pré+LS+LN+ULS. (J) : -pré+LS+LN+ULS après 15 jours de transfert sur un milieu standard de prolifération (15jrs). (K) : +pré+LS+LN+traitement avec la solution de vitrification (PVS2). (L) : +pré+LS+LN+PVS2+LN. (M) : +pré+LS+LN+PVS2+LN après 15 jours de transfert sur un milieu standard de prolifération (15jrs).....	90
Figure 17 Coupes histologiques des cellules embryogènes (Population I) des PEM de palmier dattier de la variété Sokary au cours des différentes étapes du protocole de cryoconservation par vitrification en	

gouttes. (A): témoin non traité. (B) : traitement de « loading » sans prétraitement (-pré+LS). (C) : -pré+LS+ congélation dans l'azote liquide (+LN). (D) : -pré+LS+LN+ traitement avec la solution d' « unloading » (ULS). (E) : -pré+LS+LN+ULS après 15 jours de transfert sur un milieu standard de prolifération (15jrs). (F) : Témoin prétraité pendant 3 jours sur un milieu contenant 0,5 M de saccharose. (G) : traitement de « loading » (+pré+LS). (H) : +pré+LS+LN. (I) : +pré+LS+LN+ULS. (J) : -pré+LS+LN+ULS après 15 jours de transfert sur un milieu standard de prolifération (15jrs). (K) : +pré+LS+LN+traitement avec la solution de vitrification (PVS2). (L) : +pré+LS+LN+PVS2+LN. (M) : +pré+LS+LN+PVS2+LN après 15 jours de transfert sur un milieu standard de prolifération (15jrs)..... 92

Figure 18 Coupes histologiques des cellules embryogènes (Population II) des PEM de palmier dattier de la variété Sokary au cours des différentes étapes du protocole de cryoconservation par vitrification en gouttes. (A): témoin non traité. (B) : traitement de « loading » sans prétraitement (-pré+LS). (C) : -pré+LS+ congélation dans l'azote liquide (+LN). (D) : -pré+LS+LN+ traitement avec la solution d' « unloading » (ULS). (E) : -pré+LS+LN+ULS après 15 jours de transfert sur un milieu standard de prolifération (15jrs). (F) : Témoin prétraité pendant 3 jours sur un milieu contenant 0,5 M de saccharose. (G) : traitement de « loading » (+pré+LS). (H) : +pré+LS+LN. (I) : +pré+LS+LN+ULS. (J) : -pré+LS+LN+ULS après 15 jours de transfert sur un milieu standard de prolifération (15jrs). (K) : +pré+LS+LN+traitement avec la solution de vitrification (PVS2). (L) : +pré+LS+LN+PVS2+LN. (M) : +pré+LS+LN+PVS2+LN après 15 jours de transfert sur un milieu standard de prolifération (15jrs)..... 94

Figure 19 Coupes histologiques de cellules méristématiques chez les PEM témoins non traitées de palmier dattier. (A et B): témoin non traité de la variété Sokary. (C et D) : témoin non traité de la variété Sultany. N: noyau ; Nm : noyau méthylé ; cc : chromocentre; MC: cellules méristématiques; Pop: cellules embryogènes..... 113

Figure 20 Coupes histologiques des tissus différenciés des PEM de palmier dattier de la variété Sokary après certaines étapes du protocole de cryoconservation par vitrification en gouttes. (A et B): témoin non traité. (C et D) : +pré +LS Cryo 0jr ; (E et F): +pré+LS+PVS2 Cryo 0jr ; (G et H) : +pré+LS+PVS2 Cryo 30jrs. T : témoin ; -/+ Pré : sans/ avec prétraitement sur un milieu à 0,5M de saccharose ; LS : traitement de loading ; PVS2 : traitement dans la solution de PVS2 ; Cryo 0jr : directement après le transfert sur un milieu standard de prolifération ; Cryo 30jrs : 30jours après le transfert sur un milieu standard de prolifération ; N: noyau ; Nm : noyau méthylé ; cc : chromocentre..... 114

Figure 21 Coupes histologiques des cellules embryogènes de PEM de palmier dattier de la variété Sokary après certaines étapes du protocole de cryoconservation par vitrification en gouttes. (A et B): témoin non traité ; (C et D) : -pré + LS; (E et F): -pré +LS Cryo0jr ; (G et H) : -pré +LS Cryo 30jrs ; (I et J) :+pré; (K et L) : +pré +LS; (M et N) : +pré +LS Cryo 0jr ; (O et P) : +pré +LS Cryo 30jrs ; (Q et R):+pré+30jrs; (S et T) : +pré+LS+PVS2 ; (U et V) : +pré +LS+PVS2 Cryo 0jr;(W et X) : +pré +LS+PVS2 Cryo 30jrs. T : témoin ; -/+ Pré : sans/ avec prétraitement sur un milieu à 0,5M de saccharose ; LS : traitement de loading ; PVS2 : traitement dans la solution de PVS2 ; Cryo 0jr : directement après le transfert sur un milieu standard de prolifération ; Cryo 30jrs : 30 jours après le transfert sur un milieu standard de prolifération. N: noyau ; Nm : noyau méthylé ; cc : chromocentre..... 118

Figure 22 Coupes histologiques des cellules embryogènes de PEM de palmier dattier de la variété Sultany après certaines étapes du protocole de cryoconservation par vitrification en gouttes. (A et B): témoin non traité ; (C et D) : -pré + LS; (E et F): -pré +LS Cryo0jr ; (G et H) : -pré +LS Cryo 30jrs ; (I et J) :+pré; (K et L) : +pré +LS; (M et N) : +pré +LS Cryo 0jr ; (O et P) : +pré +LS Cryo 30jrs ; (Q et R):+pré+30jrs; (S et T) : +pré+LS+PVS2 ; (U et V) : +pré +LS+PVS2 Cryo 0jr;(W et X) : +pré +LS+PVS2 Cryo 30jrs. T : témoin ; +/- Pré : sans/ avec prétraitement sur un milieu à 0,5M de saccharose ; LS : traitement de loading ; PVS2 : traitement dans la solution de PVS2 ; Cryo 0jr : directement après le transfert sur un milieu standard de prolifération ; Cryo 30jrs : 30 jours après le transfert sur un milieu standard de prolifération. N: noyau ; Nm : noyau méthylé ; cc : chromocentre..... 122

Tableaux :

- Tableau 1** Différentes utilisations des fruits et sous-produits du palmier dattier (Daher Meraneh, 2010) 7
- Tableau 2** Les espèces communes réactives de l'oxygène (ROS) (Halliwell & Gutteridge, 2007) 33
- Tableau 3** Effet du prétraitement au saccharose (3 jours, 0,5M de saccharose), et de la durée de traitement avec PVS2 sur la survie (%) des PEM cryoconservées (+LN) et non-cryoconservées (-LN) de palmier dattier de la variété Sokary. Des lettres différentes sur la même ligne indiquent des différences significatives entre les conditions du protocole de cryoconservation, selon le test de Mann-Whitney (*U* test) ($P < 0,05$). 68
- Tableau 4** Effet du prétraitement au saccharose (3 jours, 0,5M de saccharose), et de la durée de traitement avec PVS2 sur l'intensité de croissance (% de l'augmentation de la surface après 15 jours par rapport à la surface initiale de PEM) des PEM cryoconservées (+LN) et non-cryoconservées (-LN) de palmier dattier de la variété Sokary. Des lettres différentes sur la même ligne indiquent des différences significatives entre les conditions du protocole de cryoconservation, selon le test de Mann-Whitney (*U* test) ($P < 0,05$). 68
- Tableau 5** Effet du prétraitement au saccharose (3 jours, 0,5M de saccharose), et de la durée du traitement avec PVS2 sur la survie (%) des PEM cryoconservées (+LN) et non-cryoconservées (-LN) de palmier dattier de la variété Sultany. Des lettres différentes sur la même ligne indiquent des différences significatives entre les conditions du protocole de cryoconservation, selon le test de Mann-Whitney (*U* test) ($P < 0,05$). 70
- Tableau 6** Effet du prétraitement au saccharose (3 jours, 0,5M de saccharose), et de la durée de traitement avec PVS2 sur l'intensité de croissance (% de l'augmentation de la surface après 15 jours par rapport à la surface initiale de PEM) des PEM cryoconservées (+LN) et non-cryoconservées (-LN) de palmier dattier de la variété Sultany. Des lettres différentes sur la même ligne indiquent des différences significatives entre les conditions du protocole de cryoconservation, selon le test de Mann-Whitney (*U* test) ($P < 0,05$). 70
- Tableau 7** Effet du prétraitement au saccharose (3 jours, 0,5M de saccharose), et de la durée de déshydratation sur la survie (%) des PEM cryoconservées (+LN) et non-cryoconservées (-LN) de palmier dattier de la variété Sokary. Des lettres différentes sur la même ligne indiquent des différences significatives entre les conditions du protocole de cryoconservation, selon le test de Mann-Whitney (*U* test) ($P < 0,05$). 73
- Tableau 8** Effet du prétraitement au saccharose (3 jours, 0,5M de saccharose), et de la durée de déshydratation sur l'intensité de croissance (% de l'augmentation de la surface après 15 jours par rapport à la surface initiale de PEM) des PEM cryoconservées (+LN) et non-cryoconservées (-LN) de palmier dattier de la variété Sokary. Des lettres différentes sur la même ligne indiquent des différences significatives entre les conditions du protocole de cryoconservation, selon le test de Mann-Whitney (*U* test) ($P < 0,05$). 74
- Tableau 9** Effet du prétraitement au saccharose (3 jours, 0,5M de saccharose), et de la durée de déshydratation sur la survie (%) des PEM cryoconservées (+LN) et non-cryoconservées (-LN) de palmier dattier de la variété Sultany. Des lettres différentes sur la même ligne indiquent des différences significatives entre les conditions du protocole de cryoconservation, selon le test de Mann-Whitney (*U* test) ($P < 0,05$). 75
- Tableau 10** Effet du prétraitement au saccharose (3 jours, 0,5M de saccharose), et de la durée de déshydratation sur l'intensité de croissance (% de l'augmentation de la surface après 15 jours par rapport à la surface initiale de PEM) des PEM cryoconservées (+LN) et non-cryoconservées (-LN) de palmier dattier de la variété Sultany. Des lettres différentes sur la même ligne indiquent des différences significatives entre les conditions du protocole de cryoconservation, selon le test de Mann-Whitney (*U* test) ($P < 0,05$). 76
- Tableau 11** État de plasmolyse (% par rapport au témoin non traité) des cellules méristématiques des PEM de palmier dattier de la variété Sokary en fonction de l'étape du protocole de vitrification en gouttes utilisé. T : témoin non traité ; Pré : prétraitement sur un milieu 0,5M de saccharose ; LS : traitement avec la solution de « loading » ; PVS2 : traitement avec la solution de vitrification PVS2 ; LN : azote liquide ; LN+UL : azote liquide + traitement avec la solution d' « unloading » ; 15jrs : après 15 jours de culture sur un milieu standard de prolifération. Les différentes lettres minuscules indiquent des différences significatives entre les conditions du protocole de cryoconservation, selon le test de Duncan ($P < 0,05$). ... 95
- Tableau 12** État de plasmolyse (% par rapport au témoin non traité) des cellules embryogènes (Population I) des PEM de palmier dattier de la variété Sokary en fonction de l'étape du protocole de vitrification en gouttes utilisé. T : témoin non traité ; Pré : prétraitement sur un milieu 0,5M de saccharose ; LS : traitement avec la solution de « loading » ; PVS2 : traitement avec la solution de vitrification PVS2 ; LN : azote liquide ; LN+UL : azote liquide + traitement avec la solution d' « unloading » ; 15jrs : après 15 jours de culture sur un milieu standard de prolifération. Les différentes lettres minuscules indiquent des différences significatives entre les conditions du protocole de cryoconservation, selon le test de Duncan ($P < 0,05$). ... 96
- Tableau 13** État de plasmolyse (% par rapport au témoin non traité) des cellules embryogènes (Population II) des PEM de palmier dattier de la variété Sokary en fonction de l'étape du protocole de vitrification en gouttes utilisé. T : témoin non traité ; Pré : prétraitement sur un milieu 0,5M de saccharose ; LS : traitement avec la solution de « loading » ; PVS2 : traitement avec la solution de vitrification PVS2 ; LN : azote liquide ; LN+UL : azote liquide + traitement avec la solution d' « unloading » ; 15jrs : après 15 jours de culture sur un milieu standard de prolifération. Les différentes lettres minuscules indiquent des

différences significatives entre les conditions du protocole de cryoconservation, selon le test de Duncan (P <0,05).....	97
Tableau 14 Rapport nucléocytoplasmique des cellules méristématiques des PEM de palmier dattier de la variété Sokary en fonction de l'étape du protocole de vitrification en gouttes utilisé. T : témoin non traité ; Pré : prétraitement sur un milieu 0,5M de saccharose ; LS : traitement avec la solution de « loading » ; PVS2 : traitement avec la solution de vitrification PVS2; LN : azote liquide ; LN+UL : azote liquide + traitement avec la solution d' « unloading » ; 15jrs : après 15 jours de culture sur un milieu standard de prolifération. Les différentes lettres minuscules indiquent des différences significatives entre les conditions du protocole de cryoconservation, selon le test de Duncan (P <0,05).....	98
Tableau 15 Rapport nucléocytoplasmique des cellules embryogènes (Population I) des PEM de palmier dattier de la variété Sokary en fonction de l'étape du protocole de vitrification en gouttes utilisé. Té : témoin non traité ; Pré : prétraitement sur un milieu 0,5M de saccharose ; LS : traitement avec la solution de « loading » ; PVS2 : traitement avec la solution de vitrification PVS2; LN : azote liquide ; LN+UL : azote liquide + traitement avec la solution d' « unloading » ; 15jrs : après 15 jours de culture sur un milieu standard de prolifération. Les différentes lettres minuscules indiquent des différences significatives entre les conditions du protocole de cryoconservation, selon le test de Duncan (P <0,05).	98
Tableau 16 Rapport nucléocytoplasmique des cellules embryogènes (Population II) des PEM de palmier dattier de la variété Sokary du palmier dattier en fonction de l'étape du protocole de vitrification en gouttes utilisé. Té : témoin non traité ; Pré : prétraitement sur un milieu 0,5M de saccharose ; LS : traitement avec la solution de « loading » ; PVS2 : traitement avec la solution de vitrification PVS2; LN : azote liquide ; LN+UL : azote liquide + traitement avec la solution d' « unloading » ; 15jrs : après 15 jours de culture sur un milieu standard de prolifération. Les différentes lettres minuscules indiquent des différences significatives entre les conditions du protocole de cryoconservation, selon le test de Duncan (P <0,05). ...	99
Tableau 17 Taille des cellules pour les trois types cellulaires: cellules méristématiques (MC), cellules embryogènes de la population I (Pop I) et cellules embryogènes de la population II (PopII) des PEM de palmier dattier de la variété Sokary en fonction de l'étape du protocole de vitrification en gouttes utilisé. T: témoin non traité ; -Pré+LS : traitement avec la solution de loading sans prétraitement sur un milieu 0,5M de saccharose; Pré : prétraitement sur un milieu 0,5M de saccharose ; +Pré+LS : prétraitement sur un milieu 0,5M de saccharose + traitement avec la solution de loading ; +Pré+LS+PVS: prétraitement sur un milieu 0,5M de saccharose + traitement avec la solution de loading +traitement avec la solution de vitrification ; +Pré+LS+PVS+LN+ULS+15 jrs : prétraitement sur un milieu 0,5M de saccharose + traitement avec la solution de loading + traitement avec la solution de vitrification + traitement avec la solution d'unloading + 15 jours de culture sur un milieu standard de prolifération. Les différentes lettres minuscules indiquent des différences significatives entre les conditions du protocole de cryoconservation, selon le test de Duncan (P <0,05).	100
Tableau 18 Teneur en protéines de réserve des cellules méristématiques (MC) et des cellules embryogènes de la population I (Pop I) des PEM de palmier dattier de la variété Sokary en fonction de l'étape du protocole de vitrification en gouttes utilisé. T : témoin non traité ; Pré : prétraitement sur un milieu 0,5M de saccharose ; LS : traitement avec la solution de « loading » ; PVS2 : traitement avec la solution de vitrification PVS2; LN : azote liquide ; LN+UL : azote liquide + traitement avec la solution d' « unloading » ; 15jrs : après 15 jours de culture sur un milieu standard de prolifération. Les différentes lettres minuscules indiquent des différences significatives entre les conditions du protocole de cryoconservation, selon le test de Duncan (P <0,05).....	101
Tableau 19 Degré de circularité du noyau des trois types cellulaires: cellules méristématiques (MC), cellules embryogènes de la population I (Pop I) et cellules embryogènes de la population II (PopII) des PEM de palmier dattier de la variété Sokary en fonction de l'étape du protocole de vitrification en gouttes utilisé. T: témoin non traité ; Pré : prétraitement sur un milieu 0,5M de saccharose ; LS : traitement avec la solution de « loading » ; LS+PVS2 : traitement avec la solution de vitrification PVS2 après traitement avec la solution de « loading » ; LN : azote liquide ; LS+LN+UL : traitement avec la solution de « loading » + azote liquide + traitement avec la solution d' « unloading » ; 15jrs : après 15 jours de culture sur un milieu standard de prolifération. Les différentes lettres minuscules indiquent des différences significatives entre les conditions du protocole de cryoconservation, selon le test de Duncan (P <0,05).	102
Tableau 20 Pourcentage de noyaux méthylés par rapport nombre total de noyaux marqués par DAPI des tissus différenciés des PEM de palmier dattier de la variété Sokary en fonction de certaines étapes du protocole de vitrification en gouttes utilisé. T: témoin non traité ; Pré +LS Cryo 0jr: prétraitement sur un milieu 0,5M de saccharose + traitement avec la solution de loading directement après le transfert sur un milieu standard de prolifération; Pré + LS +PVS2 Cryo 0jr: prétraitement sur un milieu 0,5M de saccharose + traitement avec la solution de loading + traitement avec la solution de vitrification PVS2 après traitement avec la solution de loading ; Pré + LS +PVS2 Cryo 30jrs : après 30 jours de culture sur milieu standard de	

prolifération. Les différentes lettres minuscules indiquent des différences significatives entre les conditions du protocole de cryoconservation, selon le test de Duncan ($P < 0,05$)..... 123

Tableau 21 Pourcentage de noyaux méthylés par rapport nombre total de noyaux marqués par DAPI des cellules embryogènes des PEM de palmier dattier des variétés Sokary et Sultany en fonction de l'étape du protocole de vitrification en gouttes utilisé. T: témoin non traité ; Pré : prétraitement sur un milieu 0,5M de saccharose ; LS : traitement avec la solution de loading ; PVS2 : traitement avec la solution de vitrification PVS2 après traitement avec la solution de loading ; Cryo 0jr: directement après le transfert sur un milieu standard de prolifération ; Cryo 30jrs : après 30 jours de culture sur milieu standard de prolifération. Les différentes lettres minuscules indiquent des différences significatives entre les conditions du protocole de cryoconservation, selon le test de Duncan ($P < 0,05$). 124

CHAPITRE 1

INTRODUCTION GÉNÉRALE

Le palmier dattier (*Phoenix dactylifera* L.) est une plante très importante dans les zones arides et semi-arides chaudes. Le dattier fait partie des plantes les plus anciennement cultivées (~6000 ans) (Ashraf & Hamidi-Esfahani, 2011). Les Phéniciens ont propagé les dattiers dans le bassin méditerranéen pour leur grand apport nutritionnel et la facilité du transport de leurs fruits (dattes). De nos jours, il existe plus de 2000 variétés de dattier cultivées dans le monde (Al-shahib & Marshall, 2003). La grande majorité de ces variétés se concentrent au Moyen-Orient et en Afrique du Nord. Le dattier se retrouve également dans certains pays d'Amérique du Sud, sur la rive nord de la Méditerranée, en Inde et au Pakistan. Selon la FAO, l'Égypte, l'Arabie Saoudite, l'Iran, les Émirats Arabes Unis et l'Algérie sont les principaux producteurs au niveau mondial (FAO 2010).

La croissance du dattier ainsi que la production de dattes nécessitent des températures moyennes entre 12,7°C et 27,5°C et une forte luminosité (Al-Turki, 2008). Il peut résister à des périodes de sécheresse importantes et à une température de 50°C, ce qui en fait l'arbre fruitier du désert par excellence. Il peut également survivre à une température très basse (-5°C) pendant de courtes durées (Munier, 1973; Al-Turki, 2008). Selon la texture des fruits, les variétés de palmier dattier ont été classées en trois groupes : molles, demi-molles et sèches. Une autre classification existe selon la durée nécessaire pour la maturation des fruits (Johnson, 2011).

La production du palmier dattier se fait traditionnellement par deux voies, soit par semis (propagation sexuée), soit par les rejets prélevés sur la plante-mère (propagation végétative). Les inconvénients majeurs de la propagation sexuée sont la perte chez les plantes produites des caractéristiques organoleptiques de la plante-mère et la production de 50% de mâles et de 50% de femelles. Les rejets, par contre, donnent toujours des plantes identiques à la plante-mère. Le nombre de rejets produits par palmier reste très limité, entre 20 et 30 rejets, et la majorité sont produits pendant le premier cycle de la vie de la plante (Zaid & Arias-Jiménez, 2002). Le palmier dattier atteint son potentiel de production de fruits en moyenne à l'âge de 10 ans (Zaid & Arias-Jiménez, 2002). Sa productivité peut s'étaler jusqu'à l'âge de 50 ans. La quantité de rejets varie selon la variété et les conditions de culture. Pour cette raison, la propagation par rejets reste insuffisante pour répondre à la demande, surtout en vue du rajeunissement et du renouvellement de certaines palmeraies, notamment celles détruites à cause des maladies comme le Bayoud (la fusariose vasculaire). Par conséquent, les chercheurs se sont orientés vers la culture *in vitro* pour produire en grande quantité les variétés intéressantes.

1. Synthèse bibliographique

Le palmier dattier est une monocotylédone dioïque de la famille des Arecacées. Le nom botanique du palmier dattier est *Phoenix dactylifera* L. Ce nom lui a été donné par Linné en 1734 (Munier, 1973). Le terme *Phoenix* pourrait dériver du mot grec *phoinix* qui signifie dattier chez les Grecs de l'Antiquité, car ces derniers le considèrent comme l'arbre emblème des Phéniciens. Une seconde hypothèse propose que ce nom fait référence au Phénix, oiseau légendaire qui renaît de ses cendres. En effet, le dattier possède la capacité de se renouveler après avoir été partiellement brûlé (Popenoe, 1920; Ouennoughi & Dubost, 2005). Le mot *dactylifera* signifie en grec le doigt qui fait référence à la forme de la datte (Zaid & De Wet, 1999; Chao & Krueger, 2007). Douze espèces appartiennent au genre *Phoenix*, dont la plupart sont des espèces ornementales. Seul *P. dactylifera* a été cultivé en tant qu'arbre fruitier. Son développement est associé à la naissance et l'accroissement des premières civilisations urbaines et agricoles (Al-Turki, 2008).

1.1. Morphologie

L'appareil végétatif se compose d'un tronc cylindrique ou stipe, pouvant atteindre 20 mètres de haut, qui se termine par un bourgeon unique. Ce dernier est surplombé par une couronne de feuilles composées et pennées appelées palmes auxquelles il a donné naissance. À l'aisselle de chacune d'entre-elles se trouve un bourgeon axillaire capable de se développer pour donner soit des fleurs dans la zone coronaire, soit un gourmand dans la zone sous-coronaire, soit un rejet dans la partie basale (Munier, 1973) (Fig. 1).

L'appareil racinaire est fasciculé. Les racines se forment à partir du bulbe situé à la base du tronc. Quatre zones racinaires peuvent être distinguées : 1) racines respiratoires ; 2) racines de nutrition ; 3) racines d'absorption ; 4) racines atteignant la nappe phréatique. L'importance du système racinaire dépend de la nature du sol, du mode de culture ainsi que de la variété de dattier (Fig. 2). Le palmier dattier est une espèce dioïque. Les organes reproducteurs sont composés d'inflorescences mâles et femelles portées par des pieds différents. Les phénomènes de changement de sexe chez le palmier dattier ou de l'existence d'inflorescences des deux sexes sur le même pied sont très rares (surtout chez les mâles). Les inflorescences se forment à partir du bourgeon axillaire de l'année précédente. Elles sont enveloppées et protégées dans une bractée membraneuse fermée ou spathe (Fig. 3).

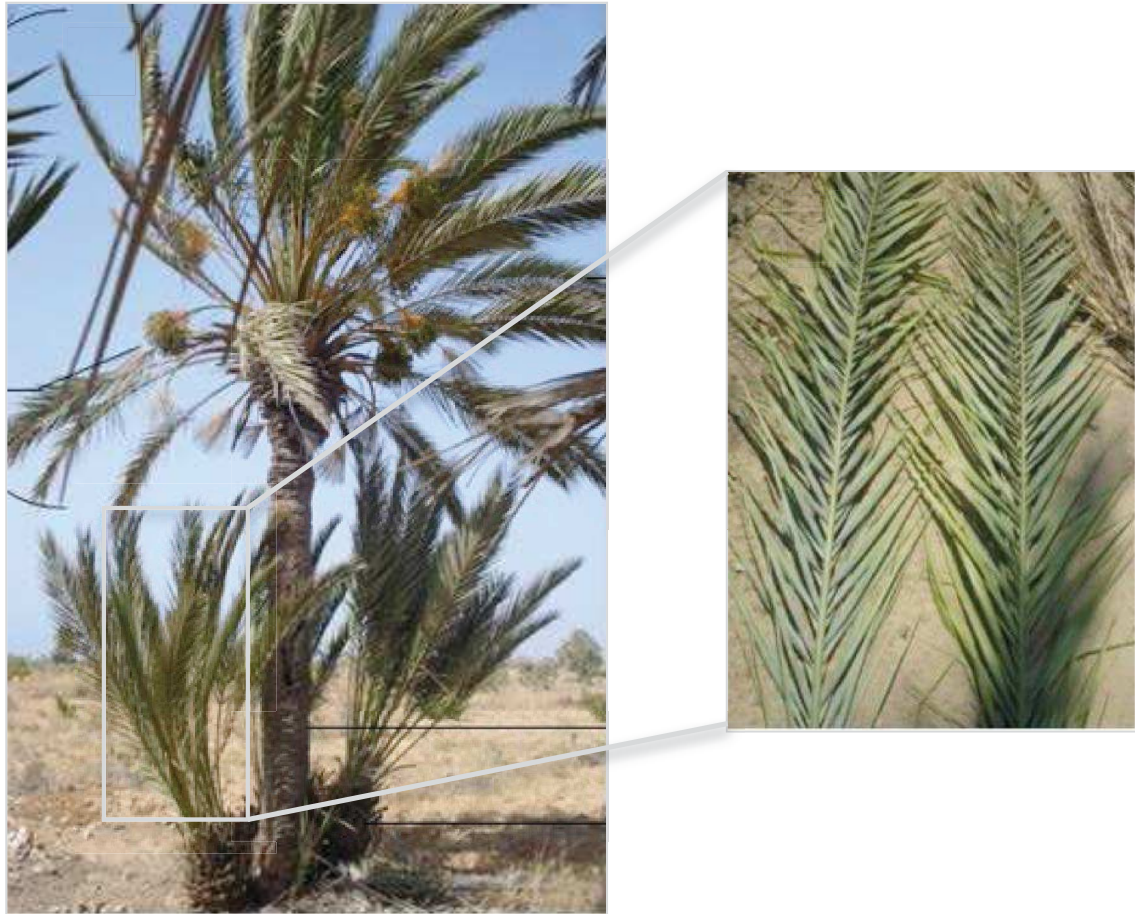


Figure 1 A) Morphologie du palmier dattier (Photo : E. Cherif), B) Palmes (Photo : S. Zehdi)

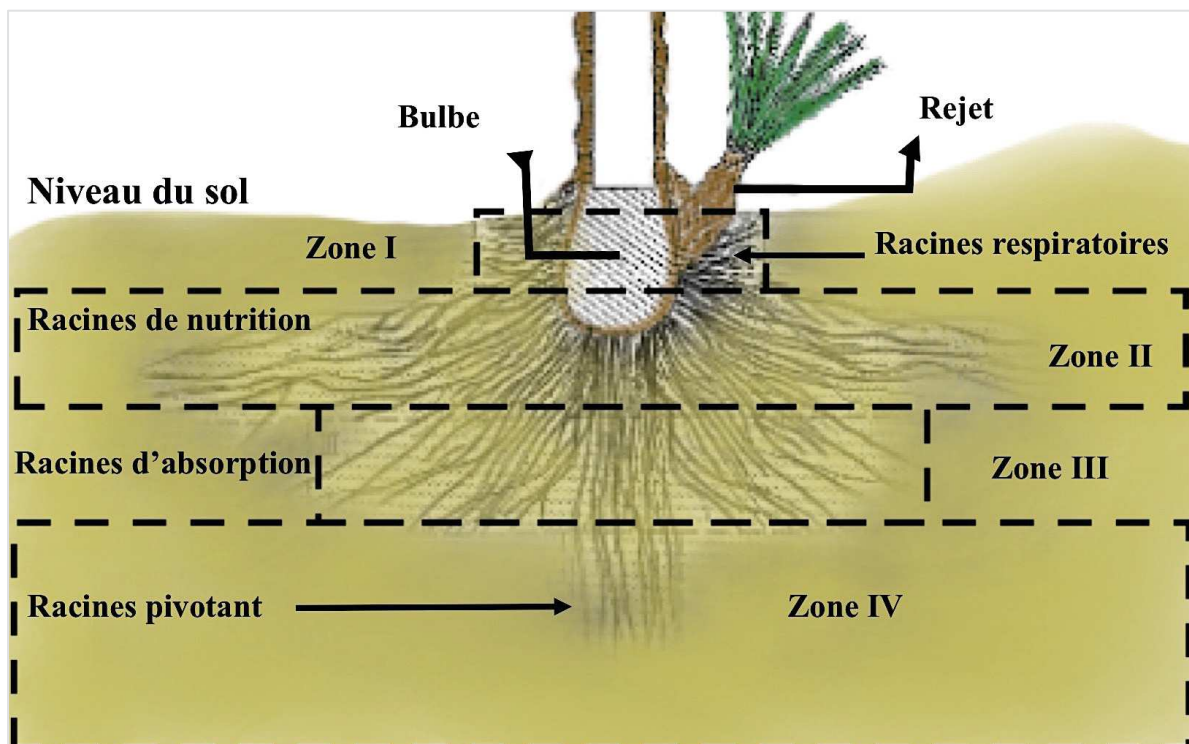


Figure 2 Les types de racines rencontrées chez le palmier dattier (D'après Munier 1973)

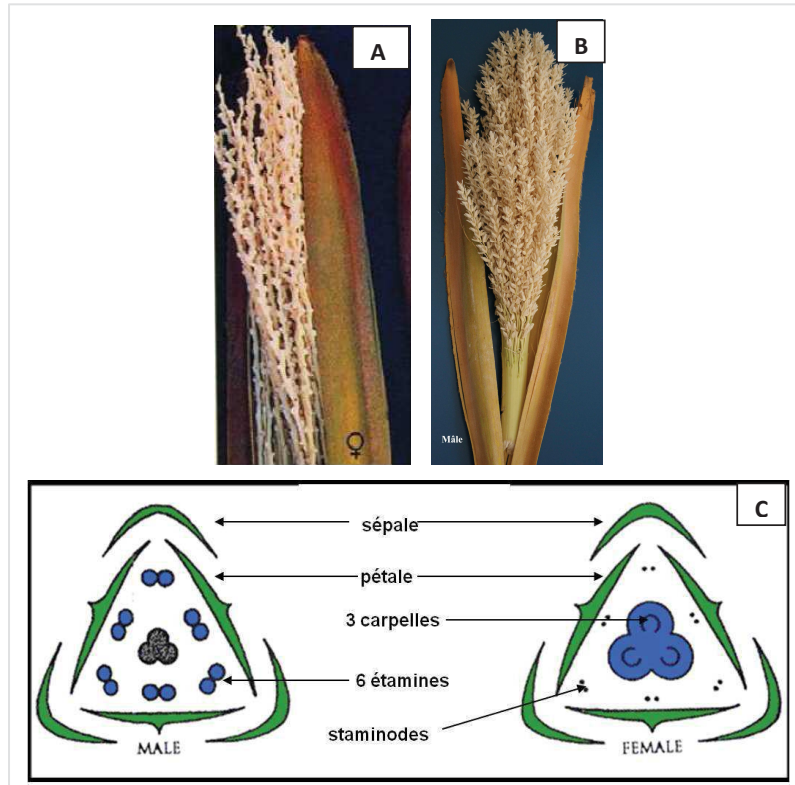


Figure 3 Inflorescences du palmier dattier. A : inflorescence femelle ; B : inflorescence mâle ; C: diagramme floral (Daher Meraneh, 2010)

Celle-ci s'ouvre naturellement selon la ligne médiane dorsale au moment de la maturité des fleurs pour les rendre accessibles pour la pollinisation qui se fait chez les arbres sauvages par le vent ou les insectes. En culture, la pollinisation est faite manuellement par l'homme en mettant en contact les inflorescences mâles avec les inflorescences femelles (Al-Turki, 2008). La forme des spathes est un élément précoce de distinction des individus mâles (spathes courtes et renflées) et femelles (spathes fines et allongées). Un arbre mâle peut produire du pollen permettant la pollinisation de 40 à 50 arbres femelles. Les fleurs mâles possèdent six étamines à déhiscence interne, disposées sur deux verticilles. Elles comportent un calice court formé de trois sépales soudés et d'une corolle de trois pétales pointus. Les fleurs femelles ont un ovaire comportant trois carpelles libres renfermant chacun un ovule. Un seul ovule est fécondé et un seul carpelle se développe par fleur. Les autres ovules avortent et tombent après la pollinisation (Munier, 1973).

Le fruit est appelé datte. C'est une baie contenant une seule graine couramment appelée noyau. La datte est constituée d'un fin péricarpe, entourant un mésocarpe charnu et un endocarpe parcheminé. Les fruits varient en taille, forme, couleur et en qualité qui dépend de la variété, des conditions de culture ainsi que du pollen utilisé lors de la pollinisation (la

métaxénie) (Swingle, 1928). Avant maturité, la couleur des fruits varie entre le vert, le jaune et le rouge et à maturité elle varie du rouge clair au jaune clair selon la variété (Al-Turki, 2008). Un seul régime de dattes peut contenir plus d'une centaine des dattes et peut peser entre 8 et 25 kg. Chaque arbre produit entre cinq et 10 régimes par an (Paquier, 2002).

1.2. Répartition géographique et écologie du palmier dattier

Le palmier dattier est cultivé dans une vaste zone s'étendant du 44^{ème} parallèle Nord jusqu'à 33° Sud. L'aire de répartition du palmier dattier se situe principalement entre 24° et 35° Nord. Sur un patrimoine phoenicicole couvrant 1 264 611 ha, environ 98 % (soit 1 257 649 ha) correspondent aux zones arides et semi-arides d'Asie et d'Afrique. Cette espèce peut se trouver également dans d'autres continents comme en Amérique, surtout aux États-Unis (Californie, Arizona, Texas), et aussi au Mexique, au Chili et au Pérou. En Australie, cette espèce se trouve dans les états du Queensland et du Northern Territory. En Europe, on le rencontre particulièrement en Espagne (Elche) et en Italie (Bordighera, San Remo) (Daher Meraneh, 2010).

Au vu de son aire de répartition, le palmier dattier est une espèce qui s'adapte à de nombreuses conditions écologiques. Cette espèce est cultivée efficacement au niveau économique dans des régions où la température peut monter au dessus de 40°C. Pour atteindre la maturité des fruits, une période de chaleur prolongée et une hygrométrie relativement faible sont essentielles. La durée de cette période peut varier de 100 à 200 jours en fonction de certains paramètres tels que les conditions écologiques, le mode de culture et bien évidemment la variété. Le concept de "chaleur de fructification", qui varie entre 3700 et 6000 °C, est utilisé afin de définir la somme des températures moyennes journalières nécessaire à la fructification. La nature des sols ne constitue pas un problème particulier car l'espèce peut s'accommoder de tous les sols des régions arides et semi-arides. Cependant, sa croissance est meilleure en sol léger et perméable qu'en sol lourd. Ses exigences en eau font qu'il se retrouve principalement dans les oasis. La pluie cause des pertes considérables si elle survient pendant la période de floraison ou de fructification car elle nuit à une bonne fécondation des fleurs et provoque des maladies cryptogamiques. Sur les fruits déjà formés, les pluies favorisent l'éclatement de l'épiderme, le noircissement, l'apparition de moisissures et la fermentation des dattes (Peyron, 2000). L'intervalle optimal d'implantation entre les arbres est de 6 à 8 mètres pour permettre un bon niveau d'éclairage des plantes et une bonne maturation des dattes.

1.3. Importance socio-économique

Le dattier produit des fruits très énergétiques, (300 Kcal, cinq fois l'orange et quatre fois le raisin). Sa richesse en fibres, en minéraux et en vitamines A et B fait de la datte un aliment d'un grand intérêt nutritif, consommable à l'état de fruit, facile à stocker par une simple dessiccation sous le soleil. Les dattes peuvent aussi être préparées sous forme de gâteaux, de sirop ou même fermentées en vin et vinaigre ou utilisées comme une source de bioéthanol. Sur le plan pharmaceutique, les dattes pourraient être utilisées comme calmants contre les insomnies et contre les ballonnements. L'ancienne Égypte utilisait les suspensions de pollen contre l'infertilité masculine (Bahmanpour *et al.*, 2006). Le dattier une fois abattu, son cœur est comestible. Les noyaux sont également consommables par le bétail. Dans les oasis, ces plantes assurent un microclimat permettant aux la survie d'autres espèces sous les conditions extrêmes du désert. Son bois est précieux comme bois d'œuvre, dans des régions où les arbres sont très rares. Ses feuilles (palmes) fournissent une matière première pour la fabrication de divers objets (Tableau 1).

Tableau 1 Différentes utilisations des fruits et sous-produits du palmier dattier (Daher Meraneh, 2010)

Partie de l'arbre	Ses utilisations
Dattes	Consommation humaine (dattes nature, sous forme transformée, aliment pour le bétail (déchets des dattes et les noyaux) ; biocarburant
Palmes	Bois de chauffage, ombrage, clôture
Folioles	Vannerie, cordes, aliment pour le bétail, cure-dents (épines)
Rachis	Bois de chauffage, fibres
Spadices	Cordes et bois de chauffage
Lif*	Cordes, couffins, filets
Stipe	Bois de chauffage et d'œuvre (menuiserie, canaux d'irrigation)
Cœur de palmier	Nourriture
Sève	Boisson
Pollen	Médicaments

* Les fibres de surface de palmiers dattiers (appelées localement : lif)

1.4. Propagation du palmier dattier

Le palmier dattier est habituellement multiplié *via* deux méthodes : la propagation traditionnelle et la micropropagation.

1.4.1. Propagation traditionnelle

1.4.1.1. Multiplication sexuée (par semis)

Cette méthode, très ancienne, est rarement employée du fait que le palmier dattier est une espèce dioïque. Un semis peut générer un pied mâle ou femelle avec un ratio de 1:1. Il faut donc attendre plusieurs années jusqu'à la floraison pour connaître le sexe d'un dattier. De plus, la multiplication sexuée engendre un brassage génétique qui ne permet pas la conservation des caractères de la plante-mère. Ces plantes produisent généralement des fruits de qualité inférieure (Zaid & De Wet, 1999; Eke *et al.*, 2005). Cependant, la propagation sexuée reste une méthode simple de multiplication et permet d'enrichir la diversité génétique du palmier dattier. Cette qualité est très intéressante et primordiale pour les programmes de sélection et d'amélioration variétale (Tisserat, 1982). Dans certains pays, le nombre de géotypes issus de semis est important. À titre d'exemple, 3,5 millions pieds en Égypte et plus de 2 millions au Maroc sont issus de semis (Abahmane, 2011).

1.4.1.2. Propagation végétative

Elle se base sur l'utilisation des rejets prélevés sur la plante-mère. La reproduction par rejets permet la conservation des caractères génétiques de la plante-mère. Elle assure une homogénéité du sexe, de la variété, de la vigueur et de la qualité des fruits. En général, les rejets qui se trouvent au niveau du tronc sont les plus utilisés car ils ont une meilleure survie. Cependant, La production des rejets dépend de l'âge et de la variété. Les rejets sont produits pendant la phase juvénile de la plante (Tisserat, 1983). La qualité du rejet est un paramètre très important car il détermine sa réussite au champ. Il faut donc prendre en considération certains critères afin d'obtenir des rejets de bonne qualité comme le poids (10 à 25 kg), l'âge (2-5 ans), le diamètre de la base (20-30 cm) et la formation de ses propres racines (Abahmane, 2011). Cependant, ce type de multiplication reste limité pour de nombreuses raisons :

- a) Une méthode laborieuse et coûteuse
- b) Un nombre limité de rejets par individu (10 à 30) (Heselmans, 1997)

- c) Un risque de transmission de maladies (Abahmane, 2011).
- d) Une nécessité d'un savoir-faire pour le sevrage et la transplantation des rejets (Al-Khayri, 2001).

1.4.2. Micropropagation

La totipotence est la capacité des cellules végétales différenciées, de se dédifférencier et de régénérer un nouvel organisme. La culture *in vitro* (aussi appelée micropropagation) est une technique qui se base sur cette capacité de régénération pour produire une nouvelle plante à partir de cellules ou de tissus végétaux sur un milieu nutritif. Dans cette approche, les tissus (explants) sont placés sur un milieu de croissance stérile (qui comprend du saccharose comme source d'énergie, des vitamines, des éléments minéraux et éventuellement des hormones de croissance) dans un environnement à une température, un taux d'humidité et une luminosité contrôlés.

L'un des plus grands avantages de la culture *in vitro*, hormis de produire des clones de la plante-mère, est de répondre beaucoup plus rapidement aux besoins en plantes par rapport à la propagation traditionnelle. En effet, la multiplication du palmier dattier par rejets ne génère que 10 pieds tous les 10-15 ans alors que *via* la micropropagation par organogenèse, ce taux est de trois pieds tous les 2 mois, soit plus d'un demi-million de pieds en 2 ans (Ferry, 2011). La régénération des plantes par la culture *in vitro* peut mettre à notre disposition des technologies et des outils pour la production à grande échelle de variétés d'intérêt, pour les programmes de sélection (Parveez *et al.*, 2000) et pour la conservation des ressources génétiques des plantes (Engelmann & Dussert, 2000).

Les recherches sur la micropropagation du palmier dattier ont commencé vers 1970. Deux techniques de régénération ont été employées, ce qui a permis de proposer plusieurs stratégies de clonage *in vitro* par organogenèse (Rhiss *et al.*, 1979; Drira & Benbadis, 1985) et par embryogenèse somatique (Fki *et al.*, 2003; Sané *et al.*, 2006). Divers explants ont été utilisés pour établir les cultures, y compris les embryons zygotiques (Ammar & Benbadis, 1977; Reynolds & Murashige, 1979), les apex (Veramendi & Navarro, 1996), les bourgeons latéraux (Drira, 1983; Bouguedoura *et al.*, 1990), les feuilles (Bhaskaran & Smith, 1992; Fki *et al.*, 2003) et les inflorescences (Drira & Benbadis, 1985; Bhaskaran & Smith, 1992; Fki *et al.*, 2003). Le milieu de culture conçu par Murashige et Skoog (1962) a été souvent utilisé pour la culture des tissus de palmier dattier. L'auxine 2,4-D est la phytohormone la plus fréquemment utilisée pour réaliser la callogenèse (Fki *et al.*, 2003). De même, pour la

régénération des plantes, les milieux liquides ont été largement utilisés (Sharma *et al.*, 1986; Daguin & Letouzé, 1988; Bhaskaran & Smith, 1992; Veramendi & Navarro, 1996; Fki *et al.*, 2003; Zouine *et al.*, 2005).

1.4.2.1. Micropropagation par organogénèse

L'organogénèse est le résultat de la régénération directe des méristèmes racinaires, des bourgeons axillaires et des cellules de bourgeons floraux en présence de phytohormones en très faible quantité. Son avantage est la formation directe des plantules sans le passage par une phase de dédifférenciation des cellules en formant des cals. Par conséquent, les plantes issues sont toutes identiques aux plantes-mères (Kunert *et al.*, 2003). En revanche, cette approche est très lente et le nombre de plantes obtenues reste limité par rapport à l'embryogénèse somatique car de nombreuses plantules ne survivent pas pendant l'étape d'enracinement.

L'organogénèse se divise en quatre étapes : l'initiation des bourgeons végétatifs, leur multiplication, l'élongation des pousses et l'enracinement. Le succès de cette technique est fortement tributaire de la réussite de la première étape qui nécessite un personnel bien formé. En effet, la plupart des problèmes rencontrés dans les étapes suivantes sont liés à la phase d'initiation (Zaid *et al.*, 1999). Plusieurs protocoles de régénération du palmier dattier ont utilisé l'organogénèse du fait qu'elle est moins risquée en termes de variation somaclonale (Tisserat, 1984; Drira & Benbadis, 1985; Taha *et al.*, 2001; Al-Khateeb, 2008a).

1.4.2.2. Micropropagation par embryogénèse somatique

1.4.2.2.1. Définition

L'embryogénèse somatique reproduit les étapes de l'embryogénèse zygotique avec comme différence que les plantes produites sont les résultats d'embryons non originaires de cellules reproductives. La concentration très élevée de phytohormones au cours de la culture peut augmenter le risque de mutation chez les plantules obtenues. L'embryogénèse somatique, qui a été décrite indépendamment pour la première fois en 1958 par Reinert et Steward *et al.* peut être réalisée de deux manières (Reinert, 1958; Steward *et al.*, 1958). La première est l'embryogénèse somatique directe où la production des embryons est directement réalisée sur le tissu en culture. À titre d'exemple, cette technique a été employée sur des cellules épidermiques de jeunes feuilles de palmier dattier afin d'induire la formation de cellules embryonnaires sans passer par la callogenèse (Sudharsan *et al.*, 1993). La seconde est une voie indirecte, fréquemment utilisée, qui passe par une étape de dédifférenciation

avant la production d'embryons (Al-Khayri, 2005).

Lors de l'embryogenèse somatique indirecte, le tissu doit impérativement être traité sur un milieu riche en phytohormones, notamment en auxines qui provoquent la division cellulaire. Grâce à cette division, le tissu est ramené à un état juvénile extrême, ce qui conduit à la formation de plusieurs types de cals. En effet, les tissus ont des capacités morphogénétiques différentes. Les cals embryogènes sont reconnaissables à la présence de nodules à la fin de la période d'induction. Ces cals commencent à se multiplier pour former des amas proembryogènes (PEM). Les cellules formant ces amas sont caractérisées par une taille réduite, un cytoplasme dense renfermant des réserves amylopectines ainsi qu'un nucléole volumineux (Michaux-Ferrière & Schwendiman, 1992; Sané *et al.*, 2006). Afin de permettre aux embryons de se développer, un traitement sur un milieu sans auxine est nécessaire.

Chez le palmier dattier, certains auteurs ont donné plus d'importance à l'embryogenèse somatique, principalement en raison de son potentiel élevé pour la propagation en masse (Poulain *et al.*, 1979; Reynolds & Murashige, 1979; Tisserat & Demason, 1980; Daguin & Letouzé, 1988; Bhaskaran & Smith, 1992; Hadrami *et al.*, 1995; Masmoudi *et al.*, 1999; Al-Khayri & Al-Bahrany, 2001; Fki *et al.*, 2003; Al-Khateeb, 2008b; Othmani *et al.*, 2009).

1.4.2.2.2. Facteurs affectant l'embryogenèse somatique

Plusieurs facteurs influencent le développement des tissus cultivés, en particulier la nature de l'explant et les conditions de culture.

1.4.2.2.2.1. Nature de l'explant

L'aptitude à l'embryogenèse somatique varie en fonction de la partie de la plante mise en culture. Lors de ces processus, des tissus de type juvénile sont généralement utilisés pour leurs propriétés de totipotence. Pour induire des cals embryogènes chez le dattier, différents types d'explants ont été utilisés comme les embryons zygotiques, les apex, les feuilles, les bourgeons latéraux ou les inflorescences (Fki *et al.*, 2011c). Le succès de l'induction des cals nécessite des conditions physico-chimiques très particulières qui sont essentielles pour la dédifférenciation des cellules. Chez le palmier dattier, la callogenèse est un processus très lent qui peut nécessiter 4 à 8 mois (Fki *et al.*, 2011c). Ce caractère semble être une caractéristique générique de la culture *in vitro* de la famille des *Arecaceae*, comme cela a été décrit pour le cocotier (Verdeil & Buffard-Morel, 1995) et le palmier à huile (*Elaeis guineensis* Jacq.) (Duval *et al.*, 1995). Cette étape de culture très lente a évidemment un impact négatif sur le

coût des vitroplants. Les cals apparaissent généralement soit sur la surface supérieure ou inférieure des feuilles, cependant le côté inférieur est nettement plus productif et génère le plus grand nombre de cals (Fki *et al.*, 2003). Dans le cas où une inflorescence immature est utilisée en tant qu'explant primaire, seuls les cals qui proviennent de la prolifération des tissus floraux montrent un potentiel embryogène. La capacité de callogenèse des inflorescences est généralement plus élevée que celle des feuilles (Drira & Benbadis, 1985; Fki *et al.*, 2003). Certains auteurs ont rapporté que les embryons zygotiques matures ou immatures produisent des cals avec une faible capacité embryogène (Reynolds & Murashige, 1979; Fki, 2005), ce qui représente un résultat inattendu au vu de l'importante capacité morphogénétique de ces explants chez d'autres espèces comme le palmier à huile (Teixeira *et al.*, 1995).

1.4.2.2.2. Milieu de culture

Le paramètre le plus important après la nature de l'explant est la composition du milieu de culture qui est un facteur essentiel pour la réussite de l'embryogenèse somatique et la régénération des vitroplants. Les milieux nutritifs sont généralement basés sur celui de Murashige et Skoog (1962) avec certaines optimisations en ajoutant d'autres éléments tels que des facteurs de croissance, une source de carbone et une source organique ou inorganique d'azote. Plusieurs recherches ont montré que l'auxine 2,4-D est la plus appropriée pour l'initiation de la callogenèse du palmier dattier. En outre, des concentrations supérieures ou égales à 5 mg/L (Tisserat, 1979; Hadrami & Baaziz, 1995) ou même inférieures à 1 mg/L se sont montrées efficaces (Masmoudi *et al.*, 1999; Fki *et al.*, 2003). Les cytokinines telles que la 2iP (2- isopentyle adénine) ne semblent pas être nécessaires, comme c'est le cas pour de nombreuses plantes monocotylédones (Magnaval *et al.*, 1997). Le travail de Fki, (2005) a montré que l'herbicide Picloram (0,2 à 0,5 mg/L) induit la callogenèse, bien qu'il génère des cals non embryogènes et des embryons somatiques anormaux.

De plus, l'effet de diverses substances sur l'embryogenèse somatique a été étudié. A titre d'exemple, la biotine et la thiamine peuvent améliorer la qualité des cals embryogènes (Al-Khayri, 2001); le nitrate d'argent a également été signalé comme promoteur de l'embryogenèse somatique (Al-Khayri & Al-Bahrany, 2001, 2004). Dans une étude pour déterminer les effets du sirop de palmier dattier sur induction l'embryogenèse somatique, l'auteur a constaté qu'un tel extrait naturel pourrait être utilisé à une concentration de 6% pour remplacer le saccharose (Al-Khateeb, 2008b). Une autre étude a montré l'impact positif des extraits méristématiques de palmier dattier sur l'embryogenèse somatique (El-Assar *et al.*, 2004).

Enfin, la fragmentation des explants permet un contact direct des cellules totipotentes avec le milieu de culture et donc une meilleure initiation des cals embryonnaires (Fki, 2005). Néanmoins, il a été constaté que la fragmentation de l'explant conduit souvent à une prolifération rapide des bactéries endogènes.

1.4.2.3. Contraintes de la micropropagation du dattier

La micropropagation du palmier dattier se heurte à certaines contraintes qui réduisent son efficacité. Parmi ces problèmes, le brunissement des tissus et les contaminants bactériens sont les facteurs les plus importants qui affectent la culture des tissus de palmier dattier (Abahmane, 2011).

1.4.2.3.1. Brunissement des tissus

Les tissus du palmier dattier sont riches en acide caffcoylshikimique (de 190 à 430 µg/g poids frais selon la variété) qui est l'une des enzymes responsables du brunissement des tissus (Loutfi & El Hadrami, 2005). Au fil du temps, le milieu de culture devient brun à cause des polyphénols libérés. Ces substances sont oxydées par les polyphénoloxydases et forment des quinones qui sont très toxiques pour les tissus en culture. Leur sécrétion est renforcée par les dommages dus à la préparation pour la mise en culture *in vitro* ou à leur manipulation lors du transfert sur un milieu frais (Abahmane, 2011).

De nombreuses études ont été menées pour réduire l'incidence de ce phénomène :

- Le prétraitement des tissus dans des solutions antioxydantes (100 mg/l d'acide ascorbique et 150 mg/l d'acide citrique) (Murashige, 1974; Zaid & Tisserat, 1983)
- L'addition aux milieux de culture de certains adsorbants comme l'adénine, la glutamine et le citrate (Rhiss *et al.*, 1979)
- L'utilisation du charbon actif, qui fait partie des composés largement utilisés pour éviter le brunissement des tissus ; cependant, une grande quantité de régulateurs de croissance ajoutée est également absorbée par le charbon actif. C'est pour cela que de fortes concentrations d'hormones sont couramment utilisées.

1.4.2.3.2. Contaminations endophytiques

Les cultures *in vitro* de palmier dattier sont parfois fortement contaminées par des bactéries endogènes. De nombreuses études ont rapporté l'existence de bactéries dans les tissus internes d'explants qui sont visiblement en bonne santé (Abahmane, 2011). Lors de la phase d'initiation, ces contaminations sont susceptibles d'apparaître sur quelques rares

explants dont le degré de différenciation est assez avancé. Ces contaminations se manifestent rapidement sous des conditions physico-chimiques défavorables liées aux intervalles excessivement longs entre les transferts. L'isolement et l'identification de ces contaminants ont montré qu'ils appartiennent au genre *Bacillus* (Leary *et al.*, 1986). La présence de ces contaminants peut conduire à l'élimination de la culture à tout moment. Des observations microscopiques ont montré la présence de deux types de bactéries en forme de bâtonnets. La première se manifeste sous forme de colonies blanchâtres et la seconde sous forme de colonies jaunâtres (Fki *et al.*, 2010). Selon Fki *et al.* (2010) la présence de ces bactéries dans le milieu de culture n'affecte pas la croissance des vitroplants ; cependant elle inhibe d'une manière significative la prolifération des souches organo-embryogènes. D'autre part, plusieurs auteurs ont montré l'effet favorable de certaines souches de bactéries sur la croissance et le développement des vitroplants (Leifert *et al.*, 1994). Certaines études ont montré la possibilité de les utiliser comme un moyen de lutte contre des agents pathogènes par l'induction de modifications ultrastructurales au sein des tissus végétaux ou par compétition avec les agresseurs (Leifert *et al.*, 1994; Berg *et al.*, 2005; Newman & Reynolds, 2005).

Le contrôle de ces contaminants peut être réalisé par l'utilisation de certains antibiotiques: la tétracycline (30 µg/ml), la streptomycine (10 µg/ml), la néomycine (20 µg/ml) et le chloramphénicol (30 µg/ml) (Leary *et al.*, 1986). Cependant, dans la pratique, la meilleure façon de surmonter ce problème est de dépister les cultures contaminées dans les premières étapes de multiplication afin de les éliminer.

1.5. Moyens de conservation

1.5.1. La conservation des ressources génétiques

La vraie richesse de notre planète est sa diversité au sein de laquelle il existe un nombre phénoménal d'espèces végétales et animales. Cette biodiversité est le garant de la pérennité des espèces. Plusieurs facteurs tels que le réchauffement climatique et la sélection des espèces végétales et animales d'intérêt agronomique, menacent cette biodiversité planétaire depuis le début de 20^{ème} siècle.

L'impact direct et le plus important des politiques de sélection est la réduction de la diversité génétique (Sprague, 1980; Withers, 1980, 1983). La sélection de variétés végétales « élites » a changé le paysage de certaines régions où elle a causé la disparition de nombreuses variétés traditionnelles. À ce rythme, si aucune mesure de gestion durable des

ressources et de protection des espaces naturels n'est prise, l'homme verra sa survie menacée dans les millénaires à venir (OCDE, 2008). Pour cela, depuis plusieurs années des politiques de conservation des ressources génétiques (CGR) ont été mises en place au niveau international. Afin d'aboutir à cet objectif, toutes les stratégies de gestion des ressources génétiques ont pour but de mettre en place des techniques de conservation, qui soient économiquement rentables et applicables par les institutions chargées de la conservation (Koo *et al.*, 2003).

Il existe deux stratégies de conservation : la conservation *in situ* et la conservation *ex situ* qui sont à leur tour composées de différentes techniques. Selon l'article 2 de la Convention sur la diversité biologique :

- La conservation *ex situ* correspond à la conservation d'éléments constitutifs de la diversité biologique en dehors de leur milieu naturel;
- La conservation *in situ* correspond à la conservation des écosystèmes et des habitats naturels et le maintien et la reconstitution de populations viables d'espèces dans leur milieu naturel et, dans le cas des espèces domestiquées et cultivées, dans le milieu où se sont développés leurs caractères distinctifs (UNCED, 1992).

1.5.2. Conservation *in situ*

Ce type de conservation se base sur la délimitation d'une région naturelle sauvage qui sera conservée en l'état, sans intervention humaine. Cela est difficile à réaliser car les grands espaces sauvages sont très rares. La conservation *in situ* concerne surtout les ressources génétiques d'espèces sauvages dont la seule possibilité de conservation est la protection de leurs écosystèmes par la protection de leurs territoires (Maxted *et al.*, 1997).

La conservation *in situ* concerne aussi toutes les ressources génétiques des espèces utilisées dans les cultures traditionnelles. Donc, cet équilibre entre une exploitation du milieu et une faible anthropisation des espaces naturels garantit à la fois le maintien de la biodiversité et la structure sociétale des populations concernées. Ainsi, toutes les stratégies de conservation *in situ* doivent passer par le consentement et la participation des populations locales (MacNeely & Ness, 1996).

1.5.3. Conservation *ex situ*

Contrairement à la conservation *in situ*, des plantes cultivées et leurs espèces sauvages apparentées sont extraites de leur habitat naturel, afin de les protéger des risques de

disparition causés par la sélection naturelle. L'objectif est de conserver fidèlement l'intégrité des ressources génétiques pour que celles-ci puissent être utilisées soit directement, soit dans des programmes de création variétale (Frankel *et al.*, 1995). La technique de conservation *ex situ* doit être bien choisie en fonction de la nature de la ressource génétique à préserver, du coût de la conservation et de la facilité de sa mise en œuvre. Les méthodes de conservation *ex situ* se divisent en quatre méthodes principales.

1.5.3.1. Conservation de graines

On distingue trois types de graines : les graines orthodoxes (tolérantes à la déshydratation et aux basses températures), les graines récalcitrantes (très riches en eau et intolérantes à la déshydratation et aux basses températures) et les graines intermédiaires qui sont tolérantes à un certain niveau de déshydratation mais qui ne supportent pas les basses températures (Ellis *et al.*, 1990). Pour les nombreuses espèces végétales à semences orthodoxes, la conservation des graines est la méthode la plus adaptée et la plus facile à appliquer. 90% des 7,3 millions d'accessions stockées dans les banques de gènes sont conservées sous la forme de semences (Engelmann, 2010). Ces graines sont naturellement capables de résister à une forte déshydratation puisqu'à maturité, elles possèdent des teneurs en eau très faibles représentant 3% à 7% du poids de la graine mature (Engels & Visser, 2003).

Cette qualité naturelle permet leur stockage à basse température (-18°C) pendant de nombreuses années tout en gardant leur pouvoir germinatif. Cependant, leur viabilité diminue au cours du temps car les processus de dégradation (réactions enzymatiques) ne sont pas complètement stoppés à cette température. Pour cette raison, cette méthode nécessite la vérification à intervalles réguliers de la viabilité des graines stockées et la réintroduction de nouvelles graines pour les variétés les plus sensibles, ce qui augmente par conséquent les coûts de gestion.

Selon ce principe, il existe au Spitzberg (Norvège) depuis février 2008 une banque mondiale de graines (Svalbard Global Seed Vault) dont le but est de stocker en chambre froide (-18°C) une copie de l'ensemble des graines des cultures alimentaires de la planète.

1.5.3.2. Collections en champ

Il s'agit de cultiver en champ un nombre important d'espèces qui sont souvent du même genre. Cette technique est employée pour la conservation des espèces à semences non-orthodoxes et celle des plantes à multiplication végétative.

Cette méthode garantit la disponibilité permanente du matériel végétal mais nécessite un espace de culture important. De plus, ces collections sont toujours menacées de pertes dues aux attaques parasitaires, aux catastrophes naturelles et aux erreurs humaines. D'autre part, elles ne sont pas conservées sous une forme qui facilite les échanges de matériel génétique car les risques de transfert de maladies lors des échanges sont fortement probables. En outre, l'entretien sur le long terme des collections en champ est coûteux (main d'œuvre, immobilisation de surfaces importantes, engrais et traitements phytosanitaires) (Engelmann & Engels, 2002). Par exemple, la collection de palmiers à huile du CIRAD en Côte d'Ivoire comprend près de 10.000 individus et s'étend sur 100 hectares. Dans le cas de cette espèce, on compte un technicien mécanisé pour l'entretien de 20 hectares (Nouaille, 1991). Au niveau international, il existe de nombreuses collections végétales comme par exemple celle de Jima en Éthiopie qui contient 1600 accessions de caféiers (Engels & Visser, 2003) ou encore la collection d'*Hydrangea* Agrocampus-Ouest contenant environ 400 accessions différentes.

1.5.3.3. Conservation *in vitro*

Ces dernières années, les techniques de culture *in vitro* se sont largement développées et elles ont été appliquées à plus de 1000 espèces différentes (George *et al.*, 2007). Les techniques de cultures de tissus sont d'un grand intérêt pour la collecte, la multiplication et la conservation du matériel génétique (Engelmann, 1991, 1997). La culture de tissus est une alternative au maintien des collections en serre ou au champ. Elle offre la possibilité de réaliser à la fois la multiplication et la conservation des espèces rares ou en voie de disparition, des espèces à semences récalcitrantes et de celles se reproduisant par voie asexuée. Ce type de conservation présente plusieurs avantages :

1. La propagation du matériel végétal avec des taux de multiplication élevés.
2. La culture en conditions stériles permettant la propagation de plantes indemnes de maladies.
3. La réduction de l'espace de conservation et du personnel d'entretien.

4. La possibilité de conservation de plantes haploïdes utilisées pour la sélection de caractères récessifs.
5. La possibilité d'obtenir des plantes exemptes de virus grâce à la culture de méristèmes en combinaison avec la thérapie.

Différentes techniques de conservation *in vitro* sont utilisées selon la durée de stockage (Engelmann, 1991, 1997). Pour le stockage à court et moyen terme, des stratégies basées sur le ralentissement de la croissance des explants ont été développées. Le principe est de ralentir la croissance du matériel végétal pour pouvoir le conserver pour des durées de quelques mois à quelques années. Afin de réaliser cet objectif, la technique la plus largement utilisée est la réduction de la température (Lynch, 1999) qui peut être combinée avec une diminution de l'intensité lumineuse (Banerjee & Langhe, 1985) ou même une culture à l'obscurité. Généralement, la réduction du taux de croissance en diminuant la température de stockage de l'ordre de 0-5°C est employée en tenant compte de la sensibilité au froid de l'espèce considérée. Alors que des vitroplants *d'Actinidia sinensis* peuvent être conservés à une température de +8°C (Monette, 1987), des plantules et des embryons somatiques *d'Elaeis guineensis* (palmier à huile) ne peuvent supporter que des températures supérieures à +18°C (Corbineau *et al.*, 1990). Des plantules de *Malus domestica* (pommier) survivent à 100 % après un an à +1°C (Druart, 1985). D'une manière générale, la température de conservation des espèces tropicales ou sub-tropicales doit être plus élevée que celle des espèces tempérées. Des vitroplants de bananier pourront être conservés en abaissant l'intensité lumineuse (1000 lux) en parallèle à la réduction de température à +15°C (Banerjee & Langhe, 1985).

Une autre technique pour ralentir la croissance est d'abaisser la teneur en oxygène dans la salle de culture. Par exemple, la réduction de la concentration en oxygène des enceintes de culture jusqu'à 1,3% a permis de conserver durant 6 semaines des plantules de tabac et de chrysanthème sans altérer leur taux de croissance ultérieur lorsqu'elles sont replacées dans une atmosphère normale (Bridgen & Staby, 1981). De même, une concentration en oxygène de 1 % a permis de conserver des embryons somatiques de palmier à huile pendant 4 mois à 27°C sans repiquage (Espinoza *et al.*, 1989).

Plusieurs modifications peuvent également être apportées au milieu de culture afin de ralentir la croissance (Withers & Engelmann, 1998). Un ralentissement de la croissance des vitroplants de pomme de terre cultivés à 25°C a été obtenu en ajoutant 4% de mannitol au milieu de culture (Espinoza *et al.*, 1989). Une concentration en mannitol égale à 6 % s'est

révélée positive pour le stockage de protocormes de *Vanda hookeriana* (Kadzimin, 1988). Des concentrations élevées en saccharose permettent aussi la conservation à basse température de protocormes de *Cymbidium* sp. et de *Dendrobium* sp. (Homes *et al.*, 1982; Tandon & Sharma, 1986). La nature, solide ou liquide, du milieu de culture intervient sur les possibilités de conservation. Des plantules de *Prunus insititia* seront conservées de préférence en milieu liquide, des brunissements apparaissant en milieu gélosé (Wilkins *et al.*, 1988).

Les techniques de stockage *in vitro* en croissance ralentie sont utilisées en routine pour la conservation à moyen terme de nombreuses espèces tropicales et tempérées, comme la pomme de terre, les bananiers, l'igname et le manioc (Engelmann, 1999). Cependant, si la conservation *in vitro* semble une option simple et pratique pour la conservation à moyen terme de nombreuses espèces, son utilisation nécessite une adaptation à chaque nouveau matériel ainsi que des intrants continus, et des questions se posent quant à la stabilité génétique du matériel stocké pour certaines espèces. Des directives techniques ont été publiées (Reed *et al.*, 2004a), qui peuvent servir de guide pour les chercheurs et les gestionnaires des banques de gènes pour l'établissement et la gestion des collections *in vitro* de ressources génétiques.

Des collections *in vitro* ont été mises en place dans plusieurs pays, par exemple en Australie pour la préservation de 17 espèces de *Grevillea* (Sarasan *et al.*, 2006), pour la conservation de l'arbre à pain *Artocarpus altilis* (Murch *et al.*, 2008), L'ITC (INIBAP Transit Centre, Leuven, Belgique) conserve *in vitro* la collection mondiale de bananier qui comporte plus de 1000 accessions (Swennen, 1998), le CIP (Lima, Pérou) la collection mondiale de pomme de terre qui comprend plus de 1500 accessions ou encore le CIAT (Cali, Colombie) la collection mondiale de manioc, riche de 6592 accessions.

1.6. Cryoconservation

Afin de pouvoir stocker le matériel végétal pour des durées importantes, il faut pouvoir arrêter toute la machinerie cellulaire. A l'heure actuelle, la cryoconservation à température ultra-basse dans l'azote liquide (-196°C), est la seule technique disponible. A cette température, le matériel végétal peut être conservé sans altération ni modifications pendant des durées prolongées (Ashwood-Smith & Friedmann, 1979). Par ailleurs, les cultures sont stockées dans un volume réduit, à l'abri des contaminations et avec un entretien limité.

La constitution de banque de graines ne peut être réalisée que lorsque celles-ci sont tolérantes à la déshydratation. Or tous les végétaux ne produisent pas ce type de graines, comme c'est le cas pour le caféier (Dussert *et al.*, 2003) ou encore le cacaoyer (Chandel *et al.*, 1995). De plus, pour les végétaux à multiplication végétative comme le bananier ou l'ananas, la cryoconservation est la méthode la mieux adaptée pour préserver les ressources génétiques.

1.6.1. Principe de la cryoconservation

La cryoconservation consiste à stocker à température ultra-basse (-196°C) des tissus et des cellules dans le but de les conserver pendant de nombreuses années, en diminuant le plus possible les altérations de leur potentiel vital et en préservant leur capacité à se régénérer de manière conforme. La réussite de la cryoconservation est dépendante de la capacité à s'affranchir des contraintes biologiques et physiques associées à une exposition à un froid extrême. Pour cela, il est impératif de connaître la nature du matériel végétal à cryoconserver ainsi que les effets du gel sur les cellules et les tissus.

D'après la loi d'Arrhenius $k=A.e^{-(E_a/RT)}$ où k est la constante vitesse de réaction, plus la température est basse, plus les vitesses de réaction sont faibles. Par conséquent, à la température l'azote liquide (-196°C) toutes réactions sont stoppées, surtout les réactions enzymatiques et oxydatives (Gallard, 2008). Le plus important dans un protocole de cryoconservation est de réduire le risque de la cristallisation de l'eau dans les tissus ainsi que la déstabilisation des membranes causées par l'exposition à l'azote liquide. En général, la formation de glace intracellulaire entraîne la mort cellulaire.

1.6.2. Les méthodes de cryoconservation

Les matériels qui présentent des processus naturels de déshydratation, comme les semences orthodoxes ou les bourgeons dormants, peuvent être cryoconservés sans aucun prétraitement. Cependant, la plupart des systèmes expérimentaux employés en cryoconservation (apex de vitroplants, embryons, suspensions ou cals) contiennent des quantités d'eau intracellulaire élevées et sont donc extrêmement sensibles à la congélation puisqu'ils ne sont pas naturellement tolérants à la déshydratation. Par conséquent, les cellules doivent être déshydratées artificiellement pour les protéger de la formation de glace intracellulaire (Engelmann, 2010). La déshydratation peut varier selon la méthode. Il s'agira donc de trouver le bon compromis entre le niveau de déshydratation et la survie car une déshydratation trop forte entraînera aussi la mort des cellules.

Il existe plusieurs techniques de cryoconservation. Les conditions de chacune des étapes successives des protocoles doivent être optimisées. Un protocole de cryoconservation se compose des étapes suivantes : sélection du matériel végétal, préculture, traitement cryoprotecteur, refroidissement, stockage, réchauffement et post-traitement. Il existe deux méthodes de cryoconservation.

1.6.2.1. Les méthodes avec cristallisation extracellulaire

On les appelle aussi les méthodes classiques. Ces techniques comprennent les étapes suivantes : préculture ou prétraitement de quelques heures ou jours en présence d'osmoticums comme le mannitol ou le sorbitol pour provoquer une légère déshydratation, ce qui va permettre aux cellules d'éviter un choc osmotique trop important lorsqu'elles sont plongées dans la solution de cryoprotection (Kartha & Engelmann, 1994) puis traitement cryoprotecteur avec des substances variées (sucres, polyols, diméthylsulfoxyde, etc.). La congélation est réalisée en deux étapes: d'abord, un refroidissement lent de l'ordre de 0,5 à quelques °C.min⁻¹ jusqu'à une température donnée (d'environ - 40°C, selon les espèces), dite de pré-refroidissement, afin d'obtenir une cryodéshydratation des cellules par effet d'exosmose contrôlée (Verleysen, 2005), ensuite une immersion rapide des échantillons dans l'azote liquide pour y être stockés (Reinhoud *et al.*, 1995). Lors du réchauffement, les échantillons sont plongés immédiatement dans une solution à une température donnée (entre 25 et 40°C selon la méthode appliquée) afin d'éviter la cristallisation du cytosol au moment de la décongélation. Une étape de détoxification des échantillons pour éliminer la solution cryoprotectrice est alors appliquée avant de commencer le processus de régénération. Dans certains cas, afin de stimuler la reprise de croissance, les conditions standards de culture sont transitoirement modifiées, par exemple en diminuant l'intensité lumineuse ou en changeant la composition hormonale ou minérale du milieu de culture (Kartha & Engelmann, 1994; Engelmann, 1997).

Au cours des années, ces techniques ont été utilisées sur différents types de matériel végétal comme par exemple : des apex des plants à multiplication végétative (Reed, 2001; Reed & Uchendu, 2008), des cultures dédifférenciées (Heine-Dobbernack *et al.*, 2008) et des cultures embryogènes (Lynch & Benson, 1991). Le caractère différencié ou indifférencié des structures végétales joue un rôle important. En effet, plus le niveau de différenciation cellulaire est élevé, plus le contrôle de l'exosmose est difficile, notamment à cause d'un volume vacuolaire différent entre les types cellulaires. De ce fait, cette méthode est surtout

employée pour la conservation de structures non différenciées comme des suspensions cellulaires ou des cals.

L'inconvénient de ces méthodes est qu'elles nécessitent le plus souvent un investissement lourd avec l'achat d'un congélateur programmable, sophistiqué et coûteux. Par conséquent, ces méthodes sont de moins en moins appliquées par rapport aux techniques de cryoconservation sans cristallisation extracellulaire.

1.6.2.2. Les méthodes sans cristallisation extracellulaire

Ces méthodes sans cristallisation extracellulaire, grâce à la vitrification, présentent des avantages par rapport aux techniques précédentes. La vitrification est un processus physique par lequel une solution très concentrée, refroidie rapidement à une très basse température, forme un solide métastable, sans formation de cristaux de glace (Fahy *et al.*, 1984).

La vitrification de l'eau dans les systèmes biologiques dépend de la viscosité des cellules. L'augmentation de la viscosité empêche les molécules d'eau de se regrouper pour former de la glace. L'état vitrifié est métastable, ce qui peut être traduit par la capacité des molécules d'eau à revenir à un état liquide ou même de se dévitrifier pour former de la glace. La vitrification peut être réalisée par plusieurs moyens qui conduisent tous au même résultat qui est l'augmentation de la concentration en solutés dans la cellule jusqu'à obtention d'une viscosité importante (Benson, 2008).

Les méthodes basées sur la vitrification, qui empêche la formation de glace cristalline dans les échantillons, permettent de cryoconserver des organes complexes tels que les apex et les embryons, composés de types cellulaires différents qui nécessiteraient chacun des conditions particulières de déshydratation induite par la congélation. Elles ne requièrent pas l'utilisation de congélateurs programmables. Elles ne nécessitent que certaines modifications pour leur adaptation à des matériels et types cellulaires différents (Engelmann, 1997). Ces méthodes, qui ont été développées pour des apex et des suspensions cellulaires de nombreuses espèces différentes (Sakai & Engelmann, 2007; Sakai *et al.*, 2008), ont permis d'obtenir de bons résultats sur un grand nombre d'espèces depuis le début des années 90.

Selon la façon dont la vitrification est réalisée, les méthodes sans cristallisation sont différentes dans leur déroulement :

1.6.2.2.1. La vitrification

Cette méthode se base sur l'utilisation des solutions très concentrées (5-8 M), appelées solutions de vitrification, afin de déshydrater fortement les matériels à cryoconserver avant de les refroidir rapidement par une immersion directe dans l'azote liquide (Reinoud *et al.*, 2000). Ce refroidissement rapide ne permet pas la formation de glace et facilite la vitrification du milieu et des cellules.

En général, un protocole de vitrification se divise en quatre étapes. D'abord, une étape de traitement dans une solution de charge ou Loading Solution (LS) contenant 0,4M de saccharose et 2M de glycérol (Sakai, 2000). Cette procédure a pour but de préparer les cellules au stress osmotique causé par une trop grande différence de pressions osmotiques entre la solution cryoprotectrice (souvent PVS2) et le cytoplasme, et ainsi de réduire la toxicité de VS et de minimiser les dommages pendant l'étape de déshydratation (Sakai & Engelmann, 2007). La seconde étape va consister à déshydrater le matériel végétal dans une solution cryoprotectrice comme PVS2.

Certains chercheurs ont proposé un passage direct dans la solution de vitrification sans traitement dans la solution de loading, par exemple pour des racines adventives de *Hyoscyamus niger* (Jung *et al.*, 2001) ou pour des apex de chrysanthèmes (Halmagyi *et al.*, 2004). Mais dans ce cas, un durcissement au froid ou un prétraitement sur un milieu enrichi en sucres comme le saccharose (Leunufna & Keller, 2003), en alcool comme le glycérol (Touchell *et al.*, 2002) ou parfois en DMSO (Winkelmann *et al.*, 2004) est nécessaire.

Afin de stocker le matériel dans l'azote liquide, les procédures de vitrification impliquent la déshydratation avec des mélanges cryoprotecteurs très concentrés (solutions de vitrification, VS) avant l'immersion dans l'azote liquide (LN). L'application de ces solutions est l'élément clé pour le succès de la cryoconservation dans les procédures basées sur la vitrification. Pour cela les échantillons sont ensuite transférés dans des cryotubes contenant de la solution cryoprotectrice fraîche. Les solutions de vitrification sont généralement composées d'un mélange de cryoprotecteurs pénétrants et non pénétrants pour déshydrater les échantillons, tout en limitant la cytotoxicité, et pour la protection des cellules restantes de la cristallisation de molécules d'eau (Kim *et al.*, 2009). La durée de traitement avec la solution de VS et de déshydratation appropriée est l'un des facteurs le plus importants pour la survie après la cryoconservation comme l'ont rapporté Kim *et al.* (2006) sur des apex de l'ail et de chrysanthème (*Dendranthema grandiflora*). Les solutions de vitrification sont des solutions

cryoprotectrices aqueuses qui peuvent être refroidies lentement à des températures inférieures à la température de formation de glace, soit intra- ou extracellulaire (Fahy *et al.*, 1987). Ces solutions permettent, grâce à l'état vitreux au cours du refroidissement et du réchauffement, d'éviter la cristallisation (Fahy *et al.*, 1987). Actuellement le mélange des cryoprotecteurs décrit par Sakai en 1990 est le plus largement utilisé pour cette méthode. Ce mélange dénommé PVS2 « Plant Vitrification Solution 2 » se compose de 30% (p/v) glycérol, 15% (p/v) DMSO, et 15% (p/v) éthylène glycol et de saccharose à 0,4M. Les propriétés physico-chimiques de la solution PVS2 (transition vitreuse à -115°C, rôle cryoprotecteur), ont permis la cryoconservation de nombreuses espèces végétales (Gallard, 2008). Chaque composant de PVS2 semble avoir un rôle spécifique. Le DMSO, en formant des liaisons chimiques, stabiliserait les membranes cellulaires (Örvar *et al.*, 2000). De plus, l'éthylène glycol et le DMSO empêcheraient l'augmentation de la concentration en électrolytes dans le cytoplasme et ce en pénétrant dans les cellules (Brison *et al.*, 1995). Le glycérol participerait à la déshydratation des cellules (Verleysen, 2005). De plus, selon Volk et Walters (2006), la solution de PVS2 intervient dans trois mécanismes qui sont liées aux cryoprotecteurs : (1) elle remplace l'eau contenue dans les cellules, (2) elle modifie le comportement de l'eau résiduelle, (3) elle interagit avec l'eau résiduelle pour limiter les dégâts causés par une contraction excessive des cellules lors d'une déshydratation physique. Enfin, il existe d'autres solutions de cryoconservation qui diffèrent par leur composition par rapport au PVS2 notamment PVS3 (glycérol 50% et saccharose 50%) (Nishizawa *et al.*, 1993) et PVS4 (35% glycérol, 20,5% saccharose et 20% éthylène glycol) (Sakai, 2000).

Puis les cryotubes sont immédiatement plongés dans l'azote liquide. Ensuite, les tubes sont sortis de l'azote liquide et rapidement réchauffés par immersion dans un bain-marie (généralement à 37°C) pour éviter la formation de cristaux de glace. La solution cryoprotectrice est ensuite remplacée par une solution d'unloading (ULS) enrichie en saccharose (1,2M) afin d'éliminer les cryoprotecteurs toxiques et de réduire le choc osmotique lié à la diminution de la concentration de la solution.

Cette méthode de cryoconservation a été appliquée pour la première fois par Rall et Fahy en 1985 sur des cellules animales. La première réussite chez les plantes a été rapportée par Langis *et al.* (1989) et Uragami *et al.* (1989), respectivement sur des suspensions cellulaires de *Brassica campestris* L. et des embryons somatiques d'asperge. À la même période, cette méthode a été appliquée sur des cals dérivés des tissus nucellaires de *Citrus sinensis* par Sakai *et al.* (1990). Le principal avantage de la vitrification est d'éviter

l'utilisation des congélateurs programmables très coûteux. De plus, elle assure une congélation ultra-rapide et permet d'éliminer totalement l'eau cristallisable et de limiter le stress causé aux cellules lors de l'exosmose dans le cas d'un refroidissement lent (Grout, 1995), ce qui permet d'obtenir un meilleur pourcentage de survie (Reinhoud *et al.*, 1995).

1.6.2.2.2. L'encapsulation- déshydratation

Cette méthode est fondée sur la technologie développée pour la production des semences artificielles. Elle a été proposée par Fabre et Dereuddre en 1990. Dans cette technique, afin de limiter et de réguler la déshydratation en minimisant les chocs osmotiques lors des différentes étapes du protocole de cryoconservation, les échantillons sont encapsulés dans des billes d'alginate de calcium. Depuis, la technique a été modifiée selon l'espèce et le type de matériel végétal, cependant le principe reste le même.

Une fois l'explant encapsulé, les billes sont pré-cultivées en milieu liquide enrichi en sucre (le plus souvent le saccharose) pendant 1 ou plusieurs jours. Par effet d'osmose, une partie de l'eau sort des billes et des explants tandis qu'à l'inverse une entrée de saccharose se produit. Ce mouvement continue jusqu'à ce que l'équilibre osmotique soit établi. Après la pré-culture, une déshydratation physique est réalisée sous une hotte à flux laminaire (Fabre & Dereuddre, 1990) ou avec du silicagel (Dumet *et al.*, 2002), jusqu'à l'obtention d'une teneur en eau d'environ 20% par rapport à la masse de matière fraîche. Ainsi, la concentration en saccharose dans l'apex favorise la vitrification du cytoplasme lors de l'immersion dans l'azote liquide.

Pour assurer la vitrification lors de l'immersion dans l'azote liquide l'étude de (Block, 2003) a montré que, dans les conditions classiques d'encapsulation, la teneur en eau des billes d'alginate doit être de 0,4 g d'eau par g de matière sèche. Dans cette étude, Block parle de la vitrification des billes car il est difficile de savoir si les explants qui se trouvent à l'intérieur des billes ont subi la vitrification. Par conséquent, il faut prendre en considération la teneur en eau des billes en relation avec la survie au lieu de celle de l'explant. Par exemple, le meilleur résultat sur les apex de *Pelargonium* a été obtenu pour une teneur en eau de 0,25g d'eau par g de matière sèche (Grapin *et al.*, 2003).

La dernière étape consiste à réchauffer rapidement les explants après leur sortie de l'azote liquide avant de les transférer sur le milieu de culture pour commencer le processus de régénération. Le réchauffement est une étape décisive qui peut varier selon le protocole utilisé mais doit être toujours réalisée rapidement. À titre d'exemple, les cryotubes contenant les

apex encapsulés de *Dendranthema grandiflora* sont immergés 3 min dans de l'eau à 35°C pour être réchauffés (Martín & González-Benito, 2005) alors que chez le *Pelargonium*, les apex encapsulés sont plongés directement pendant 1 min dans la solution de préculture à température ambiante (Dumet *et al.*, 2002).

L'avantage de l'utilisation de cette méthode est d'éviter l'application de cryoprotecteurs qui sont généralement toxiques tels que le glycérol et surtout le DMSO (Volk & Walters, 2006) utilisés dans la vitrification. Les pourcentages de survie sont généralement élevés et la reprise de croissance est rapide et directe, sans formation de cal (Engelmann & Dussert, 2000).

Cette technique, mise au point sur le poirier (Dereuddre *et al.*, 1990), a été appliquée aux apex de nombreuses espèces tempérées et tropicales ainsi que pour les suspensions cellulaires et les embryons somatiques de plusieurs espèces (Gonzalez-Arno & Engelmann, 2006; Engelmann *et al.*, 2008).

1.6.2.2.3. L'encapsulation-vitrification

Cette technique est une combinaison de l'encapsulation et de la vitrification dans laquelle les échantillons sont encapsulés dans des billes d'alginate puis déshydratés en utilisant des solutions de vitrification (Sakai, 1997; Engelmann & Dussert, 2000). Tannoury *et al.* (1991) ont été les premiers à associer les deux méthodes pour cryoconserver des apex d'œillet. Cette méthode est facile à appliquer et permet d'économiser un temps important en éliminant la durée de dessiccation physique sous la hotte (Sakai & Engelmann, 2007; Sakai *et al.*, 2008). En revanche, la principale contrainte de cette méthode est liée à la détermination des durées d'incubation du matériel végétal encapsulé dans les différentes solutions (LS et PVS2) intervenant dans la vitrification. En effet, la barrière physique formée par les billes d'alginate ralentit la diffusion des solutions dans la bille, donc la pénétration dans le matériel végétal, ce qui conduit à l'augmentation des durées d'incubation nécessaires à l'obtention d'une bonne osmoprotection dans les cellules lors de la cryoconservation (Matsumoto *et al.*, 2000). Depuis le travail de Tannoury *et al.* (1991), cette technique a été appliquée à plus de 70 espèces (Engelmann *et al.*, 2008).

1.6.2.2.4. La vitrification en goutte ou droplet-vitrification

Cette méthode a été développée à partir de la méthode de «droplet-freezing» mise au point pour la cryoconservation d'apex de manioc par Kartha *et al.* (1982) dans laquelle les

apex sont placés dans des gouttes de solution cryoprotectrice puis refroidis lentement à l'aide d'un congélateur programmable. Elle a été mise au point pour la première fois par Panis *et al.* (2005) avec pour objectif d'augmenter la vitesse de refroidissement par la réduction du volume des liquides autour du matériel végétal. Avec la vitrification en goutte, les apex sont placés individuellement, juste après l'étape de loading, sur des bandelettes de papier d'aluminium dans des microgouttes (5-10 μ l) de solution de vitrification (le plus souvent PVS2) (Sakai & Engelmann, 2007). Lors du réchauffement, les bandelettes d'aluminium contenant les apex sont directement immergées dans la solution d'unloading (ULS). Les apex sont alors récupérés puis déposés sur un papier filtre dans des boîtes de Petri contenant du milieu de culture pour éliminer le reste de la solution d'unloading et les cryoprotecteurs résiduels.

Le traitement de loading implique une exposition de courte durée (20 à 60 min) des échantillons à un mélange cryoprotecteur avec une concentration modérée avant la déshydratation avec la solution de vitrification (VS) fortement concentrée (Nishizawa *et al.*, 1993).

Des solutions alternatives de vitrification ont été développées par Kim *et al.* (2009) en utilisant cette technique. Ceci a été élaboré à partir de la solution de vitrification PVS2 originale en augmentant le taux du glycérol et du saccharose et / ou en diminuant celui du DMSO et de l'éthylène glycol, ou à partir de la solution de vitrification PVS3 initial en diminuant la concentration du glycérol et du saccharose.

Cette technique assure un pourcentage de survie très élevé grâce au contact direct du matériel végétal avec l'azote liquide, ce qui assure un refroidissement ultra-rapide et un réchauffement ultra-rapide au contact de la solution d'unloading (Kim *et al.*, 2009). Elle a été appliquée à de nombreuses espèces (Sakai & Engelmann, 2007). Elle est aujourd'hui l'une des techniques les plus appliquées en cryoconservation végétale.

1.6.2.2.5. Les techniques de V cryo-plate et D cryo-plate

La mise en œuvre des procédures de vitrification en goutte nécessite des personnes expérimentées pour réaliser certaines étapes comme le traitement dans les solutions cryoprotectrices, la déshydratation, le transfert sur la bandelette d'aluminium puis dans les cryotubes. Afin de faciliter ces étapes problématiques, Yamamoto *et al.* (2011) ont développé deux techniques de cryoconservation basées sur l'utilisation de plaques en aluminium, dont les dimensions sont de 7 mm x 37 mm x 0,5mm. La première technique, nommée V Cryo-

plate, combine les techniques d'encapsulation-déshydratation et de vitrification en goutte. Dans cette méthode, les échantillons sont fixés avec une goutte d'alginate de calcium sur des cryo-plates, traités avec les solutions de loading et de vitrification, puis refroidis par immersion directe des cryo-plates dans l'azote liquide et réchauffés par immersion dans la solution d'unloading toujours sur les cryo-plates. Enfin, les échantillons sont facilement détachés à l'aide d'une lame de scalpel puis transférés sur un milieu de culture (Yamamoto *et al.*, 2011; Yamamoto *et al.*, 2012c; Yamamoto *et al.*, 2012b). Niino *et al.* (2013) ont développé la deuxième technique de D cryo-plate, qui est identique à celle de V cryo-plate, sauf pour l'étape de déshydratation après le loading, qui se fait par une déshydratation physique sous hotte à flux laminaire au lieu d'une immersion dans une solution de PVS.

Les deux dernières techniques de cryoconservation (vitrification en goutte et Cryo-plate) ont des caractéristiques communes car les échantillons placés sur des bandelettes d'aluminium ou des cryo-plates (avec une conductivité thermique très élevée), sont en contact direct avec l'azote liquide pendant le refroidissement et la solutions d'unloading lors du réchauffement (Engelmann, 2014). Cependant la dernière technique présente certains avantages par rapport à la première :

1. Éliminer ou diminuer considérablement les risques de dommages ou de perte de matériel végétal pendant la manipulation.
2. L'immersion directe des cryo-plates dans l'azote liquide puis dans la solution d'unloading permet un refroidissement et un réchauffement ultra-rapides ($3000-4500^{\circ}\text{C min}^{-1}$) (Niino & Sakai, 1992; Tanaka *et al.*, 2011; Yamamoto *et al.*, 2011).
3. Cette méthode peut être mise en œuvre par des personnes avec une expérience limitée dans ce domaine car toutes les procédures sont effectuées en utilisant les cryo-plates sur lesquelles les explants ont été collés.

La technique de « V cryo-plate » a été appliquée avec succès sur certaines espèces comme le fraisier (Yamamoto *et al.*, 2012c), l'œillet (Sekizawa *et al.*, 2011), le Chrysanthème de Dalmatie (Yamamoto *et al.*, 2011), la menthe (Yamamoto *et al.*, 2012b) et la canne à sucre (Rafique *et al.*, 2015). À notre connaissance, il existe deux rapports de l'utilisation de la technique de D cryo-plate pour les apex de *Lomandra longifolia* (Niino *et al.*, 2013) et le plaqueminier du Japon (Matsumoto *et al.*, 2013). Après la publication de notre travail sur des masses proembryogènes du palmier dattier (Salma *et al.*, 2014a) cette technique a été

appliquée chez d'autres espèces : les apex de *Chrysanthemum* (Tanaka *et al.*, 2014), les apex de *Clinopodium odorum* (Engelmann-Sylvestre & Engelmann, 2015), les apex de pomme de terre (Yamamoto *et al.*, 2015) et les apex de kaki (Matsumoto *et al.*, 2015).

1.6.3. Développement de la cryoconservation

De nos jours, les recherches en cryoconservation ont considérablement progressé. Cette discipline contribue à la conservation de la biodiversité dans de nombreux secteurs tels que la médecine, l'horticulture, l'agriculture, l'aquaculture et la foresterie (Benson *et al.*, 2006).

Nikolay Maximow a été le premier à décrire l'effet protectif du glycérol pendant la congélation (Maximow, 1912). Il a également identifié l'effet d'autres agents chimiques qui sont devenus, des années plus tard, des agents cryoprotecteurs très importants (Benson, 2004). Cependant, ce n'est qu'à partir de la fin des années 40 que les premières expériences de cryoconservation sur des cellules animales ont été effectuées (Polge *et al.*, 1949; Lovelock, 1953; Lovelock & Bishop, 1959). La première référence de survie des tissus végétaux après congélation dans l'azote liquide est le travail de Sakai, (Sakai, 1960)(Sakai, 1960)(1960) sur des bourgeons dormants du saule. Douze ans plus tard, Quatrano réussit la cryoconservation de cultures cellulaires de lin (Quatrano, 1968). Ces recherches ont significativement progressé pendant les années 1980 et 1990 avec le développement des nouvelles approches telles que la méthode de Simple control-rate freezing (Withers & King, 1980), la technique de Droplet-freezing (Kantha *et al.*, 1982), la vitrification (Sakai *et al.*, 1990) et l'encapsulation-déshydratation (Fabre & Dereuddre, 1990).

Depuis, des améliorations ont été apportées à ces techniques, ce qui s'est traduit par le développement de nouvelles techniques basées sur la vitrification, le développement de protocoles de cryoconservation pour plus de 200 espèces végétales (Engelmann, 2004) et la création de nouvelles cryobanques de matériel végétal. Ces cryobanques concernent tout type d'explants (apex, cals, embryons somatiques, graines, suspensions cellulaires...) aussi bien pour des plantes tropicales que pour des plantes de milieux tempérés (Sakai & Engelmann, 2007).

1.6.4. Cryoconservation : Facteurs limitants

1.6.4.1. Choix du matériel végétal :

Le choix de l'explant et de ses caractères physiologiques jouent un rôle important dans la tolérance à la cryoconservation. Les explants cryoconservés peuvent provenir de matériel *in*

vivo ou *in vitro* même si ce dernier est privilégié puisque les explants sont miniaturisés et stériles (Engelmann, 1991, 1997).

La survie après le stockage dans l'azote liquide dépend de l'état physiologique des explants (Engelmann, 1997), de la nature et du type de cellules utilisées (Ashmore & Engelmann, 1997; Swan *et al.*, 1999). En général, il est conseillé d'utiliser du matériel physiologiquement très actif, dont les cellules sont caractérisées par un cytoplasme dense avec de petites vacuoles moins développées, car ces cellules sont les plus adaptées pour survivre à la cryoconservation (Ashmore & Engelmann, 1997; Moges *et al.*, 2003; Gonzalez-Arno *et al.*, 2014). À titre d'exemple, les suspensions cellulaires en phase de croissance exponentielle, qui présentent ces caractéristiques, sont les mieux armées contre les dommages de la congélation (Withers, 1985).

Un autre paramètre est essentiel, à savoir la taille des explants. Les échantillons de grande taille sont souvent sensibles à la cryoconservation du fait de l'existence de gradients de déshydratation lors du traitement cryoprotecteur entre les tissus superficiels et les tissus internes et de gradients thermiques lors du refroidissement et du réchauffement. En revanche, des explants de trop petite taille peuvent entraîner dans certains cas des problèmes liés aux manipulations du matériel durant l'expérimentation (Gonzalez-Arno *et al.*, 2014). De plus, la régénération d'explants de petite taille est souvent lente et nécessite l'utilisation de milieux de culture complexes (Gonzalez-Arno *et al.*, 2014).

1.6.4.2. Cryoprotection :

Certaines espèces comme les espèces tempérées se caractérisent par une tolérance naturelle au froid. Cette propriété permet d'augmenter la tolérance au froid extrême de l'azote liquide par un simple traitement au froid des plantes-mères pendant quelques jours à quelques semaines avant la cryoconservation (Benson, 2008). Cependant, de nombreuses espèces végétales ne présentent pas ce caractère de tolérance. Il est donc nécessaire de développer d'autres approches permettant aux explants d'acquérir cette tolérance à la déshydratation et la congélation dans l'azote liquide.

Depuis la découverte du rôle du glycérol en tant que cryoprotecteur par Polge *et al.* (1949), de nombreuses substances cryoprotectrices telles que le DMSO, le glycérol, l'éthylène glycol (EG), le polyéthylène glycol (PEG), des acides aminés et des sucres ont été utilisées pour la cryoconservation de matériel végétal (Ashmore & Engelmann, 1997; Wang *et al.*, 2002). Le DMSO, à l'origine utilisé pour la cryoprotection des globules rouges et des spermatozoïdes (Lovelock & Bishop, 1959), est l'un des cryoprotecteurs plus utilisés chez les

animaux, les plantes et les micro-organismes. Il pénètre très rapidement dans la cellule, même à une basse température, et a une tendance à la vitrification (Taylor *et al.*, 1974; Fahy *et al.*, 1987). L'EG est connu pour sa perméabilité rapide et pour sa tendance à bloquer la formation de glace (Suzuki *et al.*, 2008). Le glycérol est moins perméable que le DMSO et l'EG, en raison de son poids moléculaire et de sa viscosité plus élevés (Steponkus *et al.*, 1992). Les sucres sont souvent ajoutés dans des mélanges cryoprotecteurs du fait qu'ils aident à la déshydratation des explants (effet osmotique) et peuvent également préserver l'intégrité des membranes à l'état déshydraté en remplaçant l'eau (Carpenter *et al.*, 1990). La durée d'exposition des explants aux solutions de vitrification est généralement très courte en raison de leur cytotoxicité (Kim *et al.*, 2009). Fahy *et al.* (1987) ont démontré que la toxicité des cryoprotecteurs est l'obstacle le plus important pour la réussite de la vitrification dans les systèmes vivants complexes. L'identification de la nature de la toxicité (biochimique et / ou osmotique) est nécessaire pour établir des protocoles de cryoconservation appropriés dans lesquels l'utilisation de solutions cryoprotectrices toxiques est réduite au minimum possible (Kim *et al.*, 2009). Pour être efficace, un cryoprotecteur doit généralement avoir les qualités suivantes :

- non toxique à la concentration utilisée (Withers, 1991; Moges *et al.*, 2003)
- un faible poids moléculaire
- facilement miscible à l'eau (Ashmore & Engelmann, 1997)
- un fort pouvoir de pénétration dans les cellules

L'ajout de ces solutions permet de déshydrater partiellement les cellules, de réduire la taille des cristaux et la température de formation de glace, ce qui favorise la tolérance des cellules à une température ultra-basse (Ford *et al.*, 2000). Afin d'obtenir une efficacité optimale, il est préférable de combiner plusieurs substances cryoprotectrices (le DMSO, le glycérol etc.) même si l'utilisation d'une seule substance, le DMSO par exemple, montre une efficacité dans certains cas (Withers, 1991). Il est également recommandé de préparer les solutions cryoprotectrices directement dans le milieu de culture.

1.6.5. Mécanismes de tolérance à la cryoconservation

Les dommages causés par la cristallisation sur les cellules représentent les principales causes d'échec de la cryoconservation. Néanmoins, il existe d'autres facteurs qui peuvent avoir un impact sur la survie après la cryoconservation (Fig. 4).

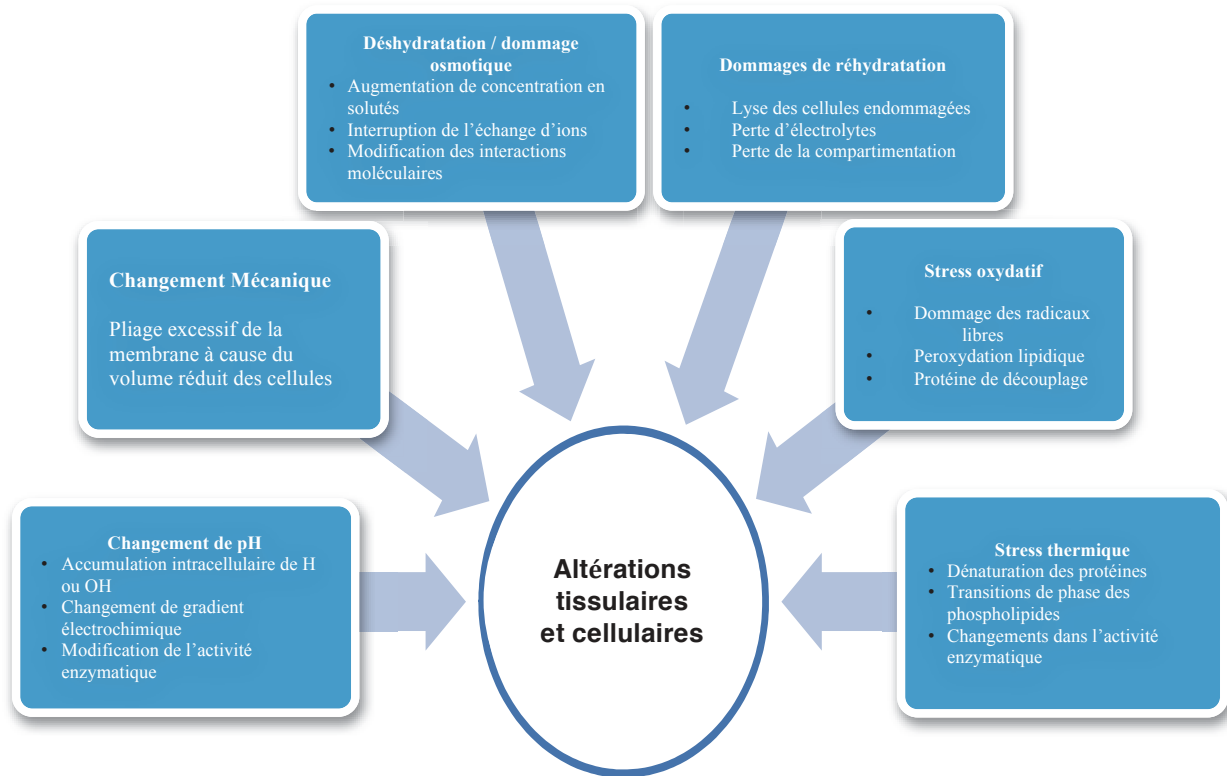


Figure 4 Les principales causes de dommages tissulaires des plantes pendant la cryoconservation. D'après (Kaczmarczyk *et al.*, 2012).

1.6.5.1. Dommages liés aux radicaux libres

Dans la nature, l'oxygène (dioxygène : O_2) fait partie des gaz vitaux. L'apparition de ce dernier sur notre planète remonte à plus de 2500 millions d'années (Gardès-Albert *et al.*, 2003). L'oxygène est nécessaire à tous les êtres vivants (animaux, plantes et bactéries) pour produire de l'énergie à l'exception de quelques organismes (anaérobies et aérotolestants). L'adaptation des espèces vivantes à l'oxygène s'est traduite par l'apparition d'enzymes facilitant sa consommation et l'élimination de ses métabolites ou espèces réactives de l'oxygène (ROS) tels que le peroxyde d'hydrogène et le radical superoxyde qui sont beaucoup plus toxiques que l'oxygène lui-même (Gardès-Albert *et al.*, 2003).

En dépit de l'importance de l' O_2 pour les êtres vivants, ses produits dérivés tels que les ROS représentent un danger pour les cellules. Ces phénomènes constituent également un facteur limitant dans les protocoles de cryoconservation. La formation des ROS peut avoir lieu à n'importe quel moment pendant la réalisation d'un protocole de cryoconservation. À titre d'exemple, la formation de ROS a été détectée au cours du stress photo-oxydatif subi pendant la culture *in vitro*, lors du prétraitement en milieu riche en sucre et après la

déshydratation qui suit l'application des agents cryoprotecteurs. Cette formation peut également avoir lieu lors des changements rapides de température soit dans l'azote liquide ou quand les explants sont réchauffés (Roach *et al.*, 2008). Les ROS sont des molécules très réactives qui peuvent causer des dommages à plusieurs niveaux dans les cellules. Les ROS regroupent une grande variété de molécules qui sont des espèces chimiques oxygénées telles que les radicaux libres, les ions oxygénés et les peroxydes, rendus chimiquement très réactifs par la présence d'électrons de valence non appariés (Tableau 2). Cet électron non apparié est capable de réagir avec les molécules voisines par la suppression d'un autre électron, ce qui cause une cascade de réaction en chaîne formant d'autres radicaux. Cette suppression peut causer une perte de fonctionnalité ainsi qu'une altération structurale de certaines macromolécules nommées « protein-like », des lipides et de l'ADN (Benson, 1990; Apel & Hirt, 2004; Obert *et al.*, 2005).

Tableau 2 Les espèces communes réactives de l'oxygène (ROS) (Halliwell & Gutteridge, 2007)

Radicaux	Non-Radicaux
Superoxyde ($O_2^{\bullet -}$)	Peroxyde l'Hydrogène (H_2O_2)
Hydroxyle (OH^{\bullet})	Peroxynitrite ($ONOO^-$)
Hydroperoxyde (OOH^{\bullet})	Acide peroxyde ($ONOOH$)
Peroxyde (ROO^{\bullet})	Acide hypochloreux ($HOCl$)
Alcoxyde (RO^{\bullet})	Acide hypobromeux ($HOBr$)
Carbonate ($CO_3^{\bullet -}$)	Ozone (O_3)
Dioxyde de carbone ($CO_2^{\bullet -}$)	Oxygène singlet ($^1\Delta_g$)
Oxygène singlet ($^1\Sigma_g^+$)	

Le ratio oxydés/réduits des antioxydants est une bonne indication de la formation des ROS et de la capacité des cellules à réguler le stress oxydatif. L'identification de la fin de la production des ROS est une indication du dommage causé et est aussi un signe que les cellules n'étaient pas capables de stopper suffisamment les activités des ROS (Kaczmarczyk *et al.*, 2012).

1.6.5.2. La peroxydation des lipides (oxydation lipidique)

La peroxydation des lipides est considérée comme le processus le plus nuisible connu pour tous les organismes vivants. L'altération des membranes est parfois considérée comme un paramètre unique pour déterminer le niveau de destruction des lipides sous différentes

contraintes (Gill & Tuteja, 2010). Les membranes cellulaires représentent les zones les plus touchées par les dommages de la congélation. Ces dommages causés par la cryoconservation peuvent altérer l'équilibre fragile entre les solutés intra- et extracellulaires, ce qui entraîne la mort cellulaire (Dowgert & Steponkus, 1984; Anchooguy *et al.*, 1987; Lynch & Steponkus, 1987). La peroxydation des acides gras des phospholipides peut causer des dommages importants à la membrane cellulaire si la chaîne de réaction n'est pas contrôlée, ce qui entraîne des altérations de la semi-perméabilité des membranes et engendre, par conséquent, des dysfonctionnements (Benson *et al.*, 1992).

Il existe plusieurs facteurs qui influencent l'oxydation lipidique à savoir des facteurs intrinsèques (composition en résidus d'acides gras des lipides, présence d'ions métalliques, d'enzymes ou antioxydants naturels) et des facteurs extrinsèques comme la température, la lumière, la pression partielle en oxygène, l'activité de l'eau, etc. (Cojocar, 2010).

La peroxydation des lipides peut avoir lieu quand des ROS spécifiques comme le radical hydroxyle, le radical peroxy et l'oxygène singlet réagissent avec les acides gras. Les acides gras polyinsaturés (AGPI) sont les plus sensibles à la peroxydation (Young & McEneny, 2001; Møller *et al.*, 2007). La formation des produits toxiques finaux de la peroxydation lipidique, comme le malondialdéhyde (MDA) et le « 4-hydroxynonanal » (HNE), peut également causer des dommages cellulaires (Halliwell & Gutteridge, 2007) (Fig. 5).

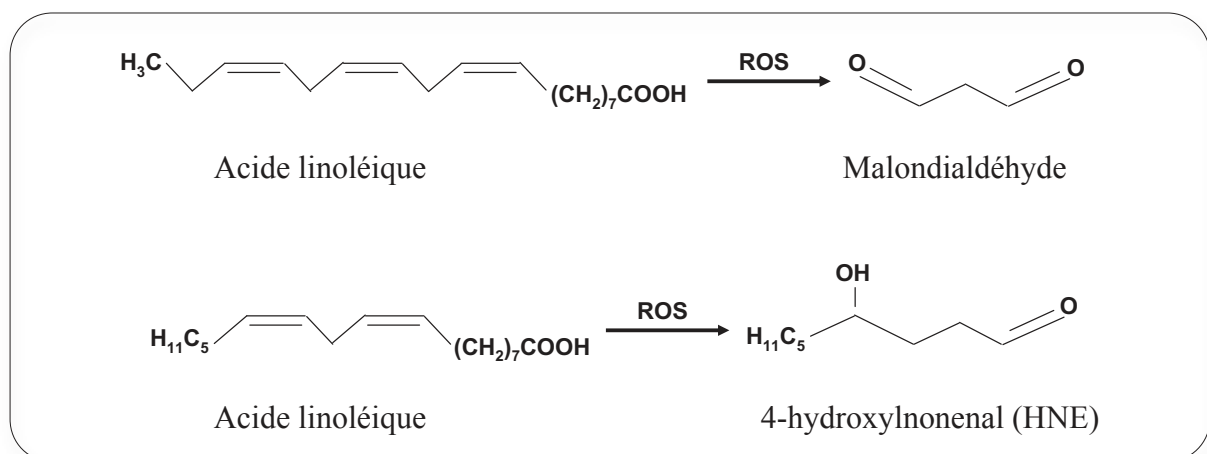


Figure 5: Oxydation des acides gras polyinsaturés (AGPI) d'après (Gill & Tuteja, 2010)

L'identification de la formation du MDA et du HNE est couramment utilisée dans la cryoconservation comme indicateur de stress oxydatif. De plus, une corrélation entre les niveaux élevés de MDA ou de HNE et la diminution des taux de survie a été montrée chez les

suspensions cellulaires de riz (Benson *et al.*, 1992), les apex de lin et de mûrier (Obert *et al.*, 2005; Uchendu *et al.*, 2010) et les embryons somatiques d'olivier (Lynch *et al.*, 2011).

1.6.5.3. Les antioxydants

L'exposition des plantes à des conditions environnementales défavorables telles que les températures extrêmes, les métaux lourds, la sécheresse, les polluants atmosphériques, la carence en nutriments ou le stress salin peut augmenter la production de ROS. Pour se protéger contre ces dérivés toxiques de l'oxygène, les cellules végétales et leurs organites comme les chloroplastes, les mitochondries et les peroxysomes emploient des systèmes de défense antioxydants (Gill & Tuteja, 2010). Un antioxydant peut être défini comme toute molécule qui retarde, empêche ou supprime les dommages oxydatifs (Halliwell & Gutteridge, 2007). Les antioxydants peuvent être classés comme suit :

- 1) Les enzymes qui éliminent par catalyse les ROS comme les superoxyde- dismutases (SOD), la catalase (CAT), l'ascorbate peroxydase (APX), Monodehydroascorbate réductase (MDHAR), Dehydroascorbate réductase (DHAR) et la glutathion réductase (GR)
- 2) Les antioxydants sacrificiels qui sont oxydés de façon préférentielle pour protéger les molécules les plus importantes en neutralisant les ROS (Halliwell & Gutteridge, 2007) comme la glutathion (GSH), l'acide ascorbique (vitamine C), les caroténoïdes et les tocophérols (Mittler *et al.*, 2004; Singh *et al.*, 2008; Gill *et al.*, 2011).

Certains chercheurs ont montré que l'addition d'antioxydants exogènes pendant les processus de cryoconservation amélioreraient dans certains cas la survie (Wang & Deng, 2004; Uchendu *et al.*, 2010). Il est possible que l'addition d'antioxydants exogènes puisse également aider à réduire les stress oxydatifs immédiatement après réchauffement, lorsque le métabolisme cellulaire n'a pas été restauré à son état d'origine (Kaczmarczyk *et al.*, 2012).

1.6.5.4. Stabilité de la membrane cellulaire

Les membranes cellulaires sont généralement les parties les plus touchées par les effets de la congélation (Steponkus, 1984). La membrane cellulaire est une bicouche constituée de différents lipides et de protéines associées, où le rôle des lipides est de définir la structure de la membrane cellulaire et sa fluidité. Les trois grandes classes de lipides présents dans les membranes cellulaires sont des glycérolipides (principalement des phospholipides), des stérols et des sphingolipides (Furt *et al.*, 2011). De plus, les membranes sont responsables

de la transduction des signaux chimiques entre les cellules (Foubert *et al.*, 2007; Furt *et al.*, 2011). La stabilité de ces dernières est donc essentielle pour réduire les dommages de la congélation. Il existe quatre formes de dommages membranaires :

- La lyse causée par l'augmentation de la pression osmotique extracellulaire pendant le refroidissement et le réchauffement ;
- La perte de la réactivité osmotique ;
- L'augmentation de la perméabilité membranaire induisant une fuite de l'eau et des solutés à l'extérieur de la cellule ;
- La perturbation des membranes due à la formation de glace intracellulaire (Steponkus, 1984) .

Certaines études ont rapporté que les sucres intracellulaires solubles et les sucres alcooliques (polyols) comme ceux que l'on emploie dans les milieux de prétraitement réduisent les dommages membranaires lorsque les cellules subissent une déshydratation et peuvent améliorer la stabilité membranaire (Steponkus, 1984; Crowe *et al.*, 1988).

1.6.6. Le rôle des sucres

Le succès de la culture *in vitro* des tissus végétaux dépend fortement de la composition des milieux de culture (Kozai *et al.*, 1997). En culture *in vitro*, la croissance saine et vigoureuse d'une plante nécessite les éléments suivants : les macronutriments, les micronutriments, les régulateurs de croissance, les vitamines, les acides aminés, les éléments azotés et les sucres (source de carbone). Les sucres sont indispensables pour remplacer le carbone normalement fixé par les plantes par la photosynthèse *in vivo* dans le but d'assurer la croissance et le développement (Kozai *et al.*, 1997).

An niveau cellulaire, les molécules des sucres de petite taille aident les membranes à maintenir un certain taux d'hydratation et à augmenter la distance entre les membranes, ce qui réduit les contraintes de compression et, par conséquent, réduit les chances d'une transition de la phase liquide en gel (Wolfe & Bryant, 1999). En outre, les groupes hydroxyles polaires (-OH) des sucres et des polyols ont pour rôle d'interagir avec les groupes des têtes polaires des phospholipides membranaires et de stabiliser les membranes en maintenant la séparation des molécules de phospholipides (Steponkus, 1984; Wolfe & Bryant, 1999; Turner *et al.*, 2001). En 2001, Turner *et al.* ont testé plusieurs sucres et polyols et ont déterminé que la petite taille de molécules telles que le glycérol et l'érythritol donne une meilleure

agglomération autour des membranes, ce qui assure une meilleure capacités de liaison. De plus, la disposition stéréochimique des groupes -OH, en particulier leur orientation d'un seul côté des molécules, assure des liaisons hydrogènes plus stables avec les phospholipides membranaires et, par conséquent, conduit à une grande stabilité des membranes (Turner *et al.*, 2001). Les sucres solubles diminuent la température de la phase de transition de gel en liquide pendant la déshydratation des membranes cellulaires (Wolfe & Bryant, 1999; Lenné *et al.*, 2010). En outre, des concentrations intracellulaires élevées de sucres favorisent la vitrification au cours du refroidissement des explants grâce à la nature très visqueuse de leurs solutions aqueuses (Wolfe & Bryant, 1999).

Au cours des processus de cryoconservation, des études sur plusieurs espèces ont montré la possibilité de remplacer le prétraitement au froid, essentiel pour éliminer l'eau cristallisable, par un prétraitement sur des milieux riches en saccharose (Stushnoff *et al.*, 1997; Suzuki *et al.*, 1998). Ceci a été illustré récemment par Barraco *et al.* (2012) sur les apex de *Prunus cerasus*. Ces auteurs ont montré que le protocole standard qui comprenait 3 semaines de prétraitement des plantes mères au froid suivies de 3 jours de prétraitement sur un milieu riche en sucres a été efficacement remplacé par un prétraitement de 7 jours sur un milieu contenant, soit 0,4 M de glycérol ou de saccharose, soit 0,4 M de saccharose + 0,4 M de glycérol, soit du glycérol à 0,8 M. Pour les deux techniques, les pourcentages de reprise de croissance étaient comparables (entre 41 et 63%) (Barraco *et al.*, 2012).

Dans la plupart des cas, le prétraitement des explants sur un milieu riche en sucre comme le saccharose est nécessaire pour la réussite d'un protocole de cryoconservation (Jitsuyama *et al.*, 2002). L'utilisation du saccharose dans les protocoles de cryoconservation est bien documentée pour de nombreuses espèces (Decruse *et al.*, 1999; Pence, 2001). L'incubation dans des milieux dont les concentration en sucres sont très élevées est connue pour améliorer la survie après cryoconservation chez plusieurs espèces (Leborgne *et al.*, 1995; Blakesley *et al.*, 1996; Ribeiro *et al.*, 1996; Elleuch *et al.*, 1998; Ramon *et al.*, 2002; Zhu *et al.*, 2006; Keller *et al.*, 2008). De plus, l'accumulation de sucre intracellulaire pendant le prétraitement avec des sucres semble avoir un effet positif sur la prévention des dommages dûs à la congélation. Plusieurs études ont montré une corrélation entre l'accumulation des sucres pendant le prétraitement et la survie après la cryoconservation, chez des cultures embryogènes de palmier à huile (Dumet *et al.*, 1994), des suspensions cellulaires d'*Eucalyptus gunnii* et d'*Asparagus officinalis* L (Leborgne *et al.*, 1995; Travert *et al.*, 1997), des scalps de bananier (Zhu *et al.*, 2006) et des apex de pomme de terre (Folgado *et al.*, 2014).

La nature du sucre utilisé pendant le prétraitement a également un impact sur la survie après la cryoconservation, comme l'a illustré l'étude de Dumet *et al.* (1994) chez les embryons somatiques de palmier à huile sur lesquels plusieurs sucres et polyols ont été testés pendant un prétraitement de 7 jours. Dans cette étude, le saccharose, le galactose et le fructose ont produit un pourcentage de reprise de croissance très élevé alors que le glucose, le raffinose et le sorbitol ont donné un pourcentage de reprise de croissance faible. Pour le maltose et le lactose, les auteurs n'ont noté aucune reprise de croissance. En 2002, sur des apex de bananier, (Panis *et al.*, 2002) ont montré que le saccharose pouvait être remplacé par le fructose et le glucose sans effet significativement négatif sur la survie après cryoconservation. En revanche, il a été montré, sur des scalps de bananier, qu'un prétraitement de 14 jours avec des solutions de saccharose ou de tréhalose avec des concentrations de 0,4M ou 0,5M était toxique. La régénération n'a été observée qu'avec des solutions de glucose et de fructose à des concentrations de 0,4M ou de 0,5M ou pour certaines variétés de bananier avec des solutions de tréhalose à 0,4M (Sipen *et al.*, 2011). Chez le palmier dattier des expérimentations ont été réalisées pour étudier l'impact de l'utilisation de différents sucres et polyols pendant le prétraitement. Ces recherches ont montré que l'efficacité du saccharose était supérieure aux autres agents et que le prétraitement sur des milieux contenant du tréhalose ou du raffinose ne donnait aucune survie (Paquier, 2002). Par contre, une combinaison de plusieurs sucres pendant le prétraitement n'a pas amélioré la tolérance des explants à la cryoconservation comme cela a été observé chez les apex de bananier (Panis *et al.*, 2002) et les masses embryogènes de palmier dattier (Paquier, 2002).

Une étude réalisée par Zhu *et al.* (2006) sur des apex de bananier a illustré certains effets du prétraitement au saccharose pendant 2 semaines dans un protocole de cryoconservation. Ces auteurs ont rapporté que la teneur totale en acides gras libres avait augmenté chez trois variétés (Cachaco, Williams et Obino l'Ewai) mais qu'aucune modification n'avait été notée chez la variété Mbwarizume. De même, cette dernière avait montré une faible augmentation de la teneur totale en sucres après le prétraitement au saccharose. L'ensemble des résultats de cette étude reflète l'effet positif du prétraitement au saccharose sur la régénération des trois variétés tolérantes (Cachaco, Williams et Obion l'Ewai). Plus récemment, Menon *et al.* (2014), on noté que les changements induits par le prétraitement au froid (augmentations de teneurs en phosphatidylcholine et en sucres, surtout le fructose, le galactose, le glucose et le saccharose) sur les apex de *Lomandra sonderi* L. étaient responsables de leur tolérance à la cryoconservation.

Enfin, plusieurs études ont conclu que l'effet du saccharose pendant le prétraitement pouvait être amélioré en présence d'ABA (Bravo *et al.*, 1998; Lu *et al.*, 2009; Popova *et al.*, 2009). Lu *et al.* (2009) ont trouvé que chez des cals de *Ginkgo biloba*, le prétraitement au saccharose seul n'avait aucun effet sur la reprise de la croissance après la cryoconservation tandis que le prétraitement des cals avec de l'ABA et du saccharose assurait une reprise de croissance stable. La reprise maximale de croissance après la décongélation (54%) était observée pour les cals prétraités sur un milieu additionné de 10% de saccharose et 2 mg.l⁻¹ ABA pendant 21 jours, suivie d'une dessiccation de 150 min.

En conclusion, lors de la cryoconservation, il est absolument nécessaire de chercher à limiter la formation de cristaux dans les cellules, de maintenir la stabilité du plasmalemme et donc de réduire au maximum le stress cellulaire.

1.6.7. Impact de la cryoconservation sur la physiologie des explants

1.6.7.1. Impact de la cryoconservation sur l'intégrité structurale

Une condition primordiale pour la réussite de la cryoconservation est que la structure des explants congelés doit être suffisamment préservée pour permettre leur reprise de croissance rapide et directe. Même si l'étude histologique des explants fournit des informations très utiles sur l'impact de chacune des étapes successives d'un protocole de cryoconservation sur leur intégrité structurale et peut aider à optimiser les traitements, les études effectuées en relation avec la cryoconservation restent encore limitées.

De nombreuses études histologiques ont été réalisées pour décrire l'impact, au niveau qualitatif, de la cryoconservation sur la structure des tissus et cellules de différentes espèces végétales. Ces études ont révélé des réactions différentes selon le type d'explants congelés et la technique de cryoconservation utilisée. L'étude histologique a ainsi montré que seules quelques zones d'apex de palmier dattier étaient intactes après la cryoconservation, expliquant pourquoi la reprise de croissance commençait par une phase de callogenèse avant que l'apex ne se développe (Bagniol *et al.*, 1992). Chez les apex de canne à sucre, Gonzalez Arnao *et al.* (1993) ont noté que les cellules de la région apicale présentaient les caractères suivants : un rapport nucléocytoplasmique élevé, une cytoplasme très dense, de petites vacuoles et un grand noyau avec un ou deux nucléoles. Ils ont également trouvé que la synthèse d'amidon était fortement augmentée suite aux 24 heures de prétraitement sur un milieu riche en saccharose (0,75M). En ce qui concerne, l'étape de déshydratation, ces mêmes auteurs ont rapporté que cette étape causait des modifications structurales considérables qui sont les suivantes :

- Des noyaux rétractés
- Des nucléoles devenus invisibles
- Un cytoplasme souvent rétracté et détaché des membranes cellulaires

Au terme du protocole de cryoconservation Gonzalez Arnao *et al.* (1993) indiquaient qu'aucun changement n'avait été noté au niveau des échantillons immédiatement après la congélation et le réchauffement. Toutes les cellules apicales retrouvaient leur état initial après 24 h sur le milieu de récupération. Trois jours après, la majorité des cellules apicales avaient survécu alors que celles des zones basales étaient sévèrement endommagées ou détruites.

Chez le caféier, la plupart des cellules de certains apex étaient fortement endommagées après la congélation, conduisant à une callogenèse lors de la reprise, alors que les cellules moins endommagées avaient une croissance directe (Mari *et al.*, 1995). Les observations ultrastructurales fournissent des informations supplémentaires sur l'impact des protocoles de cryoconservation au niveau cellulaire. Yap *et al.* (2011) ont observé, après le prétraitement d'apex de *Garcinia cowa* pendant 3 jours sur un milieu contenant 0,3 M de saccharose, la fusion des vacuoles et l'accumulation de résidus denses aux électrons sur la face interne du tonoplaste. L'addition de glycérol dans la solution de loading produisait une plasmolyse intense et des dommages importants dans l'ultrastructure des cellules, se traduisant par une diminution de la survie des apex.

Dans les protocoles de cryoconservation, l'étape qui a l'impact le plus important sur l'état de plasmolyse des cellules varie en fonction des protocoles, des espèces et des tissus. Zeng *et al.* (2005) indiquent que c'est l'addition de la solution de vitrification qui entraîne la plasmolyse la plus importante lors de la congélation des apex de papayer par vitrification. Chez des apex de *Garcinia cowa*, c'est l'addition de la solution de loading qui a un effet majeur sur l'intensité de la plasmolyse, alors qu'aucune plasmolyse n'est observée lors du prétraitement avec du saccharose (Yap *et al.*, 2011). Mari *et al.* (1995) rapportent que, chez des apex de vitroplants de caféiers cryoconservés par la technique d'encapsulation-déshydratation, la plasmolyse apparaît essentiellement lors de la phase de déshydratation physique des explants, qui suit leur traitement avec des solutions concentrées en saccharose. A l'opposé, Gallard, (2008) indique que, lors de la cryoconservation d'apex de *Pelargonium* par vitrification en goutte, la plasmolyse s'observe après le traitement avec la solution de loading et qu'aucune différence n'apparaît après l'immersion des explants dans la solution de vitrification. Barraco *et al.* (2014), lors de la cryoconservation d'apex de vitroplants d'igname

par encapsulation-déshydratation, observent une plasmolyse intense des cellules après un prétraitement pendant 24 h dans une solution contenant 1,25 M de saccharose. La déshydratation physique qui suit ce prétraitement n'entraîne pas de plasmolyse supplémentaire. Les observations réalisées par Salma *et al.* (2014b) sur les racines de *Rubia akane* ont également montré que c'est le prétraitement sur des milieux enrichis en saccharose (0,3 puis 0,5 M) qui induit la plasmolyse la plus importante. Le traitement avec la solution de loading entraîne une plasmolyse supplémentaire, mais moins prononcée. Par contre, aucune différence significative n'apparaît dans l'état de plasmolyse des cellules après l'application de la solution de vitrification. Après le traitement des racines avec la solution d'unloading, on observe un retour rapide vers un état de plasmolyse des cellules proche de celui existant chez les témoins non traités. Cependant, des différences entre les trois catégories de cellules ont été observées, les cellules du cortex semblant être plus déplasmolysées que les cellules de l'endoderme et du péricycle.

Les techniques d'imagerie cellulaire récemment développées pour la quantification des microphotographies (McMullen *et al.*, 2010), peuvent être utilisées pour quantifier des observations histologiques qualitatives, ce qui permet de les compléter et de les rendre plus précises. Ces techniques n'ont été que rarement appliquées pour l'étude du matériel végétal (Mankessi *et al.*, 2010; Mankessi *et al.*, 2011). Seuls quelques rapports ont été publiés, en ce qui concerne les modifications quantitatives induites au niveau cellulaire lors d'un protocole de cryoconservation (Volk & Caspersen, 2007; Gallard, 2008; Barraco *et al.*, 2014; Salma *et al.*, 2014b). Volk et Caspersen (2007) ont étudié la plasmolyse des apex de *Mentha x piperita* au cours du processus de cryoconservation. Ces auteurs ont montré que les protoplastes dans les cellules des méristèmes et des jeunes feuilles avaient un ratio de plasmolyse de 0,79 ou plus selon la durée de traitements avec PVS2 et que ces types de cellules devenaient plus plasmolysées en suivant la procédure de cryoconservation. Enfin, ils ont trouvé que le rapport de plasmolyse diminuait à 0,47 après l'exposition à l'azote liquide et le réchauffement dans une solution contenant 1,2 M de saccharose. Gallard, (2008) a mesuré les modifications de la surface totale des apex de *Pelargonium* après les étapes successives du protocole de cryoconservation. Il a rapporté une diminution du volume du dôme apical d'environ 15% après le traitement de loading puis encore de 5% après le traitement avec PVS2, soit une réduction du volume totale d'environ 20%. À notre connaissance, deux études ont suivi l'évolution de plusieurs paramètres cellulaires pendant la cryoconservation. La première est celle de Barraco *et al.* (2014) sur les apex d'igname en utilisant la technique d'encapsulation-déshydratation. Ces auteurs ont mesuré le pourcentage de plasmolyse (27%)

après le traitement des apex d'igname avec du saccharose. La deuxième est celle de Salma *et al.* (2014b) sur les racines de *R. akane* cryoconservées qui lors du protocole de vitrification en goutte, ont quantifié la plasmolyse (entre 39 et 45% après le prétraitement au saccharose selon le type de cellules étudiées).

1.6.7.2. Impact de la cryoconservation sur le degré de méthylation globale de l'ADN

1.6.7.2.1. La stabilité génomique

Théoriquement, à la température de l'azote liquide, toutes les activités cellulaires sont arrêtées, ce qui laisse penser qu'aucune modification n'est attendue après la cryoconservation (Panis *et al.*, 2000). Par contre, les protocoles de cryoconservation ne se composent pas que du refroidissement et du réchauffement. Puisqu'ils nécessitent l'utilisation des techniques de culture *in vitro* pour la multiplication du matériel végétal et sa régénération, des changements phénotypiques et génomiques peuvent avoir lieu, causant des variations somaclonales. Selon Larkin et Scowcroft (1981) une variation somaclonale est une variation incontrôlée du génotype ou du phénotype lors de la culture cellulaire. Les variations somaclonales sont le plus souvent héréditaires, et peuvent affecter la structure du génome, ou bien son expression. Le but de la cryoconservation est de maintenir le matériel végétal conservé génétiquement stable. Ainsi, l'utilité de la cryoconservation est seulement établie quand son application ne conduit pas à des modifications génétiques (Zarghami *et al.*, 2008). La cryoconservation peut causer des dommages au niveau cellulaire mais il n'est pas encore clair si elle peut toucher l'intégrité génétique des explants. Pour cela il est important de vérifier la conformité génétique du matériel végétal cryoconservé par rapport au matériel d'origine (Harding, 2004).

La stabilité génétique des plantes cryoconservées a néanmoins été confirmée pour la plupart des échantillons analysés à plusieurs niveaux. À titre d'exemple, des comparaisons morphologiques entre témoins et plantes cryoconservées ont établi la conformité chez plusieurs espèces comme les *Prunus*, la canne à sucre, l'oignon, le kiwi, l'*Eucalyptus*, le caféier, les orchidées (*Dendrobium* sp.) et les cosmos (*Cosmos* sp.) (Harding, 2004).

De nombreuses études sur l'intégrité génétique chez la pomme de terre après la cryoconservation ont été effectuées. Des comparaisons morphologiques et phénotypiques (Harding & Benson, 1994; Benson *et al.*, 1996; Schafer-Menuhr *et al.*, 1996; Hirai & Sakai, 1999; Mix-Wagner, 1999; Barandalla *et al.*, 2003; Zarghami *et al.*, 2008), d'autres cytologiques (Ward *et al.*, 1993; Benson *et al.*, 1996; Schafer-Menuhr *et al.*, 1996; Mix-Wagner, 1999; Barandalla *et al.*, 2003; Zarghami *et al.*, 2008) et des études moléculaires

(Harding, 1991; Schafer-Menuhr *et al.*, 1996; Hirai & Sakai, 1999; Mix-Wagner, 1999; Harding & Benson, 2000; Zarghami *et al.*, 2008), ont conclu à l'absence d'altérations génétiques et ont confirmé la stabilité génétique du matériel végétal cryoconservé (Kaczmarczyk *et al.*, 2011). De plus, des études cytologiques utilisant la cytométrie de flux ont confirmé la stabilité génétique des espèces végétales telles que les pois, le palmier à huile, le bouleau, les ronces (*Rubus* sp.) et le riz (Harding, 2004).

De nombreuses techniques moléculaires utilisant différents marqueurs (RFLP, RAPD, SSR et AFLP) ont été appliquées pour comparer les profils génétiques de plantes témoins et cryoconservées. La plupart de ces études ont confirmé la stabilité génétique (Helliot *et al.*, 2002; Castillo *et al.*, 2010) et lorsque des différences entre les témoins et les plantes cryoconservées ont été trouvées, il a été suggéré que les changements génétiques n'étaient pas associés aux processus de cryoconservation eux-mêmes, mais plutôt causés par la culture *in vitro*, la cryoprotection et les processus de régénération (Harding, 2004; Castillo *et al.*, 2010).

1.6.7.2.2. Modifications épigénétiques

Les techniques moléculaires utilisées dans les différentes études de conformité impliquent la structure même de l'ADN, dont la transmission est soumise aux lois Mendéliennes. Cependant, ceci ne peut être appliqué à l'épigénétique dont les mécanismes sont bien différents (Harding, 2004). Les changements génétiques ont lieu quand la séquence nucléotidique de l'ADN est modifiée alors que les changements épigénétiques n'en affectent pas la structure (Boyko & Kovalchuk, 2008). Par contre, ils peuvent causer des changements héréditaires au niveau de l'expression des gènes. Selon Harding, (2004), ce sujet a été défini pour la première fois en 1942 par Waddington puis a été révisé par Holliday (1994) et Cavalli (2002). Les mécanismes épigénétiques sont généralement des interactions protéine-ADN (Harding & Millam, 2000). Cette interaction est influencée par les modifications chimiques des protéines histones et de l'ADN (l'acétylation, la méthylation et la phosphorylation). Les caractères typiques associés aux processus épigénétiques, comme la régulation de l'expression de gènes, les activités des éléments transposables et la défense contre l'ADN étranger, sont les résultats de la méthylation de l'ADN, des modifications particulières des histones et des altérations de la structure de la chromatine (Boyko & Kovalchuk, 2008).

La méthylation de l'ADN consiste en l'addition d'un groupement méthyle ($-CH_3$) qui est originaire de la S-adénosyl-L-méthionine sur le carbone 5 d'un résidu cytosine. En 1925, la 5-méthylcytosine a été identifiée pour la première fois comme une base azotée, à partir d'ADN de *Mycobacterium tuberculosis* (Johnson & Coghill, 1925). En 1950, la présence et

l'abondance de la 5-méthylcytosine ont déjà été décrites dans l'ADN de plusieurs animaux et dans l'ADN du germe de blé (Wyatt, 1950). Depuis, la 5-méthylcytosine a été dosée chez de nombreuses plantes comme la betterave, le riz, le maïs, le tournesol et le coton (Thomas & Sherratt, 1956; Ergle & Katterman, 1961). La méthylation de l'ADN existe chez les Procaryotes et chez la grande majorité des Eucaryotes incluant les plantes, les champignons et les animaux.

Chez les plantes, la méthylation de l'ADN touche les structures CG, CHG, CHH (où H=A, C ou T). La méthylation est plus fréquente dans les sites CG. Ces sites peuvent atteindre un niveau de méthylation de 80 à 100%, alors que le taux de méthylation pour les sites de CHH est environ de 10%. En ce qui concerne les sites CHG, le niveau de méthylation est entre 20 et 100% (Cokus *et al.*, 2008). La méthylation de l'ADN est contrôlée par deux voies enzymatiques (méthylation *de novo* et de maintenance) dirigées à leur tour par les ADN méthyltransférases. La voie *de novo* correspond à la méthylation de séquences antérieurement non méthylées par l'ajout de groupements méthyle sur de nouveaux résidus cytosine en dehors de la phase de réplication, ce qui provoque l'apparition de nouveaux patrons de méthylation. La méthylation de maintenance est le processus par lequel les patrons de méthylation préexistants sont maintenus après la réplication de l'ADN (Zhang *et al.*, 2010).

La méthylation de l'ADN joue un rôle essentiel dans la vie de la cellule. Elle pourrait avoir un impact sur la vigueur et la morphogenèse (Chan *et al.*, 2005), l'embryogénèse, l'empreinte parentale, l'inhibition des éléments transposables et la régulation transcriptionnelle des gènes (Li *et al.*, 1992; Zilberman *et al.*, 2007; Lister *et al.*, 2008). Certaines études ont abordé l'effet des changements de la méthylation de l'ADN sur la stabilité génomique en relation avec la micropropagation et la cryoconservation (Harding, 2004; Harding *et al.*, 2008; Peredo *et al.*, 2008). Les premières études comparatives de l'état de la méthylation de l'ADN avant et après la cryoconservation ont révélé des modifications chez l'amandier (Channuntapipat *et al.*, 2003), le papayer (Kaity *et al.*, 2008), *Ribes* (Johnston *et al.*, 2009) et la pomme de terre (Kaczmarczyk *et al.*, 2010).

Dans un autre contexte, chez les deux variétés 'Désirée' et 'Golden Wonder' de pomme de terre (*S. tuberosum*) étudiées, des changements de méthylation de l'ADN ont été trouvés chez les plantes cultivées sur un milieu MS avec 6% (p/v) du mannitol pendant 6 mois. La croissance sur un milieu enrichi en mannitol semble être corrélée avec l'hyperméthylation d'ADN ultérieure, qui peut être une réaction adaptative à des conditions environnementales anormales liées au stress osmotique élevé (Harding, 2004). Ce résultat a des implications chez les plantes à multiplication végétative, comme la pomme de terre, car le statut de méthylation

pourrait être héréditaire dans la descendance des tubercules. De plus, des changements phénotypiques peuvent apparaître dans les générations suivantes (Harding, 2004).

Heringer *et al.* (2013) sur le palmito (*Bactris gasipaes* Kunth), en utilisant la technique de la vitrification en goutte, ont trouvé que les profils de méthylation globale de l'ADN étaient influencés par le traitement cryoprotecteur ainsi que par la cryoconservation. Ils ont noté une augmentation de la méthylation de l'ADN en réponse au traitement dans la solution de vitrification en présence et en absence de congélation dans l'azote liquide. Par contre, ils ont observé un retour à l'état de méthylation initial chez les masses d'embryons somatiques incubées pendant 120 min et 180 min après 24 semaines de reprise de croissance. De même, sur des méristèmes apicaux de trois espèces : *Ribes ciliatum* (Humb. et Bonpl.), *R. sanguineum* (cultivar King Edward VII) et *R. nigrum* (cultivars Ben More et Ben Tron), Johnston *et al.* (2009) ont montré que la méthylation de l'ADN, induite chez le génotype tolérant à la cryoconservation pendant le prétraitement au saccharose, était présente au cours des premiers cycles de propagation mais qu'elle régressait aux valeurs du témoin au cours de la micropropagation.

D'autres études ont confirmé la stabilité épigénétique chez des plantes cryoconservées comme chez *Quercus robur* L. où la déshydratation et la cryoconservation avaient une influence négligeable sur l'état de la méthylation de l'ADN (Plitta *et al.*, 2014). Kaity *et al.* (2013) en utilisant des marqueurs RAF (Randomly Amplified DNA fingerprinting) ou AMP (Amplified DNA Methylation Polymorphism), ont conclu aussi que les variations étaient soit inexistantes ou très faibles et non associées à la cryoconservation. Les résultats obtenus en employant une nouvelle variante de metAFLP, qui permet d'étudier les changements de l'ADN génomique et les patrons de méthylation de l'ADN, ont confirmé l'absence de variations au niveau de la méthylation entre les suspensions cellulaires de *Gentiana cruciata* cryoconservées et témoins (Mikuła *et al.*, 2011).

Plusieurs études, en utilisant une analyse biochimique des organes entiers, ont décrit les changements dans les niveaux de la méthylation globale de l'ADN pendant la différenciation des organes de reproduction des plantes (Zluvova *et al.*, 2001; Zhao *et al.*, 2008; Meijón *et al.*, 2009). Néanmoins, les données sur les modifications des profils de distribution de l'ADN nucléaire méthylé *in situ* sont encore très rares. Pour étudier la dynamique de méthylation de l'ADN au cours du développement de la plante dans les différents types de cellules du même organe, l'analyse de sa répartition spatiale et temporelle constitue une approche très importante (Testillano *et al.*, 2013).

1.6.7.3. Application de l'immunolocalisation

L'utilisation de l'immunolocalisation a été facilitée grâce au développement d'anticorps marqués qui se fixent à des molécules spécifiques dans la cellule (Coons *et al.*, 1941). Par conséquent, cette technique permet d'observer la distribution spatiale ou temporelle d'une protéine donnée dans la cellule entière, dans le noyau, dans les chromosomes ou dans des organites spécifiques. Les premières descriptions de l'utilisation de l'immunolocalisation chez les plantes remontent aux années 70 où les antigènes de la paroi cellulaire du pollen et des protéines de cotylédons ont été localisés (Knox, 1970).

La technique d'immunolocalisation se base sur le principe de réaction antigène-anticorps pour détecter des molécules très spécifiques dans une cellule ou dans un tissu (de Paula & Techio, 2014). Les réactifs communs utilisés dans l'immunolocalisation sont des anticorps monoclonaux ou polyclonaux qui sont généralement produits dans des animaux tels que le lapin, la chèvre, le rat et la souris à travers des procédures spécifiques (Boenisch, 2009). Les anticorps polyclonaux sont un mélange hétérogène d'anticorps qui se lient à des épitopes différents de la même protéine, alors que les anticorps monoclonaux sont des populations homogènes, spécifiques à un seul épitope de la protéine (Boenisch, 2009). Plusieurs facteurs influencent la réussite de l'immunolocalisation comme le type d'anticorps, les conditions de stockage et la dilution des anticorps, qui sont généralement indiquées par les fabricants (de Paula & Techio, 2014). De plus, il est indispensable de prendre en compte des facteurs tels que l'affinité (la force d'interaction entre l'épitope de l'antigène et le paratope d'un anticorps), l'avidité (le terme utilisé pour décrire la force globale des interactions entre l'antigène et les divers anticorps qui le reconnaissent) et la réactivité croisée (Steward & Steensgaard, 1983; Boenisch, 2009). Une haute affinité antigène-anticorps indique une grande tendance à les maintenir ensemble (Boenisch, 2009). En outre, des facteurs tels que la concentration élevée en sel, une température élevée et un pH faible au cours des cycles de lavage appliqués dans la technique, peuvent entraîner la dissociation du complexe antigène-anticorps (de Paula & Techio, 2014).

L'immunolocalisation sur des tissus végétaux peut être réalisée par deux procédures : une procédure indirecte où l'on utilise au moins deux anticorps: un anticorps primaire reconnaît et se lie à des épitopes de l'antigène (protéine) à localiser et un anticorps secondaire, souvent conjugué à un fluorochrome, reconnaît l'anticorps primaire correspondant. La méthode directe utilise un seul anticorps lié à un fluorochrome. L'avantage de la technique indirecte est l'amplification du signal obtenu, due au fait que plusieurs anticorps secondaires peuvent se lier à un même anticorps primaire (Brown & Lemmon, 1995; Marttila & Santén,

2007). Un fluorochrome est un produit chimique qui, lors de l'excitation à une longueur d'onde spécifique, fluoresce à une autre longueur d'onde, et le signal peut alors être observé avec un microscope à épifluorescence (Brown & Lemmon, 1995). C'est pour cette raison que la procédure est également appelée immunofluorescence (de Paula & Techio, 2014).

Les histones sont constituées de protéines associées à l'ADN eucaryote, comprenant le nucléosome, qui se compose d'un octamère de quatre histones majeures (H3, H4, H2A, H2B) (Luger *et al.*, 1997; Kouzarides, 2007). Chaque histone possède une chaîne d'acides aminés, appelée N-terminale, qui est soumise à plusieurs modifications post-traductionnelles (Kouzarides, 2007; Jin *et al.*, 2008). Ces modifications épigénétiques influent sur la structure et la fonction de la chromatine, régulant ainsi l'expression du gène et peuvent être identifiées par immunolocalisation (Bannister & Kouzarides, 2011). Il existe au moins huit différents types d'altérations des histones, cependant l'acétylation, la méthylation et la phosphorylation sont les plus étudiées (Kouzarides, 2007; Chen *et al.*, 2010).

Moghaddam *et al.* (2010) ont utilisé l'immunolocalisation pour étudier entre autres la relation entre les changements dans la méthylation de l'ADN, la structure de la chromatine, et l'expression des gènes dans des génotypes hétérotiques chez *Arabidopsis thaliana*. Ils ont pu, grâce à cette technique, comparer la distribution de la méthylation de l'histone H3 (H3K27me3, H3K4me2 et H3K9me2) entre les plantes parentales et les hybrides. Dans le travail de Testillano *et al.* (2013), l'immunolocalisation du 5mdC puis l'analyse par microscopie confocale ont été appliquées pour des analyses *in situ* de cellules végétales, de tissus et d'organes présentant des caractéristiques différentes comme la dureté, l'hétérogénéité, l'accessibilité de la cellule et la compacité de tissu. Ces auteurs ont ainsi démontré la faisabilité de l'approche pour différents échantillons de plantes, et ont révélé des profils de méthylation de l'ADN nucléaires associés à la différenciation et la prolifération de divers types de cellules végétales. De plus, ils ont quantifié l'intensité d'immunofluorescence du 5mdC par un logiciel d'analyse d'image, ce qui a permis d'évaluer les différences de niveaux de méthylation globaux de l'ADN entre différents types cellulaires d'un même organe au cours du développement.

D'autres études ont employé cette approche pour analyser la dynamique et la distribution des profils de méthylation de l'ADN puis quantifier le degré de méthylation globale pendant la reprogrammation de la microspore pour l'embryogenèse et le développement du pollen chez l'orge (El-Tantawy *et al.*, 2014) ou pour analyser les trois types de modifications épigénétiques pendant la reprogrammation de la microspore pour l'embryogenèse chez le colza (Rodríguez-Sanz *et al.*, 2014).

Très récemment, Pérez *et al.* (2015) ont analysé les niveaux d'ABA et de la méthylation au cours du développement de l'embryon somatique de *Q. suber* et ils ont déterminé la distribution spatiale et temporelle de l'ABA et 5-méthyl-désoxycytidine (5mdC) dans les embryons en utilisant l'immunolocalisation. Cette analyse a été appliquée à différents stades de développement afin de déterminer quels domaines de cellules, au sein de l'embryon, montrent des profils d'expression différents.

1.6.8. La cryoconservation chez le palmier dattier

Les études réalisées sur la cryoconservation du palmier dattier restent limitées. Tout commence en 1982 où un protocole de congélation a été développé pour les cals embryogènes de la variété « Medjool » (Ulrich *et al.*, 1982). Dans cette étude, Ulrich *et al.* ont utilisé un congélateur programmable pour diminuer la température des échantillons de 4°C à -4°C à 3°C/min puis jusqu'à -30°C avec une vitesse de refroidissement de 1°C/min avant de les plonger dans l'azote liquide. Ces auteurs ont estimé la croissance en mesurant l'augmentation de poids frais et le nombre d'embryons produits au cours de 18 semaines de culture. Ils ont trouvé que la croissance de cals qui ont été cryoconservés, par rapport à d'autres traitements, a été fortement inhibée pendant les 9 premières semaines de culture.

Plus récemment, des protocoles ont été mis au point pour les apex (variété : Bou Sthammi), en 1992, en utilisant également un congélateur programmable après une durée de 24 h de prétraitement sur un milieu dont la molarité est de 0,5M de saccharose suivi d'un traitement cryoprotecteur pendant 2 heures à 0°C dans un milieu liquide contenant 0,5M de saccharose et 10% de DMSO. Le refroidissement lent a été réalisé à une vitesse de 1°C/mn jusqu'à -30°C, suivi d'une immersion dans l'azote liquide. Le réchauffement rapide a été effectué dans un bain marie thermostaté à +40°C (Bagniol, 1992; Bagniol & Engelmann, 1992; Bagniol *et al.*, 1992). Cette étude a permis d'obtenir respectivement des taux de reprise de 43,3%, 12,9% et 50,3% pour les variétés Bou Sthammi noir, Zahidi et Nabut Seif.

En 1995, des embryons somatiques ont été cryoconservés en appliquant une technique, préalablement utilisée chez les axes embryonnaires du pois (*Pisum sativum*), qui emploie un traitement cryoprotecteur (solution contenant 5% de glycérol et 5% de saccharose pendant 15min puis dans une solution contenant 10% de glycérol et 10% de saccharose pendant 15 min) et une déshydratation partielle pendant une heure avant le transfert dans l'azote liquide (Mycock *et al.*, 1995). L'application de cette technique a permis d'obtenir entre 86 et 88% de survie selon la stade de l'embryogénèse.

Avec le progrès des techniques de la cryoconservation, Paquier (2002) a réussi à optimiser un protocole qui repose sur la déshydratation osmotique de massifs d'embryons somatiques lors d'une préculture sur un milieu à 0,75 M de saccharose, un réchauffement rapide puis un post-traitement sur des milieux progressivement appauvris en saccharose et enrichis en 2,4-D. Elle a également montré que seul le saccharose parmi d'autres hydrates de carbone testés (mono-, di-, triholosides et polyols) permettait de conférer une résistance à la cryoconservation. Deux autres travaux sur des tissus indifférenciés de la variété Zaghlool (Bekheet *et al.*, 2007) et des suspensions cellulaires de la variété Khalas (Al-Bahrany & Al-Khayri, 2012) ont développé des protocoles basés sur la vitrification. Bekheet *et al.* (2007) ont montré que les cultures dont la teneur en eau était d'environ 65% (20 min de déshydratation sous hottes à flux laminaire) avaient une survie maximale de 80% après la cryoconservation. En étudiant l'effet de sucres sur la survie, ces auteurs ont trouvé que, parmi les différents types de sucres utilisés (fructose, glucose, le sorbitol et saccharose) comme agents osmotiques dans un milieu de préculture, le saccharose (1 M de saccharose) était le plus efficace avec un pourcentage de survie de 80%. Enfin, pour déterminer le potentiel de vitrification sur la tolérance à la cryoconservation, les cultures ont été exposées à une solution de vitrification pendant 20 à 100 min. La survie maximale a été obtenue après 80 min à 0°C et après 40 min à 25°C. Al-Bahrany et Al-Khayri (2012) ont prétraité les échantillons dans une solution de saccharose puis les ont traités dans une solution cryoprotectrice contenant du saccharose à des concentrations correspondant à celles utilisées dans le prétraitements (0,1, 0,25, 0,5, 0,75 et 1 M) et complété soit avec du DMSO à 0,5 et 10 % soit avec du glycérol à 0,1 et 2 M. Ces auteurs ont montré que la formation de colonies (21 colonies), la croissance (0,12 g) et le nombre d'embryons (11 embryons) les plus élevés ont été obtenus chez les cellules traitées avec 10% de DMSO et 0,75 M de saccharose.

En 2011, des protocoles de vitrification et de vitrification en gouttes ont été établis pour les masses proembryogènes de la variété Barhee (Fki *et al.*, 2011a). Dans ce protocole, les PEM ont été prétraitées sur un milieu à 0,5M de saccharose pendant 3 jours puis ont été traitées dans la solution de LS contenant 2M de glycérol et 0,4M de saccharose. Avant la congélation, les PEM ont été immergées dans la solution de PVS2 (3,26M de glycérol, 2,42M d'éthylène glycol, 0,4M de saccharose et 1,9M de DMSO). Cette étude a conclu que la technique de vitrification en goutte s'est avérée être supérieure et que le prétraitement au saccharose a considérablement augmenté la survie après la cryoconservation. La régénération la plus élevée a atteint 63,3% lorsque les PEM ont été traitées avec PVS2 pendant 30 min à

0°C et 56,7% lorsque le traitement avec PVS2 a duré 15 min à 25°C. De plus, les auteurs ont rapporté que les premiers signes de reprise de croissance ont été observés après 2 à 3 semaines de transfert sur le milieu de prolifération. Récemment, une autre étude a été réalisée sur des bourgeons produits à partir d'explants foliaires (Fki *et al.*, 2013). Dans ce travail, les auteurs ont employé les mêmes solutions de loading et de vitrification décrites dans l'étude de Fki *et al.* (2011a). Cette étude a comparé l'efficacité de trois techniques de cryoconservation : vitrification, vitrification en goutte et encapsulation-vitrification, qui ont conduit à respectivement 26,7%, 60% et 40% de survie. Elle a également montré que les explants dont la taille a été inférieure de 3mm, avaient une meilleure capacité de survie. Enfin, ces auteurs ont rapporté un effet significatif du prétraitement au saccharose, de l'acclimatation au froid et du traitement de LS sur le taux de régénération.

1.7. Objectif de la thèse

Le palmier dattier est confronté à plusieurs défis : d'abord, la multiplication du dattier se fait traditionnellement par la voie végétative à travers les rejets ou par une voie sexuée à travers les semis. Cependant la reproduction sexuée génère des pieds mâles et femelles, ce qui la rend peu intéressant pour les agriculteurs. Le nombre des rejets produits par plantes ne répond pas à la demande pour replanter les palmeraies. Les maladies, comme le Bayoud, ont également causé la disparition de palmeraies complètes. De plus, certaines pratiques culturales, notamment la sélection des variétés d'importances commerciales a beaucoup réduit la diversité génétique. D'où la nécessité de trouver une méthode efficace de multiplication et de conservation. Pour cela les chercheurs se sont orientés vers la culture *in vitro* mais cette technique, très coûteuse et qui nécessite beaucoup de maintenances, a généré d'autres problèmes comme la contamination des cultures et les variations somaclonales (à cause de l'utilisation intense d'hormones). Pour surmonter ces problèmes il fallait un moyen qui permette à la fois la conservation des ressources génétiques et la gestion de la production du palmier dattier. La seule solution disponible de nos jours est la cryoconservation, qui permet d'assurer la disponibilité du matériel végétal à tout moment et de contourner les problèmes liés à la culture *in vitro*.

Le but de notre travail de thèse est :

1. De comparer l'efficacité de deux protocoles de cryoconservation, le protocole de vitrification en goutte mis au point par Fki *et al.* (2011a) et le protocole de D cryo-plate développé par Niino *et al.* (2013), sur des masses proembryogènes (PEM) de

deux variétés de palmier dattier (Sokary et Sultany) Cette étude permettra de définir des conditions expérimentales donnant des pourcentages de survie contrastés qui feront l'objet des études suivantes.

2. Dans un deuxième temps d'étudier l'effet des étapes successives du protocole de vitrification en goutte sur :
 - L'intégrité structurale des PEM (masses Proembryogènes) de la variété Sokary. Cette étude a pour but de suivre les modifications induites par le protocole de DV au niveau cellulaire.
 - La méthylation de l'ADN pour détecter puis suivre les changements éventuels du niveau de méthylation des différents types cellulaires des PEM après les étapes clés du protocole DV. Cette étude cherchera à savoir si les modifications de profils de méthylation, peuvent être reliés avec des pourcentages de survie différents et si ces modifications sont permanentes ou temporaires après la cryoconservation.

CHAPITRE 2

MATÉRIELS & MÉTHODES

2. Matériels et Méthodes

2.1. Matériel végétal

Les cals de deux variétés de palmier dattier (Sokary et Sultany) ont été fournis par le Dr. Fki (Laboratoire de biotechnologie végétale, Faculté des sciences de Sfax, Tunisie). Ces cals ont été repiqués pendant 6 mois afin d'avoir une quantité suffisante de masses proembryogènes (PEM). Ces PEM ont été produites à partir de feuilles juvéniles prélevées sur des rejets, selon la méthode décrite par Fki *et al.* (2011b) (Fig. 6).

2.2. Culture *in vitro*

Les PEM sont cultivées sur un milieu MS (Murashige & Skoog, 1962), additionné de 0,15 M de saccharose, 8 g l⁻¹ d'agar et 0,3 mg l⁻¹ d'acide 2,4 dichlorophénoxyacétique (2,4 D) avec un pH de 5,75. Les PEM sont placées dans une salle de culture à 27±2 °C avec une photopériode de 12 h jour/12 h nuit et une intensité de 50 µmol m⁻² s⁻¹. L'intervalle entre les repiquages est de 6-8 semaines puis celui-ci est réduit à 1 semaine avant la cryoconservation.

2.3. Cryoconservation

Deux protocoles de cryoconservation ont été appliqués sur les PEM des deux variétés Sokary et Sultany. Les PEM qui ont fait l'objet de cette étude ont approximativement un diamètre de 3-5 mm. Elles sont composées d'agrégats d'environ de 15 proembryons et ont une taille d'environ 500 µm pour chaque proembryon (Fig. 6).

2.3.1. Vitrification en gouttes (DV)

La procédure développée par Fki *et al.* (2011a) a été utilisée : des PEM sont transférées pendant 3 jours sur un milieu de prétraitement contenant les mêmes composants du milieu MS standard sans hormones et avec 0,5 M de saccharose au lieu de 0,15 M de saccharose. Ensuite, les explants sont transférés dans des boîtes de Petri (60 mm de diamètre) et traités avec la solution de loading (LS) C7 (2,0 M glycérol + 0,4 M saccharose) (Matsumoto *et al.*, 1994) pendant 20 min à température ambiante. La LS est enlevée et remplacée par la solution de vitrification (PVS2) A1 (3,3 M glycérol + 2,4 M éthylène glycol + 0,4 M saccharose + 1,9 M DMSO 35) (Sakai *et al.*, 1990), avec laquelle les PEM sont traitées pendant 15, 30, 60 ou 120 min à 0°C. Quelques min avant la fin de ce traitement, les explants sont déposés sur des bandelettes de papier d'aluminium (7 × 20 mm) dans une goutte de PVS2. Les PEM sont refroidies par une immersion directe dans l'azote liquide. Au bout d'1 h de stockage à -196°C, les échantillons sont réchauffés en plongeant les bandelettes d'aluminium dans 12 ml de solution d'unloading (ULS, milieu liquide contenant 1,2 M saccharose) à température ambiante (Kim *et al.*, 2010). Au bout de 15 min, les PEM sont placées sur un papier filtre sur le milieu de post-traitement contenant 0,3 M de saccharose à l'obscurité

pendant 3 jours. Enfin les échantillons sont transférés sur le milieu standard de prolifération sous les conditions standard de culture pour permettre la reprise de la croissance (Fig. 8).

2.3.2. D cryo-plate

Cette technique, développée par Niino *et al.* (2013), a été employée pour la cryoconservation des PEM des deux variétés Sokary et Sultany. Les PEM sont prétraitées pendant 3 jours sur un milieu de prétraitement contenant les mêmes composants du milieu MS standard sans hormone et 0,5 M de saccharose au lieu de 0,15 M de saccharose. Les PEM sont ensuite transférées dans les puits des cryo-plates dans une goutte (2 μ l) de solution d'alginate de sodium à 3% (préparée dans un milieu standard sans calcium). Puis elles sont recouvertes avec 2 μ l de la même solution. Les cryo-plates, dont les dimensions sont 7 mm x 37 mm x 0,5 mm avec 10 puits (1.5 mm de diamètre et 0,75 mm de profondeur) (Fig. 8A), ont été fournis par le Dr. Niino (NIAS, Tsukuba, Japon). Ensuite, une solution enrichie en chlorure de calcium (0,1 M chlorure de calcium dans un milieu standard liquide) est versée goutte à goutte sur les cryo-plates jusqu'à les recouvrir complètement. La polymérisation de l'alginate de calcium est complète au bout de 15 min (Fig. 7). La solution de chlorure de calcium est éliminée par aspiration avec une micropipette. Puis les cryo-plates sont transférées dans la LS contenant 2,0 M glycérol et 0,4 M saccharose (Matsumoto *et al.*, 1994) pendant 20 min à température ambiante. La déshydratation physique est réalisée sous une hotte à flux laminaire pendant 30, 60, 90, 120, 150 ou 300 min à 23°C et 40 à 50% d'humidité relative. Après déshydratation, les cryo-plates sont plongées dans des cryotubes préalablement remplis d'azote liquide. Après 1 h dans de l'azote liquide, les PEM sont réchauffées par immersion des cryo-plates dans cryo-cryotubes de 2 ml remplis d'ULS contenant 1,2 M de saccharose pendant 15 min. Les PEM sont ensuite détachées des cryo-plates avec une lame de scalpel, transférées sur un papier filtre placé sur un milieu standard avec 0,3 M de saccharose à l'obscurité pendant 3 jours, puis transférées sur milieu standard avec 0,15 M de saccharose avec 12 h lumière/12 h obscurité (Fig. 9).

2.3.3. Paramètres étudiés

Deux paramètres ont été mesurés. Le premier est le pourcentage de survie qui est évalué en comptant le nombre de proembryons survivants par PEM. Un proembryon est considéré vivant quand sa taille augmente 15 jours après transfert sur le milieu standard de prolifération (Fig. 10C, D, E, F). La survie a été calculée selon la formule suivante :

$$\left(\frac{\text{Nombre de proembryons survivants}}{\text{Nombre total de proembryons}} \right) \times 100$$

Le deuxième paramètre est l'intensité de croissance. Afin d'évaluer ce paramètre, pour chaque traitement, une photo de chaque PEM a été directement prise après le transfert sur le milieu standard puis une autre après 15 jours de culture en utilisant un stéréomicroscope (Leica EZ4HD).



Figure 6 Masse proembryogène (PEM) de palmier dattier de la variété Sokary (Échelle : 100 μm)

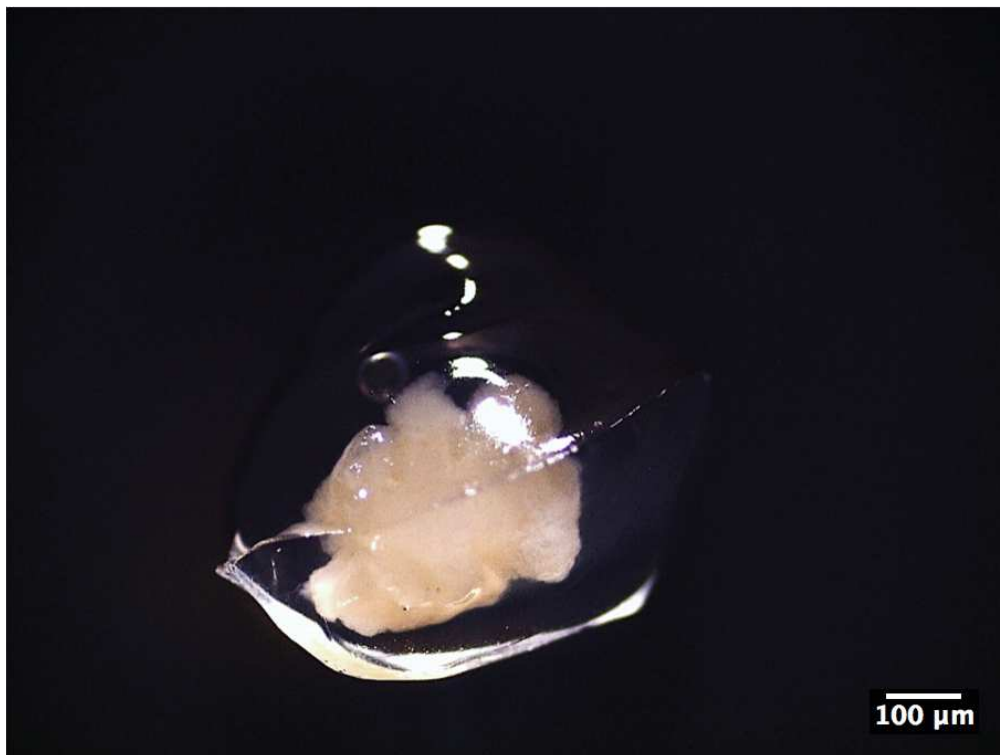


Figure 7 Masse proembryogène (PEM) de palmier dattier de la variété Sokary encapsulée (Échelle : 100 μm).

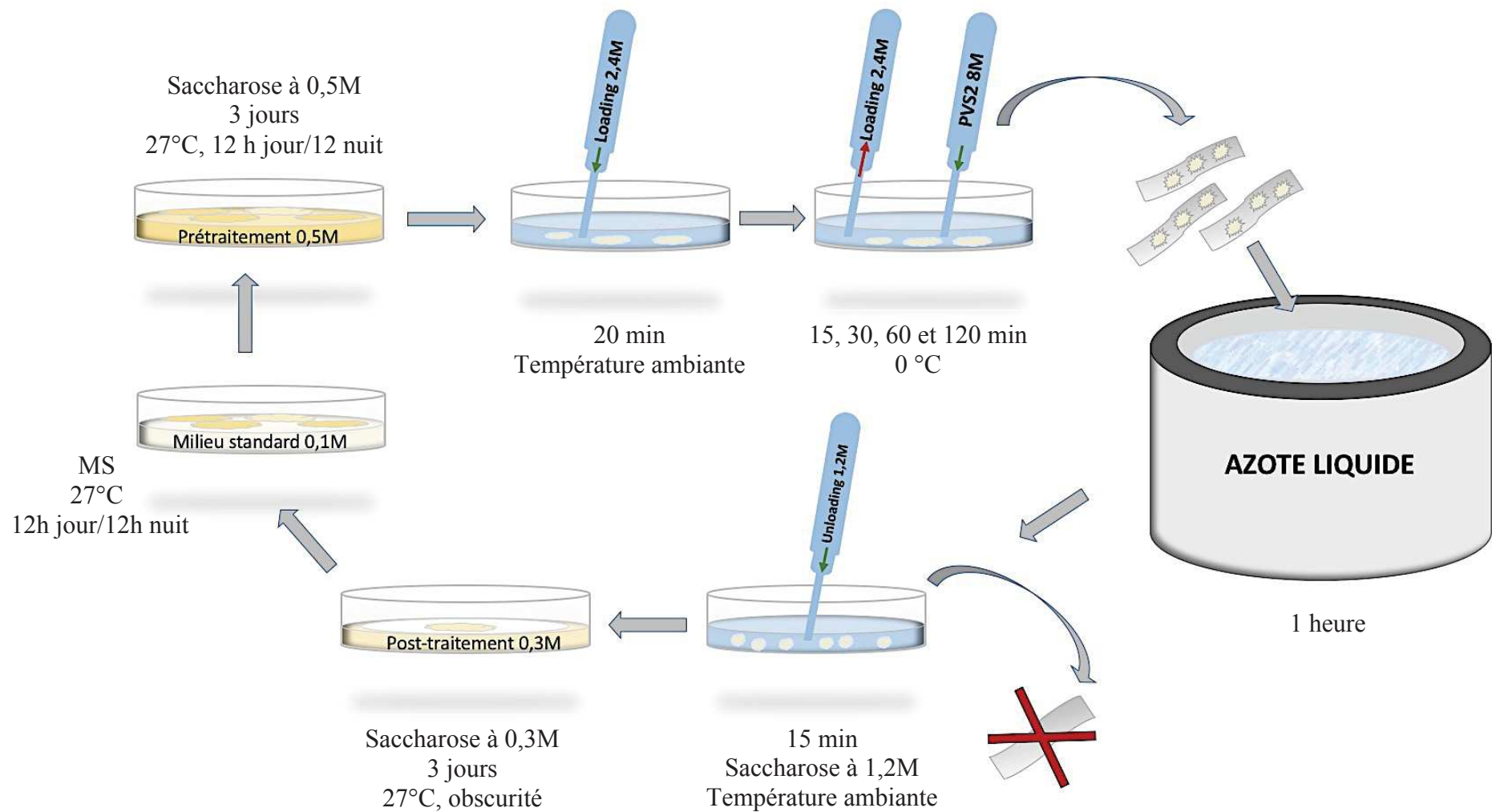


Figure 8 Étapes du protocole de vitrification en goutte (DV) sur des PEM de palmier dattier. Le milieu de prétraitement contient les mêmes composants du milieu MS standard sans hormones et avec 0,5 M de saccharose La solution de loading (LS) : C7 (2,0 M glycérol + 0,4 M saccharose). La solution de vitrification PVS2 : (3,3 M glycérol + 2,4 M éthylène glycol + 0,4 M saccharose + 1,9 M DMSO 35). La solution d'unloading (ULS) un milieu liquide contenant 1,2 M saccharose).

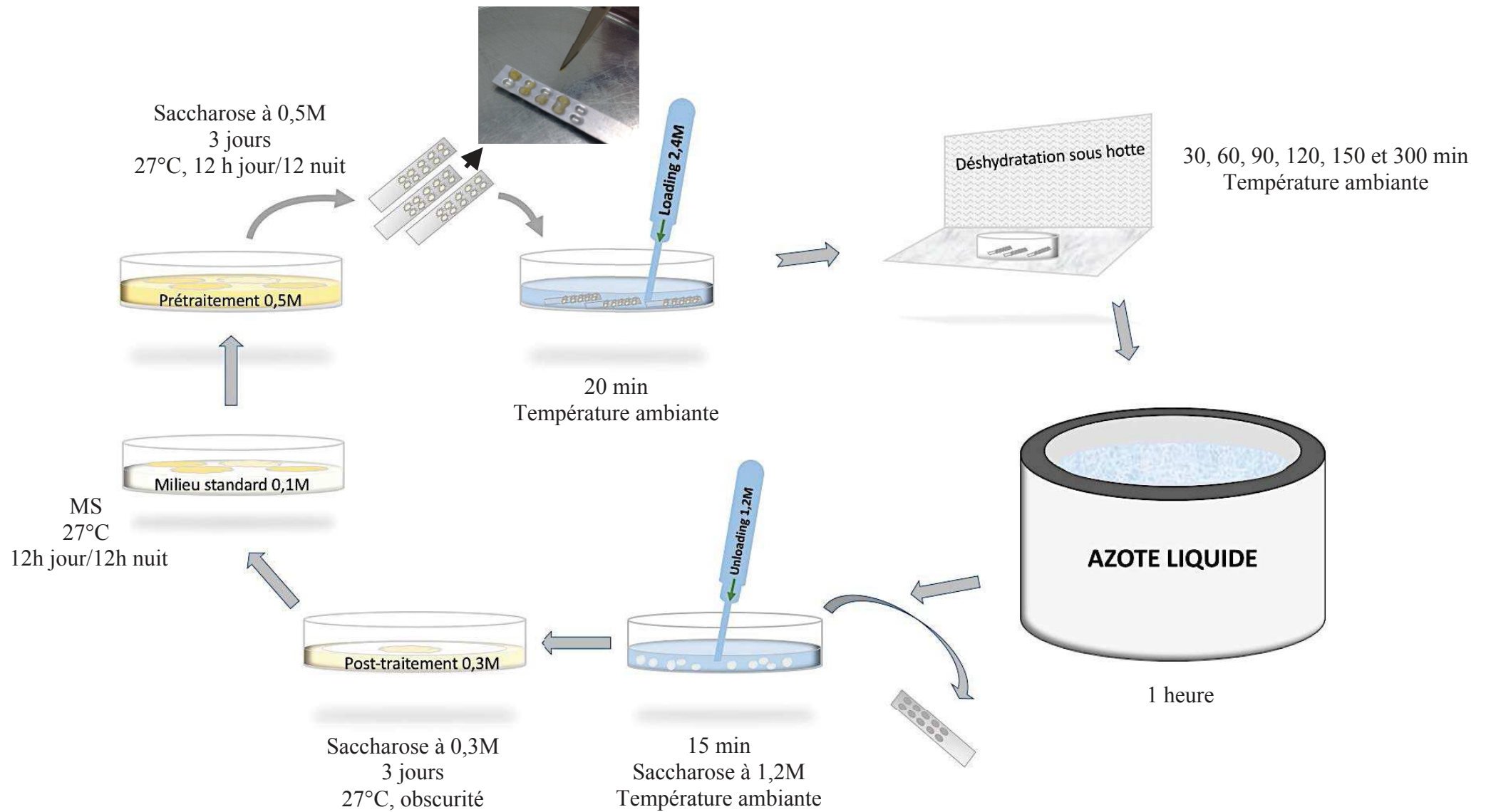


Figure 9 Étapes du protocole de D cryo-plate sur des PEM de palmier dattier. Le milieu de prétraitement contient les mêmes composants du milieu MS standard sans hormones et avec 0,5 M de saccharose La solution de loading (LS) : C7 (2,0 M glycérol + 0,4 M saccharose). La solution d'unloading (ULS) un milieu liquide contenant 1,2 M saccharose).

Le rapport entre la surface initiale des PEM (surface des PEM au moment du transfert sur le milieu standard de prolifération) et leur surface après 15 jours a été mesuré en utilisant le logiciel de traitement d'image Image-J, développé par le National Institute of Health, USA (Fig. 11C, D, E, F). Enfin, l'intensité de croissance a été calculée selon la formule suivante:

$$\left(\frac{\text{Surface après 15 jours} - \text{surface initiale}}{\text{surface initiale}} \right) \times 100$$

Ces mesures ont été effectuées sur 40 à 80 PEM pour le protocole de DV et sur 20 à 30 PEM pour le protocole de D cryo-plate.

2.4. Teneur en eau

L'estimation de la teneur en eau a été effectuée en mesurant le poids frais des 10 PEM encapsulées sur trois cryo-plates individuelles. Ces mesures ont été réalisées directement après le traitement de loading puis après chaque durée testée. Le poids sec a été mesuré après 24 h à 103°C.

2.5. Étude histologique

Les échantillons ont été fixés pendant 5 jours à température ambiante dans un fixateur contenant du paraformaldéhyde à 10%, du glutaraldéhyde à 50% et 1 g de caféine dans un tampon phosphate (Annexe 1). Ensuite, les PEM ont été déshydratées par transferts successifs dans des bains d'alcool avec des concentrations croissantes (Annexe 1). L'inclusion a été réalisée dans de la résine (Kulser 7100). Chaque bloc a été coupé en faisant 20 coupes de 4 µm d'épaisseur en utilisant un microtome automatique (Microtome MICROM HM3CS).

2.6. Coloration

La coloration a été réalisée en utilisant le PAS (acide périodique-réactif de Schiff) et le NBB (naphtol blue black). Cette technique permet la double coloration spécifique des composés polysaccharidiques qui se colorent en rouge et des protéines solubles et non solubles qui se colorent en bleu noir (Fisher, 1968).

2.7. L'immunolocalisation

En raison de la quantité très limitée de matériel végétal à notre disposition, nous garderons uniquement pour la réalisation de l'étude de la méthylation de l'ADN les 12 conditions expérimentales entourées en rouge qui ont permis d'observer des pourcentages de survie contrastés en présence/absence de prétraitement chez la variété Sokary. Ce sont les conditions : 1, 2, 9, 10, 12, 13, 18, 20, 19, A, F et H décrites dans la Fig. 11.

2.7.1. Fixation et déshydratation

Après chacune des étapes sélectionnées du protocole de DV, des PEM ont été fixées par immersion pendant une nuit dans un tampon phosphate 10 mM (PBS 1X), pH 7,2, contenant 4% de paraformaldéhyde. Les échantillons ont été déshydratés dans une série de bains d'éthanol de concentration croissante (de 50 à 70%) (Annexe 2). Les échantillons ont été stockés dans l'éthanol à 70% à 4°C pendant deux semaines avant le traitement ultérieur. Les échantillons stockés ont été inclus dans de l'agarose à 6%. Ensuite, ces blocs ont été coupés à 50 µm d'épaisseur avec un vibratome (Vibratome LEICA VT1000).

2.7.2. Protocole d'immunolocalisation

Les coupes ont été placées dans des puits en verre contenant une solution de PBS 1X (pH 7,4), puis traitées avec de la solution de blocage BB (« blocking Reagent de ROCHE ref 11096176001 à la concentration finale de 5% dans du tampon PBS). Les échantillons ont ensuite été dénaturés dans 70% de formamide dans la solution de BB à 80°C pendant 3 min. Pour conserver les acides nucléiques sous forme dénaturée, les échantillons sont placés dans de la glace dès leur sortie du bain de dénaturation. Puis, les coupes ont été rincées trois fois dans du PBS 1X (10 mM de phosphate de sodium pH 7,0, 143 mM de NaCl) pendant 5 min pour chaque rinçage et incubées pendant une nuit dans une solution de sérum albumine bovine (BSA) à 6% dans du PBS à 4°C et ensuite incubées pendant une nuit à 4°C avec l'anticorps primaire de souris anti 5mdC) (10805 Abcam, Cambridge, RU) dilué à 1: 250 dans du PBS 1X. Ils ont ensuite été rincés trois fois (5 min chacun) dans PBS 1X à température ambiante. Les anticorps de souris ont été détectés en utilisant un anticorps secondaire de chèvre anti-souris (IgG F(ab')₂ fragment, Molecular Probes) conjugué à l'Alexa 543 dilution 1: 400 dans du PBS 1X, (10 mM de phosphate de sodium pH 7,0, 143 mM de NaCl, 0,5% de réactif de blocage; Roche) pendant 4 h à température ambiante et à l'obscurité et puis rincées trois fois (10 min) dans du PBS 1X pour éliminer l'anticorps secondaire non fixé. Le marquage à l'Alexa 543 a été choisi car aucune autofluorescence n'a été trouvée dans les PEM correspondant à la fenêtre d'émission spectrale de ce fluorochrome. Les noyaux ont été colorés avec 10 µg ml⁻¹ de 4', 6-diamidino-2-phénylindole (DAPI) pendant 15 min. Les sections ont été montées dans un milieu de Mowiol (Sigma ref 8138). L'anticorps secondaire conjugué à Alexa 543 seul a été utilisé comme témoin négatif.

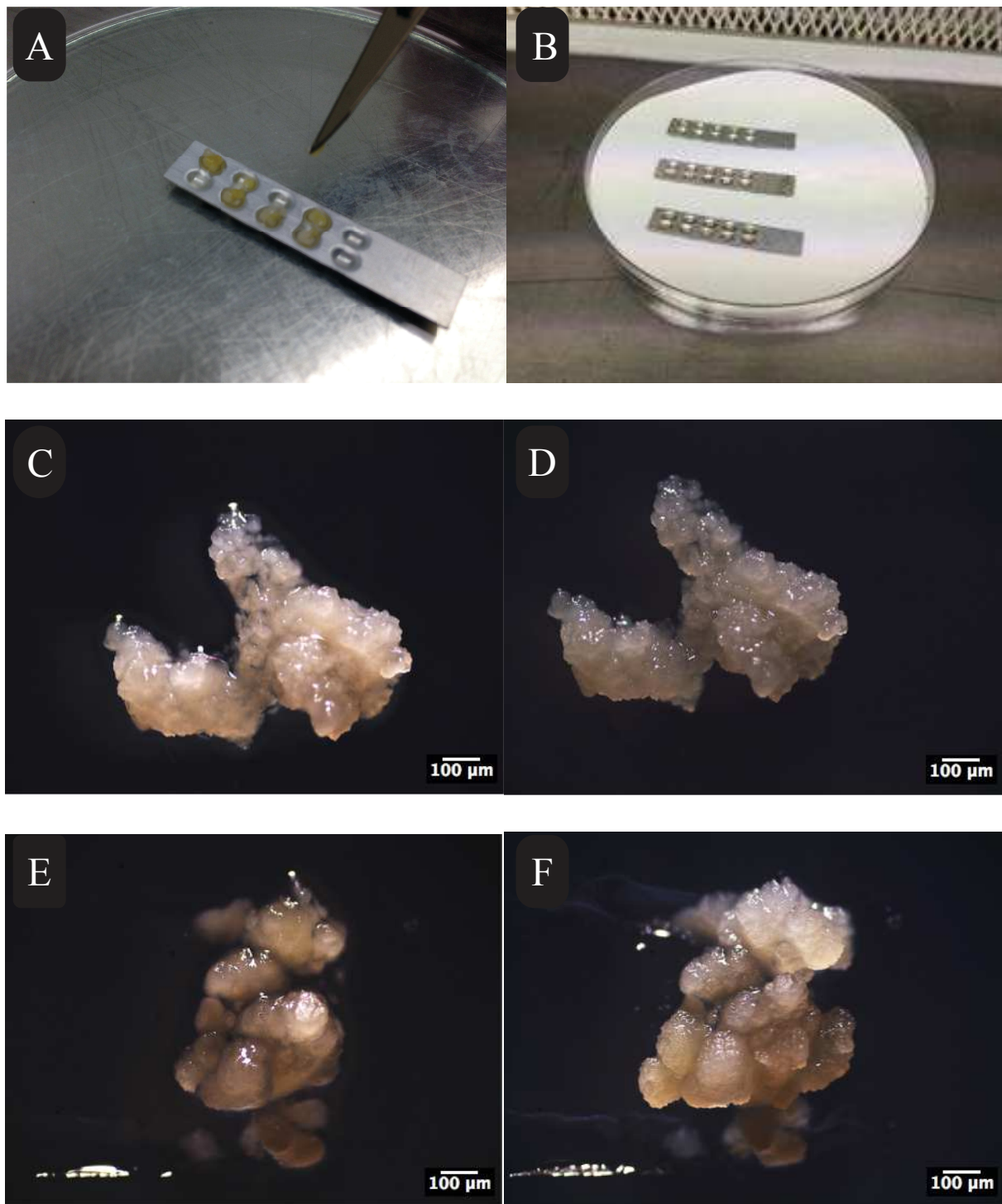


Figure 10 Illustration de certaines étapes du protocole de D cryo-plate sur des PEM de palmier dattier. A) Transfert des PEM sur le cryo-plate. B) Déshydratation sous hotte à flux laminaire. C) et E) PEM cryoconservées, immédiatement après le transfert sur le milieu standard de prolifération. D) et F) PEM après 15 jours de culture sur le milieu de prolifération. C) et D) PEM non-survivant. E) et F) PEM en croissance.

2.8. Observations, acquisition et traitement d'images

Des observations ont été réalisées après chaque étape du protocole de cryoconservation (Fig. 11). Pour chaque condition expérimentale, 60 coupes ont été réalisées (3 coupes x 20 lames) puis trois coupes réalisées sur trois lames différentes ont été choisies. Au vu de la quantité importante

d'analyses, nous avons décidé de nous concentrer sur les étapes clés du protocole de DV utilisé dans cette étude. Pour cela, treize conditions ont été sélectionnées pour étudier l'effet des étapes successives du protocole de DV sur l'intégrité structurale de PEM. Ces conditions sont les conditions : 1, 2, 5, 6, 8, 10, 13, 16, 17, 19, A, D et G décrites dans la Fig. 11.

L'acquisition des images a été effectuée en utilisant un microscope Leica DMRB équipé d'une caméra Evolution™ MP 5.0 Mega-pixel Camera Kit. Sur les coupes correspondant aux 13 conditions sélectionnées, deux types d'observations ont été réalisés:

- Des observations qualitatives de l'impact des étapes successives du protocole de cryoconservation sur trois groupes des cellules : méristématiques et embryogènes séparées en deux populations (cellules embryogènes population cellulaire I et II).
- Des observations quantitatives de l'impact des étapes successives du protocole de cryoconservation sur trois groupes des cellules méristématiques et embryogènes séparées en deux populations (cellules embryogènes population cellulaire I et II).

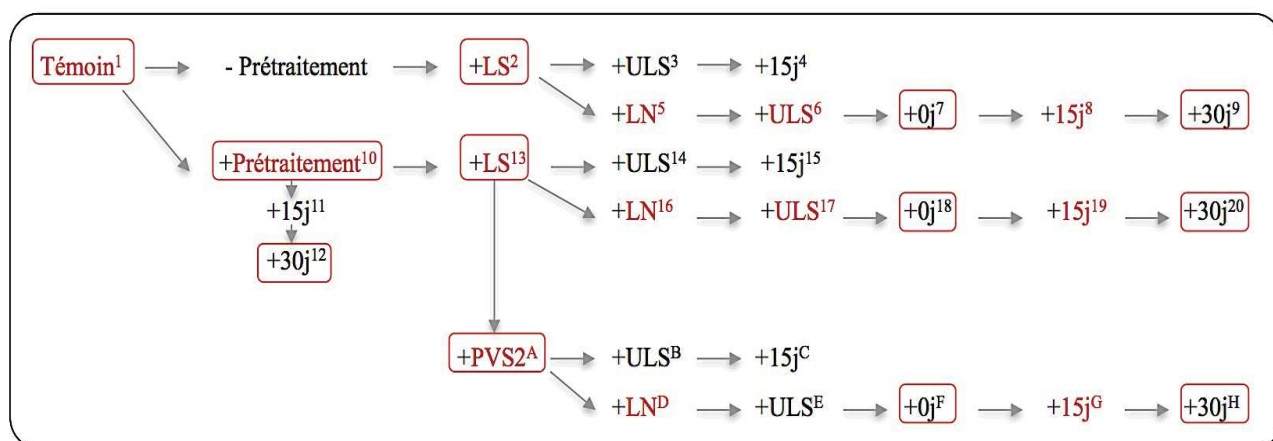


Figure 11 Représentation schématique des différentes étapes du protocole de DV étudiées par analyse histologique. Témoin: aucun traitement. +LS: traitement avec la solution de loading. +ULS : traitement avec la solution d'unloading. +15j: observation après 15 jours de culture sur milieu de croissance. +LN: congélation dans l'azote liquide. +PVS2 : traitement avec la solution de vitrification. Les treize conditions sélectionnées sont écrites en rouge. Les conditions entourées en rouge sont celles sélectionnées pour l'étude de l'immunolocalisation.

Cinq cellules de chaque type cellulaire déterminé ont été sélectionnées et l'état de plasmolyse des cellules ainsi que le rapport nucléocytoplasmique ont été étudiés en utilisant le logiciel de traitement d'image « Image-J », développé par le National Institute of Health, USA. L'état de plasmolyse, qui est exprimé en %, a été mesuré comme suit :

$$\left(\frac{\text{Surface de la cellule} - \text{surface du cytoplasme}}{\text{surface de la cellule}} \right) \times 100$$

Les mesures de plasmolyse ont été réalisées sur trois PEM et trois coupes différentes (1^{ère}, 3^{ème} et 5^{ème} lame), soit au total : 5 cellules x 3 PEM x 3 coupes = 45 cellules.

Le rapport nucléocytoplasmique a été mesuré en faisant le rapport de la surface du noyau sur la surface du cytoplasme (Fig. 12D). Ces mesures ont également été effectuées sur trois PEM et trois coupes différentes (1^{ère}, 3^{ème} et 5^{ème} lame), soit au totale : 5 cellules x 3 PEM x 3 coupes = 45 cellules.

La teneur en protéines de réserve a été estimée en calculant la surface des grains bleus par rapport à la surface totale du type cellulaire étudié (Fig. 12E), et calculé selon la formule suivante:

$$\left(\frac{SC - PR}{SC} \right) \times 100$$

Où SC est la surface du type cellulaire étudié, PR est la surface des protéines de réserve. Ces mesures ont été effectuées sur quatre PEM et trois coupes différentes (1^{ère}, 3^{ème} et 5^{ème} lame), soit au totale : 4 PEM x 3 coupes = 12 PEM.

La circularité a été mesurée en utilisant le logiciel de traitement d'image « Image-J », développé par le National Institute of Health, USA. Les valeurs de la circularité se situent entre 0 et 1,0 qui indique le cercle parfait. Ce paramètre a été calculé selon la formule :

$$4 \pi \times \left(\frac{\text{Surface}}{\text{périmètre}^2} \right)$$

Ces mesures ont été réalisées sur 15 cellules et cinq PEM différentes, soit au totale : 15 cellules x 5 PEM = 75 cellules.

Pour l'étude de la méthylation de l'ADN par immunolocalisation, les observations ont été réalisées après chacune des étapes du protocole de cryoconservation précisées ci-dessus. Pour chaque condition expérimentale, nous avons choisi au minimum sept coupes pour les cellules méristématiques, ainsi que pour les cellules embryogènes et trois coupes dans le cas des tissus différenciés pour prendre des photos en utilisant le microscope (Microscope Leica DM6000 équipé d'une caméra Rétiga 4000R). Les observations ont été réalisées avec un objectif 10X pour les tissus différenciés et 40X pour les cellules méristématiques et embryogènes en utilisant deux filtres: Texas-Red pour détecter le signal des anticorps et A4 pour détecter le signal de DAPI. Les photos ont été réalisées avec le logiciel d'acquisition Volocity (Perkin-Elmer). Le pourcentage de noyaux méthylés a été calculé selon la formule suivante :

$$\left(\frac{\text{Nombre de noyaux marqués avec l'alexa 543}}{\text{Nombre de noyaux total détectés par DAPI}} \right) \times 100$$

Pour les tissus différenciés, ces mesures ont été réalisées sur trois à sept photos (répétitions) par condition. Pour chaque répétition, le pourcentage de noyaux méthylés a été calculé sur 320 cellules en moyenne.

Pour les cellules embryogènes, ces mesures ont été effectuées sur six à 18 photos (répétitions) par condition. Le pourcentage de noyaux méthylés a été calculé sur 110 cellules en moyenne pour la variété Sokary et sur 58 cellules en moyenne pour la variété Sultany.

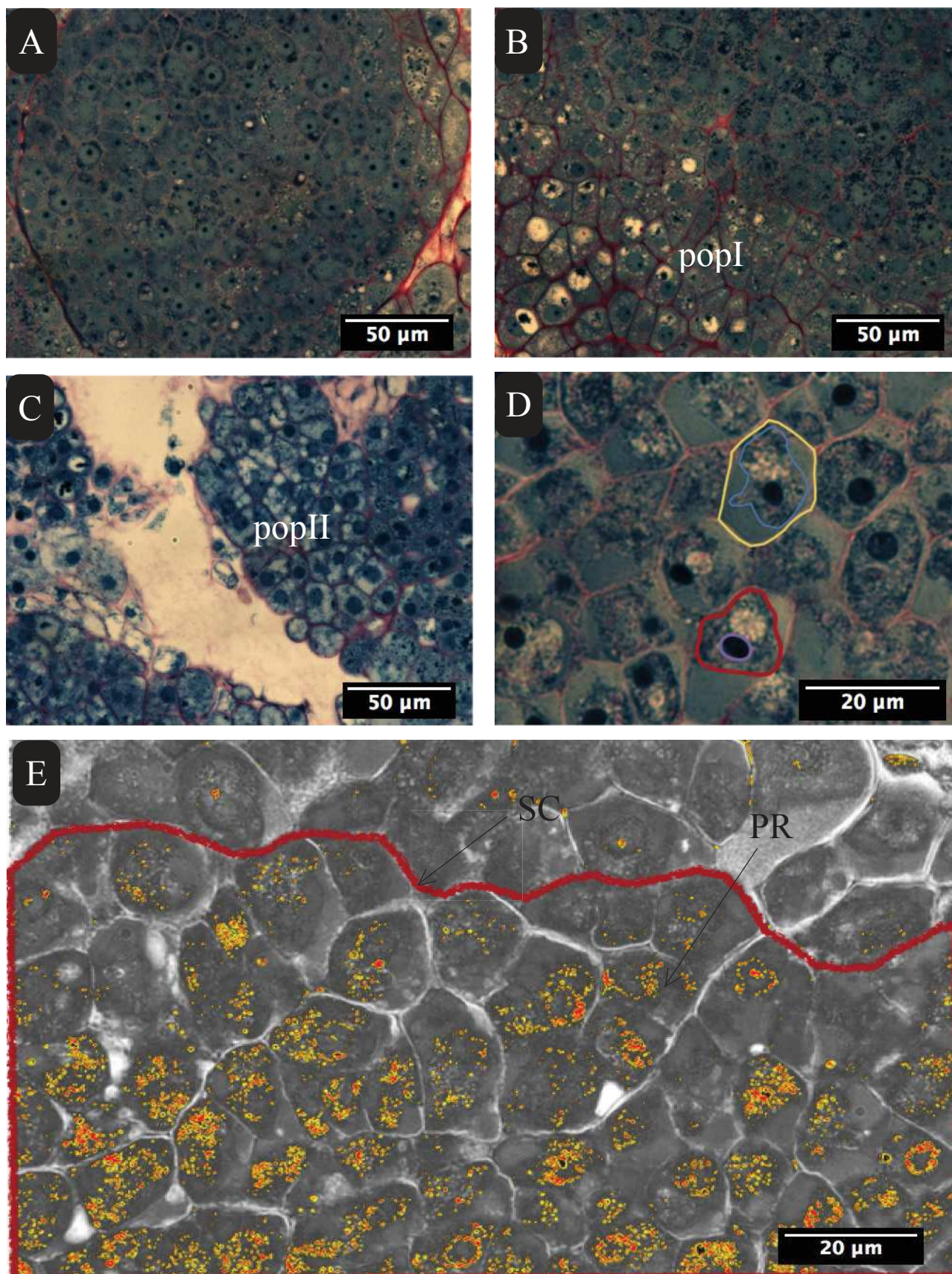


Figure 12 Coupes histologiques des PEM de palmier dattier de la variété Sokary A) cellules méristématiques; B) cellules embryogènes de la population I (popI); C) cellules embryogènes de la population II (popII); D) Mesure de l'état de la plasmolyse (surface du cytoplasme en bleu, surface de la cellule en jaune). Mesure du rapport nucléocytoplasmique (surface du cytoplasme en rouge, surface du noyau en violet). E) Mesure de la teneur en protéines de réserve (SC: surface du type cellulaire étudié, PR: surface des protéines de réserve).

CHAPITRE 3

**EFFICACITÉ DES PROTOCOLES DE DV ET
DE D CRYO-PLATE SUR DES PEM DE
PALMIER DATTIER**

3. Efficacité des protocoles de DV et de D cryo-plate sur des PEM de palmier dattier

3.1. Introduction

Dans ce chapitre nous testerons, dans un premier temps, l'efficacité de deux protocoles de cryoconservation sur deux variétés de palmier dattier, Sokary et Sultany, afin de définir les traitements optimaux permettant la cryoconservation de ces variétés. Puis nous chercherons à identifier des conditions expérimentales donnant des pourcentages de survie contrastés qui seront par la suite l'objet des études de l'impact de la cryoconservation sur la physiologie ces masses proembryogènes (PEM).

Le premier protocole est le protocole de DV développé par Fki *et al.* (2011a) pour des PEM de la variété « Barhee » et le deuxième est celui du D cryo-plate qui a été mis au point récemment par Niino *et al.* (2013) pour des bourgeons de *Juncus decipiens* Nakai. Ces deux protocoles ont des caractéristiques communes car les échantillons placés sur des bandelettes d'aluminium (protocole de DV) ou des cryo-plates en aluminium (protocole de D cryo-plate), qui assure une conductivité thermique très élevée, sont en contact direct avec l'azote liquide pendant le refroidissement et la solution d'unloading lors du réchauffement (Engelmann, 2014).

Pour comparer ces deux techniques, nous utiliserons deux paramètres d'évaluation. Le premier est le pourcentage de survie (le nombre de proembryons survivants après 15 jours de culture sur un milieu standard de prolifération / PEM) et le deuxième est l'intensité de croissance qui mesure les changements de surface de la PEM après 15 jours de culture sur un milieu standard de prolifération par rapport à la surface initiale (juste après le transfert sur le milieu standard).

3.2. Intensité de croissance des PEM

Les mesures effectuées afin d'évaluer la croissance des PEM de deux variétés montrent que l'intensité de croissance des PEM de la variété Sokary est de 42,37% après 7 jours de culture sur le milieu standard de prolifération (Fig. 13). Après 15 jours, l'intensité de croissance atteint 75,64%. Chez les PEM de la variété Sultany, l'intensité de croissance est de 26,40 et 46,75% respectivement 7 et 15 jours après le transfert. Il apparaît donc que la vitesse de croissance chez la variété Sokary est significativement supérieure à celle de la variété Sultany.

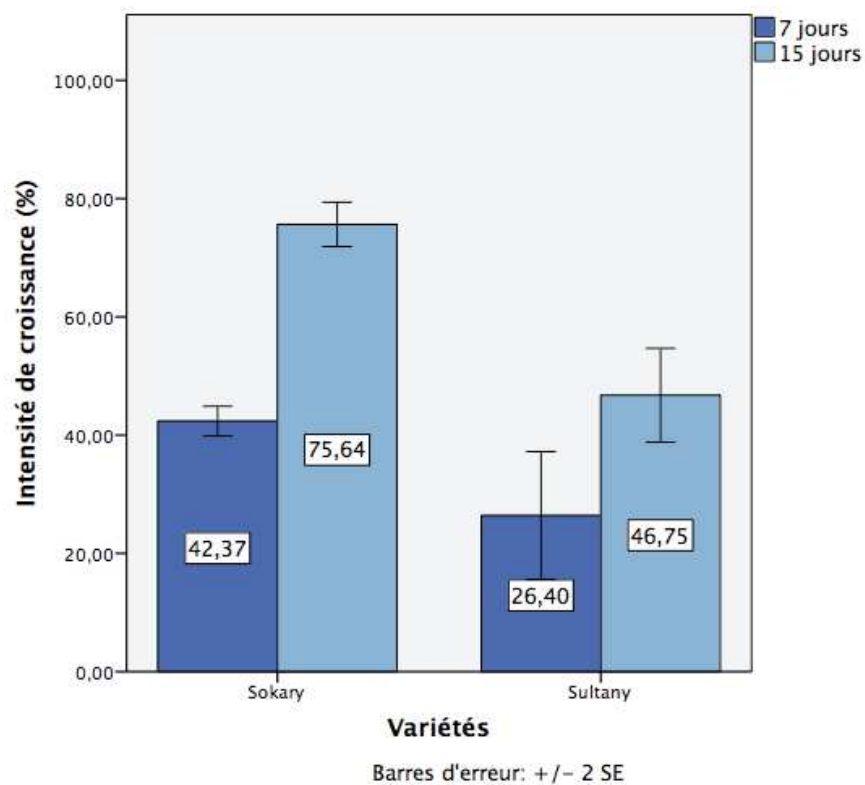


Figure 13 Intensité de croissance (% d'augmentation de la surface par rapport à la surface initiale) des PEM de deux variétés de palmier dattier, Sokary et Sultany. 7 jours: Après 7 jours de culture sur milieu standard de prolifération. 15 jours : Après 15 jours de culture sur milieu standard de prolifération.

3.3. Cryoconservation

3.3.1. Vitrification en goutte (DV)

3.3.1.1. Effet de la technique de DV sur la survie des PEM de la variété Sokary

Le pourcentage de survie est calculé 15 jours après le transfert sur le milieu standard de prolifération (MS). Chez les PEM non-prétraitées et non cryoconservées (-LN), la survie reste très élevée (97,3-100%) quelle que soit la durée de traitement dans la solution de vitrification (PVS2) (Tableau 3). Dans le cas des PEM cryoconservées (+LN), aucune survie n'est observée sans traitement avec PVS2. La survie est comprise entre 90,9 et 98,6% pour les autres durées de traitement expérimentées, avec un résultat significativement supérieur (98,6%) pour un traitement de 30 min avec la solution de PVS2. Chez les PEM prétraitées et non-cryoconservées (-LN) la survie diminue significativement dès l'application de la solution de PVS2, elle varie entre 79,6 et 95,5% pour des durées de traitement comprises entre 15 et 120 min. Nous observons chez les PEM prétraitées et cryoconservées (+LN), une survie de 21,1% en absence du traitement avec PVS2, alors que la survie est de 68,1 à 85,8% pour les autres durées de traitement au PVS2 testées. La survie maximale (85,8%), obtenue après un traitement de 30 min, est significativement supérieure à celles obtenues après les autres durées de traitement.

Tableau 3 Effet du prétraitement au saccharose (3 jours, 0,5M de saccharose), et de la durée de traitement avec PVS2 sur la survie (%) des PEM cryoconservées (+LN) et non-cryoconservées (-LN) de palmier dattier de la variété Sokary. Des lettres différentes sur la même ligne indiquent des différences significatives entre les conditions du protocole de cryoconservation, selon le test de Mann-Whitney (*U* test) ($P < 0,05$).

Prétraitement au Saccharose	Durée de traitement de PVS2 (min)					
		0	15	30	60	120
-	-LN	97,3 % a	100,0 % a	100,0 % a	100,0 % a	98,5 % a
-	+LN	0,0 % c	90,9 % b	98,6 % a	92,4 % b	92,5 % b
+	-LN	99,2 % a	91,0 % b	79,6 % c	95,5 % ab	91,2 % b
+	+LN	21,1 % c	68,1 % b	85,8 % a	81,1 % a	68,7 % b

3.3.1.2. Effet de la technique de DV sur l'intensité de croissance des PEM de la variété Sokary

Afin d'évaluer l'intensité de croissance, le rapport en % entre la surface initiale de chaque PEM et sa surface après 15 jours est calculé. Nous constatons chez les PEM non prétraitées et non cryoconservées (-LN) que l'intensité de croissance est significativement supérieure (105%) en l'absence de traitement avec PVS2 par rapport aux PEM traitées (Tableau 4).

Tableau 4 Effet du prétraitement au saccharose (3 jours, 0,5M de saccharose), et de la durée de traitement avec PVS2 sur l'intensité de croissance (% de l'augmentation de la surface après 15 jours par rapport à la surface initiale de PEM) des PEM cryoconservées (+LN) et non-cryoconservées (-LN) de palmier dattier de la variété Sokary. Des lettres différentes sur la même ligne indiquent des différences significatives entre les conditions du protocole de cryoconservation, selon le test de Mann-Whitney (*U* test) ($P < 0,05$).

Prétraitement au Saccharose	Durée de traitement de PVS2 (min)					
		0	15	30	60	120
-	-LN	105,1 % a	90,3 % b	83,8 % bc	77,4 % c	89,8 % b
-	+LN	-1,3 % b	85,8 % a	92,5 % a	83,4 % a	83,8 % a
+	-LN	77,5 % a	39,9 % c	38,5 % c	58,3 % b	68,4 % ab
+	+LN	21,7 % c	51,7 % b	73,1 % a	67,3 % a	70,4 % a

Après l'application de PVS2, ce pourcentage diminue significativement et varie entre 77,4 et 90,3% pour des durées comprises entre 15 et 120 min du traitement avec PVS2. En suivant le protocole de

cryoconservation (+LN), aucune survie n'est notée sans traitement avec PVS2 et l'intensité de croissance se situe entre 83,4 et 92,5% pour les autres durées de traitement dans la solution de PVS2, sans différences significatives. Chez les PEM prétraitées et non cryoconservées (-LN), l'intensité de croissance diminue d'une manière significative de 77,5% sans traitement avec PVS2 à des valeurs comprises entre 38,5 et 68,4% pour les autres durées de traitement avec PVS2. Après la cryoconservation (+LN), l'intensité de croissance augmente significativement de 21,7% après traitement avec la solution de loading à des valeurs comprises entre 51,7 et 73,1% pour des durées de traitement avec PVS2 entre 15 et 120 min, avec un résultat significativement supérieur (73,1%) pour un traitement de 30 min avec la solution de PVS2.

Il apparaît donc qu'avec un traitement au PVS2, le prétraitement sur un milieu contenant du saccharose à 0,5 M n'améliore ni le pourcentage de survie ni l'intensité de croissance après la cryoconservation chez les PEM de la variété Sokary. Cependant, une amélioration du pourcentage de survie et de l'intensité de croissance est constatée chez les PEM prétraitées et congelées directement après le traitement de loading (Tableaux 3 et 4). Après cryoconservation, une survie (98,6%) et une intensité de croissance (92,5%) optimales sont observées chez les PEM non prétraitées après 30 min de traitement avec PVS2.

3.3.1.3. Effet de la technique de DV sur la survie des PEM de la variété Sultany

Chez les PEM de la variété Sultany, la survie des témoins ni prétraités ni cryoconservés (-LN) est de 96% après le traitement de loading (Tableau 5). Dès l'application de la solution de PVS2 la survie diminue significativement, atteignant 91,5% après 60 min puis 82,6% après 120 min de traitement avec PVS2. La cryoconservation des PEM non prétraitées (+LN) ne génère aucune survie sans traitement avec PVS2, alors que la survie augmente significativement et varie entre 85,6 et 88% pour les autres durées d'incubation dans le PVS2.

Après 3 jours de traitement sur le milieu de prétraitement (0,5 M de saccharose) la survie des PEM non cryoconservées (-LN) varie de 95,6 à 85,9% pour des durées de 0 à 120 min de traitement avec PVS2. Les PEM cryoconservées (+LN) et non traitées avec la solution de PVS2 montrent une survie quasi-nulle (1,3%), alors que la survie varie entre 69,3 et 86,6% pour les quatre durées de traitement avec PVS2 testées, avec une survie significativement supérieure (86,6%) après un traitement de 30 min.

Tableau 5 Effet du prétraitement au saccharose (3 jours, 0,5M de saccharose), et de la durée du traitement avec PVS2 sur la survie (%) des PEM cryoconservées (+LN) et non-cryoconservées (-LN) de palmier dattier de la variété Sultany. Des lettres différentes sur la même ligne indiquent des différences significatives entre les conditions du protocole de cryoconservation, selon le test de Mann-Whitney (*U* test) ($P < 0,05$).

Prétraitement au Saccharose	Durée de traitement de PVS2 (min)					
		0	15	30	60	120
-	-LN	96,0 % a	95,2 % a	92,9 % ab	91,5 % b	82,6 % b
-	+LN	0,0 % b	85,6 % a	88,0 % a	87,8 % a	87,4 % a
+	-LN	95,6 % a	92,2 % bc	90,0 % bc	92,4 % ab	85,9 % c
+	+LN	1,3 % c	77,7 % b	86,6 % a	78,3 % b	69,3 % b

3.3.1.4. Effet de la technique de DV sur l'intensité de croissance des PEM de la variété Sultany

L'intensité de croissance des PEM non prétraitées et non cryoconservées (-LN) augmente de manière significative de 71,8% (sans traitement avec PVS2) à 82,8% après 30 min de traitement avec PVS2 (Tableau 6). Après la cryoconservation (+LN), l'intensité de croissance est nulle en l'absence de traitement avec PVS2, alors qu'elle augmente significativement et se situe entre 61,1 et 84,6% pour les durées de traitement avec PVS2 testées, avec un résultat significativement supérieur (84,6%) pour un traitement de 120 min avec PVS2.

Tableau 6 Effet du prétraitement au saccharose (3 jours, 0,5M de saccharose), et de la durée de traitement avec PVS2 sur l'intensité de croissance (% de l'augmentation de la surface après 15 jours par rapport à la surface initiale de PEM) des PEM cryoconservées (+LN) et non-cryoconservées (-LN) de palmier dattier de la variété Sultany. Des lettres différentes sur la même ligne indiquent des différences significatives entre les conditions du protocole de cryoconservation, selon le test de Mann-Whitney (*U* test) ($P < 0,05$).

Prétraitement au Saccharose	Durée de traitement de PVS2 (min)					
		0	15	30	60	120
-	-LN	71,8 % b	71,5 % b	82,8 % a	71,0 % b	60,8 % c
-	+LN	-1,3 % c	68,2 % b	65,1 % b	61,1 % b	84,6 % a
+	-LN	67,9 % a	45,6 % c	49,4 % bc	53,8 % b	54,0 % b
+	+LN	-0,4 % c	46,8 % b	58,5 % a	49,1 % ab	46,2 % ab

Suite au prétraitement de 3 jours sur un milieu contenant 0,5 M de saccharose, l'intensité de croissance des PEM non cryoconservées (-LN) est significativement inférieure après incubation dans la solution de PVS2 (entre 45,6 et 54,0% pour des durées comprises entre 0 et 120 min de traitement avec PVS2). Après la cryoconservation (+LN), l'intensité de croissance des PEM prétraitées est négative (-0,4%) en absence du traitement avec la solution de vitrification PVS2 alors qu'elle est entre 46,2 et 58,5% pour les durées de traitement avec PVS2 testées. L'intensité de croissance maximale (58,5%) est obtenue après 30 min du traitement avec PVS2 sans différences significatives par rapport aux durées de 60 et 120 min.

Ces résultats suggèrent que le prétraitement sur le milieu contenant 0,5 M de saccharose n'améliore ni pourcentage de survie ni l'intensité de croissance après la cryoconservation chez les PEM de la variété Sultany. Après la cryoconservation, la survie optimale (88,0%) et l'intensité de croissance optimale (84,6%) sont obtenues chez les PEM non prétraitées après respectivement 30 et 120 min de traitement dans la solution de PVS2 (Tableaux 5 et 6)

3.3.2. D-cryo plate

3.3.2.1. Teneur en eau des PEM encapsulées

Après le traitement avec la solution de loading, les teneurs en eau des PEM encapsulées prétraitées ou non-prétraitées des deux variétés étudiées sont comprises entre 64 ± 1 et 70 ± 3 % (Fig. 14). Puis la teneur en eau diminue significativement (entre 45 et 48 ± 3 %) après 30 min de déshydratation sans différences significatives entre les deux variétés. Une deuxième diminution significative est observée (entre 21 ± 1 et 27 ± 3 %) après 60 min de déshydratation. Une troisième diminution significative est notée après 90 min (entre 14 ± 1 et 17 ± 2 %) puis nous n'observons plus de différences significatives de la teneur en eau qui varie entre 10 ± 1 et 14 ± 0 % pour les durées de déshydratation de 120 et 300 min chez la variété Sokary alors que, pour la variété Sultany, la teneur en eau est significativement plus basse, avec des valeurs de 8 ± 3 et 5 ± 1 %, après 300 min de déshydratation.

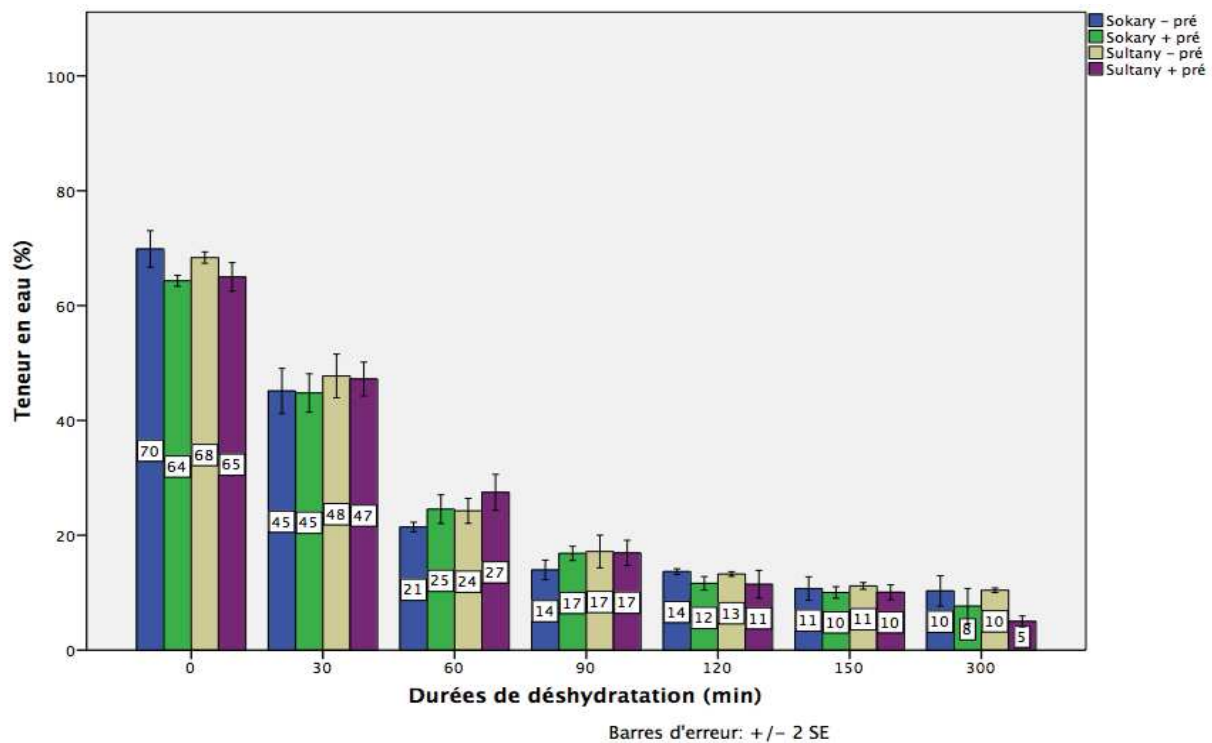


Figure 14 Évolution de la teneur en eau (% matière fraîche) des PEM de palmier dattier encapsulées pendant la déshydratation sous hotte à flux laminaire. Sokary-pré : PEM de la variété Sokary non prétraitées. Sokary+pré : PEM de la variété Sokary prétraitées pendant 3 jours sur un milieu contenant 0,5 M de saccharose. Sultany-pré : PEM de la variété Sultany non prétraitées. Sultany+pré : PEM de la variété Sultany prétraitées pendant 3 jours sur un milieu contenant 0,5 M de saccharose.

3.3.2.2. Effet de la technique de D cryo-plate sur la survie des PEM de la variété Sokary

Chez la variété Sokary, lorsque la technique de D cryo-plate est appliquée aux PEM non prétraitées et non cryoconservées (-LN), la survie diminue significativement à 45,5% (teneur en eau de $17 \pm 1\%$) après 90 min de déshydratation par rapport aux PEM non déshydratées (66,9%, teneur en eau de $70 \pm 3\%$) ou déshydratées pendant 30 min (71,1%, teneur en eau de $45 \pm 3\%$) (Tableau 7) alors que la survie est nulle après 300 min de déshydratation (teneur en eau de $10 \pm 2\%$). Chez les PEM cryoconservées (+ LN), la survie est nulle sans déshydratation (teneur en eau de $70 \pm 3\%$), alors qu'elle augmente significativement après la déshydratation. La survie est comprise entre 43,1 et 70,9% pour des durées de déshydratation de 30 à 150 min, avec un résultat significativement supérieur (70,9%) après 90 min de déshydratation (teneur en eau de $14 \pm 1\%$). La déshydratation la plus longue (300 min) est mortelle pour les PEM non-prétraitées (teneur en eau de $10 \pm 2\%$). Après le prétraitement pendant 3 jours sur un milieu contenant du saccharose à 0,5 M, la survie varie entre 91,3 (sans déshydratation, teneur en eau de $64 \pm 1\%$) et 96,4% (60 min de déshydratation, teneur en eau de $25 \pm 2\%$) chez les PEM non-cryoconservées (-LN). Puis la survie diminue significativement jusqu'à 40,3% après 300 min de déshydratation (teneur en eau de $8 \pm 3\%$). Après la cryoconservation (+ LN), la survie est quasi-nulle (1,6%) sans déshydratation. Pour des durées de déshydratation

comprises entre 30 et 300 min, la survie augmente significativement et se situe entre 47,7 et 97,9%. La survie maximale (97,9%), obtenue après 90 min de déshydratation (teneur en eau de $8 \pm 3\%$), est significativement supérieure à celles obtenues après les autres durées de déshydratation.

Tableau 7 Effet du prétraitement au saccharose (3 jours, 0,5M de saccharose), et de la durée de déshydratation sur la survie (%) des PEM cryoconservées (+LN) et non-cryoconservées (-LN) de palmier dattier de la variété Sokary. Des lettres différentes sur la même ligne indiquent des différences significatives entre les conditions du protocole de cryoconservation, selon le test de Mann-Whitney (*U* test) ($P < 0,05$).

Prétraitement au Saccharose	Durée de déshydratation (min)							
		0	30	60	90	120	150	300
-	-LN	66,9 a	71,1 a	55,4 ab	45,5 b	53,4 b	57,1 ab	0,0 c
-	+LN	0,0 c	44,5 b	56,7 ab	70,9 a	55,0 ab	43,1 b	0,0 c
+	-LN	91,3 ab	91,0 ab	96,4 a	82,7 b	70,9 c	70,3 c	40,3 d
+	+LN	1,6 d	63,3 c	92,0 b	97,9 a	95,8 ab	79,8 b	47,7 c

3.3.2.3. Effet de la technique de D cryo-plate sur l'intensité de croissance des PEM de la variété Sokary

L'intensité de croissance des PEM de la variété Sokary non cryoconservées et non prétraitées (-LN) varie entre 45,9 (teneur en eau de $14 \pm 0\%$) et 60,3% (teneur en eau de $11 \pm 2\%$) sans différences significatives pour des durées de déshydratation comprises entre 0 et 150 min, sauf après 60 min de déshydratation, où l'intensité de croissance diminue significativement à 31,2% (teneur en eau de $21 \pm 1\%$) (Tableau 8). Après 300 min de déshydratation, l'intensité de croissance est significativement inférieure (1,5%) aux autres traitements (teneur en eau de 10 ± 2). Après la cryoconservation (+LN), l'intensité de croissance augmente significativement de 3,0% sans déshydratation (teneur en eau de $70 \pm 3\%$) jusqu'à des valeurs comprises entre 41,5 et 71,2% pour des durées de déshydratation de 30 à 150 min. L'intensité de croissance maximale (71,2%), obtenue après une déshydratation de 90 min (teneur en eau de $14 \pm 1\%$), est significativement supérieure à celles obtenues après les autres durées de traitement sauf pour les durées de 60 et 120 min où les différences ne sont pas significatives. Le prétraitement au saccharose des PEM non cryoconservées assure une intensité de croissance de 56,1% en l'absence de déshydratation (teneur en eau de $64 \pm 1\%$). Après la déshydratation, l'intensité de croissance augmente à des valeurs entre 26,6 et 88,9% (teneur en eau de $8 \pm 3\%$ et $25 \pm 2\%$, respectivement) pour des durées de déshydratation comprises

entre 30 et 300 min, avec un résultat significativement supérieur (88,9%) pour une durée de déshydratation de 60 min.

Après la cryoconservation (+LN), l'intensité de croissance augmente significativement de 2% (sans déshydratation) à des valeurs comprises entre 38,2 et 113,0% après des durées de déshydratation comprises entre 30 et 300 min. L'intensité de croissance maximale (113,0%), observée après une déshydratation de 90 min (teneur en eau de $17 \pm 1\%$), est significativement supérieure à celles obtenues après les autres durées de déshydratation.

Tableau 8 Effet du prétraitement au saccharose (3 jours, 0,5M de saccharose), et de la durée de déshydratation sur l'intensité de croissance (% de l'augmentation de la surface après 15 jours par rapport à la surface initiale de PEM) des PEM cryoconservées (+LN) et non-cryoconservées (-LN) de palmier dattier de la variété Sokary. Des lettres différentes sur la même ligne indiquent des différences significatives entre les conditions du protocole de cryoconservation, selon le test de Mann-Whitney (*U* test) ($P < 0,05$).

Prétraitement au Saccharose	Durée de déshydratation (min)							
	0	30	60	90	120	150	300	
-	-LN	49,4 a	49,6 a	31,2 b	45,9 ab	55,2 a	60,3 a	1,5 c
-	+LN	3,0 d	41,5 c	62,0 abc	71,2 a	65,4 ab	46,3 bc	2,6 d
+	-LN	56,1 b	71,4 ab	88,9 a	68,0 ab	64,5 ab	78,3 ab	26,6 c
+	+LN	2,0 d	52,1 c	92,5 b	113,0 a	90,6 b	70,7 bc	38,2 c

En conclusion, nos résultats suggèrent que le prétraitement sur un milieu contenant du saccharose à 0,5M améliore la survie et l'intensité de croissance des PEM de la variété Sokary. De plus, une augmentation significative de la survie est constatée chez les PEM prétraitées après 300 min de déshydratation (Tableaux 7 et 8). Après la cryoconservation, la survie (97,9%) et l'intensité de croissance (113,0%) maximales sont obtenues après 90 min de déshydratation (teneur en eau de $17 \pm 1\%$) chez les PEM prétraitées (Tableaux 7 et 8).

3.3.2.4. Effet de la technique de D cryo-plate sur la survie des PEM de la variété Sultany

Dans le cas de la variété Sultany, la survie des PEM non prétraitées et non cryoconservées (-LN) est comprise entre 73,3 et 56,6% (teneur en eau de 68 et $11 \pm 1\%$, respectivement) pour des durées de déshydratation comprise entre 0 et 150 min (Tableau 9). Une diminution significative à 26,8% est notée après 300 min de déshydratation (teneur en eau de $10 \pm 0\%$). Après la cryoconservation (+LN), la survie passe de 0,6% en l'absence de la déshydratation (teneur en eau

de $68 \pm 10\%$) à des valeurs se situent entre 21,1 (teneur en eau de $48 \pm 3\%$) et 56,0% (teneur en eau de $17 \pm 2\%$) pour des durées de déshydratation de 30 à 300 min, avec un résultat significativement plus élevé (56,0%) après 90 min de déshydratation (teneur en eau de $17 \pm 2\%$).

Tableau 9 Effet du prétraitement au saccharose (3 jours, 0,5M de saccharose), et de la durée de déshydratation sur la survie (%) des PEM cryoconservées (+LN) et non-cryoconservées (-LN) de palmier dattier de la variété Sultany. Des lettres différentes sur la même ligne indiquent des différences significatives entre les conditions du protocole de cryoconservation, selon le test de Mann-Whitney (*U* test) ($P < 0,05$).

Prétraitement au Saccharose	Durée de déshydratation (min)							
		0	30	60	90	120	150	300
-	-LN	73,3 a	71,7 a	67,0 a	65,1 a	68,4 a	56,6 a	26,8 b
-	+LN	0,6 c	21,1 b	40,8 ab	56,0 a	50,6 a	46,8 a	27,1 b
+	-LN	68,1 a	72,2 a	73,4 a	74,2 a	52,1 b	43,7 b	17,5 c
+	+LN	0,0 e	14,2 d	34,2 bc	67,0 a	74,6 a	42,6 b	21,5 cd

Suite aux 3 jours de prétraitement sur un milieu contenant 0,5 M de saccharose, la survie des PEM non-cryoconservées (-LN) se situe entre 68,1 (teneur en eau de $65 \pm 2\%$) et 74,2% (teneur en eau de $17 \pm 2\%$) pour des durées de déshydratation comprises entre 0 et 90 min. Elle diminue ensuite significativement à 52,1% après 120 min (teneur en eau de 10 ± 1) et à 17,5% après 300 min (teneur en eau de $5 \pm 1\%$). Après la cryoconservation (+LN), la survie augmente de manière significative de 0,0% (sans déshydratation) à 14,2% après 30 min déshydratation (teneur en eau de $47 \pm 3\%$) puis elle varie entre 21,5 et 74,6% pour des durées de déshydratation entre 60 et 300 min. La survie maximale obtenue, 74,6% (teneur en eau de $11 \pm 2\%$) après 120 min de déshydratation, est significativement supérieure par rapport aux autres durées de déshydratation sauf pour la durée de 90 min où les différences observées ne sont pas significatives.

3.3.2.5. Effet de la technique de D cryo-plate sur l'intensité de croissance des PEM de la variété Sultany

L'intensité de croissance des PEM de la variété Sultany non-cryoconservées et non prétraitée (-LN) se situe entre 48,8 et 63,8% pour des durées de déshydratation comprises entre 0 et 150 min, puis elle subit à une diminution significative à 37,4% après 300 min (teneur en eau de $10 \pm 0\%$) (Tableau 10). Après la cryoconservation (+LN), l'intensité de croissance est nulle sans déshydratation (teneur en eau de $68 \pm 1\%$). Elle augmente significativement à un maximum de 46,0% au bout de 120 min de déshydratation (teneur en eau de $13 \pm 0\%$), puis elle descend à 27,2%

après 300 min de déshydratation. Après le prétraitement avec le saccharose, l'intensité de croissance des PEM non-cryoconservées (-LN) varie entre 36,7 (teneur en eau de $10 \pm 1\%$) et 46,5% (teneur en eau de $17 \pm 2\%$) pour des durées de déshydratation comprises entre 0 et 150 min, puis elle diminue significativement à 14,7% après 300 min de déshydratation (teneur en eau de $5 \pm 1\%$). Après la cryoconservation (+LN), l'intensité de croissance est négative sans déshydratation (teneur en eau de $65 \pm 2\%$). Elle augmente ensuite significativement et se situe entre 20,7 (teneur en eau de $5 \pm 1\%$) et 58,3% (teneur en eau de $11 \pm 2\%$) pour des durées de déshydratation de 60 à 300 min. L'intensité de croissance maximale obtenue (58,5%, teneur en eau de $11 \pm 2\%$) après 120 min de déshydratation est significativement supérieure par rapport aux autres durées de déshydratation sauf pour des durées de 90 et 150 min où les différences ne sont pas significatives.

Tableau 10 Effet du prétraitement au saccharose (3 jours, 0,5M de saccharose), et de la durée de déshydratation sur l'intensité de croissance (% de l'augmentation de la surface après 15 jours par rapport à la surface initiale de PEM) des PEM cryoconservées (+LN) et non-cryoconservées (-LN) de palmier dattier de la variété Sultany. Des lettres différentes sur la même ligne indiquent des différences significatives entre les conditions du protocole de cryoconservation, selon le test de Mann-Whitney (*U* test) ($P < 0,05$).

Prétraitement au Saccharose	Durée de déshydratation (min)							
		0	30	60	90	120	150	300
-	-LN	59,9 a	62,5 a	63,8 a	56,5 a	48,8 a	51,6 a	37,4 b
-	+LN	0,0 c	14,8 b	38,2 ab	39,1 ab	46,0 a	32,3 ab	21,2 b
+	-LN	40,4 a	44,9 a	42,4 a	46,5 a	38,2 a	36,7 a	14,7 b
+	+LN	-2,1 cd	7,0 c	24,1 b	47,5 a	58,3 a	36,1 a	20,7 bc

Ces résultats suggèrent donc que, chez les PEM de la variété Sultany, le prétraitement sur le milieu contenant 0,5 M de saccharose améliore légèrement la survie et l'intensité de croissance (Tableaux 9 et 10). Après la cryoconservation, la survie (74,6%) et l'intensité de croissance (58,3%) optimales sont obtenues chez les PEM prétraitées après 120 min de déshydratation (teneur en eau de $11 \pm 2\%$).

3.4. Discussion

Dans cette étude, nous avons réussi la cryoconservation des PEM de deux variétés de palmiers dattier, Sokary et Sultany, en utilisant deux techniques différentes (vitrification en goutte (DV) et D cryo-plate). Le protocole de DV utilisé est celui publié par Fki *et al.* (2011a) sur des PEM de la variété Barhee, alors que le protocole D cryo-plate a été adapté de celui publié par Niino *et al.* (2013), employé pour la cryoconservation des bourgeons de *Juncus decipiens* Nakai. Ce travail représente le troisième rapport publié d'application de la technique de D cryo-plate et le premier rapport d'application de cette technique à des tissus embryogènes tels que les PEM et sa première application au palmier dattier.

Pour les deux techniques étudiées, nous avons exprimé les résultats à la fois en termes de pourcentage de survie % et d'intensité de croissance. Cela nous a permis de fournir une description plus précise et exacte de la réponse des PEM à la congélation et une meilleure distinction entre les conditions expérimentales. L'importance de combiner différents paramètres pour évaluer la réponse de la matière végétale à un protocole de cryoconservation a déjà été mis en évidence notamment sur des cals de soja (Engelmann, 1992) et sur des suspensions cellulaires de citrus (Aguilar *et al.*, 1993).

En ce qui concerne le protocole de DV, plusieurs différences ont été notées entre nos résultats et ceux obtenus par Fki *et al.* (2011a) sur des PEM de la variété Barhee. La survie a été plus élevée dans nos expériences, atteignant 98,6% avec la variété Sokary et 88,0% avec la variété Sultany après 30 min de traitement avec PVS2, comparativement à un maximum de 63,3% chez la variété Barhee (Fki *et al.*, 2011a). Ceci reflète généralement la variabilité observée entre géotypes en réponse à un protocole de cryoconservation (Engelmann, 2011). Dans l'étude de Fki *et al.* (2011a), le prétraitement au saccharose (3 jours sur un milieu contenant 0,5 M de saccharose) n'était pas indispensable mais il augmentait la survie de 43,0% (sans prétraitement) à 63,3% après le prétraitement. En revanche, dans nos expériences le même prétraitement au saccharose a généralement un effet négatif sur la survie et l'intensité de croissance, en particulier chez la variété Sokary où la survie diminue de 98,6% (sans prétraitement) à 85,8% (après 3 jours de prétraitement sur un milieu contenant 0,5 M de saccharose). De la même façon, l'intensité de croissance passe de 92,5% (sans prétraitement) à 73,1% après le prétraitement. Un comportement similaire a été noté chez les PEM de la variété Sultany, surtout en terme d'intensité de croissance, qui passe de 84,6% à un maximum de 58,5% après le prétraitement. Cette réponse pourrait refléter la sensibilité à l'exposition de saccharose des deux variétés de palmier dattier employées dans notre étude, comme cela a été montré dans l'étude de Sipeh *et al.* (2011) sur des scalps de certaines variétés de bananier

pour lesquels le prétraitement au saccharose à des concentrations de 0,4 M ou 0,5 M pendant 14 jours de prétraitement était extrêmement toxique.

Le prétraitement au saccharose est une partie intégrante de protocoles de cryoconservation, car il conduit généralement à une meilleure récupération après exposition à LN (Engelmann, 2014). Il est généralement composé d'une culture de 1-2 jours sur milieu avec 0,3 à 0,5 M de saccharose, mais il existe des exemples de durées plus longues de traitement (Mari *et al.*, 1995; Sipek *et al.*, 2011) et des concentrations plus élevées de saccharose dans le milieu de prétraitement (Kim *et al.*, 2010). Le prétraitement au saccharose a montré un effet positif sur la survie lorsque les PEM de la variété Sokary ont été cryoconservées directement après le traitement de loading sans aucun traitement avec PVS2. Dans ces conditions, la survie atteint 21,1%. Ces résultats sont en accord avec ceux de Paquier, (2002) qui a noté une reprise de croissance des tissus cryoconservés lorsque les embryons somatiques de palmier dattier ont été cultivés sur un milieu enrichi en saccharose à 0,3 M et cryoconservés sans déshydratation sur silicagel. De plus, dans son étude, la survie a été importante même sans déshydratation lorsque les tissus ont été prétraités sur un milieu avec 0,75M de saccharose (Paquier, 2002). Dans l'étude d'Al-Bahrany et Al-khayri (2012) sur des suspensions cellulaires du palmier dattier, on observe également que le prétraitement au saccharose à 0,5 et 0,75 M a permis d'obtenir respectivement 12 et 18 colonies après la cryoconservation. Chez d'autres espèces végétales, Dumet *et al.* (1994) ont rapporté la possibilité de cryoconserver des massifs embryogènes de palmier à huile prétraités pendant 7 jours sur un milieu avec 0,75 M de saccharose, en obtenant 40% de survie. De la même façon, près de 49% des tissus embryogènes de patate douce (*Ipomoea batatas*) survivent à la congélation après un prétraitement sur milieu à 0,4 ou 0,7 M de saccharose (Blakesley *et al.*, 1996).

An niveau cellulaire, les molécules de sucre, de petite taille, aident les membranes à maintenir un certain taux d'hydratation et à augmenter la distance entre les membranes, ce qui réduit les contraintes de compression et, par conséquent, réduit les chances d'une transition de la phase liquide en gel (Wolfe & Bryant, 1999). En outre, des concentrations intracellulaires élevées en sucres favorisent la vitrification au cours du refroidissement des explants grâce à la nature très visqueuse de leurs solutions aqueuses (Wolfe & Bryant, 1999). Le saccharose joue un rôle essentiel dans la déshydratation osmotique des explants et il entraîne également une augmentation de la concentration de sucre et d'amidon intracellulaire (Dumet *et al.*, 1994; Zhu *et al.*, 2006).

Dans des conditions optimales, les deux techniques utilisées (DV et D cryo-plate) ont conduit à une pourcentages de survie semblables avec la variété Sokary mais l'intensité de croissance était plus élevé avec D cryo-plate (113,0%) par rapport à la technique de DV (92,5%).

Dans le cas de la variété Sultany, la survie était légèrement inférieure avec D cryo-plate (74,6%) par rapport à la DV (88,0%). Les différences entre les deux techniques ont été plus marquées lorsque l'on compare l'intensité de croissance, qui était de 84,0% avec DV contre seulement 47,5% avec D cryo-plate. Ce résultat peut être dû, d'une part, à la différence de vitesse de croissance entre les deux variétés (l'intensité de croissance est de 75,65% après 15 jours de culture sur le milieu standard de prolifération chez la variété Sokary par rapport à 46,75% chez la variété Sultany). D'autre part, il pourrait être lié à des différences de réactivité entre les génotypes cryoconservés selon le même protocole. Ces différences soulignent également l'intérêt d'avoir plusieurs techniques à disposition pour la cryoconservation d'une gamme de génotypes, qui peuvent réagir différemment aux techniques disponibles (Engelmann, 2011). En outre, contrairement à ce qui a été observé avec le protocole de DV, lorsque la technique de D cryo-plate a été utilisée, aucune récupération n'a été obtenue chez les PEM cryoconservées immédiatement après le traitement de loading. Cela peut être expliqué par la présence d'alginate de calcium qui encapsule les explants et qui ralentit, par conséquent, la déshydratation réalisée par l'exposition des PEM à la solution de loading. De plus, le fait que les PEM encapsulées soient collées aux cryo-plates diminue considérablement la surface de contact avec la solution de loading, alors que dans le protocole de DV, les explants sont en contact direct avec cette solution. Ainsi, une amélioration supplémentaire de la survie des PEM cryoconservées par D cryo-plate pourrait être obtenue en optimisant la durée de traitement avec la solution de loading.

Plusieurs différences ont été notées entre la technique de D cryo-plate utilisée avec les PEM de palmier dattier et celles publiées par Niino *et al.* (2013) pour les apex de *Juncus decipiens* Nakai, par Matsumoto *et al.* (2013) pour les apex de kaki, et par Tanaka *et al.* (2014) pour des apex de *Chrysanthemum* L. Les solutions de loading et d'unloading employées avec *Juncus decipiens*, *Chrysanthemum* et le kaki étaient composées de 2,0 M de glycérol + 1,0 M de saccharose pour la solution de loading et de 1,0 M de saccharose pour celle d'unloading (Niino *et al.*, 2013), alors que dans le cas des PEM de palmier dattier, ces solutions étaient composées de 2,0 M de glycérol + 0,4 M de saccharose et de 1,2 M de saccharose respectivement pour la solution de loading et d'unloading. Une autre différence concernant la durée de déshydratation menant à la survie optimale après la cryoconservation a été observée. La survie a été la plus élevée après 120 et 180 min de déshydratation chez *Juncus decipiens* (Niino *et al.*, 2013) et après 30 min chez le kaki (Matsumoto *et al.*, 2013), alors que des durées optimales intermédiaires ont été notées avec le palmier dattier, entre 60 et 120 min pour la variété Sokary et entre 60 et 150 min pour la variété Sultany. Du fait que, dans la technique de D cryo-plate, la déshydratation est réalisée grâce au flux d'air d'une hotte, la vitesse d'écoulement de l'air, et par conséquent la vitesse de dessiccation des

échantillons peuvent varier entre les différents modèles de hottes à flux laminaire utilisées dans les différents laboratoires (Niino *et al.*, 2014). Un autre paramètre primordial est l'humidité relative de l'air dans le laboratoire (Niino *et al.*, 2014), qui varie considérablement entre les sites et entre les saisons (en particulier entre les saisons sèches et humides dans les pays tropicaux) et qui peut donc modifier aussi le niveau de déshydratation. Il peut donc être préférable, afin de standardiser les étapes de déshydratation, de déshydrater les échantillons dans des récipients hermétiques remplis de silicagel comme dans la technique d'encapsulation-déshydratation (Gonzalez-Arno & Engelmann, 2006; Niino *et al.*, 2014) ou dans des récipients contenant des solutions de sels saturés, comme pour la cryoconservation des semences non orthodoxes (Engelmann & Dussert, 2013). Ces techniques permettent d'obtenir des taux de dessiccation hautement reproductibles, à condition que la température à laquelle est effectuée la dessiccation reste constante entre les expériences. La dernière différence importante entre les expériences de Niino *et al.* (2013) sur *Juncus decipiens* et nos expériences sur le palmier dattier se rapporte à la taille et la structure des explants utilisés pour la cryoconservation. Dans le cas de *Juncus decipiens*, des bourgeons de 1,5 à 2,0 mm de long et 1,0 mm de large, avec une structure complexe comprenant le méristème, des primordiums foliaires, des gaines et une partie basale étaient employés. En revanche, dans le cas des PEM de palmier dattier, les proembryons individuels avaient un diamètre d'environ 500 μ m et une structure simple.

Les différences de réponse à la cryoconservation peuvent être dues aux différences liées aux équipements et aux compétences de manipulateurs (Reed *et al.*, 2004b; Keller *et al.*, 2008). Certaines études ont souligné l'importance de développer des techniques robustes et de mise en œuvre simple afin de permettre l'établissement des collections cryoconservées (Yamamoto *et al.*, 2012a; Yamamoto *et al.*, 2012b). La réussite de cryoconservation est influencée par deux étapes, la préparation du matériel végétal et la réalisation des procédures du protocole (Niino *et al.*, 2014). La technique de D cryo-plate permet de cryoconserver des explants de taille assez importante, ce qui facilite, par conséquent, la préparation et la manipulation du matériel végétal. Niino *et al.* 2014 ont montré que l'application de la technique de D cryo-plate sur des bourgeons de *Juncus decipiens* Nakai, par cinq manipulateurs ayant peu d'expérience dans le domaine de la culture *in vitro* n'a révélé aucune différence significative au niveau de la survie après la cryoconservation et que les cinq manipulateurs ont pu obtenir un pourcentage de survie très élevé (entre 76,7 et 93,3%). Ceci met en évidence le potentiel et l'efficacité de cette technique lorsque elle est appliquée à grande échelle dans les cryobanques.

En conclusion, nous avons montré que la cryoconservation des PEM de palmier dattier peut être efficacement effectuée en utilisant à la fois la technique de DV et la technique de D cryo-plate. En général, le prétraitement n'améliore pas la survie chez les explants cryoconservés. L'effet positif

du prétraitement sur un milieu enrichi en saccharose à 0,5 M est observé uniquement lorsque les PEM sont congelées directement après le traitement de loading. Les deux techniques permettent d'obtenir des pourcentages de survie semblables avec la variété Sokary mais l'intensité de croissance est plus élevée avec le protocole de D cryo-plate par rapport à la technique de DV. En revanche, dans le cas de la variété Sultany, la survie et l'intensité de croissance sont inférieures avec le protocole de D cryo-plate. De plus, nous avons montré l'importance de combiner différents paramètres pour évaluer la réponse du matériel végétal à un protocole de cryoconservation. Enfin, nos résultats contribueront à la conservation à long terme et la sauvegarde de la biodiversité du palmier dattier, en particulier grâce à la technique de D cryo-plate du fait de son potentiel d'utilisation à grande échelle dans les cryobanques où les besoins d'un protocole pratique, efficace et réalisable par des personnes peu expérimentées, sont importants.

CHAPITRE 4

ÉTUDE DE L'EFFET DES ÉTAPES SUCCESSIVES DU PROTOCOLE DE DV SUR L'INTÉGRITÉ STRUCTURALE DES PEM

4. Étude de l'effet des étapes successives du protocole de DV sur l'intégrité structurale des PEM

4.1. Introduction

Dans le chapitre précédent nous avons testé l'efficacité de deux protocoles de cryoconservation (la technique de DV et la technique de D cryo-plate) sur deux variétés de palmier dattier « Sokary et Sultany » afin de définir les traitements optimaux permettant la cryoconservation de ces variétés et d'identifier des conditions expérimentales donnant des pourcentages de survie contrastées. Nous avons trouvé que l'effet positif du prétraitement sur un milieu enrichi en saccharose à 0,5 M a été observé lorsque les PEM de la variété Sokary ont été congelées directement après le traitement de « loading » en appliquant la technique de DV. Pour cela, dans ce chapitre nous nous intéressons à déterminer, dans un premier temps, l'impact des étapes successives du protocole de DV sur l'intégrité structurale des PEM. Dans un deuxième temps, nous essaierons de déterminer plus précisément l'impact du prétraitement sur l'intégrité structurale des PEM de la variété Sokary.

4.2. Intégrité structurale des PEM

4.2.1. Structure des PEM

Cette étude permet de caractériser la structure d'une masse proembryogène (PEM) de palmier dattier. Les observations réalisées sur les coupes montrent qu'une PEM se compose de plusieurs proembryons qui sont constitués à leur tour de différentes populations cellulaires parmi lesquelles on distingue nettement trois types de cellules : des cellules méristématiques, des cellules embryogènes et des cellules parenchymateuses (Figure 15). Les cellules du parenchyme (Pa), qui ont des formes variées, sont peu colorées, ce qui indique la présence d'une grande vacuole. Cette vacuole a une position centrale et occupe la majorité du cytoplasme. Le noyau, qui est rarement visible, est de petite taille et est situé à la périphérie de la cellule. Les cellules méristématiques ($\approx 16 \mu\text{m}$ de diamètre) sont des cellules arrondies plus petites que les cellules parenchymateuses ($\approx 27 \mu\text{m}$ de diamètre). Ces cellules méristématiques sont caractérisées par un grand noyau central ($6,6 \mu\text{m}$ de diamètre en moyenne ; soit environ 25% la taille de la cellule) et coloré d'une manière homogène, dans lequel un ou plusieurs nucléoles sont nettement visibles. Les cellules méristématiques apparaissent fortement colorées en bleu, ce qui traduit leur richesse en protéines (Fig. 16, A). La forte présence de protéines de réserve, qui se traduit par des grains de couleur bleue très foncée, caractérise également les cellules méristématiques (Fig. 16, A). Ces cellules ont très souvent une position centrale par rapport au proembryon. Les cellules embryogènes sont variées au niveau de la taille et de la forme. Cela nous a conduit à les séparer en deux populations cellulaires : population cellulaire I et II (PopI et PopII). Les cellules embryogènes de la population I (PopI) sont également

des cellules arrondies plus grandes que les cellules méristématiques ($\approx 25 \mu\text{m}$ de diamètre). Elles possèdent un noyau souvent central dont le diamètre est d'environ $7 \mu\text{m}$. Ce noyau, coloré d'une manière homogène, contient un nucléole (dans certains cas deux nucléoles) bien visible (Fig. 17, A). Les cellules de la PopI apparaissent fortement colorées en bleu, ce qui traduit leur richesse en protéines. Comme chez les cellules méristématiques, une forte présence de protéines de réserve est observée. Par ailleurs, la présence de réserves d'amidon (visible sous forme de grains roses) caractérise également les cellules de la PopI (Fig. 17, A). Le cytoplasme de cette population cellulaire est riche en petites vacuoles. Ces cellules entourent généralement les cellules méristématiques.

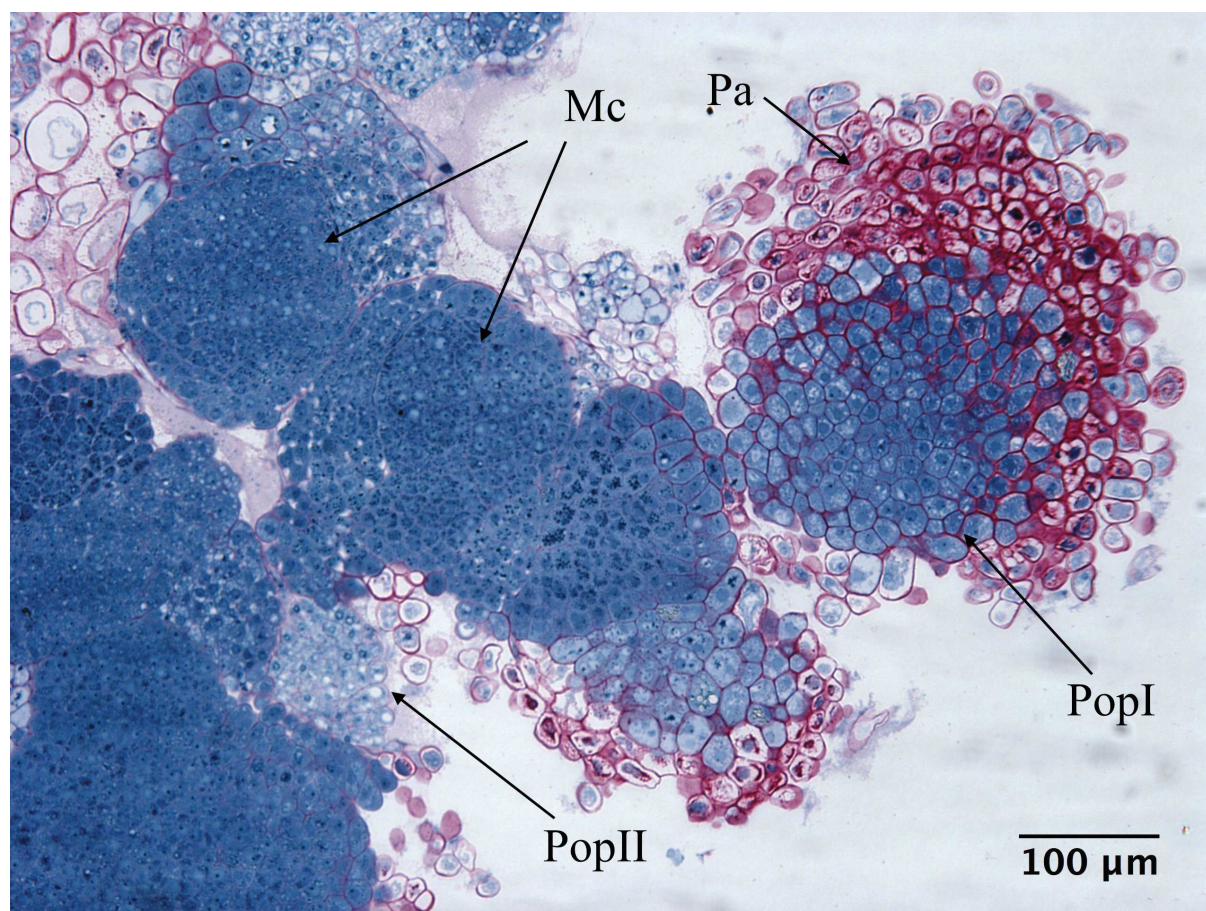


Figure 15 Coupe histologique des PEM de palmier dattier de la variété Sokary. Mc : cellules méristématiques ; PopI : cellules embryogènes (Population I); PopII: cellules embryogènes (Population II); Pa: cellules parenchymateuses. Échelle: $100\mu\text{m}$.

Les cellules embryogènes de la population II (PopII) sont des cellules arrondies d'environ $15 \mu\text{m}$ de diamètre (Fig. 18, A). La majorité des cellules de PopII possèdent un noyau central, d'un diamètre d'environ $7 \mu\text{m}$. Ce noyau est coloré d'une couleur bleu foncé. Le nucléole est dans la plupart de cas très difficile à distinguer (Fig. 18, A). Les cellules de la PopII sont peu colorées, ce qui indique la présence de grandes vacuoles. Ces vacuoles occupent la majorité du cytoplasme. Cette population cellulaire est généralement localisée en périphérie du proembryon.

Après avoir décrit la structure des PEM, nous cherchons à étudier l'impact des étapes successives du protocole de DV sur l'intégrité suturale des PEM du palmier dattier. Pour cela, des analyses qualitatives et quantitatives ont été effectuées.

4.2.2. Observations qualitatives

4.2.2.1. Cellules méristématiques

Les cellules des PEM témoins sont caractérisées par un cytoplasme dense avec un gros noyau qui a souvent une position centrale. Le noyau est coloré d'une manière homogène et possède un ou plusieurs nucléoles (Fig. 16, A). Ces cellules sont caractérisées par une grande accumulation des protéines de réserve, qui se colorent en bleu par le NBB.

Après traitement des PEM directement dans la solution de loading sans passage par l'étape de prétraitement sur un milieu de 0,5 M de saccharose, nous pouvons voir une plasmolyse importante (Fig. 16, B). Les noyaux semblent déformés, moins clairs et difficiles à différencier par rapport aux autres structures cellulaires mis à part le nucléole qui est toujours visible et très condensé. Les protéines de réserve sont peu claires. Après le transfert dans l'azote liquide (LN), nous ne notons aucune modification par rapport au traitement précédent au niveau de la plasmolyse. Les noyaux sont un peu plus clairs et beaucoup d'entre eux sont déformés (Fig. 16, C). Le nucléole perd sa position centrale et se localise en périphérie. Nous constatons également une zone claire dans le noyau autour du nucléole. Quinze min après le réchauffement dans le milieu d'unloading, les cellules méristématiques ne retrouvent pas leur aspect initial et restent plasmolysées. Le cytoplasme est moins coloré avec la présence de petites vacuoles (Fig. 16, D). Nous remarquons également que l'espace intracellulaire (l'espace entre les membranes cellulaires et le cytoplasme) est fortement coloré en bleu, ce qui peut être traduit par la présence de protéines. La majorité des noyaux sont pycnotiques et déformés et les nucléoles sont invisibles. Quand le nucléole est visible, il est fortement coloré et se positionne en périphérie. Au bout de 15 jours après le transfert sur le milieu standard de prolifération, les cellules présentent les aspects suivants : un cytoplasme beaucoup moins coloré, des noyaux difficiles à distinguer, un nucléole généralement visible et un espace intracellulaire transparent (Fig. 16, E).

Dans le cas des PEM prétraitées sur un milieu contenant 0,5 M de saccharose pendant 3 jours, aucun changement de la plasmolyse n'est noté par rapport au témoin. Les cellules sont caractérisées par un cytoplasme dense avec un gros noyau qui a souvent une position centrale. Dans certaines cellules, nous pouvons noter des petites vacuoles. Le noyau est coloré d'une manière homogène et contient un à deux nucléoles fortement colorés, souvent en position centrale (Fig. 16, F). Ces cellules montrent une grande accumulation de protéines de réserve. Après le traitement des

PEM dans la solution de loading, nous ne pouvons voir aucune plasmolyse (Figure 1, G). Cependant, le cytoplasme devient moins dense, ce qui met en évidence les protéines de réserve (grains bleus) et la présence de nombreuses petites vacuoles (Fig. 16, G). Certains noyaux semblent avoir perdu leur forme arrondie et deviennent pycnotiques. Pour la majorité des cellules, le noyau reste bien coloré avec un nucléole visible et très condensé. Pour les PEM congelées directement (sans traitement dans la solution de vitrification, PVS2), après le transfert dans l'azote liquide (LN), nous ne notons aucune modification par rapport au traitement précédent (Fig. 16, H). Nous observons également une zone claire transparente dans le noyau autour du nucléole. Quinze min après le réchauffement dans le milieu d'unloading, les cellules méristématiques ne présentent pas de modifications par rapport à la condition précédente. Le cytoplasme est moins coloré, avec la présence de petites vacuoles (Fig. 16, I). La plupart des noyaux sont pycnotiques mais le nucléole reste visible. Dans quelques noyaux, une zone transparente dans le noyau autour du nucléole est observée. Quinze jours après le transfert sur le milieu standard de prolifération, nous constatons que les cellules retrouvent un aspect normal très proche de celui du témoin non traité (Fig. 16, J).

En ce qui concerne les PEM traitées dans la solution de PVS2 pendant 30 min, aucune plasmolyse n'est observée. Le cytoplasme est moins dense et les protéines de réserve sont faciles à voir (Fig. 16, K). Les noyaux sont moins visibles et les nucléoles sont, par contre, très colorés et dans la plupart de cas entourés par une zone transparente. La congélation dans l'azote liquide n'entraîne pas de changements (Fig. 16, L). Au bout de 15 jours de culture sur le milieu de prolifération les cellules méristématiques retrouvent un aspect normal très similaire au témoin (Fig. 16, M).

4.2.2.2. Cellules embryogènes

4.2.2.2.1. Cellules embryogènes (Population I)

Comme décrit précédemment, les cellules de PopI sont caractérisées par un cytoplasme dense avec un gros noyau qui a souvent une position centrale. Le noyau est coloré d'une manière homogène et ces noyaux possèdent un ou plusieurs nucléoles, ce qui montre une activité mitotique très intense. Les différentes étapes de la mitose peuvent être observées grâce à la coloration très foncée des nucléoles en bleu. Ces cellules sont caractérisées par une grande accumulation de protéines de réserve (couleur bleue par le NBB) et de grains d'amidon (coloration rose par PAS) (Fig. 17, A).

Chez les PEM non prétraitées sur un milieu de 0,5 M de saccharose, après le traitement de loading, nous pouvons voir une plasmolyse importante (Fig. 17, B). Les noyaux apparaissent déformés et moins visibles. Le nucléole, qui est également difficile à distinguer, se localise en

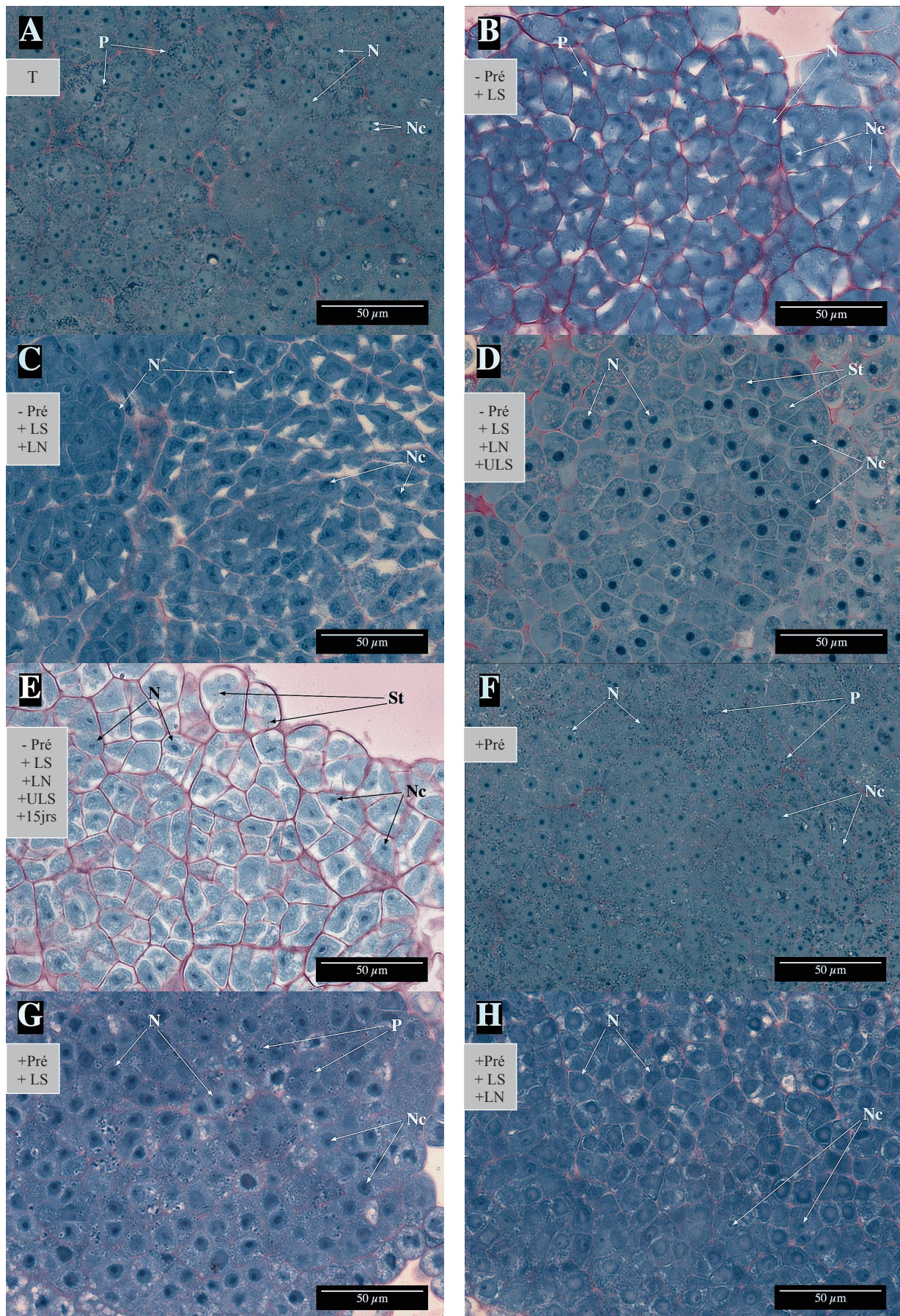
périphérie. Les protéines de réserve sont peu claires mais on note une accumulation d'amidon (grains roses). Après la congélation dans l'azote liquide (LN), aucune modification n'est observée par rapport au traitement précédent au niveau de la plasmolyse. Le noyau est un peu plus clair et souvent déformé (Fig. 17, C). Quinze min après le traitement d'unloading, les cellules de PopI ne retrouvent pas leur aspect initial et restent plasmolyées. Le cytoplasme est coloré d'une façon hétérogène avec une forte accumulation d'amidon (Fig. 17, D). Nous remarquons également que l'espace intracellulaire est coloré en bleu, ce qui peut être traduit par la présence de protéines. La majorité des noyaux sont pycnotiques et les nucléoles sont invisibles. Quinze jours après le transfert sur le milieu standard de prolifération, on trouve un cytoplasme beaucoup moins coloré avec une forte présence de grains d'amidon, des noyaux et des nucléoles difficiles à distinguer et un espace intracellulaire transparent (Fig. 17, E).

Chez les PEM prétraitées pendant 3 jours sur un milieu contenant 0,5 M de saccharose, aucun changement de plasmolyse n'est noté par rapport au témoin. Cependant, nous remarquons la présence de nombreuses vacuoles de tailles variées. Le noyau est grand, en position généralement centrale et coloré d'une manière homogène. On observe un et parfois deux nucléoles qui sont fortement colorés et ont souvent une position centrale. Ces cellules montrent une grande accumulation des protéines de réserve (Fig. 17, F). Après le traitement des PEM dans la solution de loading, aucune plasmolyse n'est observée. La coloration du cytoplasme devient moins dense avec beaucoup de vacuoles (Fig. 17, G). Quelques noyaux ont perdu leur forme arrondie et deviennent pycnotiques. Pour les PEM transférées directement dans l'azote liquide (LN) (sans traitement dans la solution de PVS2), nous ne notons aucune modification par rapport au traitement précédent hormis la coloration des noyaux qui devient moins intense et les vacuoles qui sont moins nombreuses mais plus grandes (Fig. 17, H). Quinze min après l'unloading, la coloration du cytoplasme est moins dense avec la présence de petites vacuoles et une forte accumulation d'amidon (Fig. 17, I). La majorité des noyaux sont fortement colorés mais le nucléole reste visible. Quinze jours après le transfert sur le milieu standard de prolifération, nous constatons que les cellules retrouvent un aspect normal très proche de celui des témoins non traités. Cependant, nous remarquons toujours la présence de nombreuses vacuoles de tailles différentes. (Fig. 17, J).

En ce qui concerne les PEM traitées dans la solution de PVS2 pendant 30 min, aucune plasmolyse n'est observée. Le cytoplasme est moins dense et les grains d'amidon sont faciles à voir (Fig. 17, K). Les noyaux sont moins visibles. Après la cryoconservation, les noyaux sont un peu déformés et les vacuoles sont moins nombreuses mais plus grandes (Fig. 17, L). Au bout de 15 jours de culture sur le milieu de prolifération, les cellules de la PopI ont retrouvé un aspect normal (Fig. 17, M).

4.2.2.2.2. Cellules embryogènes (Population II)

Chez le témoin, les cellules de PopII sont peu colorées et, dans leur majorité, transparentes, ce qui se traduit par l'observation de grandes vacuoles remplissant la plus grande partie du cytoplasme. La plupart des cellules de la PopII possèdent un noyau central, coloré d'une couleur bleu foncé. Le nucléole est dans la plupart de cas très difficile à distinguer (Fig. 18, A). Cette population cellulaire présente une plasmolyse très importante dès le prétraitement sur un milieu contenant 0,5 M de saccharose et le cytoplasme semble se détacher des membranes cellulaires (Fig. 18, E). On note également que les noyaux sont déformés, pycnotiques et que le nucléole n'est plus visible. Après le traitement de loading, les cellules de PopII des PEM prétraitées ou non prétraitées ont le même aspect que pour le traitement précédent (Fig. 18, F et B respectivement). En suivant les autres étapes du protocole de DV et pour toutes les autres conditions étudiées, ces cellules présentent l'aspect suivant : une plasmolyse importante, des noyaux pycnotiques et le cytoplasme détaché de la membrane cellulaire (Fig. 18, de B à M).



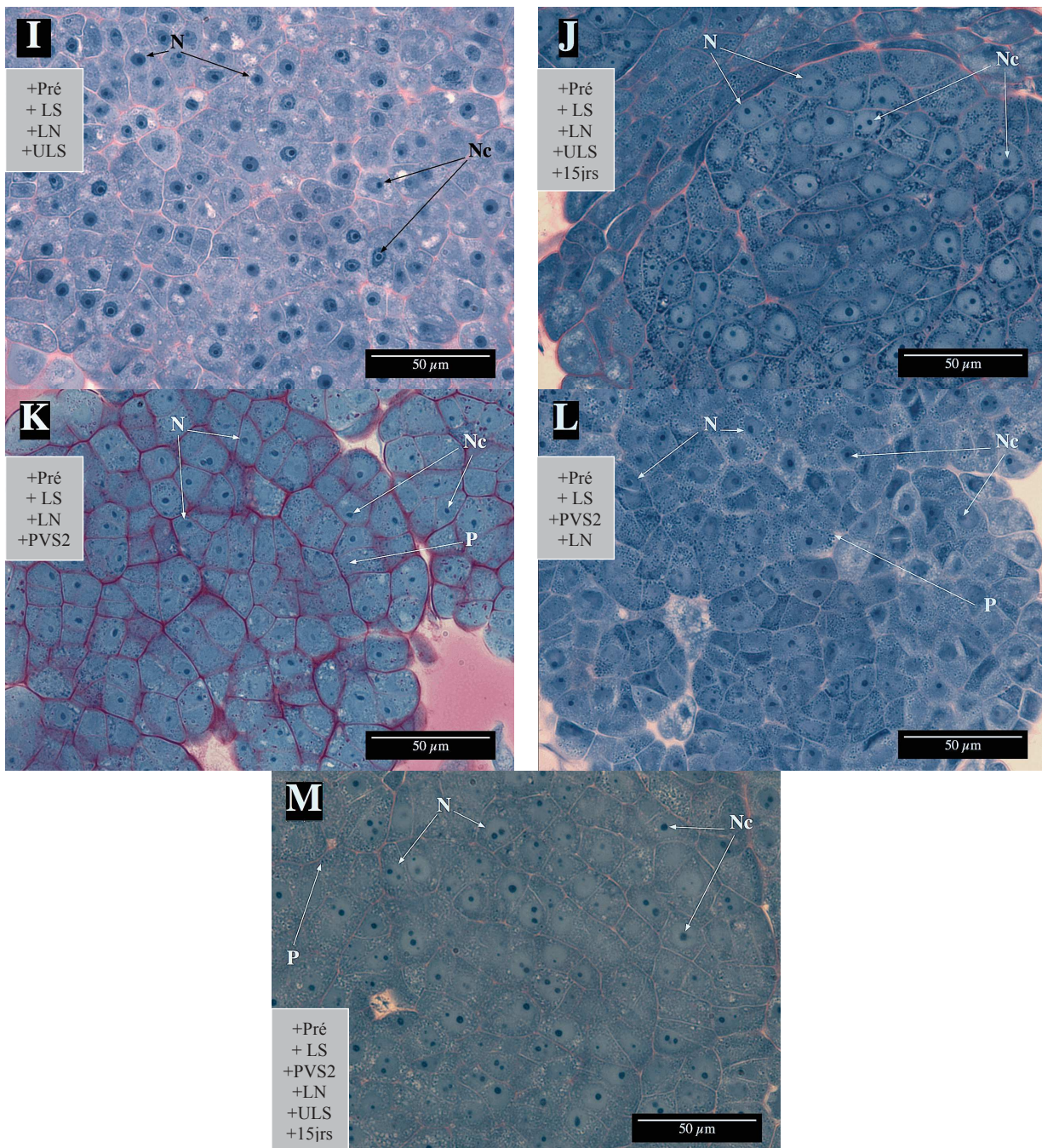
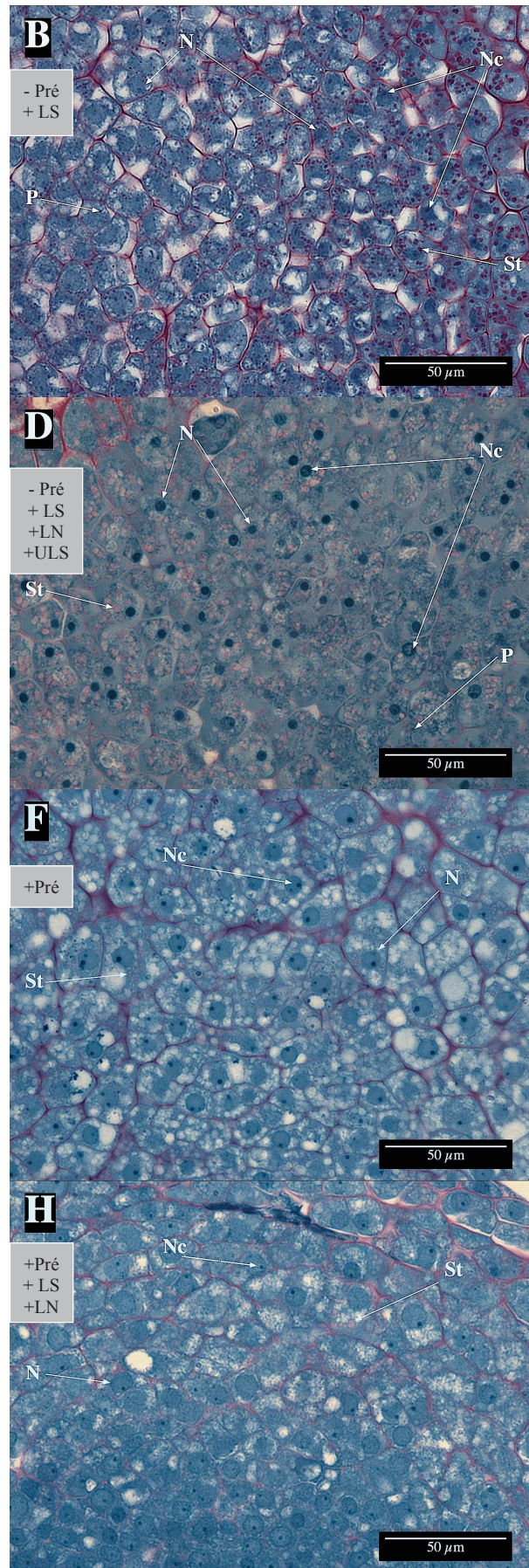
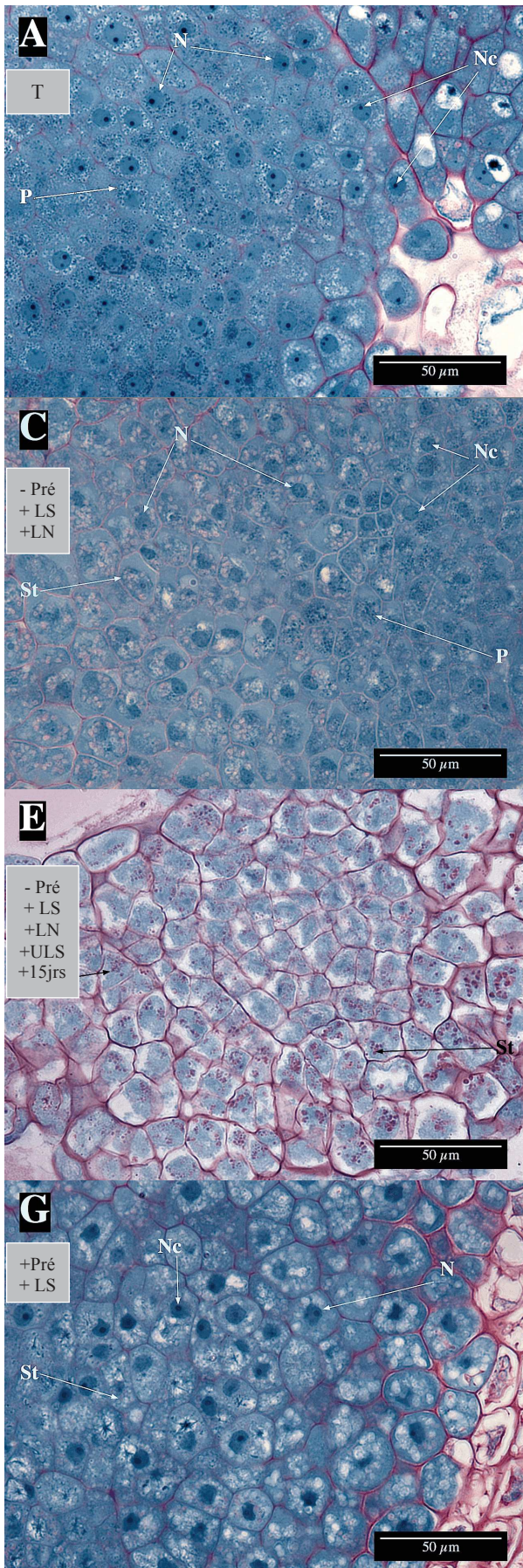


Figure 16 Coupes histologiques des cellules méristématiques des PEM de palmier dattier de la variété Sokary au cours des différentes étapes du protocole de cryoconservation par vitrification en gouttes. (A): témoin non traité. (B): traitement de loading sans prétraitement (-pré+LS). (C): -pré+LS+ congélation dans l'azote liquide (+LN). (D): -pré+LS+LN+ traitement avec la solution d'unloading (ULS). (E) : -pré+LS+LN+ULS après 15 jours de transfert sur un milieu standard de prolifération (15jrs). (F) : Témoin prétraité pendant 3 jours sur un milieu contenant 0,5 M de saccharose. (G) : traitement de loading (+pré+LS). (H) : +pré+LS+LN. (I) : +pré+LS+LN+ULS. (J) : -pré+LS+LN+ULS après 15 jours de transfert sur un milieu standard de prolifération (15jrs). (K) : +pré+LS+LN+traitement avec la solution de vitrification (PVS2). (L) : +pré+LS+LN+PVS2+LN. (M) : +pré+LS+LN+PVS2+LN après 15 jours de transfert sur un milieu standard de prolifération (15jrs).

N : Noyau ; Nc : Nucléole ; PR : Protéines de réserve. Am : Grains d'amidon ; Échelle : 50 µm.



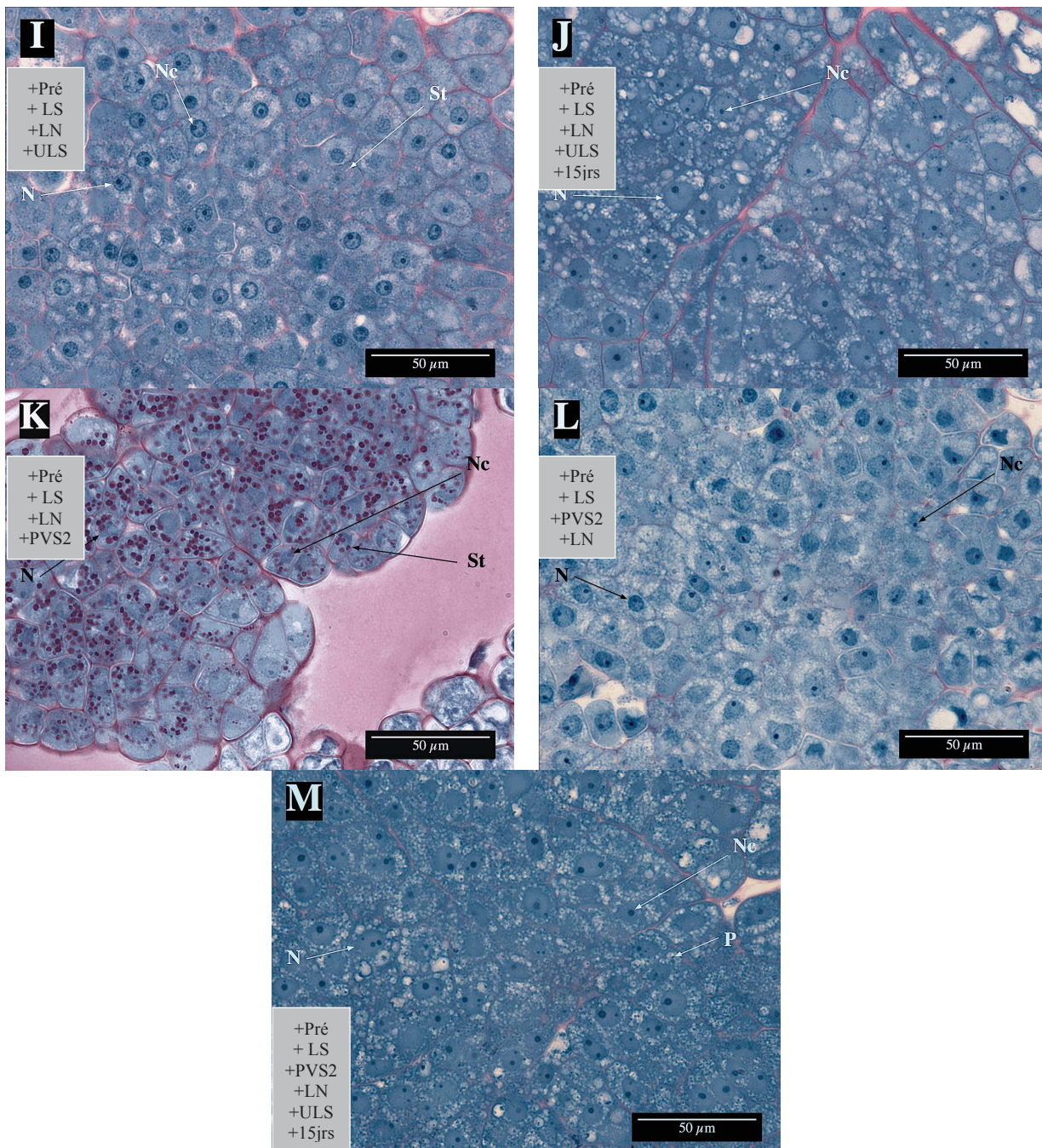
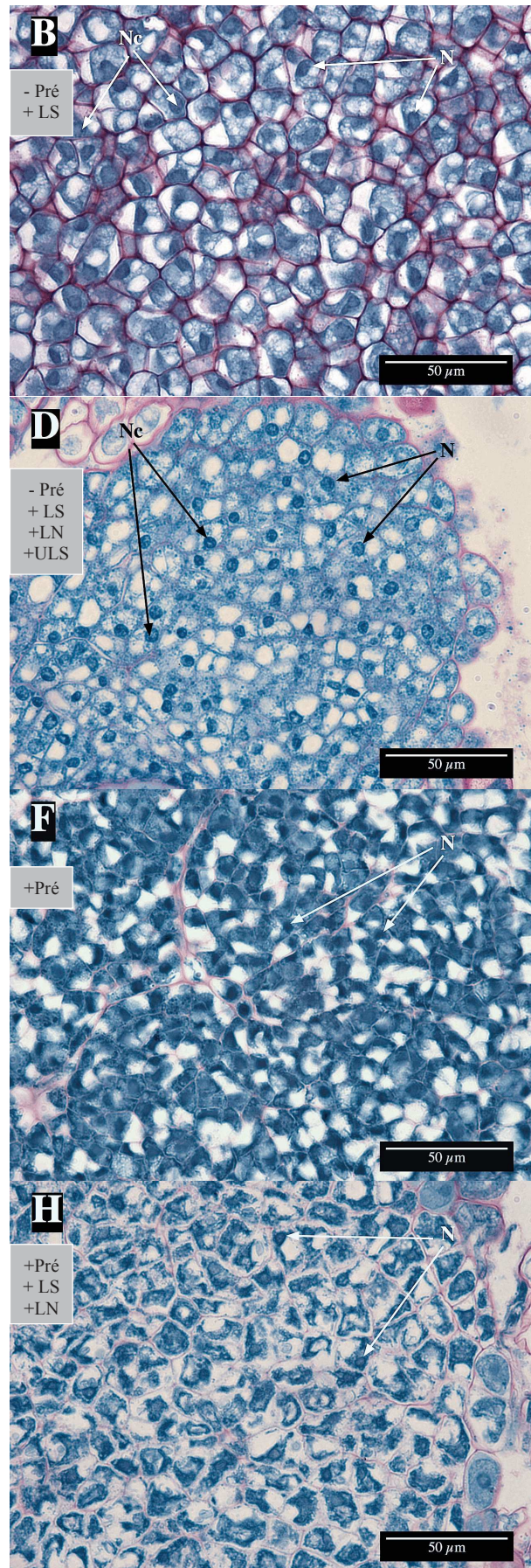
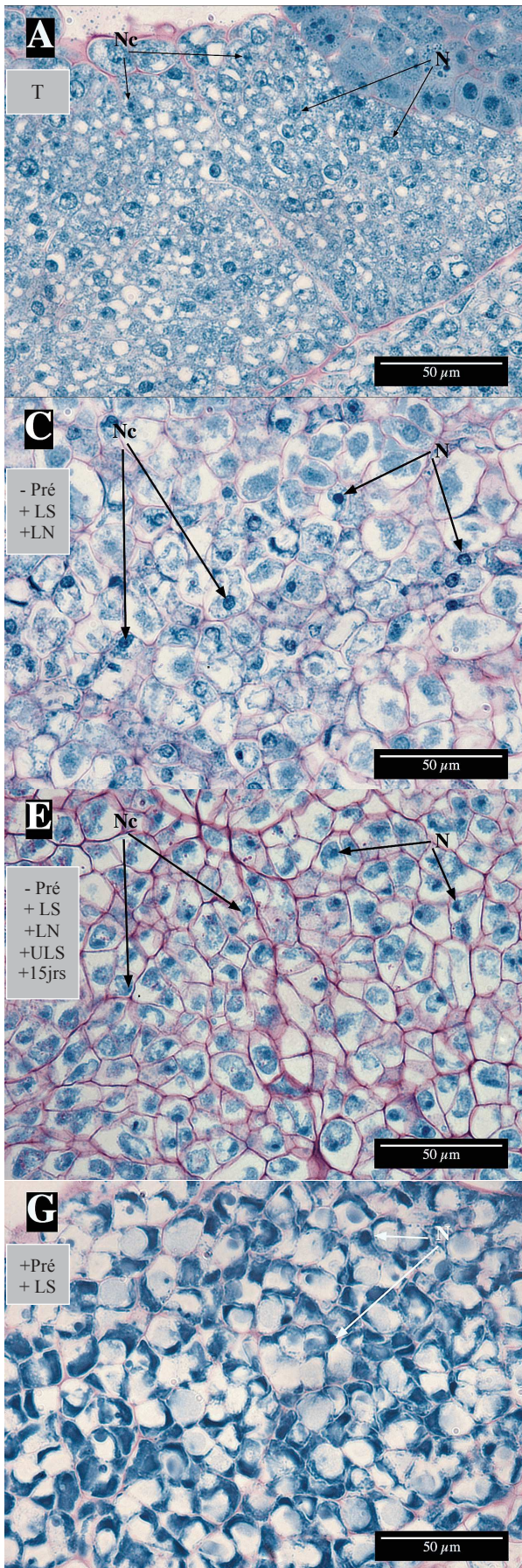


Figure 17 Coupes histologiques des cellules embryogènes (Population I) des PEM de palmier dattier de la variété Sokary au cours des différentes étapes du protocole de cryoconservation par vitrification en gouttes. (A): témoin non traité. (B): traitement de « loading » sans prétraitement (-pré+LS). (C): -pré+LS+ congélation dans l'azote liquide (+LN). (D): -pré+LS+LN+ traitement avec la solution d' « unloading » (ULS). (E): -pré+LS+LN+ULS après 15 jours de transfert sur un milieu standard de prolifération (15jrs). (F): Témoin prétraité pendant 3 jours sur un milieu contenant 0,5 M de saccharose. (G): traitement de « loading » (+pré+LS). (H): +pré+LS+LN. (I): +pré+LS+LN+ULS. (J): -pré+LS+LN+ULS après 15 jours de transfert sur un milieu standard de prolifération (15jrs). (K): +pré+LS+LN+traitement avec la solution de vitrification (PVS2). (L): +pré+LS+LN+PVS2+LN. (M): +pré+LS+LN+PVS2+LN après 15 jours de transfert sur un milieu standard de prolifération (15jrs).

N : Noyau ; Nc : Nucléole ; PR : Protéines de réserve. Am : Grains d'amidon ; Échelle : 50 µm.



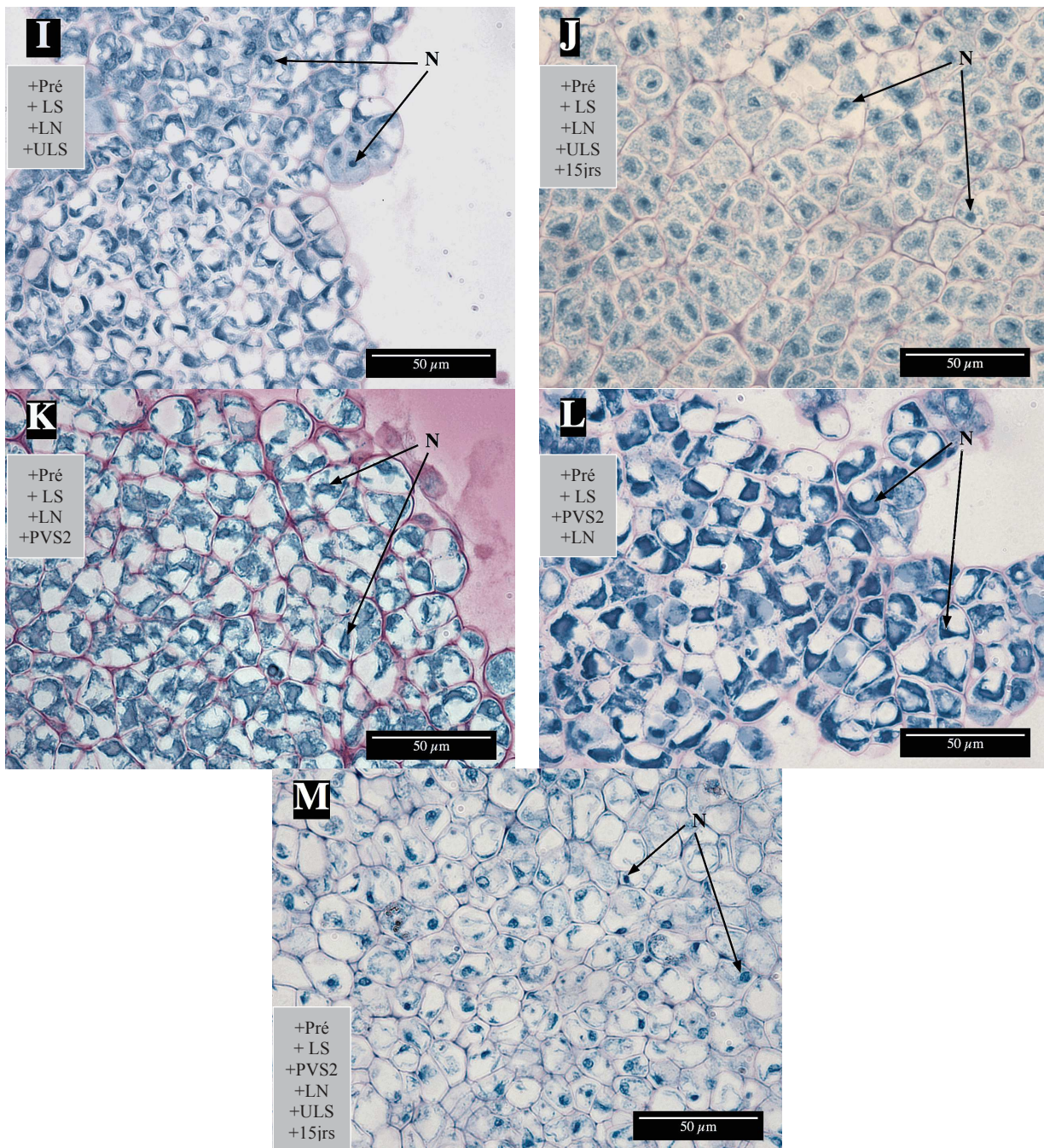


Figure 18 Coupes histologiques des cellules embryogènes (Population II) des PEM de palmier dattier de la variété Sokary au cours des différentes étapes du protocole de cryoconservation par vitrification en gouttes. (A): témoin non traité. (B) : traitement de « loading » sans prétraitement (-pré+LS). (C) : -pré+LS+ congélation dans l'azote liquide (+LN). (D) : -pré+LS+LN+ traitement avec la solution d' « unloading » (ULS). (E) : -pré+LS+LN+ULS après 15 jours de transfert sur un milieu standard de prolifération (15jrs). (F) : Témoin prétraité pendant 3 jours sur un milieu contenant 0,5 M de saccharose. (G) : traitement de « loading » (+pré+LS). (H) : +pré+LS+LN. (I) : +pré+LS+LN+ULS. (J) : -pré+LS+LN+ULS après 15 jours de transfert sur un milieu standard de prolifération (15jrs). (K) : +pré+LS+LN+traitement avec la solution de vitrification (PVS2). (L) : +pré+LS+LN+PVS2+LN. (M) : +pré+LS+LN+PVS2+LN après 15 jours de transfert sur un milieu standard de prolifération (15jrs).

N : Noyau ; Nc : Nucléole ; PR : Protéines de réserve. Am : Grains d'amidon ; Échelle : 50 µm.

4.2.3. Observations quantitatives

4.2.3.1. Plasmolyse

4.2.3.1.1. Cellules méristématiques

Le pourcentage de plasmolyse observé chez les cellules méristématiques après le traitement des PEM directement dans la solution de loading sans l'étape de prétraitement sur un milieu de 0,5 M de saccharose, est significativement plus élevé (24%) par rapport au témoin non traité (Tableau 11). Après le transfert dans l'azote liquide (LN), on ne note aucune modification par rapport au traitement précédent au niveau de la plasmolyse. Quinze min après le réchauffement dans le milieu d'unloading, les cellules méristématiques montrent toujours le même pourcentage de plasmolyse (27,5%) et ne retrouvent pas leur état initial. Quinze jours après le transfert sur le milieu standard de prolifération, le pourcentage de plasmolyse est de 28%. Après le prétraitement sur un milieu à 0,5 M de saccharose aucune plasmolyse n'est notée ni après le traitement de loading ni le traitement avec PVS2.

Tableau 11 État de plasmolyse (% par rapport au témoin non traité) des cellules méristématiques des PEM de palmier dattier de la variété Sokary en fonction de l'étape du protocole de vitrification en gouttes utilisé. T : témoin non traité ; Pré : prétraitement sur un milieu 0,5M de saccharose ; LS : traitement avec la solution de « loading » ; PVS2 : traitement avec la solution de vitrification PVS2; LN : azote liquide ; LN+UL : azote liquide + traitement avec la solution d' « unloading » ; 15jrs : après 15 jours de culture sur un milieu standard de prolifération. Les différentes lettres minuscules indiquent des différences significatives entre les conditions du protocole de cryoconservation, selon le test de Duncan ($P < 0,05$).

Plasmolyse %						
Traitement	T	Pré	LS	LN	LN+ULS	15jrs
	0 b	-	24 a	25,6 a	27,5 a	28 a
Traitement	Pré	LS	LN	LN+ULS	15jrs	
	0 b	0 b	0 b	0 b	0 b	0 b
Traitement			PVS2	LN	15jrs	
			0 b	0 b	0 b	

Il apparaît donc que c'est le traitement dans la solution de loading qui induit la plasmolyse la plus importante chez les cellules méristématiques non prétraitées et que l'application de la solution d'unloading n'entraîne aucun retour vers la valeur du témoin.

4.2.3.1.2. Cellules embryogènes (Population I)

Une plasmolyse significativement plus élevée (42,1%) est observée chez les cellules de PopI après le traitement des PEM directement dans la solution de loading sans l'étape de prétraitement

sur un milieu contenant 0,5 M de saccharose par rapport au témoin non traité (Tableau 12). Après le transfert dans l'azote liquide (LN), aucune modification n'est notée par rapport au traitement précédent au niveau de la plasmolyse. Quinze min après le réchauffement dans le milieu d'unloading, les cellules ne retrouvent pas leur aspect initial et présentent 42,4 % de plasmolyse. Au bout des 15 jours du transfert sur le milieu standard de prolifération, le pourcentage de plasmolyse reste important (40,4 %). Après le prétraitement sur un milieu à 0,5 M de saccharose aucune plasmolyse n'est également notée ni après le traitement de loading ni le traitement avec PVS2.

Tableau 12 État de plasmolyse (% par rapport au témoin non traité) des cellules embryogènes (Population I) des PEM de palmier dattier de la variété Sokary en fonction de l'étape du protocole de vitrification en gouttes utilisé. T : témoin non traité ; Pré : prétraitement sur un milieu 0,5M de saccharose ; LS : traitement avec la solution de « loading » ; PVS2 : traitement avec la solution de vitrification PVS2; LN : azote liquide ; LN+UL : azote liquide + traitement avec la solution d' « unloading » ; 15jrs : après 15 jours de culture sur un milieu standard de prolifération. Les différentes lettres minuscules indiquent des différences significatives entre les conditions du protocole de cryoconservation, selon le test de Duncan ($P < 0,05$).

Plasmolyse %						
Traitement	T	Pré	LS	LN	LN+ULS	15jrs
	0 b	-	42,1 a	42,4 a	42,4 a	40,4 a
Traitement		Pré	LS	LN	LN+ULS	15jrs
		0 b	0 b	0 b	0 b	0 b
Traitement				PVS2	LN	15jrs
				0 b	0 b	0 b

Il semble également que l'application de la solution d'unloading n'entraîne aucun retour vers la valeur du témoin et que c'est le traitement dans la solution de loading qui induit la plasmolyse la plus importante chez les cellules de PopI non prétraitées.

4.2.3.1.3. Cellules embryogènes (Population II)

Le pourcentage de plasmolyse est significativement plus élevé par rapport au témoin non traité dans toutes les conditions expérimentales (Tableau 13). On observe une augmentation très importante de la plasmolyse après le prétraitement chez les PEM et après le traitement dans la solution de loading chez les PEM non prétraitées (52,4 et 51,7% respectivement). Le traitement dans la solution d'unloading n'entraîne pas de changements significatifs au niveau de la plasmolyse qui est entre 49,3 et 54,2 %. Quinze jours après le transfert sur le milieu standard de prolifération, le pourcentage de plasmolyse reste important (entre 45,5 et 54,5 %).

Nous résultats suggèrent donc que l'application de la solution d'unloading ne cause aucun retour vers la valeur du témoin et que c'est le traitement dans la solution de loading qui induit la

plasmolyse la plus importante chez les cellules de PopII, non prétraitées, alors que c'est le prétraitement qui l'induit chez les PEM prétraitées et que l'application de la solution de PVS2 n'induit pas de plasmolyse supplémentaire.

Tableau 13 État de plasmolyse (% par rapport au témoin non traité) des cellules embryogènes (Population II) des PEM de palmier dattier de la variété Sokary en fonction de l'étape du protocole de vitrification en gouttes utilisé. T : témoin non traité ; Pré : prétraitement sur un milieu 0,5M de saccharose ; LS : traitement avec la solution de « loading » ; PVS2 : traitement avec la solution de vitrification PVS2; LN : azote liquide ; LN+UL : azote liquide + traitement avec la solution d' « unloading » ; 15jrs : après 15 jours de culture sur un milieu standard de prolifération. Les différentes lettres minuscules indiquent des différences significatives entre les conditions du protocole de cryoconservation, selon le test de Duncan ($P < 0,05$).

Plasmolyse %						
Traitement	T	Pré	LS	LN	LN+ULS	15jrs
	0 d	-	52,4 ab	52,6 ab	54,2 ab	54,2 ab
Traitement		Pré	LS	LN	LN+ULS	15jrs
		51,7 ab	52,9 ab	49 bc	49,3 ab	45,5 c
Traitement				PVS2	LN	15jrs
				50,2 ab	49,7 ab	54,5 a

4.2.3.2. Rapport nucléocytoplasmique

4.2.3.2.1. Cellules méristématiques

Les mesures du rapport nucléocytoplasmique révèlent des modifications significatives au cours du protocole. Suite au traitement des PEM dans la solution de loading sans prétraitement sur un milieu de 0,5 M de saccharose, une augmentation significative est notée. Le rapport passe de 0,25 chez le témoin à 0,28 après le traitement de loading (Tableau 14). Après le transfert dans l'azote liquide (LN), on ne note aucune modification par rapport au traitement précédent. Après le réchauffement dans le milieu d'unloading ce rapport diminue à 0,15 et à 0,16 au bout de 15 jours du transfert sur le milieu standard de prolifération, valeurs significativement inférieures à celle du témoin non traité.

Dans le cas des PEM prétraitées sur un milieu de 0,5 M de saccharose pendant 3 jours, on observe une augmentation significative de 0,25 chez le témoin à 0,32 après le prétraitement. Aucun changement significatif n'est noté après le traitement de loading ni après la cryoconservation (+LN) (Tableau 14). Quinze min après l'unloading, le rapport nucléocytoplasmique présente un retour vers des valeurs proches du témoin (0,24). La valeur la plus importante (0,42) est observée 15 jours après transfert sur le milieu standard de prolifération. En ce qui concerne les PEM traitées dans la solution de PVS2 pendant 30 min, aucune modification n'est observée par rapport au traitement dans la solution de loading (traitement précédent) mais on note une augmentation significative par

rapport au témoin. Au bout de 15 jours de culture sur le milieu de prolifération, la valeur de rapport nucléocytoplasmique est de 0,37.

Tableau 14 Rapport nucléocytoplasmique des cellules méristématiques des PEM de palmier dattier de la variété Sokary en fonction de l'étape du protocole de vitrification en gouttes utilisé. T : témoin non traité ; Pré : prétraitement sur un milieu 0,5M de saccharose ; LS : traitement avec la solution de « loading » ; PVS2 : traitement avec la solution de vitrification PVS2; LN : azote liquide ; LN+UL : azote liquide + traitement avec la solution d' « unloading » ; 15jrs : après 15 jours de culture sur un milieu standard de prolifération. Les différentes lettres minuscules indiquent des différences significatives entre les conditions du protocole de cryoconservation, selon le test de Duncan ($P < 0,05$).

Rapport n/c						
Traitement	T	Pré	LS	LN	LN+ULS	15jrs
	0,25 e	-	0,28 d	0,30 d	0,15 f	0,16 f
Traitement		Pré	LS	LN	LN+ULS	15jrs
		0,32 d	0,28 d	0,32 d	0,24 e	0,42 d
Traitement				PVS2	LN	15jrs
				0,29 d	0,29 d	0,37 d

4.2.3.2.2. Cellules embryogènes (Population I)

Chez les cellules embryogènes de la PopI, nous observons un comportement similaire à celui de cellules méristématiques. Suite au traitement des PEM dans la solution de loading sans la réalisation du prétraitement sur un milieu de 0,5 M de saccharose, une augmentation significative est notée (de 0,15 chez le témoin et de 0,18 après le traitement de loading) (Tableau 15). Après le transfert dans l'azote liquide (LN), aucun changement n'est noté par rapport au traitement précédent.

Tableau 15 Rapport nucléocytoplasmique des cellules embryogènes (Population I) des PEM de palmier dattier de la variété Sokary en fonction de l'étape du protocole de vitrification en gouttes utilisé. Té : témoin non traité ; Pré : prétraitement sur un milieu 0,5M de saccharose ; LS : traitement avec la solution de « loading » ; PVS2 : traitement avec la solution de vitrification PVS2; LN : azote liquide ; LN+UL : azote liquide + traitement avec la solution d' « unloading » ; 15jrs : après 15 jours de culture sur un milieu standard de prolifération. Les différentes lettres minuscules indiquent des différences significatives entre les conditions du protocole de cryoconservation, selon le test de Duncan ($P < 0,05$).

Rapport n/c						
Traitement	Té	Pré	LS	LN	LN+ULS	15jrs
	0,15 d	-	0,18 bc	0,19 bc	0,10 e	—
Traitement		Pré	LS	LN	LN+ULS	15jrs
		0,21 ab	0,21 ab	0,22 a	0,17 c	0,20 ab
Traitement				PVS2	LN	15jrs
				0,21 ab	0,21 ab	0,22 a

Après le traitement d'unloading, ce rapport diminue significativement à 0,10. Sur les coupes observées, au bout de 15 jours de culture sur le milieu standard de prolifération, les noyaux ne sont pas visibles pour mesurer le rapport nucléocytoplasmique. Chez les PEM prétraitées sur un milieu contenant 0,5 M de saccharose pendant 3 jours, on observe une augmentation du rapport nucléocytoplasmique de 0,15 chez le témoin à 0,21 après le prétraitement. Aucun changement significatif n'est noté après le traitement de loading ni après la cryoconservation (+LN) (Tableau 15). Quinze min après l'unloading (ULS), le rapport nucléocytoplasmique présente une valeur intermédiaire entre le témoin et le traitement de loading des témoins (0,17).

Pour les PEM traitées dans la solution de PVS2 pendant 30 min, aucune modification n'est observée par rapport au traitement dans la solution de loading (Tableau 15). Au bout de 15 jours de culture sur le milieu de prolifération, la valeur du rapport nucléocytoplasmique passe à 0,20 chez les PEM non traitées dans la solution de PVS2 et à 0,22 pour celles traitées avec cette solution.

4.2.3.2.3. Cellules embryogènes (Population II)

Suite au traitement des PEM non prétraitées sur un milieu de 0,5 M de saccharose dans la solution de loading, une augmentation significative du rapport nucléocytoplasmique est observée (de 0,19 chez le témoin et de 0,22 après le traitement de loading) (Tableau 16). La congélation dans l'azote liquide (LN) n'entraîne aucun changement. Après le traitement d'unloading, on observe une augmentation significative du rapport nucléocytoplasmique à 0,32 puis une diminution à 0,15, valeur similaire à celle du témoin non traité, suite aux 15 jours de culture sur le milieu standard de prolifération.

Tableau 16 Rapport nucléocytoplasmique des cellules embryogènes (Population II) des PEM de palmier dattier de la variété Sokary du palmier dattier en fonction de l'étape du protocole de vitrification en gouttes utilisé. Té : témoin non traité ; Pré : prétraitement sur un milieu 0,5M de saccharose ; LS : traitement avec la solution de « loading » ; PVS2 : traitement avec la solution de vitrification PVS2; LN : azote liquide ; LN+UL : azote liquide + traitement avec la solution d' « unloading » ; 15jrs : après 15 jours de culture sur un milieu standard de prolifération. Les différentes lettres minuscules indiquent des différences significatives entre les conditions du protocole de cryoconservation, selon le test de Duncan ($P < 0,05$).

Rapport n/c						
Traitement	Té	Pré	LS	LN	LN+ULS	15jrs
	0,19cd	-	0,22b	0,26b	0,32a	0,15de
Traitement		Pré	LS	LN	LN+ULS	15jrs
		0,23c	0,21c	0,21c	0,20cd	0,16de
Traitement				PVS2	LN	15jrs
				0,21c	0,20cd	0,14e

Chez les PEM prétraitées pendant 3 jours sur un milieu contenant 0,5 M saccharose, on observe une augmentation du rapport nucléocytoplasmique de 0,19 chez le témoin et de 0,23 après le prétraitement. Aucun changement significatif n'est noté après le traitement de loading, de PVS2 ou après la cryoconservation (+LN) et les valeurs du rapport nucléocytoplasmique sont entre 0,20 et 0,21 (Tableau 16). Quinze jours après le transfert sur le milieu standard de prolifération, le rapport nucléocytoplasmique présente des valeurs entre 0,16 et 0,14, respectivement en l'absence et en présence du traitement de PVS2.

4.2.3.3. Taille des cellules

Chez les cellules méristématiques, aucun changement significatif n'est observé lorsque les PEM sont traitées avec LS sans prétraitement au saccharose (Tableau 17). Pour celles qui sont soumises à ce prétraitement, une diminution significative de la taille des cellules de 183 à 120 μm^2 est notée, alors qu'aucune diminution additionnelle n'est enregistrée après le traitement avec la solution de LS ou avec celle de PVS2. Après 15 jours de culture sur le milieu de prolifération la surface augmente de façon significative à 228 μm^2 . Chez les cellules embryogènes de PopI, le traitement avec la solution de LS pour les PEM non prétraitées pendant 3 jours sur un milieu contenant 0,5 M saccharose induit une diminution significative de la taille de la cellule (244 μm^2), mais cette baisse est plus importante lorsque les PEM ont été soumises au prétraitement sur un milieu contenant 0,5 M saccharose (186 μm^2). Ensuite, aucun changement n'est observé après le traitement avec la solution de LS. Après le traitement avec la solution de PVS2, une diminution supplémentaire est notée (142 μm^2). Après 15 jours de culture sur le milieu de prolifération, les cellules PopI retrouvent des valeurs très proches des valeurs du témoin non traité.

Tableau 17 Taille des cellules pour les trois types cellulaires: cellules méristématiques (MC), cellules embryogènes de la population I (Pop I) et cellules embryogènes de la population II (PopII) des PEM de palmier dattier de la variété Sokary en fonction de l'étape du protocole de vitrification en gouttes utilisé. T: témoin non traité ; -Pré+LS : traitement avec la solution de loading sans prétraitement sur un milieu 0,5M de saccharose; Pré : prétraitement sur un milieu 0,5M de saccharose ; +Pré+LS : prétraitement sur un milieu 0,5M de saccharose + traitement avec la solution de loading ; +Pré+LS+PVS: prétraitement sur un milieu 0,5M de saccharose + traitement avec la solution de loading +traitement avec la solution de vitrification ; +Pré+LS+PVS+LN+ULS+15 jrs : prétraitement sur un milieu 0,5M de saccharose + traitement avec la solution de loading + traitement avec la solution de vitrification + traitement avec la solution d'unloading + 15 jours de culture sur un milieu standard de prolifération. Les différentes lettres minuscules indiquent des différences significatives entre les conditions du protocole de cryoconservation, selon le test de Duncan (P <0,05).

Cellules	Taille des cellules (μm)					
	Te	Pré+LS	Pré	+Pré+LS	+Pré+LS+PVS	+Pré+LS+PVS+LN+ULS+15 jrs
MC	183 b	201 b	120 c	121 c	140 c	228 a
PopI	287 a	244 bc	186 d	209 cd	142 e	279 ab
PopII	148 a	144 a	139 a	147 a	149 a	148 a

Pour les cellules embryogènes de PopII, aucune différence significative de taille n'est observée en suivant les différentes étapes successives du protocole de DV (Tableau 17).

4.2.3.4. Teneur en protéines de réserve

Les mesures effectuées afin d'estimer la teneur en protéines de réserve chez les cellules méristématiques et les cellules embryogènes (Population I) montrent chez les témoins non traités une teneur de 11,17% chez les cellules méristématiques et de 8,20% chez les cellules embryogènes de la PopI (Tableau 18).

Tableau 18 Teneur en protéines de réserve des cellules méristématiques (MC) et des cellules embryogènes de la population I (Pop I) des PEM de palmier dattier de la variété Sokary en fonction de l'étape du protocole de vitrification en gouttes utilisé. T : témoin non traité ; Pré : prétraitement sur un milieu 0,5M de saccharose ; LS : traitement avec la solution de « loading » ; PVS2 : traitement avec la solution de vitrification PVS2 ; LN : azote liquide ; LN+UL : azote liquide + traitement avec la solution d'« unloading » ; 15jrs : après 15 jours de culture sur un milieu standard de prolifération. Les différentes lettres minuscules indiquent des différences significatives entre les conditions du protocole de cryoconservation, selon le test de Duncan ($P < 0,05$).

Cellules	Protéines de réserve %					
	T	Pré	LS	LN	LN+ULS	15jrs
MC	11,17 a	-	2,74 b	2,68 b	2,87 b	0 c
PopI	8,20 a	-	2,31 b	2,32 b	2,68 b	0 c
		Pré	LS	LN	LN+ULS	15jrs
MC		3,22 b	3,19 b	3,06 b	2,98 b	2,75 b
PopI		2,12 b	2,36 b	2,85 b	2,81 b	1,60 b
				PVS2	LN	15jrs
MC				4,2 b	4,09 b	5,23 b
PopI				3,02 b	2,95 b	3,09 b

Ensuite, ce pourcentage diminue et il se situe entre 2,68 et 5,23 % sans différences significatives entre les traitements pour les cellules méristématiques et entre 1,60 et 3,09 % sans différences significatives entre les traitements pour les cellules de la PopI. Au bout de 15 jours de culture sur le milieu de prolifération, nous n'avons pas calculé la teneur en protéines de réserve chez les cellules non prétraitées de deux types cellulaires (méristématiques et ceux de la PopI) car sur les coupes histologiques observées, nous n'avons pas noté leur présence (voir Fig. 16 et 17, E). Pour la même raison, aucune mesure n'a été effectuée chez les cellules de la PopII (voir Fig. 18).

4.2.3.5. Forme du noyau

Les observations qualitatives ont révélé des changements de la forme du noyau en fonction du traitement. Dans cette étude, nous utilisons le degré de circularité comme paramètre d'évaluation. Les valeurs de la circularité se situent entre 0 et 1,0 qui indique le cercle parfait.

4.2.3.5.1. Cellules méristématiques

Chez les cellules méristématiques du témoin, la forme du noyau est circulaire avec un degré de circularité de 0,97 (Tableau 19). Après le traitement de loading, le noyau est déformé et sa circularité diminue à 0,91. La cryoconservation ne cause pas de changements significatifs. Suite au traitement d'unloading, la circularité augmente significativement à 0,96 puis elle diminue significativement à 0,88 après 15 jours de culture sur un milieu standard de prolifération. Les PEM prétraitées sur un milieu de saccharose à 0,5M ne présentent pas de changements importants au cours des différentes étapes du protocole et les valeurs de circularité varient de 0,96 à 0,97.

Tableau 19 Degré de circularité du noyau des trois types cellulaires: cellules méristématiques (MC), cellules embryogènes de la population I (Pop I) et cellules embryogènes de la population II (PopII) des PEM de palmier dattier de la variété Sokary en fonction de l'étape du protocole de vitrification en gouttes utilisé. T: témoin non traité ; Pré : prétraitement sur un milieu 0,5M de saccharose ; LS : traitement avec la solution de « loading » ; LS+PVS2 : traitement avec la solution de vitrification PVS2 après traitement avec la solution de « loading » ; LN : azote liquide ; LS+LN+UL : traitement avec la solution de « loading » + azote liquide + traitement avec la solution d' « unloading » ; 15jrs : après 15 jours de culture sur un milieu standard de prolifération. Les différentes lettres minuscules indiquent des différences significatives entre les conditions du protocole de cryoconservation, selon le test de Duncan ($P < 0,05$).

Cellules	Circularité du noyau					
	T	Pré	LS	LN	LN+ULS	15jrs
MC	0,97 a	-	0,91 c	0,90 c	0,96 b	0,88 d
PopI	0,97 a	-	0,90 c	0,88 c	0,95 ab	-
PopII	0,96 a	-	0,77 ef	0,85 b	0,85 b	0,80 cd
		Pré	LS	LN	LN+ULS	15jrs
MC		0,97 a	0,96 ab	0,96 ab	0,96 ab	0,96 ab
PopI		0,97 ab	0,91 c	0,97 ab	0,97 ab	0,97 ab
PopII		0,82 bc	0,74 ef	0,73 f	0,79 cd	0,78 de
			PVS2	LN	LN	15jrs
MC				0,97 a	0,96 ab	0,97 a
PopI				0,95 b	0,92 c	0,96 ab
PopII				0,75 ef	0,79 cd	0,79 cd

4.2.3.5.2. Cellules embryogènes (Population I)

Chez les cellules embryogènes (Population I) du témoin, la forme du noyau est également circulaire avec un degré de circularité de 0,97 (Tableau. 19). Après le traitement de loading, le noyau est déformé et sa circularité diminue à 0,90 puis à 0,88 après la cryoconservation. Suite au traitement d'unloading, la circularité augmente et devient proche du témoin non traité (0,95). Après

15 jours de culture sur le milieu standard de prolifération, les noyaux ne sont plus visibles, donnant un degré de circularité de 0%.

Chez les PEM prétraitées sur un milieu contenant 0,5M de saccharose, la circularité du noyau, après le prétraitement, reste similaire au témoin non traité. Nous observons ensuite une diminution du degré de la circularité à 0,91 suite au traitement de loading. Après la cryoconservation, le degré de circularité retrouve la valeur du témoin non traité (0,97). L'application de la solution de PVS2 entraîne une légère déformation puis une déformation plus importante (une circularité de 0,92) suite à la congélation dans l'azote liquide. Après 15 jours de culture sur un milieu standard de prolifération, on observe un retour à des valeurs très proches du témoin non traité.

4.2.3.5.3. Cellules embryogènes (Population II)

Les cellules embryogènes (Population II) présentent un taux de déformation très élevé par rapport au témoin non traité (Tableau. 19). Les mesures du degré de circularité du noyau chez les PEM non prétraitées montrent des valeurs qui se situent entre 0,77 (après le traitement de LS) et 0,85 (après la congélation dans l'azote liquide). Chez les PEM prétraitées, une diminution du degré de circularité à 0,82 est notée après 3 jours du prétraitement puis une forte diminution est induite suite au traitement de loading (0,74). Le traitement avec PVS2 n'entraîne pas de changements significatifs par rapport au traitement de loading. Après le traitement d'unloading et la culture pendant 15 jours sur un milieu standard de prolifération, on ne constate pas de retour à la valeur du témoin et le degré de circularité est compris entre 0,78 et 0,79.

4.3. Discussion

Les observations qualitatives de l'impact des étapes successives du protocole de DV sur la structure histologique des PEM de la variété Sokary que nous avons réalisées, ont montré des différences entre les trois catégories de cellules observées. Les cellules de la PopII prétraitées ou non prétraitées présentent le pourcentage de plasmolyse le plus important. Nos observations ont également montré que ce sont les cellules méristématiques et celles de la PopI prétraitées qui ne présentent de plasmolyse ni après le prétraitement sur un milieu enrichi en saccharose à 0,5 M ni après l'application de la solution de loading et de PVS2. Chez les cellules des trois types cellulaires non prétraitées, c'est le traitement dans la solution de loading qui induit la plasmolyse la plus importante, alors que chez les cellules de PopII prétraitées, c'est le prétraitement qui semble générer la plasmolyse la plus importante. En absence de prétraitement et après le traitement des PEM avec la solution d'unloading, nous n'avons pas observé de retour vers un état de plasmolyse proche de celui du témoin non traité. Nous avons remarqué des changements de la forme du noyau au cours de différentes étapes du protocole. Enfin, nous n'avons pas observé de différences dans l'aspect général des cellules méristématiques et les cellules de la PopI prétraitées et cryoconservées après 15 jours de culture sur le milieu standard de prolifération par rapport au témoin non traité.

Les analyses quantitatives effectuées ont permis de préciser ces observations qualitatives en les chiffrant. Ainsi, le prétraitement induit des différences entre les catégories de cellules observées. Chez les cellules de PopII, le prétraitement ou le traitement de loading (chez celles non prétraitées) entraînent une plasmolyse des cellules comparables et sans différences significatives (d'environ 52% par rapport à leur état initial). Le traitement de loading et de PVS2 n'entraîne pas de différence significative de l'état de plasmolyse de ces cellules par rapport au prétraitement. Le pourcentage de la plasmolyse est d'environ 24 % chez les cellules méristématiques et de 42% chez celles de PopI. Les mesures du rapport nucléocytoplasmique réalisées sur les trois groupes cellulaires après les différentes étapes du protocole ont révélé, en fonction des différents traitements, des différences significatives, ce qui indique que le noyau et le cytoplasme des cellules étudiées ont subi des modifications de volume hétérogènes et non comparables. L'étude de la circularité du noyau a confirmé la déformation causée par les différents traitements. La déformation la plus importante chez les trois types de cellules a été notée chez les cellules non prétraitées après le traitement de loading avec un degré de circularité de 0,91, 0,90, 0,77 pour respectivement les cellules méristématiques, de la PopI et de la PopII. Cette étude a également révélé des différences entre les trois groupes de cellules observées. En effet, après le prétraitement, les cellules méristématiques ne présentent pas de déformation alors que les cellules de la PopII semblent très déformées avec une diminution significative du degré de circularité à 0,82 après le prétraitement puis à 0,74 après le

traitement de loading. Le traitement avec PVS2 n'entraîne pas de déformation supplémentaire. Les cellules de la PopI montrent des réactions intermédiaires ressemblant à celle des cellules de PopII mais beaucoup moins accentuées. Ce travail confirme donc bien le grand intérêt des techniques d'analyse d'images, qui permettent de quantifier et de préciser les observations qualitatives réalisées en histologie classique, comme cela a déjà été souligné en les appliquant dans un autre contexte (Mankessi *et al.*, 2010; Mankessi *et al.*, 2011) et en les utilisant en relation avec la cryoconservation de tissus végétaux (Gallard, 2008; Barraco *et al.*, 2014; Salma *et al.*, 2014b).

L'impact d'un protocole de cryoconservation au niveau qualitatif sur la structure des tissus et cellules de différentes espèces végétales a fait l'objet de nombreuses études histologiques. En fonction du type d'explant cryoconservé ainsi de la technique de cryoconservation employée, l'étape du protocole qui a l'impact le plus important sur la plasmolyse varie. Chez des apex de vitroplants de caféiers cryoconservés par la technique d'encapsulation-déshydratation, Mari *et al.* (1995) ont montré que la plasmolyse apparaît essentiellement lors de la phase de déshydratation physique des explants, qui suit le traitement avec des solutions concentrées en saccharose. Dans l'étude de Zeng *et al.* (2005), les auteurs ont trouvé que c'est la solution de vitrification qui induit la plasmolyse la plus importante lors de la congélation d'apex de papayer par vitrification. A l'opposé, Gallard (2008) sur des apex de *Pelargonium* cryoconservés par vitrification en gouttes et Yap *et al.* (2011) sur des apex de *Garcinia cowa*, rapportent que la plasmolyse s'observe après le traitement avec la solution de loading. Barraco *et al.* (2014), sur d'apex de vitroplants d'igname cryoconservés par encapsulation-déshydratation, observent une plasmolyse intense des cellules après un prétraitement pendant 24 h dans une solution à 1,25 M de saccharose. La déshydratation physique qui suit ce prétraitement n'entraîne pas de plasmolyse supplémentaire. Sur les racines de *R. akane* lors de la cryoconservation par vitrification en goutte, c'est le prétraitement qui induit le pourcentage de plasmolyse le plus important puis une augmentation supplémentaire est obtenue après le traitement de loading alors que le traitement avec la solution de vitrification (PVS3) n'induit pas de plasmolyse supplémentaire (Salma *et al.*, 2014b). Nos résultats sont en accord avec ceux de Barraco *et al.* (2014) et Salma *et al.* (2014b) concernant l'effet du prétraitement chez les cellules de la PopII.

À notre connaissance, seuls deux rapports ont réalisé une analyse qualitative comparable à celle que nous présentons dans ce chapitre, celui de Barraco *et al.* (2014) sur d'apex de vitroplants d'igname et de Salma *et al.* (2014b) sur les « hairy roots » de *R. akane*. Les différences observées concernant l'effet du prétraitement au saccharose et des traitements avec les solutions de loading et de vitrification sur l'état de plasmolyse des cellules méristématiques et celles de la PopI par rapport au travail de Salma *et al.* (2014b) pourraient être mises, en rapport avec la nature des cellules

observées. Dans l'étude de Salma *et al.* (2014b) les explants sont des segments racinaires dont les cellules sont beaucoup plus différenciées (cellules du cortex, de l'endoderme et du péricycle), alors que les cellules étudiées dans ce travail sont des cellules méristématiques et embryogènes. La cellule végétale est généralement enveloppée par la paroi qui lui donne également sa forme. Elle est essentiellement composée de polymères glucidiques, cellulose et pectine, de protéines pariétales et éventuellement d'autres composées de nature phénolique (lignine et subérine). En général, la paroi est composée de trois parties. D'abord, la paroi primaire qui est de nature pecto-cellulosique. Cette partie est une partie flexible et extensible, ce qui permet la croissance cellulaire (Buchanan *et al.*, 2000). La deuxième partie est la paroi secondaire, qui apparaît lors de la différenciation de la cellule. Elle est constituée de cellulose et d'hémicellulose et est enrichie en composés phénoliques : lignine (pour renforcer la rigidité), cutine et subérine (pour l'imperméabiliser). Enfin, la lamelle moyenne est la partie la plus externe de la paroi (Buchanan *et al.*, 2000). La paroi assure le maintien et définit la taille et la forme de la cellule végétale. Chez les cellules méristématiques, il n'existe que la paroi primaire (Whaley *et al.*, 1952; Khan, 2001). L'absence de plasmolyse au cours de protocole chez les cellules prétraitées peut être due à la flexibilité de la paroi primaire. Donc, la déshydratation assez lente sur un milieu riche en saccharose permettrait à la paroi cellulaire de suivre la rétraction de cytoplasme provoquée par la sortie de l'eau intracellulaire libre. Barraco *et al.* (2014), sur des apex d'igname, ont également noté une diminution significative de la plasmolyse des cellules méristématiques de 8,23 et de 4,62% (après la dissection) à 0% (après un prétraitement d'une nuit) sur un milieu à 0,3 M de saccharose. Les différences observées concernant l'effet du prétraitement au saccharose et des traitements avec les solutions de loading et de vitrification sur le degré de plasmolyse (de rétraction, dans notre cas) des cellules pourraient être mises en rapport avec la concentration de saccharose et aussi la durée du prétraitement. La durée du prétraitement utilisée dans notre protocole est de 3 jours, qui est suffisante pour que le saccharose puisse être absorbé par les cellules, augmentant ainsi la concentration en solutés intracellulaires (Stanzel *et al.*, 1988; Sagishima *et al.*, 1989). De plus, le traitement avec la solution de loading (20 min) et celui avec la solution de vitrification (30 min) est de courte durée par comparaison avec le prétraitement au saccharose. Cela pourrait expliquer l'absence de plasmolyse (de rétraction des cellules) suite au traitement avec la solution de loading et la solution de vitrification. Du fait de ces durées de traitement très brèves par rapport à la durée du prétraitement, aucun des composants des solutions de loading et de vitrification ne peut pénétrer dans le cytoplasme des cellules (Sakai *et al.*, 2008). Ils resteraient dans l'espace intercellulaire et contribueraient à la déshydratation des cellules (solution de loading) et à faciliter la vitrification des solutés intracellulaires au cours du refroidissement chez les cellules traitées avec la solution de PVS2 (Kim *et al.*, 2005).

Chez les cellules non prétraitées, l'exposition à la solution de loading cause un pourcentage de plasmolyse entre 24, 40 et 50% selon les types cellulaires. Cela peut être expliqué par la vitesse de rétraction du cytoplasme plus importante par rapport au celle de paroi, ce qui entraîne le détachement du cytoplasme de cette dernière. Donc, notre hypothèse suggère que le prétraitement pendant 3 jours permet une déshydratation accompagnée par une rétraction homogène du cytoplasme avec la paroi cellulaire à un niveau suffisant pour survivre à la congélation après seulement 20 min dans la solution de loading. Les mesures de rapport nucléocytoplasmique renforcent cette hypothèse car nous avons noté une augmentation significative de la valeur de ce rapport chez les trois types cellulaire après le prétraitement au saccharose et après le traitement de loading chez les PEM non prétraitées par rapport au témoin non traité. Une telle augmentation ne peut être expliquée que par une diminution de la taille du cytoplasme. Chez les cellules non prétraitées, cette diminution est due à la plasmolyse, alors que chez les cellules prétraitées cette diminution est très probablement le résultat d'une rétraction de l'ensemble du cytoplasme avec la paroi cellulaire. En suivant l'évolution des valeurs de rapport nucléocytoplasmique, nous n'observons pas de changements significatifs après le traitement de loading chez les trois types cellulaires, ni après le traitement avec la solution de PVS2 chez les cellules qui ont subi ce traitement. Donc, aucune rétraction supplémentaire n'a pas eu lieu après ces deux traitements. Afin de tester cette hypothèse nous avons sélectionné certains traitements après des étapes clés du protocole de DV pour mesurer les changements de la taille de la cellule chez les trois types cellulaires étudiées. Les mesures réalisées ont confirmé notre hypothèse de la rétraction des cellules. Ces observations sont en accord avec celles de Barraco *et al.* (2014) et Salma *et al.* (2014b) concernant l'effet du prétraitement avec le saccharose, et avec celles de Gallard (2008) et Salma *et al.* (2014b) concernant l'effet des solutions de loading et de vitrification sur l'état de plasmolyse (rétraction des cellules dans notre étude).

La diminution de la teneur en protéines, notée soit dès le traitement de loading, soit dès le prétraitement, est très probablement due aux changements de l'intensité de la coloration bleue observée après les traitements avec les différentes solutions au cours des différentes étapes au protocole de cryoconservation utilisée et non aux changements des valeurs réelles de la teneur en protéines de réserves. En fonction de l'intensité de coloration, la capacité de détection des protéines de réserves peut varier significativement. Quinze jours après la cryoconservation chez les PEM prétraitées, le temps que la machinerie cellulaire se mette en route, on note une coloration très proche de celle du témoin non traité et, par conséquent, une augmentation de la teneur en protéines de réserve.

L'étude d'Alla-N'Nan *et al.* (2014) sur des plumules et des embryons de cocotier, a montré que les dommages qui sont les responsables de la survie ou de la mort des explants cryoconservés peuvent être divisés en trois types. La première de ces modifications concerne la plasmolyse des cellules, la condensation de la chromatine, le changement dans la conformation de l'ADN et du noyau et l'arrêt de la mitose. Le second degré de changements est la rétraction du cytoplasme et l'augmentation du volume périplasmique. Le troisième degré de modifications concerne la déformation des parois, la lyse de la membrane plasmique, qui entraîne une déformation de la cellule et l'éclatement du noyau. Selon les mêmes auteurs, les deux derniers degrés de modifications sont irréversibles et correspondent à l'absence de reprise de croissance des explants (Alla-N'Nan *et al.*, 2014). Plusieurs études ont montré des modifications des noyaux après certaines étapes du protocole de cryoconservation notamment, la présence de noyaux pycnotiques densément colorés (Bagniol *et al.*, 1992; Gallard, 2008; Barraco *et al.*, 2014; Salma *et al.*, 2014b). À notre connaissance, ce travail représente la première étude du degré de déformation du noyau qui a été effectuée en mesurant leur degré de circularité. Le degré de déformation est très important chez les cellules de la PopII. Chez les cellules méristématiques cette déformation a été seulement notée en absence de prétraitement. Par conséquent, une telle modification de la forme de noyau semble être irréversible et peut très probablement entraîner la mort de ces cellules (Alla-N'Nan *et al.*, 2014).

Pour conclure, les analyses qualitatives réalisées ont permis d'identifier quatre types cellulaires (cellules parenchymateuses, cellules méristématiques, cellules embryogènes séparées en deux populations I et II). Ces analyses ont également permis de noter la présence de une forte plasmolyse chez les trois types cellulaires étudiés en l'absence de prétraitement alors que ce sont uniquement les cellules embryogènes de la PopII qui sont plasmolysées dès le prétraitement. Nous avons ainsi observé une modification de la forme du noyau après les différentes étapes du protocole de cryoconservation. Les analyses quantitatives effectuées ont à la fois confirmé les observations qualitatives et ont fourni des informations plus précises du pourcentage de plasmolyse, du rapport nucléocytoplasmique et notamment du degré de déformation des noyaux. Cette étude illustre encore une fois l'intérêt d'utiliser conjointement des approches qualitatives et quantitatives afin de mieux décrire et préciser les observations faites.

CHAPITRE 5

ÉTUDE DE L'EFFET DES ÉTAPES SUCCESSIVES DU PROTOCOLE DE DV SUR LA MÉTHYLATION DE L'ADN DES PEM

5. Étude de l'effet des étapes successives du protocole de DV sur la méthylation de l'ADN des PEM

5.1. Introduction

L'épigénétique joue un rôle essentiel dans le processus de différenciation des cellules, ce qu'il leur permet d'être reprogrammées afin de générer de nouvelles voies de différenciation (Costa & Shaw, 2007; Kouzarides, 2007). De nouvelles recherches ont montré que les changements dans la méthylation de l'ADN accompagnent la réorganisation de l'architecture nucléaire pendant les processus de développement des plantes et en particulier dans la différenciation cellulaire, la prolifération et la reprogrammation (Kumaran *et al.*, 2008; Meijón *et al.*, 2009; Solís *et al.*, 2012).

L'étude de l'intégrité structurale des PEM a révélé la présence de trois types cellulaires qui réagissent différemment au cours du protocole de DV. Elle a confirmé une déformation importante du noyau chez les cellules mortes alors que le noyau des cellules survivantes a retrouvé un aspect normal. Dans ce chapitre, nous allons suivre les modifications de la méthylation de l'ADN après les différentes étapes du protocole de DV par immunolocalisation des sites de 5mdC (5-methyl-deoxycytidine). Nous allons essayer de savoir si ces modifications peuvent expliquer les différents pourcentages de survie et si ces modifications peuvent être associées aux changements structuraux observés dans le noyau. De plus, plusieurs études ont confirmé la stabilité génétique après la cryoconservation (Helliott *et al.*, 2002; Castillo *et al.*, 2010), ce qui n'est pas toujours le cas dans les études effectuées sur la conformité épigénétique (Heringer *et al.*, 2013; Johnston *et al.*, 2009).

5.2. Observations qualitatives :

Comme expliqué précédemment (voir : 1.6.7.2.3. Application de l'immunolocalisation), l'immunolocalisation sur des tissus végétaux peut être réalisée par deux procédures : directe ou indirecte. Dans notre étude, nous avons appliqué la méthode indirecte où l'on utilise deux anticorps : un anticorps primaire reconnaît et se lie à des épitopes de l'antigène (le site de 5mdC) à localiser et un anticorps secondaire, conjugué à un fluorochrome, reconnaît l'anticorps primaire correspondant. Nos observations ont montré que le signal obtenu se manifeste par un marquage des noyaux avec, dans certains cas, un ou plusieurs spots lumineux à l'intérieur de ce noyau. La présence et l'absence de ce marquage semblent être affectés par le type de tissus.

5.2.1. Tissus différenciés :

Chez la variété Sokary, nous avons noté la présence des tissus différenciés (Fig. 20). Ceci signifie que certains tissus des masses proembryogènes ont commencé le processus de différenciation et la formation d'embryons somatiques. Ces tissus ont été seulement rencontrés sur certaines coupes des certains traitements. Sur les coupes observées, chez le témoin non traité, un

marquage très intense a été détecté. Nous avons remarqué que les tissus de témoin présentaient également une autofluorescence très élevée, ce qui complique parfois la distinction du marquage de l'anticorps. La même observation a été constatée (sauf pour l'autofluorescence qui est nettement moins présente) chez les explants qui ont été prétraités sur un milieu à 0,5M de saccharose puis cryoconservés directement après le traitement de loading (+LN) et ceux cryoconservés après avoir subi un traitement dans le PVS2 (Fig. 20, C, D, E et F). Après 30 jours de culture sur un milieu standard de prolifération, les tissus cryoconservés qui ont été prétraités et incubés dans la solution de PVS2 montraient également un taux élevé de marquage (Fig. 20, G et H).

Chez la variété Sultany, les tissus observés étaient uniquement des masses proembryogènes (PEM). Par conséquent, nous n'avons pas été en mesure de suivre le comportement des tissus différenciés chez cette variété.

5.2.2. Masses proembryogènes PEM :

5.2.2.1. Cellules méristématiques :

Les observations effectuées sur les coupes des explants de la variété Sokary ont montré que, dans les cellules méristématiques, aucun marquage n'a été noté ni chez le témoin non traité ni après les différentes étapes du protocole de cryoconservation (Fig. 19, A,B,C et D).

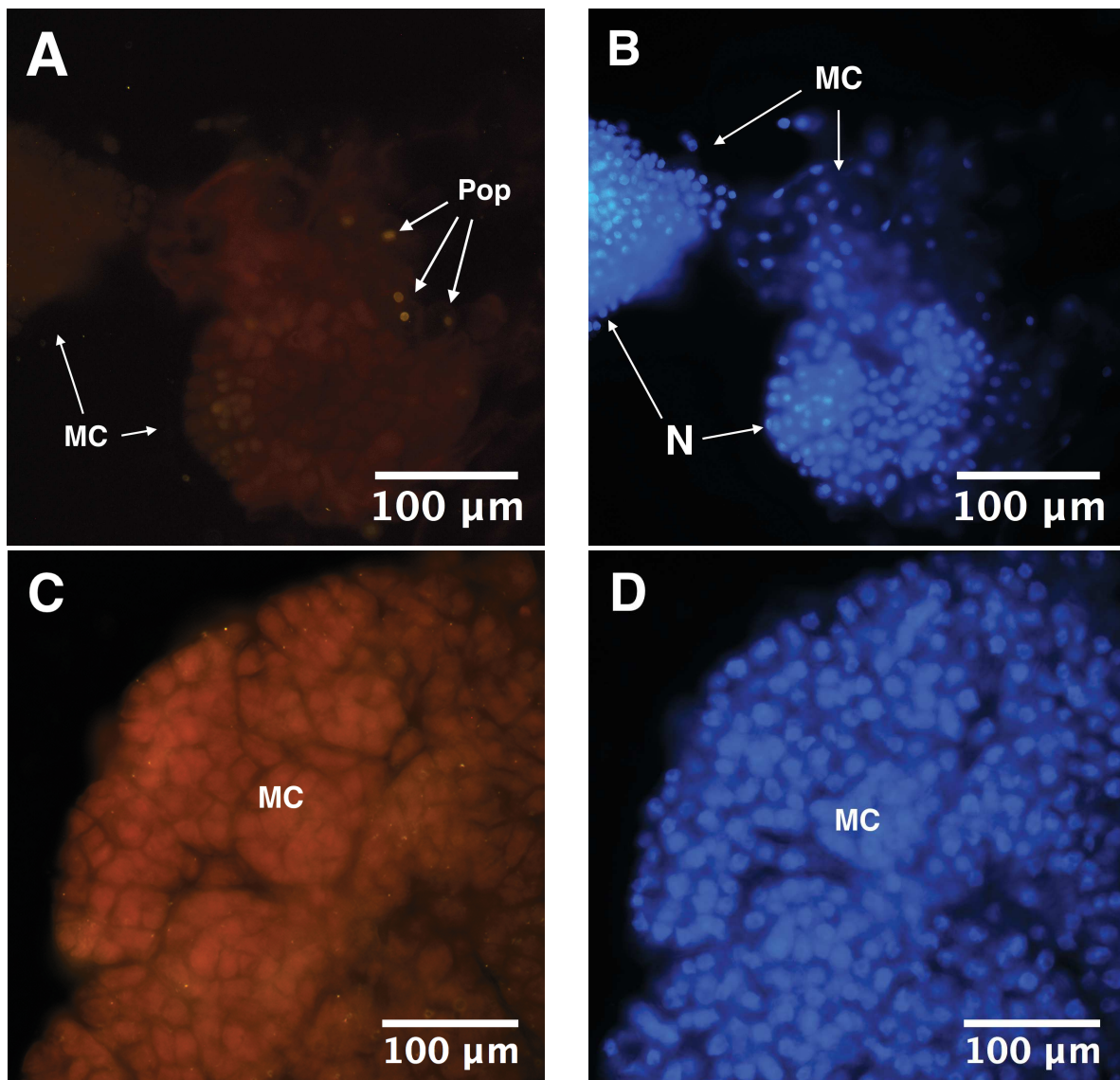
5.2.2.2. Cellules embryogènes :

Dans cette étude, nous n'avons pas séparé ce type cellulaire en deux groupes (cellules embryogènes de PopI et PopII) comme cela a été le cas dans l'étude de l'intégrité structurale. Ceci était dû à l'impossibilité des les distinguer correctement en utilisant seulement la coloration DAPI.

Les observations réalisées sur les cellules embryogènes du témoin non traité ont montré la présence d'un marquage chez certains noyaux (Fig. 21, A et B). Chez les PEM non prétraitées sur un milieu de 0,5 M de saccharose, après le traitement de loading, le même type du marquage a été observé (Fig. 21, C et D). La coloration DAPI a montré que les noyaux apparaissaient déformés. Après la congélation dans l'azote liquide (LN), aucune modification n'a été observée par rapport au traitement précédent. Le noyau était très fortement marqué. Par conséquent, il était impossible de distinguer le nombre de spots. (Fig. 21, E et F). Un mois après le transfert sur le milieu standard de prolifération, le marquage avec le DAPI semblait dispersé dans le cytoplasme alors qu'aucun marquage de l'anticorps n'était observé. (Fig. 21, G et H). Chez les PEM prétraitées pendant 3 jours sur un milieu contenant 0,5 M de saccharose, aucun changement au niveau de marquage n'a été noté par rapport au témoin (Fig. 21, I et J). Les observations effectuées sur les autres conditions n'ont pas montré de changements importants par rapport au témoin non traité (Fig. 21 de K à X).

Chez la variété Sultany, les observations qualitatives réalisées sur le témoin non traité ont montré que les cellules embryogènes étaient bien marquées par l'anticorps et que le marquage était très semblable à celui observé chez la variété Sokary (Fig. 22, A et B). Aucun changement n'a été observé chez les PEM non prétraitées sur un milieu de 0,5 M de saccharose, ni après le traitement de loading (Fig. 22, C et D) ni après la cryoconservation. La coloration DAPI a également montré que les noyaux apparaissaient déformés.

Après 3 jours de prétraitement sur un milieu contenant 0,5 M de saccharose, aucun changement au niveau de marquage n'a été noté par rapport au témoin (Fig. 22, I et J). Les observations effectuées sur les autres conditions n'ont pas montré des changements importants par rapport au témoin non traité (Fig. 22 de K à X). Par contre, chez les PEM prétraitées des deux variétés, qui ont été fixées suite au traitement de loading et de PVS2, le marquage n'était pas clair (Fig. 21 et 22, S et T). Nos observations ont montré des points très marqués à l'intérieur des noyaux méthylés. Ces spots lumineux correspondent très souvent aux chromocentres qui sont des segments d'hétérochromatine condensés dans le noyau (Fig. 19, E et F).



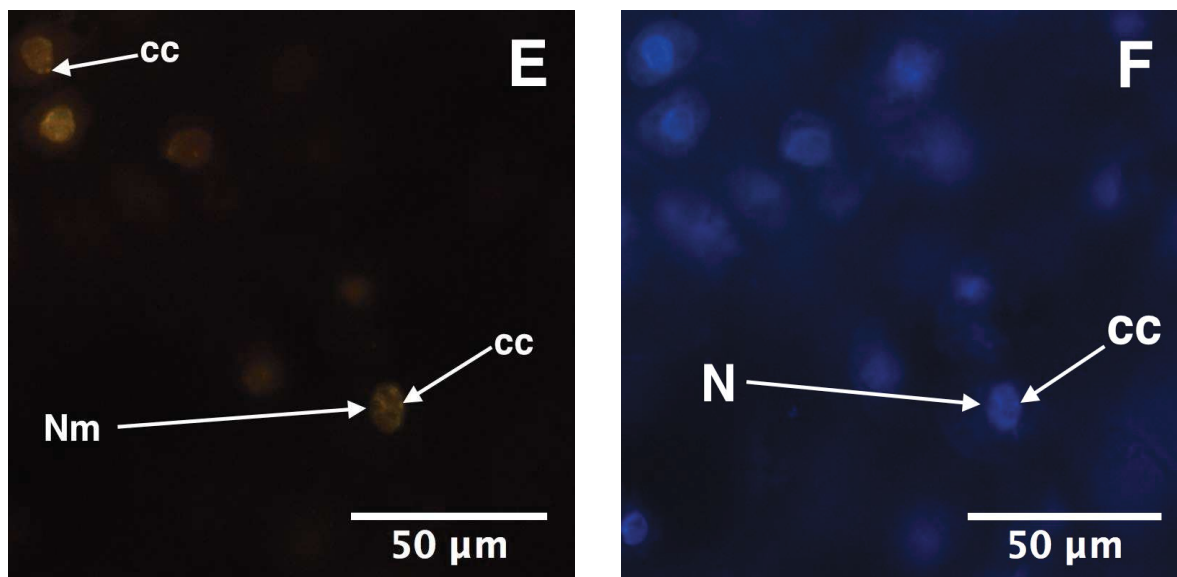
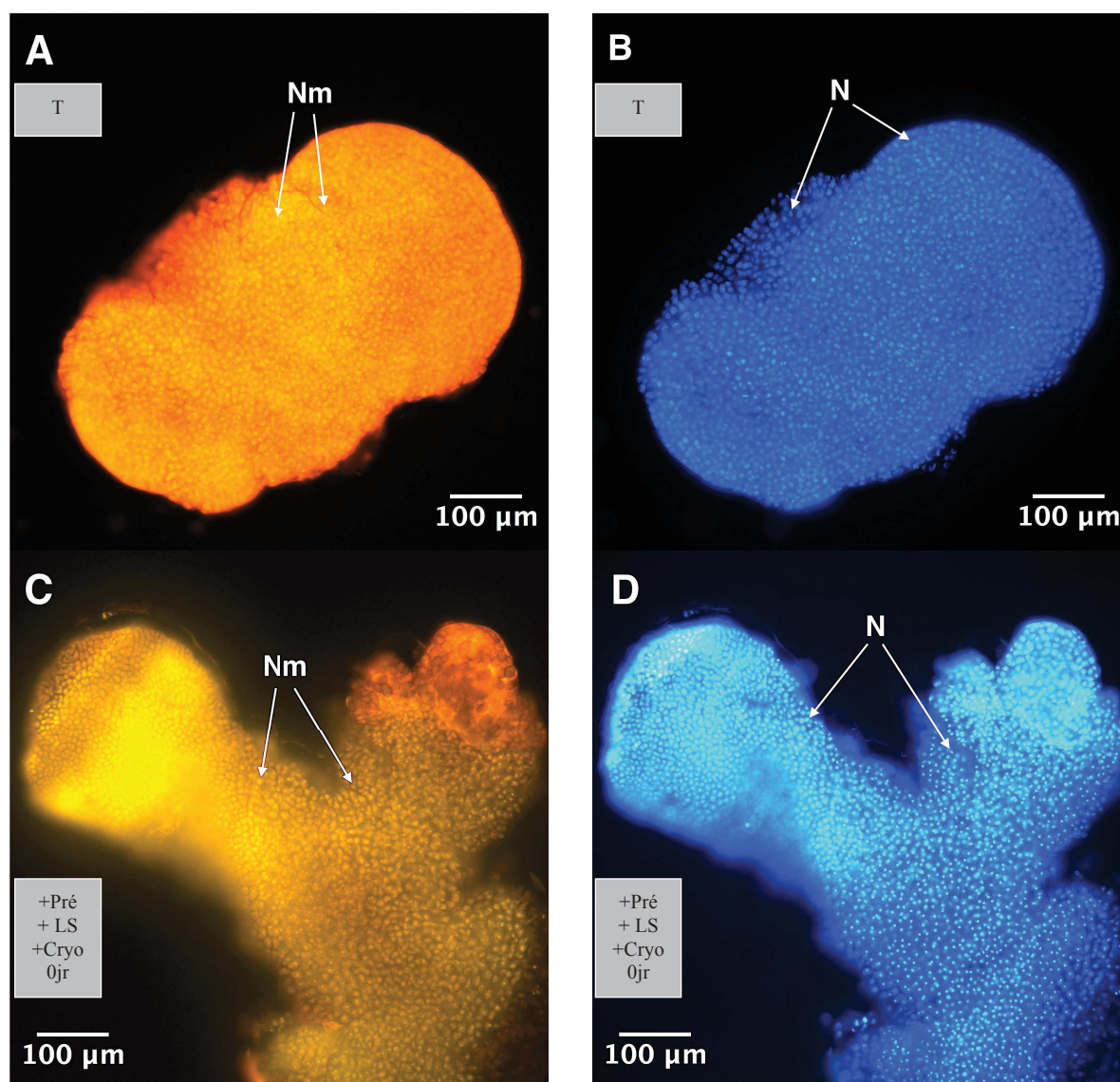


Figure 19 Coupes histologiques de cellules méristématiques chez les PEM témoins non traités de palmier dattier. (A et B): témoin non traité de la variété Sokary. (C et D): témoin non traité de la variété Sultany. N: noyau ; Nm : noyau méthylé ; cc : chromocentre; MC: cellules méristématiques; Pop: cellules embryogènes.



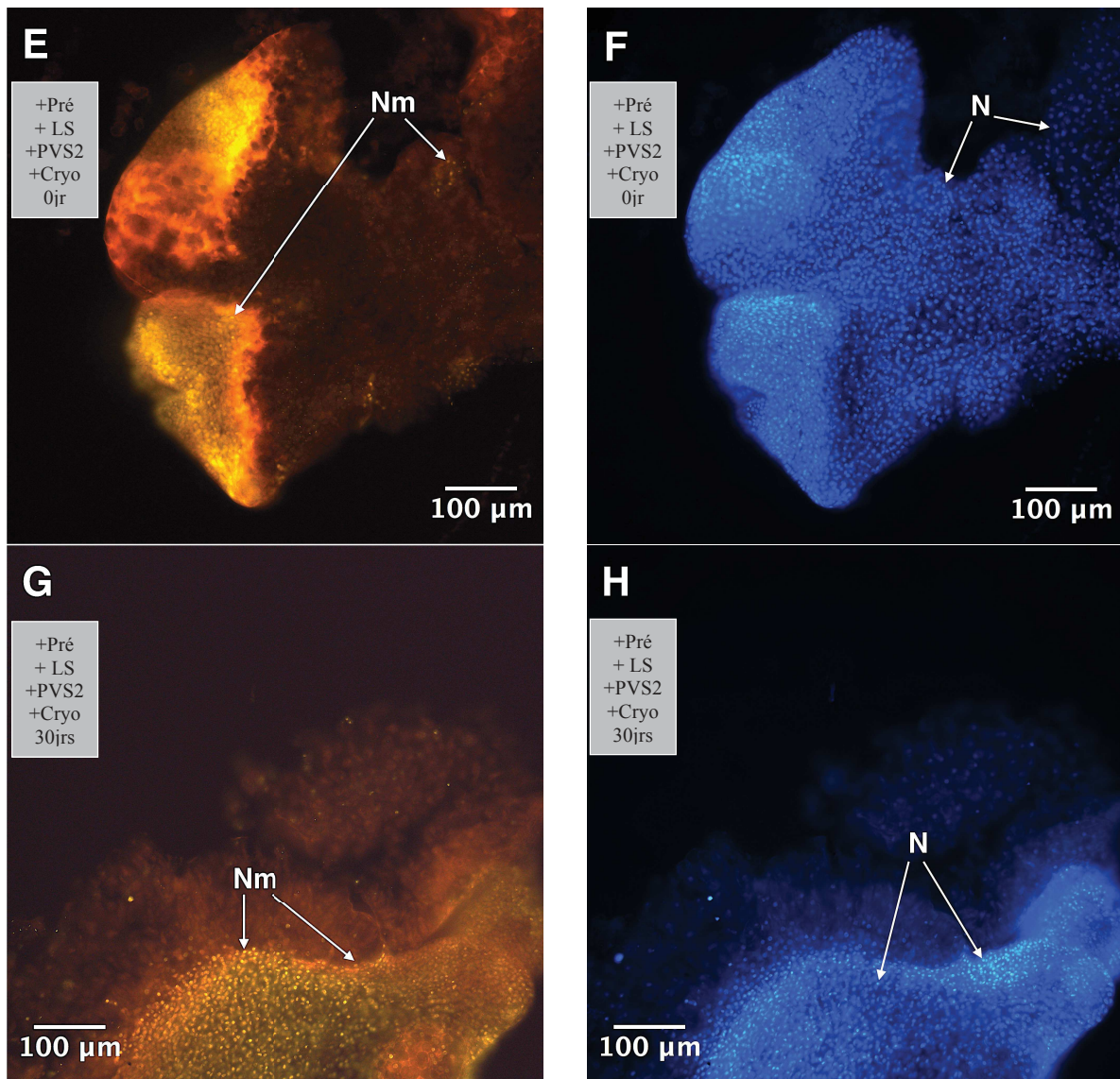
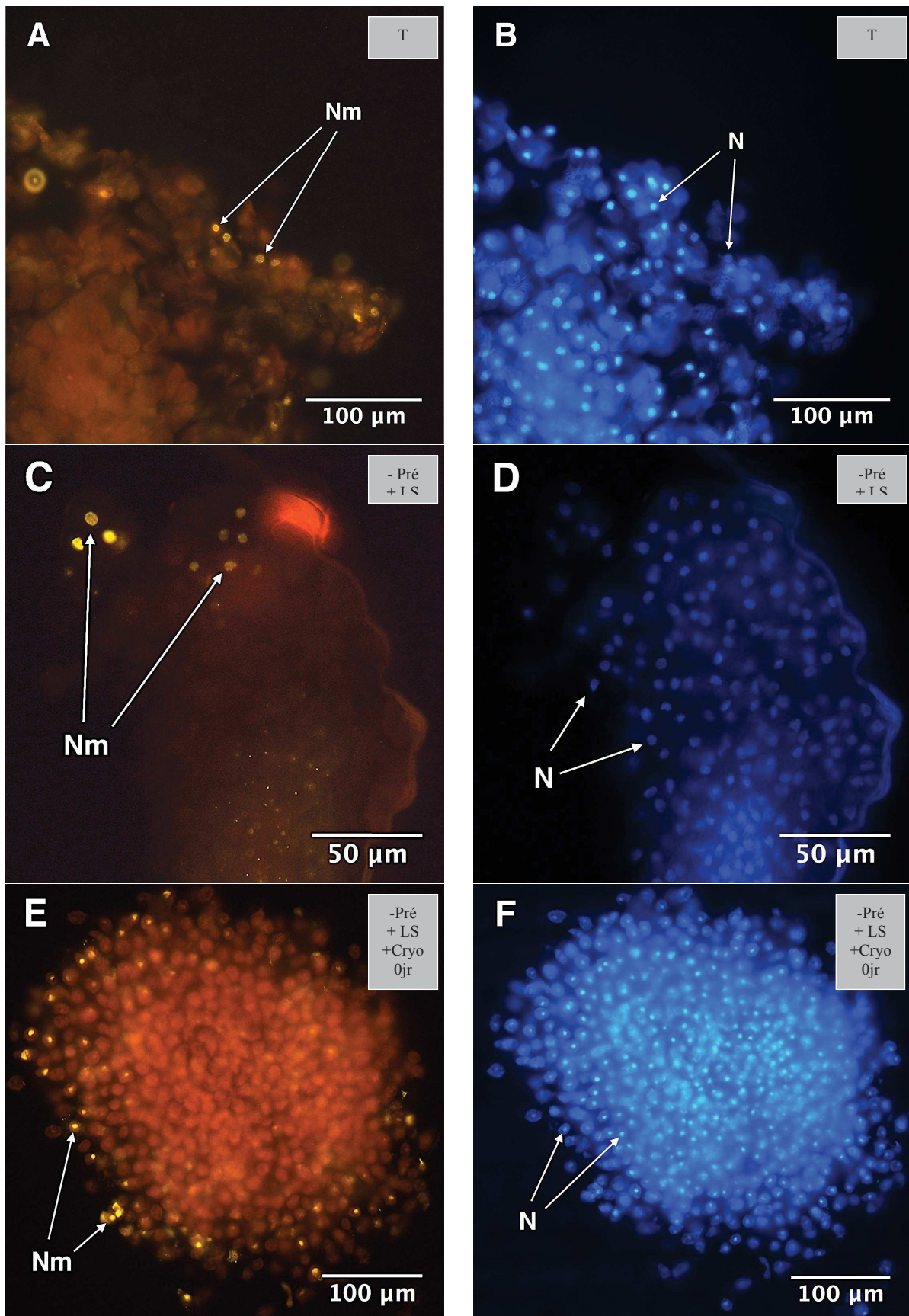
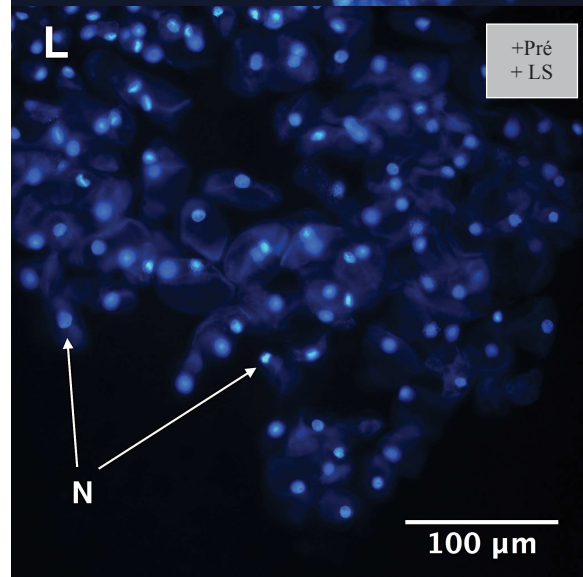
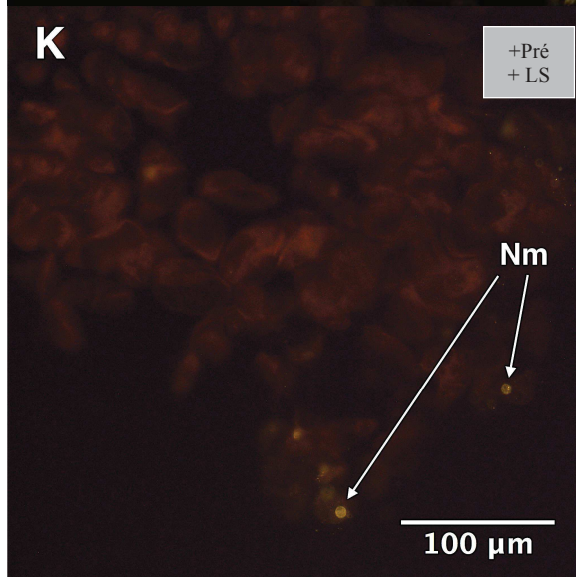
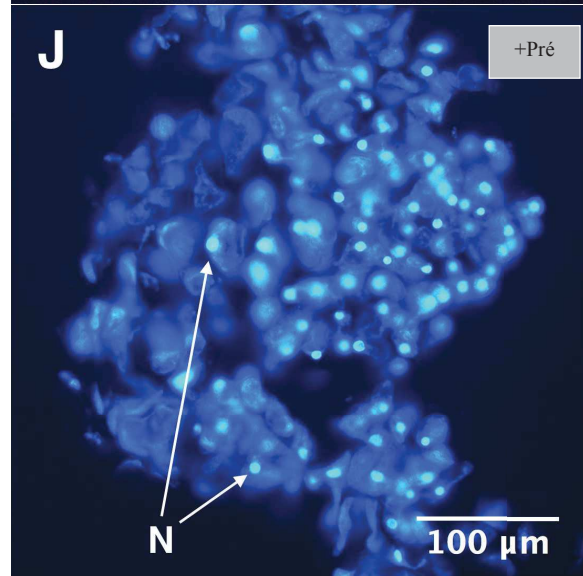
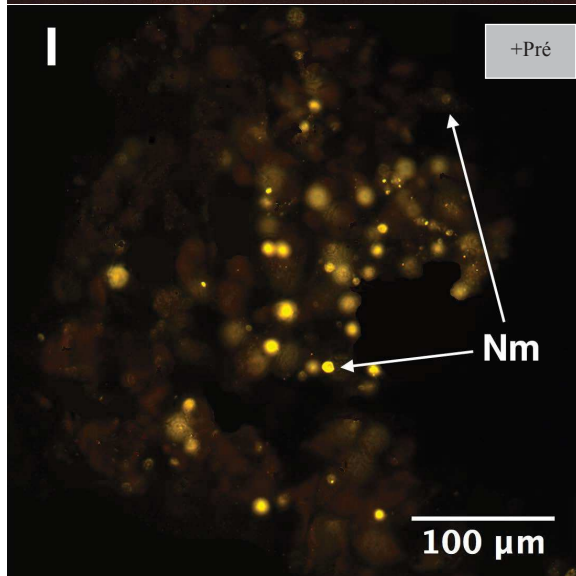
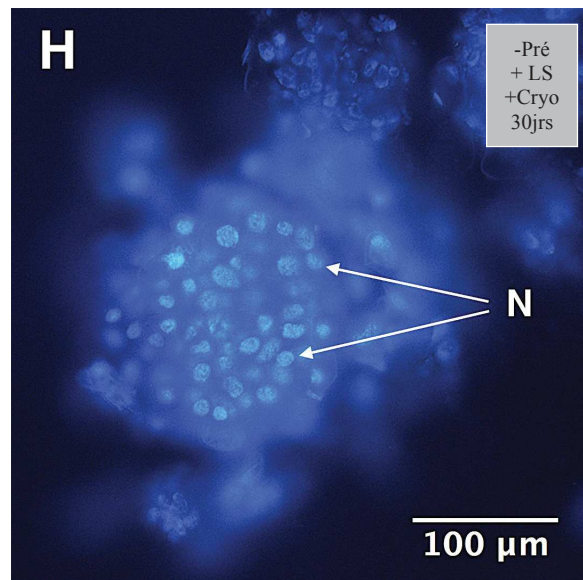
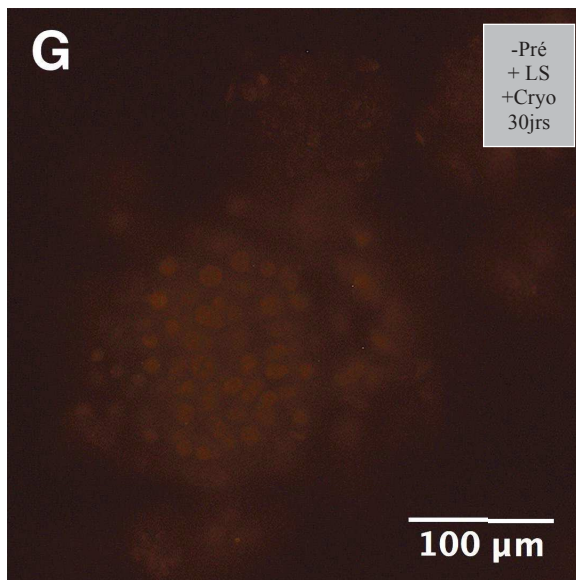
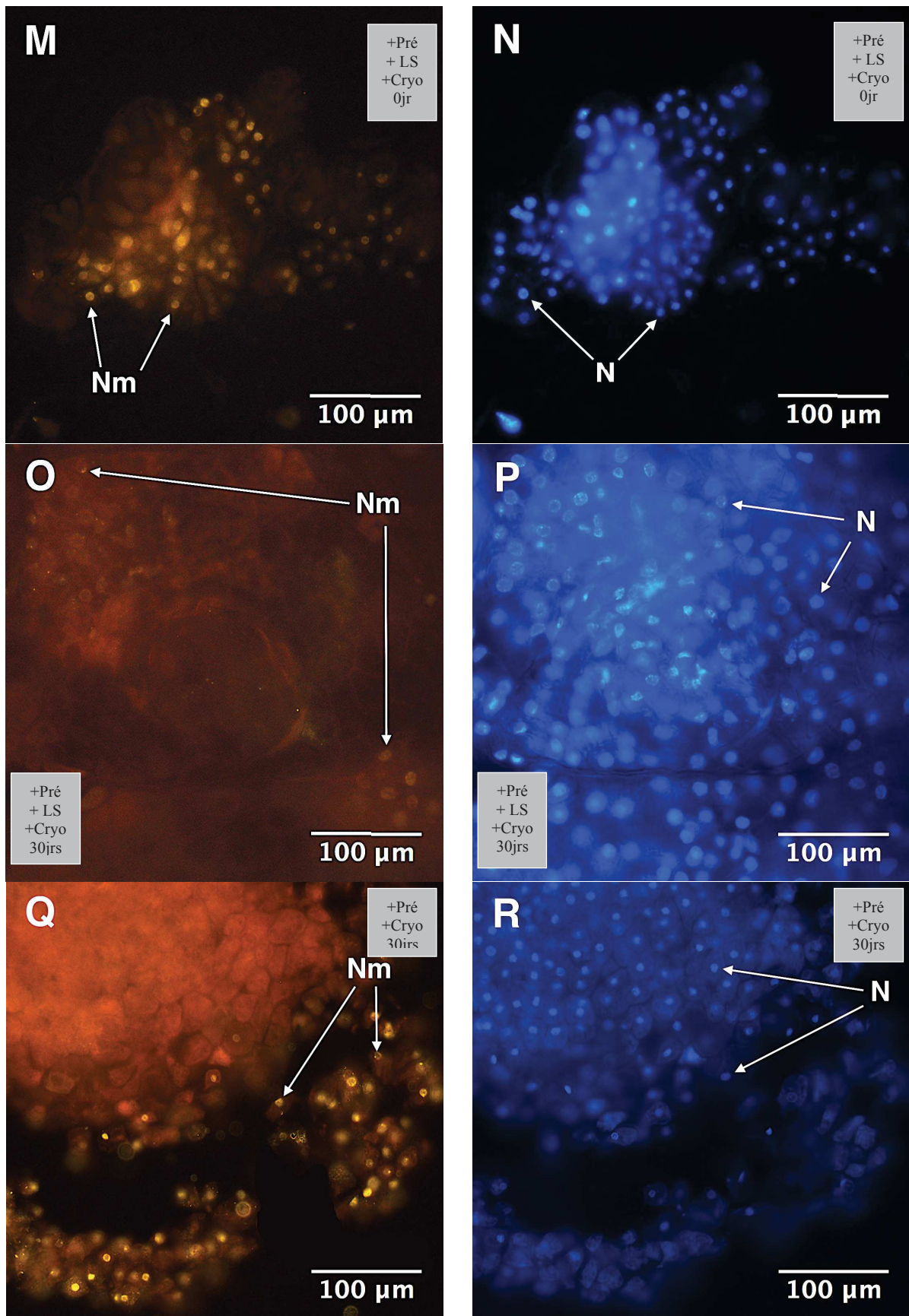


Figure 20 Coupes histologiques des tissus différenciés des PEM de palmier dattier de la variété Sokary après certaines étapes du protocole de cryoconservation par vitrification en gouttes. (A et B): témoin non traité. (C et D) : +pré +LS Cryo 0jr ; (E et F) : +pré+LS+PVS2 Cryo 0jr ; (G et H) : +pré+LS+PVS2 Cryo 30jrs. T : témoin ; -/+ Pré : sans/ avec prétraitement sur un milieu à 0,5M de saccharose ; LS : traitement de loading ; PVS2 : traitement dans la solution de PVS2 ; Cryo 0jr : directement après le transfert sur un milieu standard de prolifération ; Cryo 30jrs : 30jours après le transfert sur un milieu standard de prolifération ; N: noyau ; Nm : noyau méthylé ; cc : chromocentre.







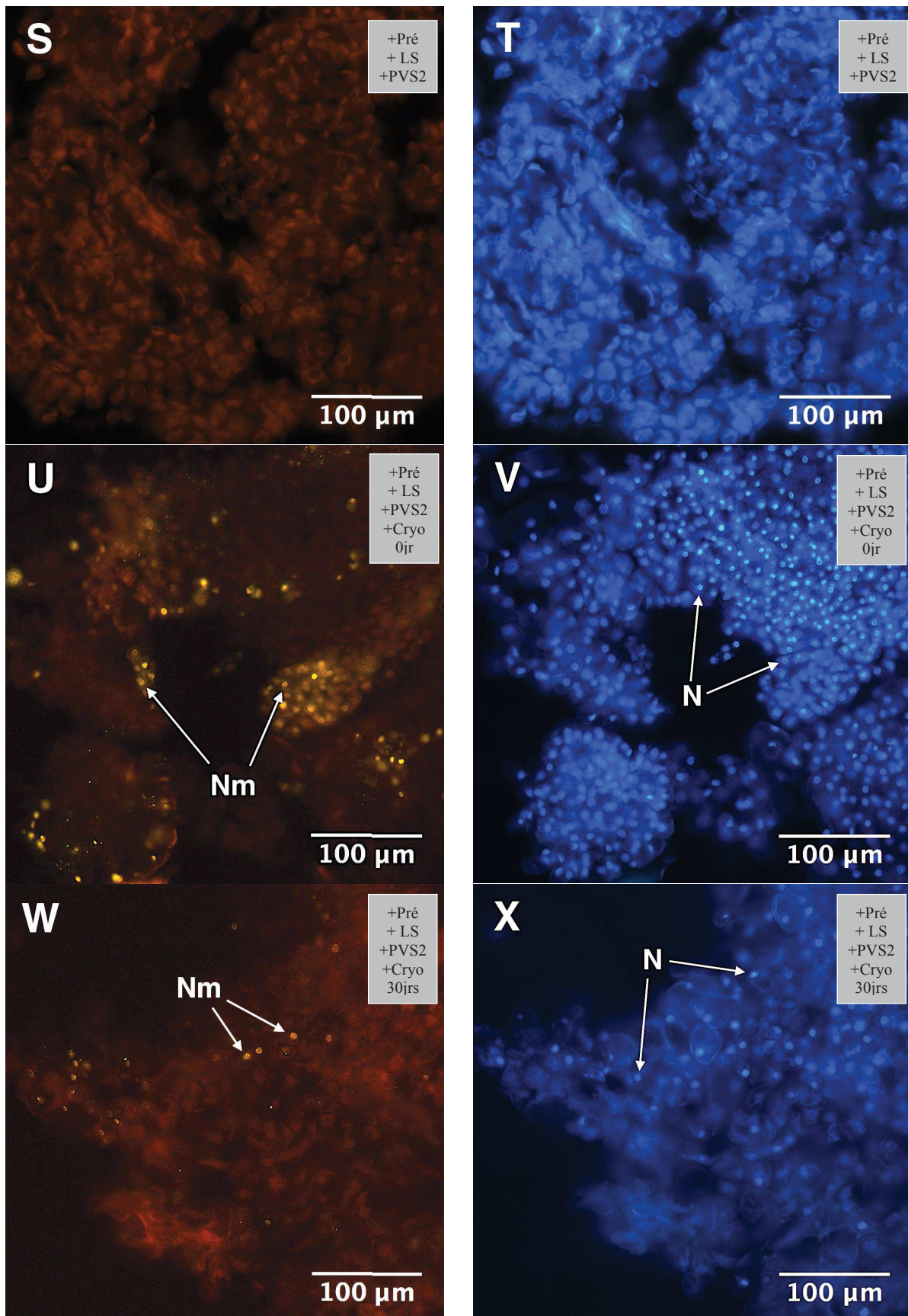
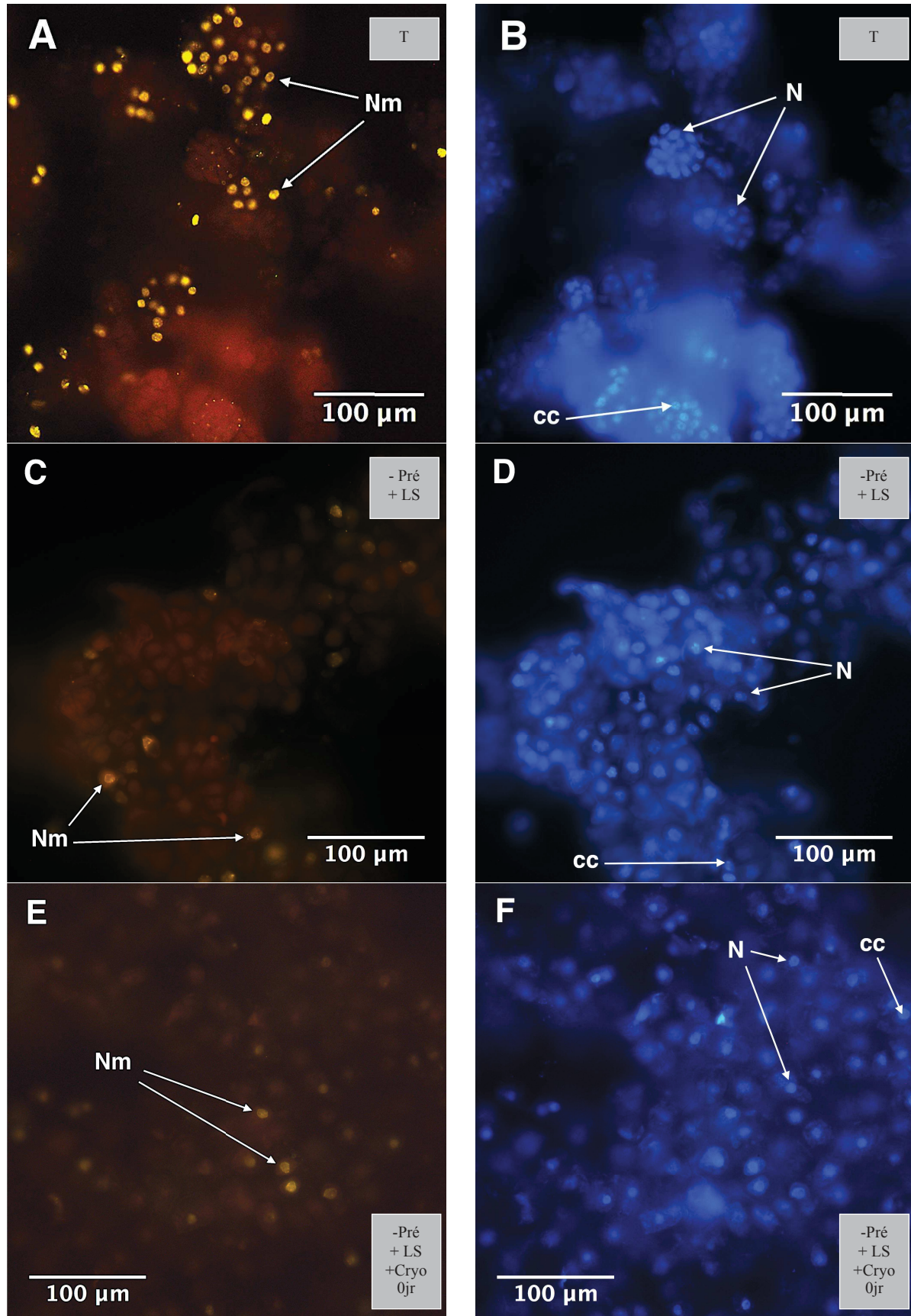
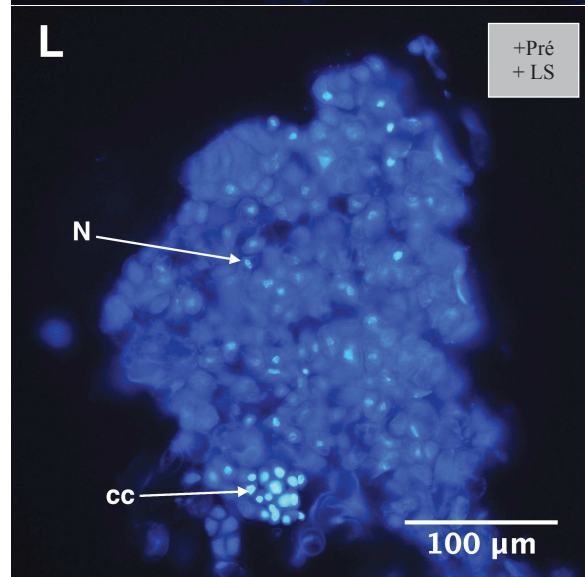
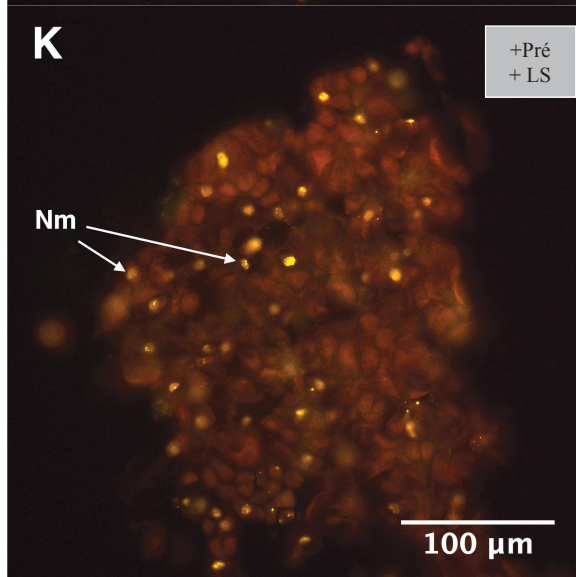
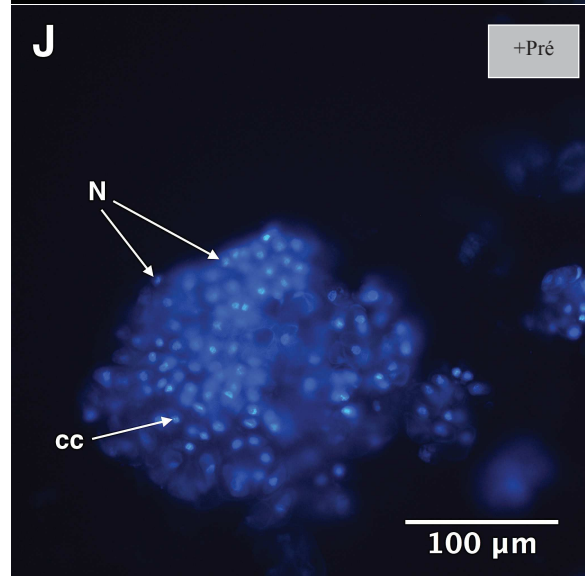
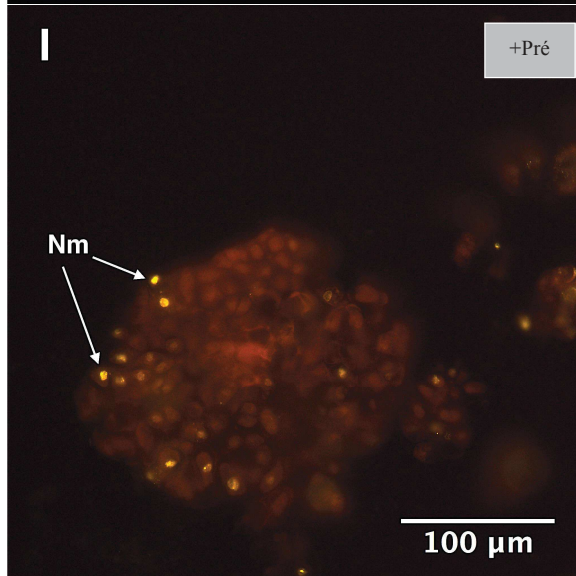
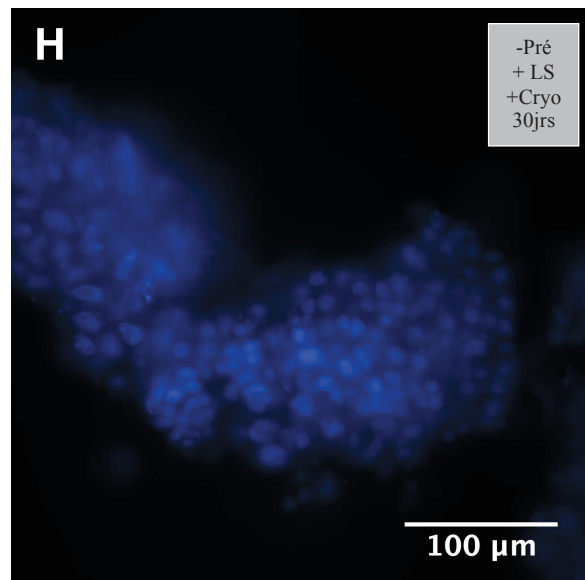
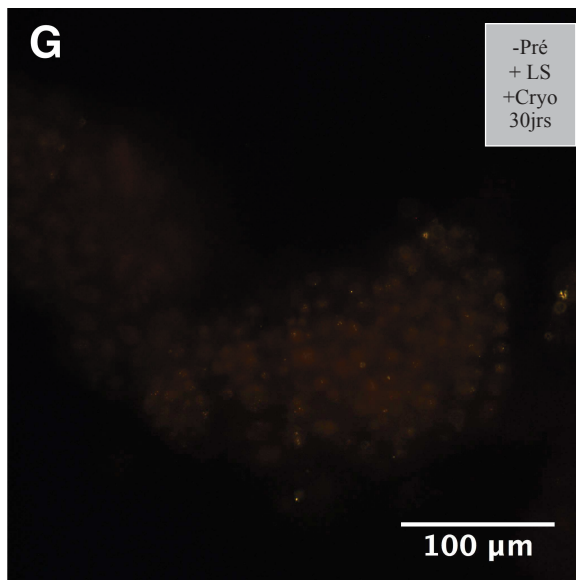
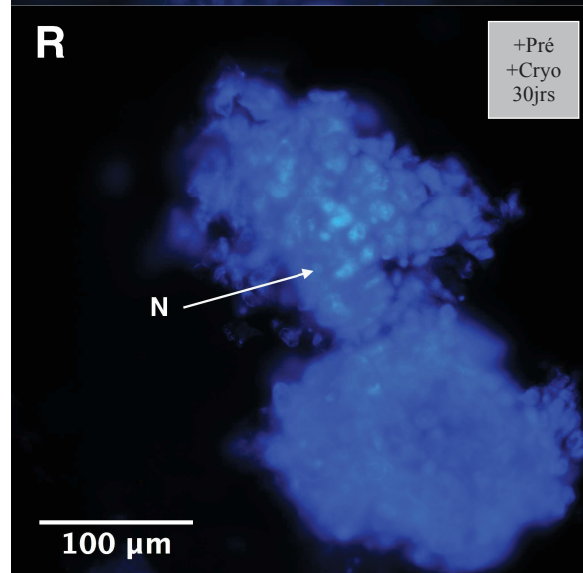
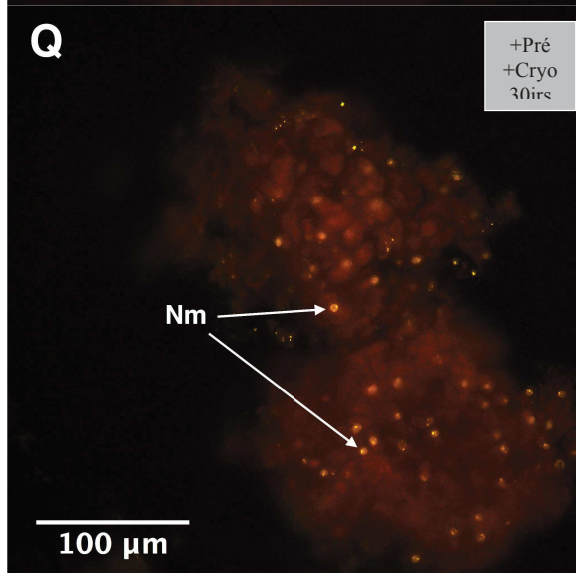
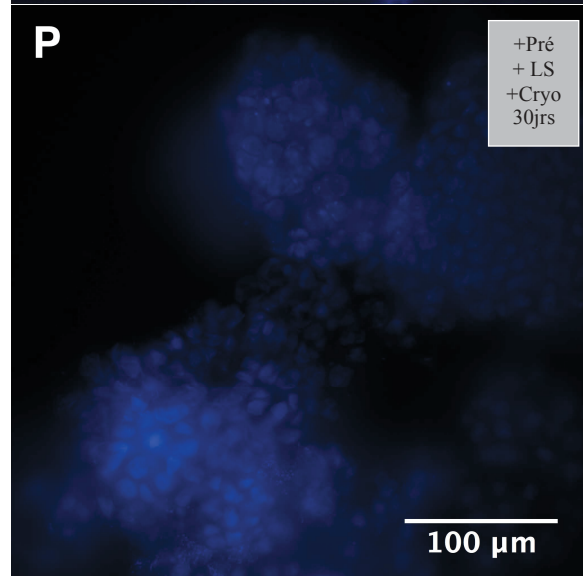
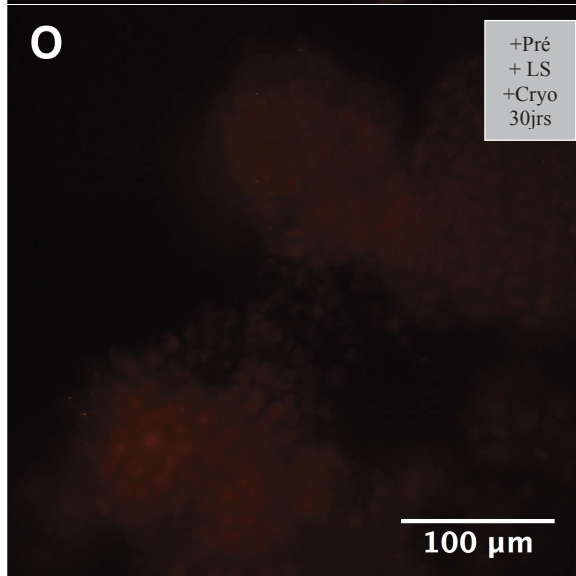
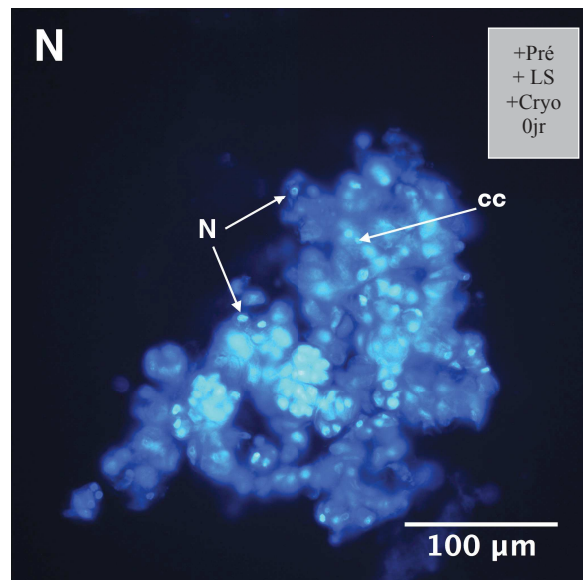
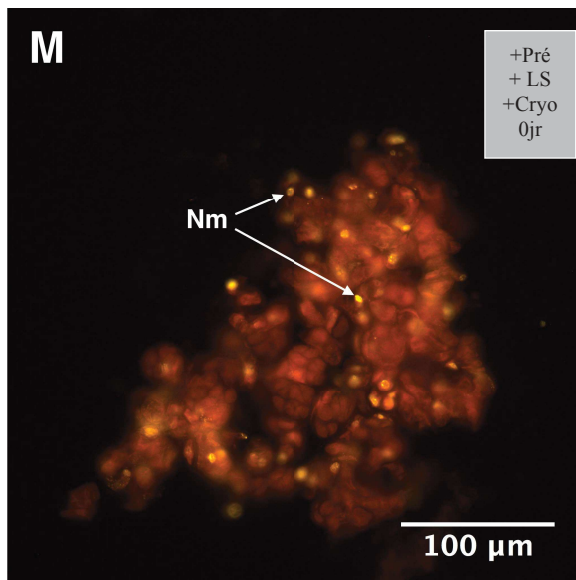


Figure 21 Coupes histologiques des cellules embryogènes de PEM de palmier dattier de la variété Sokary après certaines étapes du protocole de cryoconservation par vitrification en gouttes. (A et B): témoin non traité ; (C et D) : -pré + LS; (E et F): -pré +LS Cryo0jr ; (G et H) : -pré +LS Cryo 30jrs ; (I et J) :+pré; (K et L): +pré +LS; (M et N) : +pré +LS Cryo 0jr ; (O et P) : +pré +LS Cryo 30jrs ; (Q et R):+pré+30jrs; (S et T) : +pré+LS+PVS2 ; (U et V) : +pré +LS+PVS2 Cryo 0jr;(W et X) : +pré

+LS+PVS2 Cryo 30jrs. T : témoin ; -/+ Pré : sans/ avec prétraitement sur un milieu à 0,5M de saccharose ; LS : traitement de loading ; PVS2 : traitement dans la solution de PVS2 ; Cryo 0jr : directement après le transfert sur un milieu standard de prolifération ; Cryo 30jrs : 30 jours après le transfert sur un milieu standard de prolifération. N: noyau ; Nm : noyau méthylé ; cc : chromocentre.







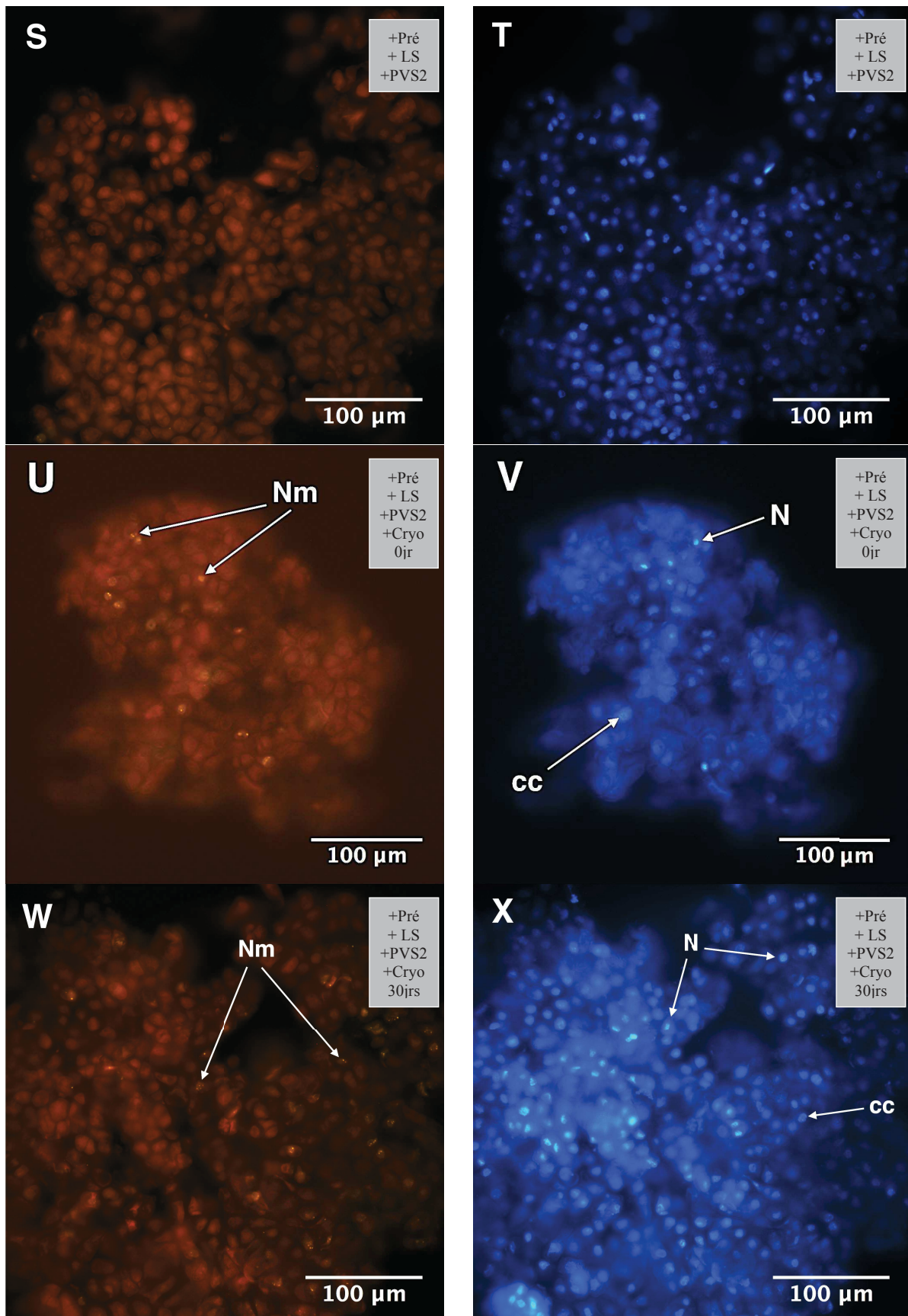


Figure 22 Coupes histologiques des cellules embryogènes de PEM de palmier dattier de la variété Sultany après certaines étapes du protocole de cryoconservation par vitrification en gouttes. (A et B): témoin non traité ; (C et D) : -pré + LS; (E et F) : -pré +LS Cryo0jr ; (G et H) : -pré +LS Cryo 30jrs ; (I et J) :+pré; (K et L) : +pré +LS; (M et N) : +pré +LS Cryo 0jr ; (O et P) : +pré +LS Cryo 30jrs ; (Q et R):+pré+30jrs; (S et T) : +pré+LS+PVS2 ; (U et V) : +pré +LS+PVS2 Cryo 0jr;(W et X) : +pré

+LS+PVS2 Cryo 30jrs. T : témoin ; +/- Pré : sans/ avec prétraitement sur un milieu à 0,5M de saccharose ; LS : traitement de loading ; PVS2 : traitement dans la solution de PVS2 ; Cryo 0jr : directement après le transfert sur un milieu standard de prolifération ; Cryo 30jrs : 30 jours après le transfert sur un milieu standard de prolifération. N: noyau ; Nm : noyau méthylé ; cc : chromocentre.

5.3. Observations quantitatives :

5.3.1. Tissus différenciés :

Les mesures du taux de méthylation en se basant sur le nombre des noyaux marqués par l'anticorps spécifique ont été réalisées sur certaines conditions où ces tissus ont été rencontrés. Sur les tissus de témoins non traités de la variété Sokary, nous avons noté 72,6% des noyaux marqués (Tableau 20). Juste après la cryoconservation des tissus prétraités et congelés directement après le traitement de loading le pourcentage de noyaux marqués était de 75,5%. Aucun changement significatif n'a été observé chez les tissus prétraités et cryoconservés après le traitement de PVS2, ni directement après le transfert sur un milieu standard de prolifération (75,3%), ni 30 jours après le transfert (72,8%).

Tableau 20 Pourcentage de noyaux méthylés par rapport nombre total de noyaux marqués par DAPI des tissus différenciés des PEM de palmier dattier de la variété Sokary en fonction de certaines étapes du protocole de vitrification en gouttes utilisé. T: témoin non traité ; Pré +LS Cryo 0jr: prétraitement sur un milieu 0,5M de saccharose + traitement avec la solution de loading directement après le transfert sur un milieu standard de prolifération; Pré + LS +PVS2 Cryo 0jr: prétraitement sur un milieu 0,5M de saccharose + traitement avec la solution de loading + traitement avec la solution de vitrification PVS2 après traitement avec la solution de loading ; Pré + LS +PVS2 Cryo 30jrs : après 30 jours de culture sur milieu standard de prolifération. Les différentes lettres minuscules indiquent des différences significatives entre les conditions du protocole de cryoconservation, selon le test de Duncan ($P < 0,05$).

Méthylation %	
Traitement	
T	72,6 a
Pré +LS Cryo 0jr	75,7 a
Pré +LS+PVS2 Cryo 0jr	75,3 a
Pré +LS+PVS2 Cryo 30jrs	72,8 a

5.3.2. Cellules embryogènes :

Les mesures effectuées afin d'estimer le pourcentage de noyaux méthylés par rapport au noyaux totaux marqués par DAPI chez les cellules embryogènes ont montré que chez les témoins non traités 31,3% des noyaux étaient méthylés chez les PEM de la variété Sokary et 38,5% chez ceux de la variété Sultany (Tableau 21). Ce pourcentage se situait entre 30,8 et 28,7 % sans différences significatives entre les traitements pour les PEM de la variété Sokary et entre 40,7 et 37,1% sans différences significatives entre les traitements pour les PEM de la variété Sultany. Chez la variété Sokary, après 30 jours de culture sur un milieu standard de prolifération des PEM non prétraitées et cryoconservées directement après le traitement de loading, aucun pourcentage de

méthylation n'était noté. Les mêmes valeurs ont été trouvées chez les PEM de la variété Sultany après 30 jours de culture sur un milieu standard de prolifération quand les PEM étaient cryoconservées directement après le traitement de loading sans traitement avec PVS2.

Tableau 21 Pourcentage de noyaux méthylés par rapport nombre total de noyaux marqués par DAPI des cellules embryogènes des PEM de palmier dattier des variétés Sokary et Sultany en fonction de l'étape du protocole de vitrification en gouttes utilisé. T: témoin non traité ; Pré : prétraitement sur un milieu 0,5M de saccharose ; LS : traitement avec la solution de loading ; PVS2 : traitement avec la solution de vitrification PVS2 après traitement avec la solution de loading ; Cryo 0jr: directement après le transfert sur un milieu standard de prolifération ; Cryo 30jrs : après 30 jours de culture sur milieu standard de prolifération. Les différentes lettres minuscules indiquent des différences significatives entre les conditions du protocole de cryoconservation, selon le test de Duncan ($P < 0,05$).

Sokary		Méthylation %				
Traitement	T	Pré	LS	Cryo 0jr	Cryo 30jrs	
	31,3 a	-	30,8 a	29,1 a	0,0 b	
Traitement		Pré	Pré+30jrs			
		28,7 a	30,6 a			
Traitement			LS	Cryo 0jr	Cryo 30jrs	
			29,4 a	28,7 a	28,7 a	
Traitement				PVS2	Cryo 0jr	Cryo 30jrs
				-	29,5 a	30,3 a
Sultany						
Traitement	T	Pré	LS	Cryo 0jr	Cryo 30jrs	
	38,5 a	-	37,6 a	37,1 a	0,0 b	
Traitement		Pré	Pré+30jrs			
		40,7 a	39,6 a			
Traitement			LS	Cryo 0jr	Cryo 30jrs	
			39,2 a	38,8 a	0,0 b	
Traitement				PVS2	Cryo 0jr	Cryo 30jrs
				-	39,5 a	39,3 a

5.4. Discussion

Les observations qualitatives réalisées sur les PEM des deux variétés étudiées ont montré trois profils de méthylation. Chaque profil correspond à un type de cellules. Nous avons constaté l'absence de marquage des cellules méristématiques chez les PEM de deux variétés (Sokary et Sultany) et chez les PEM témoins non traitées, ainsi qu'après les différentes étapes du protocole de DV. Par contre, les cellules embryogènes des deux variétés ont montré de nombreux noyaux marqués par l'anticorps spécifique. De plus, un marquage beaucoup plus important a été noté chez les tissus différenciés rencontrés chez la variété Sokary. Ces observations ont été constatées chez les PEM de témoins non traités mais également après les différentes étapes du protocole de DV.

Les analyses quantitatives que nous avons réalisées ont permis de préciser ces observations qualitatives en les chiffrant. Les mesures effectuées sur les cellules embryogènes et les tissus différenciés n'ont montré aucune modification significative au niveau de pourcentage de noyaux méthylés, ni chez les cellules embryogènes ni chez les tissus différenciés.

Le rôle de la méthylation de l'ADN génomique dans la régulation de l'expression du génome (Finnegan *et al.*, 1993) et son implication dans le déterminisme de la variation somaclonale (Brown, 1989; Karp, 1991) ont fait l'objet de nombreux travaux. Des modifications significatives du degré de méthylation de l'ADN génomique au cours de l'embryogenèse somatique ont été montrées chez les plantes supérieures (LoSchiavo *et al.*, 1989). À titre d'exemple, chez le palmier à huile, une proportion non négligeable de palmiers régénérés présentent une variation somaclonale caractérisée par une féminisation apparente des pièces florales mâles : l'anomalie « mantled » (Jaligot *et al.*, 2010). Les études de Rival *et al.* (1997 et 1998) ont rapporté que les caractéristiques de l'anomalie « mantled » (hétérogénéité spatio-temporelle, réversion, transmission non-Mendélienne par voie sexuée et aggravation du phénotype au cours des cycles successifs de culture *in vitro*), ne sont pas liées à des altérations de la structure du génome ou des gènes. Ceci a permis de poser l'hypothèse de son origine épigénétique (Jaligot *et al.*, 2010). L'étude de la méthylation de l'ADN a montré un important déficit en méthylation de l'ADN qui a été mis en évidence dans le génome des tissus porteurs de l'anomalie, par comparaison avec leurs homologues originaires d'arbres conformes (Jaligot *et al.*, 2000).

Heringer *et al.* (2013) sur des agrégats d'embryons somatiques de palmito (*Bactris gasipaes* Kunth) cryoconservés en utilisant la technique de la vitrification en goutte, ont trouvé que les profils de méthylation globale de l'ADN étaient influencés par le traitement cryoprotecteur ainsi que par la cryoconservation qui induisaient une augmentation de la méthylation globale de l'ADN en réponse au traitement dans la solution de vitrification en présence et en absence de congélation dans l'azote liquide. Les différences constatées dans cette étude par rapport à la nôtre sont peut-être dues à la nature du matériel végétal utilisé et à la manière dont le degré de la méthylation a été estimé. Dans

un premier temps, dans l'étude de Heringer *et al.* (2013), la méthylation de l'ADN a été mesurée par HPLC. Dans cette approche, la totalité du matériel végétal a été analysée sans pouvoir prendre en compte le type de tissus. A l'opposé, l'immunolocalisation offre la possibilité de suivre l'état de méthylation dans des différents types de tissus. Par conséquent, Heringer *et al.* (2013) ont estimé le degré de la méthylation de l'ADN dans l'ensemble de leurs explants, ce qui nous conduit au deuxième point qui concerne la nature d'explants utilisés. Selon Santé *et al.* (2006), les agrégats d'embryons somatiques représentent un stade plus avancé que les PEM dans les processus de développement des embryons somatiques. Dans un autre contexte, Zluvova *et al.* (2001) ont étudié le changement global de la méthylation de l'ADN pendant le développement des méristèmes apicaux du Compagnon blanc (*Silene latifolia*) par immunohistochimie. Ils ont suggéré que le profil de réplication de l'ADN pendant le développement des apex avait une corrélation négative avec le profil de méthylation de l'ADN, ce qui signifie que le rapport élevé de divisions correspond au taux méthylation de l'ADN le plus bas. Également, il a été trouvé que les méristèmes apicaux d'individus juvéniles présentent une grande capacité morphogénétique associée à de faibles niveaux de méthylation de l'ADN et que les individus matures, avec une capacité morphogénétique moindre, montrent des niveaux plus élevés de méthylation de l'ADN (Hasbún *et al.*, 2007). L'étude du niveau de méthylation des sites 5-mdC des bourgeons d'azalée (*Rhododendron. sp*) par détection immunohistochimique a montré que les différents types cellulaires ne montraient pas le même niveau de fluorescence. Les tissus différenciés montraient un pourcentage très élevé de fluorescence (100%) par rapport aux tissus peu différenciés (25%) (Meijón *et al.*, 2009). Mankessi *et al.* (2011), sur des pousses des *E. urophylla* X *E. grandis* ayant de différents âges physiologiques, ont rapporté que l'âge physiologique du matériel végétal utilisé induisait des variations qualitatives et quantitatives au niveau de la méthylation de l'ADN des apex, des méristèmes apicaux et même au niveau cellulaire. Ces auteurs ont trouvé que le degré de méthylation augmentait avec la maturation et diminuait inversement dans les tissus revenant à leur état juvénile.

Heringer *et al.* (2013) ont observé un retour à l'état de méthylation initial chez les masses d'embryons somatiques incubées pendant 120 min et 180 min dans la solution de vitrification PVS3 après 24 semaines de reprise de croissance. Cela peut-être expliqué par le changement de quantité des tissus différenciés par rapport aux tissus peu différenciés ou méristématiques. Sur le milieu de prolifération, le matériel végétal se compose généralement de plusieurs types des tissus plus au moins différenciés. Au cours du protocole de DV, différentes étapes exigent le changement des solutions cryoprotectrices. Chaque changement cause une perte d'une partie du matériel végétal. Cette partie perdue se compose généralement des tissus méristématiques ou peu différenciés ; par conséquent, on peut constater une augmentation de taux de méthylation de ces explants en comparaison avec le matériel végétal de départ (témoin non traité) et cette augmentation pourrait

être due à l'augmentation du pourcentage des tissus différenciés par rapport aux autres types de tissus.

L'analyse du degré de méthylation des méristèmes apicaux de trois espèces : *Ribes ciliatum* (Humb. et Bonpl.), *R. sanguineum* (cultivar King Edward VII) et *R. nigrum* (cultivars Ben More et Ben Tron) par HPLC, a montré que la méthylation de l'ADN, induite chez le génotype tolérant à la cryoconservation pendant le prétraitement au saccharose, était présente au cours des premiers cycles de propagation, mais qu'elle régressait aux valeurs du témoin au cours de la micropropagation (Johnston *et al.*, 2009). Dans notre étude, le prétraitement sur un milieu à 0,5M de saccharose n'a pas entraîné de changements du degré de méthylation estimé par le pourcentage de noyaux méthylés. Nous n'avons pas trouvé de lien entre le pourcentage de survie de deux variétés Sokary (tolérante) et Sultany (moins tolérante) avec le degré de méthylation de l'ADN. Cette différence peut être liée à la nature de matériel végétal utilisé, constitué d'organes différenciés dans le travail de Johnson *et al.* (2009) alors qu'il s'agit de masses proembryogènes peu différenciés dans notre cas.

De plus, plusieurs études réalisées sur d'autres espèces ont rapporté que le degré de méthylation de l'ADN n'est pas influencé par la cryoconservation. Plitta *et al.* (2014) sur des méristèmes apicaux d'embryons zigotiques de chêne (*Quercus robur* L.) ont trouvé que la variation de l'état de la méthylation globale de l'ADN mesurée après la déshydratation et la cryoconservation était négligeable. De la même manière, Kaity *et al.* (2013), en utilisant des marqueurs RAF (Randomly Amplified DNA Fingerprinting) ou AMP (Amplified DNA Methylation Polymorphism) pour étudier l'état de méthylation de l'ADN avant et après la cryoconservation des apex de papayer (*Carica papaya* L.), ont conclu que les variations étaient soit inexistantes soit très faibles et non associées à la cryoconservation. Sur des explants au même stade de développement que le matériel végétal utilisé dans notre étude, Mikuła *et al.* (2011) ont employé une variante de metAFLP sur des masses proembryogènes (PEM) afin d'étudier les changements de l'ADN génomique et les profils de méthylation de l'ADN. Ces auteurs ont conclu à l'absence de variations au niveau de la méthylation entre les suspensions cellulaires de *Gentiana cruciata* cryoconservées et celles du témoin non cryoconservé.

Les observations qualitatives de l'impact des étapes successives du protocole de DV sur l'intégrité structurale des PEM de palmier dattier ont montré des modifications au niveau de la forme et la coloration des noyaux, par conséquent leur structure. La taille et la forme des noyaux sont diverses et dépendent de la teneur en ADN, du type de cellule, et de l'état physiologique, mais les facteurs régulant la morphologie nucléaire sont encore peu connus (Walters *et al.*, 2012; Jevtić *et al.*, 2014). Les noyaux de plantes diffèrent de ceux des cellules animales par la composition de l'enveloppe nucléaire (Guo & Fang, 2014; Zhou *et al.*, 2015) et présentent une organisation

diversifiée et très dynamique de leurs chromosomes et du contenu de la chromatine (Tiang *et al.*, 2012; Del Prete *et al.*, 2014). Chez plusieurs espèces de plantes, l'hétérochromatine montre une tendance à former des amas, qui semblent condensés, nommés chromocentres (CC).

Nos observations ont montré que les spots de méthylation se trouvaient très souvent dans les chromocentres des noyaux méthylés. Fransz *et al.* (2002), sur *Arabidopsis*, ont également rapporté que l'ADN méthylé était généralement associé à des domaines transcriptionnellement silencieux et qu'il était souvent trouvé dans les régions hétérochromatiques. L'immunomarquage avec des anticorps contre la 5-méthyl-cytosine a montré que la plupart des CC contiennent de l'ADN fortement méthylé et, par conséquent, qu'ils représentent des domaines transcriptionnellement silencieux des noyaux d'*Arabidopsis*. Comme l'acétylation des histones H3 et H4 correspond souvent avec l'activité transcriptionnelle, ils ont appliqué d'autres anticorps contre les histones H4Ac5 et H4Ac8. Les deux anticorps ont spécifiquement marqué l'euchromatine, alors que cela n'a pas été le cas pour les CC, ce qui soutient l'idée que les CC sont transcriptionnellement inactifs.

Pour conclure, l'étude la méthylation par immunolocalisation a montré que le degré de méthylation variait selon le type de tissus. Nous avons montré que, chez les PEM de palmier dattier, ce sont les cellules embryogènes et les tissus différenciés qui présentent des noyaux méthylés. Cependant, les observations quantitatives ont indiqué qu'il n'y avait pas de différences significatives entre les traitements et le témoin non traité quelque soit le type de tissus étudié. Cette étude a confirmé l'uniformité des PEM cryoconservées avec celles de témoins non cryoconservés. Par conséquent, les changements structuraux observés dans le noyau semblent indépendants du degré de la méthylation de l'ADN. Enfin, notre travail a illustré encore en fois l'intérêt de utiliser conjointement des analyses qualitatives et quantitatives afin de mieux décrire et préciser les observations réalisées.

CHAPITRE 6
CONCLUSIONS GÉNÉRALES ET
PERSPECTIVES

6. Conclusions générales et perspectives:

6.1. Conclusions générales:

Le palmier dattier (*Phoenix dactylifera* L.) est une plante très importante dans les zones arides et semi-arides chaudes. Le dattier fait partie des plantes les plus anciennement cultivées (~6000 ans) (Ashraf & Hamidi-Esfahani, 2011). De nos jours, il existe plus de 2000 variétés de dattier cultivées dans le monde (Al-shahib & Marshall, 2003). La production du palmier dattier se fait traditionnellement par deux voies, soit par semis (propagation sexuée), soit par les rejets prélevés sur la plante-mère (propagation végétative). Les inconvénients majeurs de la propagation sexuée sont la perte, chez les plantes produites, des caractéristiques organoleptiques de la plante mère et la production de 50% mâles et de 50% de femelles. Les rejets, par contre, donnent toujours des plantes identiques à la plante-mère mais le nombre de rejets produits par palmier reste très limité et la majorité sont produits pendant le premier cycle de la vie de la plante (Zaid & Arias-Jiménez, 2002). Pour cela, la propagation par rejets reste insuffisante pour répondre à la demande. Par conséquent, les chercheurs se sont orientés vers la culture *in vitro* pour produire en grande quantité les variétés intéressantes. Deux techniques de régénération ont été employées, ce qui a permis de proposer plusieurs stratégies de clonage *in vitro* par organogénèse (Rhiss *et al.*, 1979; Drira & Benbadis, 1985) et par embryogenèse somatique (Fki *et al.*, 2003; Sané *et al.*, 2006). Mais cette technique, très coûteuse et qui nécessite des intrants importants, a généré d'autres problèmes comme la contamination des cultures et les variations somaclonales chez les plantes obtenues (notamment à cause de l'utilisation intense de phytohormones). Afin de surmonter ces problèmes, il fallait un moyen qui permette à la fois la conservation des ressources génétiques et la gestion de la production de palmiers dattiers à grande échelle. Et la seule technique disponible de nos jours est la cryoconservation à température ultra-basse dans l'azote liquide (-196°C). Cette technique assure la disponibilité du matériel végétal à tout moment et permet de contourner les problèmes de la culture *in vitro*.

6.1.1. Efficacité de DV et D cryo-plate

Nous avons montré l'efficacité de deux techniques de cryoconservation : la technique de vitrification en goutte (DV, en utilisant le protocole publié par Fki *et al.* (2011a) sur des PEM de la variété Barhee) et celle de D cryo-plate (adaptée du protocole publié par Niino *et al.* (2013)), employé pour la cryoconservation des bourgeons de *Juncus decipiens* Nakai) pour la cryoconservation des ressources génétiques de deux variétés de palmier dattier, Sokary et Sultany, qui sont des variétés ayant une valeur commerciale très élevée dans les pays du Moyen-Orient. Nous avons également illustré l'importance de combiner plusieurs paramètres d'évaluation afin de mieux décrire l'impact d'un protocole de cryoconservation. Dans des conditions optimales, les deux

techniques permettent d'obtenir des pourcentages de survie semblables avec la variété Sokary mais l'intensité de croissance est plus élevée avec le protocole de D cryo-plate par rapport à la technique de DV. En revanche, dans le cas de la variété Sultany, la survie et l'intensité de croissance sont inférieures en appliquant le protocole de D cryo-plate. Ce résultat peut être dû, d'une part, à la différence de vitesse croissance entre les deux variétés (l'intensité de croissance est de 75,65% après 15 jours de culture sur le milieu standard de prolifération chez la variété Sokary par rapport à 46,75% chez la variété Sultany). D'autre part, il pourrait être lié à des différences de réactivité entre les géotypes cryoconservés selon le même protocole. Les différences entre les deux techniques ont été plus marquées lorsque l'on comparait l'intensité de croissance, qui était de 84,0% avec DV contre seulement 47,5% avec D cryo-plate. Ces différences soulignent également l'intérêt d'avoir plusieurs techniques à disposition pour la cryoconservation d'une gamme de géotypes, qui peuvent réagir différemment aux techniques disponibles (Engelmann, 2011).

En outre, nous avons montré que le prétraitement sur un milieu enrichi en saccharose (0,5M) n'a pas amélioré la survie après la cryoconservation chez les deux variétés en utilisant le protocole de DV. L'effet positif de ce traitement a été évident chez les deux variétés lors de l'emploi de la technique de D cryo-plate. De plus, nous avons montré l'importance du prétraitement au saccharose chez les PEM cryoconservées par DV lors de la congélation des PEM directement après le traitement de loading (sans traitement avec PVS2). Au niveau cellulaire, les molécules de sucre, de petite taille, aident les membranes à maintenir un certain taux d'hydratation et à augmenter la distance entre les membranes, ce qui réduit les contraintes de compression et, par conséquent, réduit les chances d'une transition de la phase liquide en gel (Wolfe & Bryant, 1999). De plus, les concentrations intracellulaires élevées en sucres favorisent la vitrification au cours du refroidissement des explants grâce à la nature très visqueuse de leurs solutions aqueuses (Wolfe & Bryant, 1999). Le saccharose joue un rôle essentiel dans la déshydratation osmotique des explants et il entraîne également une augmentation de la concentration en sucre et d'amidon intracellulaire (Dumet *et al.*, 1994; Zhu *et al.*, 2006). Tout cela nous a conduits à étudier l'effet des étapes successives du protocole de DV, notamment le prétraitement au saccharose, sur l'intégrité structurale des PEM de la variété Sokary.

Contrairement à ce qui a été observé avec le protocole de DV, lorsque la technique de D cryo-plate a été utilisée, aucune survie n'a été obtenue chez les PEM cryoconservées immédiatement après le traitement de loading. Le prétraitement au saccharose a montré un effet positif sur la survie lorsque les PEM de la variété Sokary ont été cryoconservées directement après le traitement de loading sans traitement avec PVS2. Dans ces conditions, la survie atteint 21,1%.

6.1.2. L'impact du protocole de DV sur l'intégrité structurale des PEM

Le test de l'efficacité des deux protocoles de cryoconservation utilisés (la technique de DV et la technique de D cryo-plate) sur deux variétés de palmier dattier, Sokary et Sultany, a révélé un effet positif du prétraitement sur un milieu enrichi en saccharose à 0,5 M lorsque les PEM de la variété Sokary ont été cryoconservées directement après le traitement de loading en appliquant la technique de DV. Pour cela, nous nous sommes intéressés à déterminer, dans un premier temps, l'impact des étapes successives du protocole de DV sur l'intégrité structurale des PEM de cette variété. Dans un deuxième temps, nous avons évalué l'impact du prétraitement sur l'intégrité structurale des PEM.

L'étude de l'impact du protocole de DV sur l'intégrité structurale nous a permis, grâce aux analyses qualitatives réalisées, d'identifier quatre types cellulaires (cellules parenchymateuses, cellules méristématiques, cellules embryogènes séparées en deux populations I et II). Ces observations ont également montré des différences entre les trois catégories de cellules trouvées. Nous avons noté une forte plasmolyse chez les trois types cellulaires étudiés en l'absence de prétraitement, alors que seules les cellules embryogènes de la PopII étaient plasmolysées dès le prétraitement lorsque les PEM étaient prétraitées sur un milieu avec 0,5M de saccharose. Nous avons ainsi observé une modification de la forme du noyau après les différentes étapes du protocole de DV. Les analyses quantitatives effectués, en confirmant les analyses qualitatives et en les chiffrant, ont illustré l'intérêt d'utiliser conjointement des approches des analyses qualitatives et quantitatives afin de mieux décrire et préciser les observations faites, comme l'ont souligné Mankessi *et al.* (2010 et 2011) dans un autre contexte et ainsi que Gallard, (2008), Barraco *et al.* (2014), et Salma *et al.* (2014b) en relation avec la cryoconservation des tissus végétaux. Enfin, nous n'avons pas observé de différences dans l'aspect général des cellules méristématiques et des cellules de la PopI prétraitées et cryoconservées après 15 jours de culture sur le milieu standard de prolifération par rapport au témoin non traité.

A notre connaissance, deux travaux ont utilisé des approches des analyses qualitatives et quantitatives comparables aux nôtres, celui de Barraco *et al.* (2014) sur d'apex de vitroplants d'igname et celui de Salma *et al.* (2014b) sur les « hairy roots » de *R. akane*. En général, la paroi cellulaire est composée de trois parties : la paroi primaire (une paroi flexible et extensible, ce qui permet la croissance cellulaire), la paroi secondaire, et la lamelle moyenne (Buchanan *et al.*, 2000). L'absence de plasmolyse au cours du protocole chez les cellules prétraitées peut être dû à la flexibilité de la paroi primaire. Donc, nous pensons que le prétraitement pendant 3 jours permettrait une déshydratation accompagnée par une rétraction homogène du cytoplasme avec la paroi cellulaire à un niveau suffisant pour survivre à la congélation après seulement 20 min dans la solution de loading. Les mesures du rapport nucléocytoplasmique renforcent notre hypothèse car

nous avons noté une augmentation significative de la valeur de ce rapport chez les trois types cellulaires après le prétraitement au saccharose et après le traitement de loading chez les PEM non prétraitées par rapport au témoin non traité. Une telle augmentation ne peut être expliquée que par une diminution du volume du cytoplasme. Chez les cellules non prétraitées, cette diminution est due à la plasmolyse, alors que, chez les cellules prétraitées, cette diminution est très probablement le résultat d'une rétraction de l'ensemble du cytoplasme avec la paroi cellulaire. En suivant l'évolution des valeurs du rapport nucléocytoplasmique, nous n'observons pas de changements significatifs après le traitement de loading chez les trois types cellulaires ni après le traitement avec la solution de PVS2 chez les cellules qui ont subi ce traitement. Donc, aucune rétraction supplémentaire n'a eu lieu après ces deux traitements. Afin de confirmer cette hypothèse, nous avons effectué des mesures pour évaluer les modifications de la taille des cellules après de différentes étapes du protocole de DV. Les résultats obtenus ont révélé des changements de la taille des cellules. Ces observations sont en accord avec celles de Barraco *et al.* (2014) et Salma *et al.* (2014b) concernant l'effet du prétraitement avec le saccharose, et avec celles de Gallard (2008) et Salma *et al.* (2014b) concernant l'effet des solutions de loading et de vitrification sur l'état de plasmolyse (rétraction des cellules dans notre cas).

Donc, les analyses qualitatives réalisées ont permis d'identifier trois types cellulaires (cellules méristématiques, cellules embryogènes séparées en deux populations I et II). Ces analyses ont également permis de noter la présence d'une forte plasmolyse chez les trois types cellulaires en l'absence de prétraitement au saccharose. Les analyses quantitatives effectuées ont à la fois confirmé les observations qualitatives et ont fourni des informations plus précises sur le pourcentage de plasmolyse, le rapport nucléocytoplasmique et notamment le degré de déformation des noyaux tout en illustrant encore une fois l'intérêt d'utiliser conjointement des approches qualitatives et quantitatives.

6.1.3. L'impact du protocole de DV sur la méthylation de l'ADN des PEM

L'étude de l'intégrité structurale a révélé la présence de trois types cellulaires qui réagissent différemment lors de l'application du protocole de DV ; elle a également confirmé une déformation du noyau chez les cellules mortes, alors que le noyau des cellules survivantes a retrouvé un aspect normal. Cette observation nous a conduits à suivre l'état de méthylation de l'ADN après les différentes étapes du protocole de DV par immunolocalisation des sites de 5mdC, afin de savoir si la déformation des noyaux observée précédemment pouvait avoir un impact sur le degré de méthylation des tissus. En effet, plusieurs études ont confirmé la stabilité génétique après la cryoconservation (Helliott *et al.*, 2002; Castillo *et al.*, 2010), ce qui n'est pas toujours le cas dans les

études effectuées pour détecter les modifications de la stabilité épigénétique (Heringer *et al.*, 2013; Johnston *et al.*, 2009).

De nombreux travaux ont illustré le rôle de la méthylation de l'ADN génomique dans la régulation de l'expression du génome (Finnegan *et al.*, 1993) et son implication dans le déterminisme de la variation somaclonale (Brown, 1989; Karp, 1991). À titre d'exemple, chez le palmier à huile, une proportion non négligeable de palmiers régénérés présentent une variation somaclonale caractérisée par une féminisation apparente des pièces florales mâles : l'anomalie « mantled » (Jaligot *et al.*, 2010). L'étude de la méthylation de l'ADN a montré un important déficit en méthylation de l'ADN qui a été mis en évidence dans le génome des tissus porteurs de l'anomalie, par comparaison avec leurs homologues originaires d'arbres conformes (Jaligot *et al.*, 2000). Dans notre étude, nous avons constaté que le degré de méthylation étudié par immunolocalisation variait selon le type de tissus. Nous avons trouvé que ce sont les cellules embryogènes et les tissus différenciés qui présentent le pourcentage le plus important de noyaux méthylés. Les observations quantitatives ont confirmé qu'il n'y avait pas de différences significatives entre les différents traitements et le témoin non traité quelque soit le type de tissus étudiés.

Heringer *et al.* (2013) sur des agrégats d'embryons somatiques de palmito (*Bactris gasipaes* Kunth), en utilisant la même technique employée dans notre travail (DV), ont rapporté des altérations des profils de méthylation globale de l'ADN qu'ils ont attribué au traitement cryoprotecteur ainsi qu'à la cryoconservation. Les différences constatées dans cette étude par rapport à la nôtre peuvent être dues à la nature du matériel végétal utilisé et à la manière dont le degré de méthylation a été estimé. Tout d'abord, Heringer *et al.* (2013) ont calculé le degré de méthylation de l'ADN par une analyse chimique (HPLC) où la totalité du matériel végétal a été analysée sans pouvoir prendre en compte le type de tissus, alors que l'immunolocalisation nous a offert la possibilité de tracer l'évolution de l'état de méthylation dans des différents types de tissus. Selon Santé *et al.* (2006), les agrégats d'embryons somatiques représentent un stade plus avancé que les PEM dans les processus de développement d'embryons somatiques. Dans un autre contexte, plusieurs travaux ont conclu que les tissus juvéniles ou peu différenciés présentent de faibles niveaux de méthylation de l'ADN (Zluvova *et al.*, 2001; Hasbún *et al.*, 2007; Meijón *et al.*, 2009).

De plus, plusieurs études réalisées sur d'autres espèces ont rapporté que le degré de méthylation de l'ADN n'est pas influencé par la cryoconservation ou qu'elle a une influence négligeable (Plitta *et al.*, 2014; Mikuła *et al.*, 2011; Kaity *et al.*, 2013).

Pour conclure, l'étude la méthylation par immunolocalisation a montré que le degré de méthylation varie selon le type de tissus et non pas selon le traitement appliqué après les différentes

étapes du protocole de cryoconservation. Nous avons trouvé que ce sont les cellules embryogènes et les tissus différenciés qui présentent des noyaux méthylés. Cependant, les observations quantitatives ont montré qu'il n'y a pas de différences significatives entre les traitements et le témoin non traité pour les deux types des tissus étudiés. De plus elle illustre encore une fois l'intérêt de combiner des approches analytiques qualitatives et quantitatives.

6.2. Perspectives

Dans ce travail, nous avons montré le potentiel de la cryoconservation pour à la fois conserver les ressources génétiques de palmier dattier mais également pour gérer la production des cultures *in vitro* qui sont confrontées en permanence aux risques de contamination. Les deux techniques testées se sont montrées très efficaces avec un pourcentage de survie plus important en utilisant la technique de DV, notamment chez les PEM de la variété Sultany. Cette technique comprend l'utilisation de substances cryoprotectrices plus au moins toxiques comme le DMSO. Nous avons noté 21% de survie chez les PEM congelées de la variété Sokary directement après le traitement de loading. Il serait donc très intéressant d'améliorer ce pourcentage de survie afin d'éviter au maximum l'utilisation des solutions toxiques telles que le DMSO. D'autre part, cela permettrait de simplifier le protocole de cryoconservation pour le rendre plus accessible aux personnes moins expérimentées car, selon Reed *et al.* (2001b) et Keller *et al.* (2008), les différences de réponse à la cryoconservation peuvent être dues aux différences liées aux équipements et aux compétences de manipulateurs. D'autres études ont également souligné l'importance de développer des techniques robustes et de mise en œuvre simple afin de permettre l'établissement des collections cryoconservées (Yamamoto *et al.*, 2012a; Yamamoto *et al.*, 2012b).

Nous avons trouvé que le prétraitement avait un effet positif sur la survie après la cryoconservation chez les deux variétés lorsque la technique de D cryo-plate a été employée. Par contre, la survie a été moins importante par rapport à la technique de DV. Cette différence est plus prononcée chez les PEM de la variété Sultany, notamment en terme d'intensité de croissance. Vu l'importance de développer un protocole de cryoconservation simple et pratique, le protocole de D cryo-plates se montre très prometteur d'où l'importance d'améliorer son efficacité.

Il convient donc, afin d'atteindre ces deux objectifs (l'amélioration de la survie des PEM cryoconservées directement après le traitement de loading et l'augmentation l'efficacité de la technique de D cryo-plates), d'employer d'autres sucres durant l'étape de prétraitement comme le glucose, le fructose, le maltose ou le tréhalose. En fait, plusieurs études ont rapporté que la nature de sucre utilisé peut avoir un impact positif ou négatif sur la survie à la cryoconservation (Dumet *et al.*, 1994; Panis *et al.*, 2002; Paquier, 2002; Sipek *et al.*, 2011). Il peut être également pertinent de

essayer d'augmenter la concentration en sucre du milieu de prétraitement à 0,75M, notamment pour améliorer la survie des PEM cryoconservées directement après le traitement de loading.

L'étude du degré de méthylation par immunolocalisation a permis de localiser les sites de méthylation dans les noyaux mais également de quantifier le pourcentage des noyaux méthylés. Les mesures réalisées ont montré qu'il n'y a pas de différences significatives entre les conditions, par conséquent, on pourrait conclure que le degré de méthylation après les différentes étapes de protocole est semblable à celui de témoin non traité. En revanche, il serait préférable d'estimer le degré de méthylation globale de l'ADN par une autre approche telle que l'HPLC pour confirmer les résultats obtenus dans cette étude. Afin que les analyses par HPLC soient précises, il serait pertinent d'évaluer le degré de méthylation globale en fonction des types de tissus (tissus différenciés et PEM).

Enfin, notre travail a confirmé l'efficacité de deux techniques de cryoconservation employées au cours de cette thèse, tout en soulignant le potentiel de la technique de D cryo-plate comme technique utile et très prometteuse pour la conservation à grande échelle dans les cryobanques où les besoins d'un protocole pratique, efficace et réalisable par des personnes peu expérimentées, sont importants. Nous avons montré l'intérêt de combiner différents paramètres pour évaluer la réponse du matériel végétal à un protocole de cryoconservation comme cela a déjà été mis en évidence notamment sur des cals de soja (Engelmann, 1992) et sur des suspensions cellulaires de citrus (Aguilar *et al.*, 1993). Notre étude a également permis de produire des résultats originaux sur l'effet des différentes phases de protocoles sur l'intégrité structurale des PEM de palmier dattier. De plus, elle n'a pas montré des différences significatives du nombre de noyaux méthylés chez les PEM cryoconservées par rapport au témoin chez les deux variétés Sokary et Sultany. Nos résultats contribueront donc à la conservation à long terme et la sauvegarde de la biodiversité du palmier dattier. Même si nous n'avons pas trouvé des données précises sur le nombre des variétés de palmier dattier cultivées *in vitro*, Aaouire, (2003) a rapporté la régénération de 30 génotypes de palmier dattier via la technique d'organogénèse directe (Jain, 2012). En se basant sur les publications recensées par Fki *et al.* (2011c), nous avons pu dénombrer au moins 16 variétés multipliées par culture *in vitro*. De plus, l'Université d'UAE à Al-Ain, aux Émirats Arabes Unis, semble avoir appliqué la micropropagation à environ 50 variétés de palmier dattier (Rajmohan, 2011). Toutes ces variétés représentent une partie précieuse du patrimoine génétique de cette espèce que nous pourrions déjà cryoconserver.

7. Références bibliographiques

- Aaouine M** (2003) Date palm large-scale propagation through tissue culture techniques. The date palm from traditional resource to green wealth: 79-86
- Abahmane L** (2011) Date Palm Micropropagation via Organogenesis. In SM Jain, JM Al-Khayri, DV Johnson, eds, Date Palm Biotechnology. Springer Netherlands, pp 69-90
- Aguilar ME, Engelmann F, Michaux-Ferrière N** (1993) Cryopreservation of cell suspensions of *Citrus deliciosa* Tan. and histological study. *CryoLetters* **14**: 217-228
- Al-Bahrany AM, Al-Khayri JM** (2012) Optimizing In vitro Cryopreservation of Date Palm (*Phoenix dactylifera* L.). *Biotechnology(Faisalabad)* **11**: 59-66
- Al-Khateeb AA** (2008a) Regulation of in vitro bud formation of date palm (*Phoenix dactylifera* L.) cv. Khanezi by different carbon sources. *Bioresource Technology* **99**: 6550-6555
- Al-Khateeb AA** (2008b) Comparison Effects of Sucrose and Date Palm Syrup on Somatic Embryogenesis of Date Palm (*Phoenix dactylifera* L.). *American Journal of Biochemistry and Biotechnology* **4**: 19
- Al-Khayri JM** (2001) Optimization of biotin and thiamine requirements for somatic embryogenesis of date palm (*Phoenix dactylifera* L.). *In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant* **37**: 453-456
- Al-Khayri JM** (2005) Date Palm *Phoenix dactylifera* L. In SM Jain, P Gupta, eds, Protocol for Somatic Embryogenesis in Woody Plants, Vol 77. Springer Netherlands, pp 309-319
- Al-Khayri JM, Al-Bahrany AM** (2001) Silver nitrate and 2-isopentyladenine promote somatic embryogenesis in date palm (*Phoenix dactylifera* L.). *Scientia Horticulturae* **89**: 291-298
- Al-Khayri JM, Al-Bahrany AM** (2004) Genotype-dependent in vitro response of date palm (*Phoenix dactylifera* L.) cultivars to silver nitrate. *Scientia Horticulturae* **99**: 153-162
- Al-shahib W, Marshall RJ** (2003) The fruit of the date palm: its possible use as the best food for the future? *International Journal of Food Sciences and Nutrition* **54**: 247-259
- Al-Turki SM** (2008) Antioxidant Properties of Date Palm (*Phoenix dactylifera* L.) Cultivars. ProQuest
- Alla-N'Nan O, Tiécoura K, Bi SG, Verdeil J-L, Malaurie B** (2014) Ultrastructural changes during cryopreservation of plumules and embryos of coconut (*Cocos nucifera* L.). *International Journal of Agronomy and Agricultural Research* **5**: 103-115
- Ammar S, Benbadis A** (1977) Multiplication vegetative du Palmier-dattier (*Phoenix dactylifera* L.) par la culture de tissus de jeunes plantes issues de semis. *Comptes Rendus Hebdomadaires des Seances de l'Academie des Sciences. Serie D*

- Anchordoguy TJ, Rudolph AS, Carpenter JF, Crowe JH** (1987) Modes of interaction of cryoprotectants with membrane phospholipids during freezing. *Cryobiology* **24**: 324-331
- Apel K, Hirt H** (2004) Reactive oxygen species: Metabolism, Oxidative Stress, and Signal Transduction. *Annual Review of Plant Biology* **55**: 373-399
- Ashmore SE, Engelmann F** (1997) Status report on the development and application of *in vitro* techniques for the conservation and use of plant genetic resources. International Plant Genetic Resources Institute (IPGRI), Rome, Italy
- Ashraf Z, Hamidi-Esfahani Z** (2011) Date and Date Processing: A Review. *Food Reviews International* **27**: 101-133
- Ashwood-Smith MJ, Friedmann GB** (1979) Lethal and chromosomal effects of freezing, thawing, storage time, and x-irradiation on mammalian cells preserved at -196° in dimethyl sulfoxide. *Cryobiology* **16**: 132-140
- Bagniol S** (1992) Cryoconservation d'apex prelevés sur des vitroplants de palmier dattier (*Phoenix dactylifera* L.). Mise au point du protocole et étude histo-cytologique des échantillons au cours de la congélation et de la remise en culture. Thèse de doctorat. Paris 6, France
- Bagniol S, Engelmann F** (1992) Effect of thawing and recovery conditions on the regrowth of meristems of date palm (*Phoenix dactylifera* L.) after cryopreservation in liquid nitrogen. *CryoLetters*: 253-260
- Bagniol S, Engelmann F, Mihaux-Ferriere N** (1992) Histo-cytological study of apices from *in vitro* plantlets of Date Palm (*Phoenix dactylifera* L.) during a cryopreservation process. *CryoLetters* **13**: 405-412
- Bahmanpour S, Talaei T, Vojdani Z, Panjehshahin MR, Poostpasand A, Zareei S, Ghaemina M** (2006) Effect of *Phoenix dactylifera* pollen on sperm parameters and reproductive system of adult male rats. *IJMS* **31**: 208-212
- Banerjee N, Langhe Ed** (1985) A tissue culture technique for rapid clonal propagation and storage under minimal growth conditions of Musa (Banana and plantain). *Plant Cell Reports* **4**: 351-354
- Bannister AJ, Kouzarides T** (2011) Regulation of chromatin by histone modifications. *Cell Res* **21**: 381-395
- Barandalla L, Sánchez I, Ritter E, Ruiz de Galarreta JI** (2003) Conservation of potato (*Solanum tuberosum* L.) cultivars by cryopreservation. *Spanish Journal of Agricultural Research* **1**: 9-13
- Barraco G, Chatelet P, Balsemin E, Decourcelle T, Sylvestre I, Engelmann F** (2012) Cryopreservation of *Prunus cerasus* through vitrification and replacement of cold hardening

with preculture on medium enriched with sucrose and/or glycerol. *Scientia Horticulturae* **148**: 104-108

- Barraco G, Sylvestre I, Collin M, Escoute J, Lartaud M, Verdeil J-L, Engelmann F** (2014) Histocytological analysis of yam (*Dioscorea alata*) shoot tips cryopreserved by encapsulation-dehydration. *Protoplasma* **251**: 177-189
- Bekheet SA, Taha HS, Solliman ME, Hassan NA** (2007) Cryopreservation of date palm (*Phoenix dactylifera* L.) cultured *in vitro*. In A Zaid, V Hegarty, HHS AlKaabi, eds, Proceedings of the Iiird International Date Palm Conference. International Society Horticultural Science, Leuven 1, pp 283-291
- Benson EE** (1990) Free Radical Damage in Stored Plant Germplasm. International Board for Plant Genetic Resources (IBPGR), Rome, Italy
- Benson EE** (2004) Cryoconserving algal and plant diversity: historical perspectives and future challenges. In. Life in the Frozen State. CRC Press, London, UK, pp 299-328
- Benson EE** (2008) Cryopreservation Theory. In BM Reed, ed, Plant Cryopreservation: A Practical Guide. Springer New York, pp 15-32
- Benson EE, Lynch PT, Jones J** (1992) The detection of lipid peroxidation products in cryoprotected and frozen rice cells: consequences for post-thaw survival. *Plant Science* **85**: 107-114
- Benson EE, Johnston J, Muthusamy J, Harding K** (2006) Physical And Engineering Perspectives Of In Vitro Plant Cryopreservation. In SD Gupta, Y Ibaraki, eds, Plan Tissue Culture Engineering, Vol 6. Springer Netherlands, pp 441-476
- Benson EE, Wilkinson M, Todd A, Ekuere U, Lyon J** (1996) Developmental competence and ploidy stability in plants regenerated from cryopreserved potato shoot-tips. *CryoLetters* **17**: 119-128
- Berg G, Krechel A, Ditz M, Sikora RA, Ulrich A, Hallmann J** (2005) Endophytic and ectophytic potato-associated bacterial communities differ in structure and antagonistic function against plant pathogenic fungi. *FEMS Microbiology Ecology* **51**: 215-229
- Bhaskaran S, Smith RH** (1992) Somatic Embryogenesis from Shoot Tip and Immature Inflorescence of *Phoenix dactylifera* cv. Barhee. *Plant Cell Reports* **12**: 22-25
- Blakesley D, Mazrooei SA, Bhatti MH, Henshaw GG** (1996) Cryopreservation of non-encapsulated embryogenic tissue of sweet potato (*Ipomoea batatas*). *Plant Cell Reports* **15**: 873-876
- Block W** (2003) Water status and thermal analysis of alginate beads used in cryopreservation of plant germplasm. *Cryobiology* **47**: 59-72

- Boenisch T** (2009) Antibodies. *In* L Kummar, L Rudbeck, eds, Immunohistochemical (IHC) Staining Methods, Dako North America, California, pp 1-9
- Bouguedoura N, Michaux-Ferrière N, Bompar J-L** (1990) Comportement in vitro de bourgeons axillaires de type indéterminé du palmier dattier (*Phoenix dactylifera*). Canadian Journal of Botany **68**: 2004-2009
- Boyko A, Kovalchuk I** (2008) Epigenetic control of plant stress response. Environmental and Molecular Mutagenesis **49**: 61-72
- Bravo LA, Zúñiga GE, Alberdi M, Corcuera LJ** (1998) The role of ABA in freezing tolerance and cold acclimation in barley. Physiologia Plantarum **103**: 17-23
- Bridgen MP, Staby GL** (1981) Low pressure and low oxygen storage of *Nicotiana tabacum* and *Chrysanthemum × morifolium* tissue cultures. Plant Science Letters **22**: 177-186
- Brisson M, de Boucaud M-T, Dosba F** (1995) Cryopreservation of in vitro grown shoot tips of two interspecific *Prunus rootstocks*. Plant Science **105**: 235-242
- Brown PTH** (1989) DNA methylation in plants and its role in tissue culture. Genome **31**: 717-729
- Brown RC, Lemmon BE** (1995) Methods in plant immunolight microscopy. Methods Cell Biol **49**: 85-107
- Buchanan BB, Gruissem W, Jones RL** (2000) Biochemistry & molecular biology of plants, Vol 40. Amer. Soc. of Plant Physiologists, Rockville, Maryland, USA
- Carpenter JF, Crowe JH, Arakawa T** (1990) Comparison of Solute-Induced Protein Stabilization in Aqueous Solution and in the Frozen and Dried States. Journal of Dairy Science **73**: 3627-3636
- Castillo NRF, Bassil NV, Wada S, Reed BM** (2010) Genetic stability of cryopreserved shoot tips of *Rubus* germplasm. *In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant* **46**: 246-256
- Cavalli G** (2002) Chromatin as a eukaryotic template of genetic information. Current Opinion in Cell Biology **14**: 269-278
- Chan SWL, Henderson IR, Jacobsen SE** (2005) Gardening the genome: DNA methylation in *Arabidopsis thaliana*. Nature Reviews Genetics **6**: 351-360
- Chandel KPS, Chaudhury R, Radhamani J, Malik SK** (1995) Desiccation and Freezing Sensitivity in Recalcitrant Seeds of Tea, Cocoa and Jackfruit. Annals of Botany **76**: 443-450
- Channuntapipat C, Sedgley M, Collins G** (2003) Changes in Methylation and Structure of DNA from Almond Tissues during *in vitro* Culture and Cryopreservation. Journal of the American Society for Horticultural Science **128**: 890-897
- Chao CT, Krueger RR** (2007) The date palm (*Phoenix dactylifera* L.): overview of biology, uses, and cultivation. HortScience **42**: 1077-1082

- Chen M, Shaolei LV, Meng Y** (2010) Epigenetic performers in plants. *Dev Growth Differ* **52**: 555-566
- Cojocar T** (2010) Peroxidation of iron at the oil/water interface stabilized by milk proteins: influence of phosphate residues and stability of iron chelates. Thèse de doctorat. Université de Bourgogne, Dijon, France
- Cokus SJ, Feng S, Zhang X, Chen Z, Merriman B, Haudenschild CD, Pradhan S, Nelson SF, Pellegrini M, Jacobsen SE** (2008) Shotgun bisulphite sequencing of the Arabidopsis genome reveals DNA methylation patterning. *Nature* **452**: 215-219
- Coons AH, Creech HJ, Jones RN** (1941) Immunological properties of an antibody containing a fluorescent group. *Proc Soc Exp Biol Med* **47**: 200-202
- Corbineau F, Engelmann F, Côme D** (1990) Ethylene production as an indicator of chilling injury in oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.) somatic embryos. *Plant Science* **71**: 29-34
- Costa S, Shaw P** (2007) 'Open minded' cells: how cells can change fate. *Trends in Cell Biology* **17**: 101-106
- Crowe JH, Crowe LM, Carpenter JF, Rudolph AS, Wistrom CA, Spargo BJ, Anchordoguy TJ** (1988) Interactions of sugars with membranes. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Biomembranes* **947**: 367-384
- Daguin F, Letouzé R** (1988) Régénération du palmier dattier (*Phoenix dactylifera* L.) par embryogenèse somatique: amélioration de l'efficacité par passage en milieu liquide agité. *Fruits* **43**: 191-194
- Daher Meraneh A** (2010) Détermination du sexe chez le palmier dattier : approches histocytologiques et moléculaires. Thèse de doctorat. Université de Montpellier 2, Montpellier, France
- de Paula C, Techio V** (2014) Immunolocalization of chromosome-associated proteins in plants - principles and applications. *Botanical Studies* **55**: 63
- Decruse SW, Seeni S, Pushpangadan P** (1999) Cryopreservation of alginate coated shoot tips of *in vitro* grown *Holostemma annulare* (Roxb.) K. Schum, an endangered medicinal plant: influence of preculture and DMSO treatment on survival and regeneration. *CryoLetters* **20**: 243-250
- Del Prete S, Arpón J, Sakai K, Andrey P, Gaudin V** (2014) Nuclear Architecture and Chromatin Dynamics in Interphase Nuclei of Arabidopsis thaliana. *Cytogenetic and Genome Research* **143**: 28-50
- Dereuddre J, Scottez C, Arnaud Y, Duron M** (1990) Résistance d'apex caulinaires de vitroplants de Poirier (*Pyrus communis* L. cv Beurré Hardy), enrobés dans l'alginate, à une déshydratation puis à une congélation dans l'azote liquide : effet d'un durcissement

préalable au froid. Comptes rendus de l'Académie des sciences. Série 3, Sciences de la vie **310**: 317-323

- Dowgert MF, Steponkus PL** (1984) Behavior of the Plasma Membrane of Isolated Protoplasts during a Freeze-Thaw Cycle. *Plant Physiology* **75**: 1139-1151
- Drira N** (1983) Vegetative propagation of Date Palm (*Phoenix dactylifera* L.) by *in vitro* culture of axillary buds and of leaves originating from them. Comptes Rendus De L Academie Des Sciences Serie Iii-Sciences De La Vie-Life Sciences **296**: 1077-1082
- Drira N, Benbadis A** (1985) Multiplication végétative du Palmier dattier (*Phoenix dactylifera* L.) par réversion, en culture *in vitro*, d'ébauches florales de pieds femelles. *Journal of Plant Physiology* **119**: 227-235
- Druart P** (1985) *In vitro* germplasm preservation technique for fruit trees. In S-M A, ed, *In vitro Techniques. Propagation and Long Term Storage.*, Vol 14. Martinus Nijhoff Publishers, Dordrecht, Netherlands, pp 167-171
- Dumet D, Grapin A, Bailly C, Dorion N** (2002) Revisiting crucial steps of an encapsulation/desiccation based cryopreservation process: importance of thawing method in the case of *Pelargonium* meristems. *Plant Science* **163**: 1121-1127
- Dumet D, Engelmann F, Chabrilange N, Dussert S, Duval Y** (1994) Effect of various sugars and polyols on the tolerance to desiccation and freezing of oil palm polyembryonic cultures. *Seed Science Research* **4**: 307-313
- Dussert S, Chabrilange N, Montillet J-L, Agnel J-P, Engelmann F, Noirot M** (2003) Basis of coffee seed sensitivity to liquid nitrogen exposure: oxidative stress or imbibitional damage? *Physiologia Plantarum* **119**: 534-543
- Duval Y, Engelmann F, Durand-Gasselín T** (1995) Somatic Embryogenesis in Oil Palm (*Elaeis guineensis* Jacq.). In YPS Bajaj, ed, *Somatic Embryogenesis and Synthetic Seed I*, Vol 30. Springer Berlin Heidelberg, pp 335-352
- Eke CR, Akomeah P, Asemota O** (2005) Somatic embryogenesis in date palm (*Phoenix dactylifera* L.) from apical meristem tissues from 'zebia' and 'loko' landraces. *African Journal of Biotechnology* **4**: 244-246
- El-Assar AM, El-Messeih WM, El-Shenawi MR** (2004) Applying of some natural extracts and growth regulators to culture media their effects on Sewi cv. date palm tissues grown *in vitro*. *Assuit J. Agric. Sci* **35**: 155-168
- El-Tantawy A-A, Risueño MaC, Solís MaT, Testillano PS** (2014) Changes in DNA methylation levels and nuclear distribution patterns after microspore reprogramming to embryogenesis in barley. *Cytogenet Genome Res* **143**: 200-208

- Elleuch H, Gazeau C, David H, David A** (1998) Cryopreservation does not affect the expression of a foreign sam gene in transgenic *Papaver somniferum* cells. *Plant Cell Reports* **18**: 94-98
- Ellis RH, Hong TD, Roberts EH** (1990) An Intermediate Category of Seed Storage Behaviour? *Journal of Experimental Botany* **41**: 1167-1174
- Engelmann F** (1991) *In vitro* conservation of tropical plant germplasm - a review. *Euphytica* **57**: 227-243
- Engelmann F** (1992) Effects of freezing in liquid nitrogen on the properties of a soybean (*Glycine max* L. var. acme) callus strain used as a bioassay for cytokinin activity. *CryoLetters* **13**: 331-336
- Engelmann F** (1997) *In vitro* conservation methods. In JA Callow, BV Ford-Lloyd, HJ Newbury, eds, *Biotechnology and plant genetic resources: conservation and use*. CAB INTERNATIONAL, Wallingford, UK, pp 119-161
- Engelmann F** (1999) Management of field and in vitro germplasm collections. . In *Proceedings of a consultation meeting International Plant Genetic Resources Institute, Rome, Italy*
- Engelmann F** (2004) Plant cryopreservation: Progress and prospects. *In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant* **40**: 427-433
- Engelmann F** (2010) Conservation des ressources génétiques du palmier dattier. In F Aberlenc-Bertossi, ed, *Biotechnologies du palmier dattier*. IRD Editions pp 161-174
- Engelmann F** (2011) Use of biotechnologies for the conservation of plant biodiversity. *In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant* **47**: 5-16
- Engelmann F** (2014) Cryopreservation of Clonal Crops: a Review of Key Parameters. II *International Symposium on Plant Cryopreservation* **1039**: 31-39
- Engelmann F, Dussert S** (2000) Développement de la cryoconservation pour la conservation des ressources génétiques végétales. *Cahiers Agricultures* **9**: 237-244
- Engelmann F, Engels JMM** (2002) Technologies and strategies for *ex situ* conservation. In JMM Engels, V Ramanatha Rao, AHD Brown, MT Jackson, eds, *Managing plant genetic diversity*. CABI Publishing, Wallingford, UK, pp 89-103
- Engelmann F, Dussert S** (2013) Cryopreservation. In MN Normah, HF Chin, BM Reed, eds, *Conservation of Tropical Plant Species*. Springer New York, pp 107-119
- Engelmann F, Arnao M-TG, Wu Y, Escobar R** (2008) Development of Encapsulation Dehydration. In BM Reed, ed, *Plant Cryopreservation: A Practical Guide*. Springer New York, pp 59-75
- Engelmann-Sylvestre I, Engelmann F** (2015) Cryopreservation of *in vitro*-grown shoot tips of *Clinopodium odorum* using aluminium cryo-plates. *In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant*: 1-7

- Engels J, Visser B** (2003) Genebank Management Procedures. *In* EJM M., L Visser, eds, A guide to effective management of germplasm collections. IPGRI, Rome, Italy, pp 60-80
- Ergle DR, Katterman FRH** (1961) Deoxyribonucleic acid of cotton 1. *Plant Physiology* **36**: 811-815
- Espinoza N, Lizarraga R, Silva - Rodriguez D** (1989) Tissue culture micropropagation, conservation, and export of potato germplasm. International Potato Center, Lima, Peru
- Fabre J, Dereuddre J** (1990) Encapsulation-dehydration: a new approach to cryopreservation of *Solanum* shoot-tips. *CryoLetters*: 413-126
- Fahy GM, Levy DI, Ali SE** (1987) Some emerging principles underlying the physical properties, biological actions, and utility of vitrification solutions. *Cryobiology* **24**: 196-213
- Fahy GM, MacFarlane DR, Angell CA, Meryman HT** (1984) Vitrification as an approach to cryopreservation. *Cryobiology* **21**: 407-426
- Fahy GM, Wowk B, Wu J, Paynter S** (2004) Improved vitrification solutions based on the predictability of vitrification solution toxicity. *Cryobiology* **48**: 22-35
- Ferry M** (2011) Potential of Date Palm Micropropagation for Improving Small Farming Systems. *In* SM Jain, JM Al-Khayri, DV Johnson, eds, Date Palm Biotechnology. Springer Netherlands, pp 15-28
- Finnegan EJ, Brettell RIS, Dennis ES** (1993) The role of DNA methylation in the regulation of plant gene expression. *In* J-P Jost, H-P Saluz, eds, DNA Methylation, Vol 64. Birkhäuser Basel, pp 218-261
- Fki L** (2005) Application des suspensions cellulaires embryogenes au clonage et à l'amélioration in vitro du Palmier dattier. Thèse de doctorat. Faculté des Sciences de Sfax, Sfax, Tunisie
- Fki L, Masmoudi R, Drira N, Rival A** (2003) An optimised protocol for plant regeneration from embryogenic suspension cultures of date palm, *Phoenix dactylifera* L., cv. Deglet Nour. *Plant Cell Reports* **21**: 517-524
- Fki L, Kiaa W, Sahnoun N, Bouaziz N, Masmoudi R, Drira N** (2010) Production de vitroplants de palmier dattier à l'échelle pilote, Schémas de production et traitement des contraintes. *In* F Aberlenc-Bertossi, ed, Biotechnologies du palmier dattier. IRD Editions, pp 195-214
- Fki L, Bouaziz N, Sahnoun N, Swennen R, Drira N, Panis B** (2011a) Palm Cryobanking. *CryoLetters* **32**: 451-462
- Fki L, Bouaziz N, Kriaa W, Benjemaa-Masmoudi R, Gargouri-Bouazid R, Rival A, Drira N** (2011b) Multiple bud cultures of 'Barhee' date palm (*Phoenix dactylifera*) and physiological status of regenerated plants. *Journal of Plant Physiology* **168**: 1694-1700

- Fki L, Bouaziz N, Chkir O, Benjemaa-Masmoudi R, Rival A, Swennen R, Drira N, Panis B** (2013) Cold hardening and sucrose treatment improve cryopreservation of date palm meristems. *Biologia Plantarum* **57**: 375-379
- Fki L, Masmoudi R, Kriaâ W, Mahjoub A, Sghaier B, Mzid R, Mliki A, Rival A, Drira N** (2011c) Date Palm Micropropagation via Somatic Embryogenesis. *In* SM Jain, JM Al-Khayri, DV Johnson, eds, *Date Palm Biotechnology*. Springer Netherlands, pp 47-68
- Folgado R, Sergeant K, Renaut J, Swennen R, Hausman J-F, Panis B** (2014) Changes in sugar content and proteome of potato in response to cold and dehydration stress and their implications for cryopreservation. *Journal of Proteomics* **98**: 99-111
- Ford CS, Jones NB, Van Staden J** (2000) Cryopreservation and plant regeneration from somatic embryos of *Pinus patula*. *Plant Cell Reports* **19**: 610-615
- Foubert I, Dewettinck K, Walle DVd, Dijkstra AJ, Quinn PJ** (2007) Physical Properties: Structural and Physical Characteristics. *In* *The Lipid Handbook Ed Third*. CRC Press, pp 471-534
- Frankel OH, Brown AHD, Burdon JJ** (1995) *The Conservation of Plant Biodiversity*. Cambridge University Press Cambridge, UK
- Fransz P, de Jong JH, Lysak M, Castiglione MR, Schubert I** (2002) Interphase chromosomes in *Arabidopsis* are organized as well defined chromocenters from which euchromatin loops emanate. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **99**: 14584-14589
- Furt F, Simon-Plas F, Mongrand S** (2011) Lipids of the Plant Plasma Membrane. *In* AS Murphy, B Schulz, W Peer, eds, *The Plant Plasma Membrane*. Springer Berlin Heidelberg, pp 3-30
- Gallard A** (2008) Etude de la cryoconservation d'apex en vue d'une conservation à long terme de collections de ressources génétiques végétales: compréhension des phénomènes mis en jeu et évaluation de la qualité du matériel régénéré sur le modèle *Pelargonium*. Thèse de doctorat. Université d'Angers, Angers, France
- Gardès-Albert M, Bonnefont-Rousselot D, Abedinzadeh Z, Jore D** (2003) Espèces réactives de l'oxygène. Comment l'oxygène peut-il devenir toxique? *L'actualité chimique*: 91-96
- George EF, Hall MA, Klerk G-Jd** (2007) *Plant Propagation by Tissue Culture Ed 3 Vol 1*. Springer, Dordrecht, Netherlands
- Gill SS, Tuteja N** (2010) Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants. *Plant Physiology and Biochemistry* **48**: 909-930
- Gill SS, Khan NA, Anjum NA, Tuteja N** (2011) Amelioration of cadmium stress in crop plants by nutrients management: Morphological, physiological and biochemical aspects. *Plant Stress* **5**: 1-23

- Gonzalez Arnao MT, Engelmann F, Huet C, Urrea C** (1993) Cryopreservation of encapsulated apices of sugarcane: effect of freezing procedure and histology. *CryoLetters* **14**: 303-308
- Gonzalez-Arnao MT, Engelmann F** (2006) Cryopreservation of Plant Germplasm Using the Encapsulation-dehydration Technique: Review and Case Study on Sugarcane. *CryoLetters* **27**: 155-168
- Gonzalez-Arnao MT, Martinez-Montero ME, Cruz-Cruz CA, Engelmann F** (2014) Advances in Cryogenic Techniques for the Long-Term Preservation of Plant Biodiversity. *In* MR Ahuja, KG Ramawat, eds, *Biotechnology and Biodiversity*. Springer International Publishing, pp 129-170
- Grapin A, Dumet D, Holota H, Dorion N** (2003) Cryopreservation of Pelargonium shoot tips by encapsulation-dehydration: effects of sucrose concentration, dehydration duration and genotype. *Acta horticulturae*: 225-230
- Grout BWW** (1995) Introduction to the in Vitro Preservation of Plant Cells, Tissues and Organs. *In* DB Grout, ed, *Genetic Preservation of Plant Cells in Vitro*. Springer Berlin Heidelberg, pp 1-20
- Guo T, Fang Y** (2014) Functional organization and dynamics of the cell nucleus. *Frontiers in Plant Science* **5**: 378
- Hadrami IE, Baaziz M** (1995) Somatic embryogenesis and analysis of peroxidases in *Phoenix dactylifera* L. *Biologia Plantarum* **37**: 197-203
- Hadrami IE, Cheikh R, Baaziz M** (1995) Somatic embryogenesis and plant regeneration from shoot-tip explants in *Phoenix dactylifera* L. *Biologia Plantarum* **37**: 205-211
- Halliwell B, Gutteridge J** (2007) *Free Radicals in Biology and Medicine*, Ed Fourth. Oxford University Press, New York, USA
- Halmagyi A, Fischer-Klüver G, Mix-Wagner G, Schumacher HM** (2004) Cryopreservation of *Chrysanthemum morifolium* (*Dendranthema grandiflora* Ramat.) using different approaches. *Plant Cell Reports* **22**: 371-375
- Harding K** (1991) Molecular stability of the ribosomal RNA genes in *Solanum tuberosum* plants recovered from slow growth and cryopreservation. *Euphytica* **55**: 141-146
- Harding K** (2004) Genetic integrity of cryopreserved plant cells: A review. *CryoLetters* **25**: 3-22
- Harding K, Benson EE** (1994) A study of growth, flowering, and tuberisation in plants derived from cryopreserved potato shoot-tips: implications for in vitro germplasm collections. *CryoLetters* **15**: 59-66
- Harding K, Benson EE** (2000) The use of microsatellite analysis in *Solanum tuberosum* l. *in vitro* plantlets derived from cryopreserved germplasm. *CryoLetters* **22**: 199-208

- Harding K, Millam S** (2000) Analysis of chromatin, nuclear DNA and organelle composition in somatic hybrids between *Solanum tuberosum* and *Solanum sanctae-rosae*. *Theoretical and Applied Genetics* **101**: 939-947
- Harding K, Johnston JW, Benson EE** (2008) Exploring the physiological basis of cryopreservation success and failure in clonally propagated *in vitro* crop plant germplasm. *Agricultural and Food Science* **18**: 103-116
- Hasbún R, Valledor L, Santamaria E, Canal M, Rodriguez R, Berdasco M** (2007) Dynamics of DNA methylation in chestnut trees development. *Acta Horticulturae* **760**: 563
- Heine-Dobbernack E, Kiesecker H, Schumacher HM** (2008) Cryopreservation of Dedifferentiated Cell Cultures. *In* BM Reed, ed, *Plant Cryopreservation: A Practical Guide*. Springer New York, pp 141-176
- Helliot B, Madur D, Dirlwanger E, Boucaud MTD** (2002) Evaluation of genetic stability in cryopreserved Prunus. *In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant* **38**: 493-500
- Heringer AS, Steinmacher DA, Fraga HPF, Vieira LN, Ree JF, Guerra MP** (2013) Global DNA methylation profiles of somatic embryos of peach palm (*Bactris gasipaes* Kunth) are influenced by cryoprotectants and droplet-vitrification cryopreservation. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* **114**: 365-372
- Heselmans M** (1997) Setting research priorities through an international date palm network. *In* *Biotechnology and Development Monitor*, pp 18-20
- Hirai D, Sakai A** (1999) Cryopreservation of *in vitro*-grown meristems of potato (*Solanum tuberosum* L.) by encapsulation-vitrification. *Potato Research* **42**: 153-160
- Holliday R** (1994) Epigenetics: An overview. *Developmental Genetics* **15**: 453-457
- Homes J, Dubus F, Bourdon JL** (1982) Cold storage of plant tissue cultures. *In* F A., ed, 5th International Congress of Plant Tissue and Cell Culture. *Plant Tissue and Cell Culture*, Tokyo and Lake Yamanake, Japan, pp 801–802
- Jain SM** (2012) *In vitro* mutagenesis for improving date palm (*Phoenix dactylifera* L.). *Emir J Food Agric* **24**: 400-407
- Jaligot E, Ilbert P, Rival A** (2010) Etude et maîtrise des variants somaclonaux chez le palmier à huile. *In* F Aberlenc-Bertossi, ed, *Biotechnologies du palmier dattier*. IRD, pp 187-193
- Jaligot E, Rival A, Beulé T, Dussert S, Verdeil JL** (2000) Somaclonal variation in oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.): the DNA methylation hypothesis. *Plant Cell Reports* **19**: 684-690
- Jevtić P, Edens LJ, Vuković LD, Levy DL** (2014) Sizing and shaping the nucleus: mechanisms and significance. *Current Opinion in Cell Biology* **28**: 16-27
- Jin W, Lamb JC, Zhang W, Kolano B, Birchler JA, Jiang J** (2008) Histone modifications associated with both A and B chromosomes of maize. *Chromosome Res* **16**: 1203-1214

- Jitsuyama Y, Suzuki T, Harada T, Fujikawa S** (2002) Sucrose incubation increases freezing tolerance of Asparagus (*Asparagus officinalis* L.) embryogenic cell suspensions. *CryoLetters* **23**: 103-112
- Johnson DV** (2011) Introduction: Date Palm Biotechnology from Theory to Practice. *In* SM Jain, JM Al-Khayri, DV Johnson, eds, Date Palm Biotechnology. Springer Netherlands, pp 1-11
- Johnson TB, Coghill RD** (1925) Researches on pyrimidines. C111. The discovery of 5-methylcytosine in tuberculinic acid, the nucleic acid of the tubercle bacillus1. *Journal of the American Chemical Society* **47**: 2838-2844
- Johnston JW, Benson EE, Harding K** (2009) Cryopreservation induces temporal DNA methylation epigenetic changes and differential transcriptional activity in *Ribes* germplasm. *Plant Physiology and Biochemistry* **47**: 123-131
- Jung D-W, Sung CKi, Touno K, Yoshimatsu K, Shimomura K** (2001) Cryopreservation of *Hyoscyamus niger* adventitious roots by vitrification. *Journal of Plant Physiology* **158**: 801-805
- Kaczmarczyk A, Rokka V-M, Keller ERJ** (2011) Potato Shoot Tip Cryopreservation. A Review. *Potato Research* **54**: 45-79
- Kaczmarczyk A, Houben A, Keller ERJ, Mette MF** (2010) Influence of Cryopreservation on the Cytosine Methylation State of Potato Genomic DNA. *CryoLetters* **31**: 380-391
- Kaczmarczyk A, Funnekotter B, Menon A, Phang PY, Al-Hanbali A, Bunn E, Mancera RL** (2012) Current issues in plant cryopreservation. *In* Current frontiers in cryobiology. InTech, pp 417-438
- Kadzimin Sb** (1988) Germplasm preservation of orchid through tissue culture. *In* U R.C., U I., H S., N M.N., eds, Application of Tissue Culture Techniques in Economically Important Tropical Species, Vol 35. Biotrop Special Publ., Bogor, Indonesia, pp 167-179
- Kaity A, Drew RA, Ashmore SE** (2013) Genetic and epigenetic integrity assessment of acclimatised papaya plants regenerated directly from shoot-tips following short- and long-term cryopreservation. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* **112**: 75-86
- Kaity A, Ashmore SE, Drew RA, Dulloo ME** (2008) Assessment of genetic and epigenetic changes following cryopreservation in papaya. *Plant Cell Reports* **27**: 1529-1539
- Karp A** (1991) On the current understanding of somaclonal variation. *In* BJ Mifflin, ed, Oxford surveys of plant molecular and cell biology, Vol 7. Oxford University Press, pp 1-50
- Kartha KK, Engelmann F** (1994) Cryopreservation and Germplasm Storage. *In* IK Vasil, TA Thorpe, eds, Plant Cell and Tissue Culture. Springer Netherlands, pp 195-230

- Kartha KK, Leung NL, Mroginski LA** (1982) *In vitro* Growth Responses and Plant Regeneration from Cryopreserved Meristems of Cassava (*Manihot esculenta* Crantz). *Zeitschrift für Pflanzenphysiologie* **107**: 133-140
- Keller ERJ, Kaczmarczyk A, Senula A** (2008) Cryopreservation for plant genebanks - a matter between high expectations and cautious reservation. *CryoLetters* **29**: 53-62
- Khan A** (2001) *Plant Anatomy and Physiology*. Kalpaz Press, New Delhi, India
- Kim HH, Cho EG, Park SU** (2006) Analysis of Factors Affecting the Cryopreservation of Garlic Shoot Tips. *Journal of Biomedical Nanotechnology* **2**: 129-132
- Kim HH, Lee Y-G, Shin D-J, Ko H-C, Gwag J-G, Cho E-G, Engelmann F** (2009) Development of Alternative Plant Vitrification Solutions in Droplet-Vitrification Procedures. *CryoLetters* **30**: 320-334
- Kim HH, Popova EV, Yi JY, Cho GT, Park SU, Lee SC, Engelmann F** (2010) Cryopreservation of hairy roots of *Rubia akane* (Nakai) using a droplet-vitrification procedure. *CryoLetters* **31**: 473-484
- Kim JB, Kim HH, Baek HJ, Cho EG, Kim YH, Engelmann F** (2005) Changes in sucrose and glycerol content in garlic shoot tips during freezing using PVS3 solution. *CryoLetters* **26**: 103-112
- Knox RB** (1970) Freeze-sectioning of plant tissues. *Stain Technol* **45**: 265-272
- Koo B, Smale M, Engels JMM, Visser L** (2003) Economic costs of genebank operation. A guide to effective management of germplasm collections. IPGRI, Rome: 93-106
- Kouzarides T** (2007) Chromatin modifications and their function. *Cell* **128**: 693-705
- Kozai T, Kubota C, Jeong BR** (1997) Environmental control for the large-scale production of plants through *in vitro* techniques. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* **51**: 49-56
- Kumaran RI, Thakar R, Spector DL** (2008) Chromatin Dynamics and Gene Positioning. *Cell* **132**: 929-934
- Kunert KJ, Baaziz M, Cullis CA** (2003) Techniques for Determination of True to type Date Palm (*Phoenix dactylifera* L.) Plants : A Literature Review. *EMIR J AGRIC SCI* **15**: 1-16
- Langis R, Schnabel B, Earle ED, Steponkus PL** (1989) Cryopreservation of *Brassica campestris* L. . *CryoLetters* **10**: 421-428
- Larkin PJ, Scowcroft WR** (1981) Somaclonal variation — a novel source of variability from cell cultures for plant improvement. *Theoretical and Applied Genetics* **60**: 197-214
- Leary JV, Nelson N, Tisserat B, Allingham EA** (1986) Isolation of Pathogenic *Bacillus circulans* from Callus Cultures and Healthy Offshoots of Date Palm (*Phoenix dactylifera* L.). *Applied and Environmental Microbiology* **52**: 1173-1176

- Leborgne N, Teulieres C, Travert S, Rols M-P, Teissie J, Boudet AM** (1995) Introduction of Specific Carbohydrates into *Eucalyptus gunnii* Cells Increases their Freezing Tolerance. *European Journal of Biochemistry* **229**: 710-717
- Leifert C, Morris CE, Waites WM** (1994) Ecology of Microbial Saprophytes and Pathogens in Tissue Culture and Field-Grown Plants: Reasons for Contamination Problems In Vitro. *Critical Reviews in Plant Sciences* **13**: 139-183
- Lenné T, Garvey CJ, Koster KL, Bryant G** (2010) Kinetics of the lamellar gel–fluid transition in phosphatidylcholine membranes in the presence of sugars. *Chemistry and Physics of Lipids* **163**: 236-242
- Leunufna S, Keller ERJ** (2003) Investigating a new cryopreservation protocol for yams (*Dioscorea* spp.). *Plant Cell Reports* **21**: 1159-1166
- Li E, Bestor TH, Jaenisch R** (1992) Targeted mutation of the DNA methyltransferase gene results in embryonic lethality. *Cell* **69**: 915-926
- Lister R, O'Malley RC, Tonti-Filippini J, Gregory BD, Berry CC, Millar AH, Ecker JR** (2008) Highly Integrated Single-Base Resolution Maps of the Epigenome in Arabidopsis. *Cell* **133**: 523-536
- LoSchiavo F, Pitto L, Giuliano G, Torti G, Nuti-Ronchi V, Marazziti D, Vergara R, Orselli S, Terzi M** (1989) DNA methylation of embryogenic carrot cell cultures and its variations as caused by mutation, differentiation, hormones and hypomethylating drugs. *Theoretical and Applied Genetics* **77**: 325-331
- Loutfi K, El Hadrami I** (2005) *Phoenix dactylifera* Date Palm. In RE Litz, ed, *Biotechnology of fruit and nut crops*. CAB International, Wallingford, pp 144-156
- Lovelock JE** (1953) Het mechanism of the protective action of glycerol against haemolysis by freezing and thawing. *Biochimica et Biophysica Acta* **11**: 28-36
- Lovelock JE, Bishop MWH** (1959) Prevention of Freezing Damage to Living Cells by Dimethyl Sulphoxide. *Nature* **183**: 1394-1395
- Lu Z-W, Popova EV, Wu C-H, Lee E-J, Hahn E-J, Paek K-Y** (2009) Cryopreservation of Ginkgo Biloba Cell Culture: Effect of Pretreatment with Sucrose and Aba. *CryoLetters* **30**: 232-243
- Luger K, Mader AW, Richmond RK, Sargent DF, Richmond TJ** (1997) Crystal structure of the nucleosome core particle at 2.8Ådegrees resolution. *Nature* **389**: 251-260
- Lynch DV, Steponkus PL** (1987) Plasma Membrane Lipid Alterations Associated with Cold Acclimation of Winter Rye Seedlings (*Secale cereale* L. cv Puma). *Plant Physiology* **83**: 761-767

- Lynch PT** (1999) Tissue culture techniques in *in vitro* plant conservation. In EE Benson, ed, Plant conservation biotechnology, pp 41-62
- Lynch PT, Benson E** (1991) Cryopreservation, a method for maintaining the plant regeneration capability of rice cell suspension cultures. In Proceeding of the Second International Rice Genetics Symposium. International Rice Reserch Institue, Manila, Philippines, pp 321-332
- Lynch PT, Siddika A, Johnston JW, Trigwell SM, Mehra A, Benelli C, Lambardi M, Benson EE** (2011) Effects of osmotic pretreatments on oxidative stress, antioxidant profiles and cryopreservation of olive somatic embryos. *Plant Science* **181**: 47-56
- MacNeely JA, Ness G** (1996) People, parks, and biodiversity: issues in population-environment dynamics. In D V., ed, Human Population, Biodiversity and Protected Areas: Science and Policy Issues. American Association for the Advancement of Science, Washington, USA, pp 19-70
- Magnaval C, Noirot M, Verdeil JL, Blattes A, Huet C, Grosdemange F, Beulé T, Buffard-Morel J** (1997) Specific nutritional requirements of coconut calli (*Cocos nucifera* L.) during somatic embryogenesis induction. *Journal of Plant Physiology* **150**: 719-728
- Mankessi F, Saya AR, Montes F, Lartaud M, Verdeil J-L, Monteuis O** (2011) Histocytological characteristics of *Eucalyptus urophylla* × *Eucalyptus grandis* shoot apical meristems of different physiological ages. *Trees* **25**: 415-424
- Mankessi F, Saya AR, Boudon F, Guédon Y, Montes F, Lartaud M, Verdeil J-L, Monteuis O** (2010) Phase change-related variations of dome shape in *Eucalyptus urophylla* × *Eucalyptus grandis* shoot apical meristems. *Trees* **24**: 743-752
- Mari S, Engelmann F, Chabrillange N, Huet C, Michaux-Ferriere N** (1995) Histo-cytological study of apices of coffee (*Coffea racemosa* and *C. sessiliflora*) *in vitro* plantlets during their cryopreservation using the encapsulation-dehydration technique. *CryoLetters* **16**: 289-298
- Martín C, González-Benito ME** (2005) Survival and genetic stability of *Dendranthema grandiflora* Tzvelev shoot apices after cryopreservation by vitrification and encapsulation–dehydration. *Cryobiology* **51**: 281-289
- Marttila S, Santén K** (2007) Practical aspects of Immunomicroscopy on plant material. *Modern Research and Educational Topics in Microscopy*: 1015-1021
- Masmoudi R, Rival A, Nato A, Lavergne D, Drira N, Ducreux G** (1999) Carbon metabolism in *in vitro* cultures of date palm: the role of carboxylases (PEPC and RubisCO). *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* **57**: 139-143
- Matsumoto T, Sakai A, Yamada K** (1994) Cryopreservation of *in vitro*-grown apical meristems of wasabi (*Wasabia japonica*) by vitrification and subsequent high plant regeneration. *Plant Cell Reports* **13**: 442-446

- Matsumoto T, Yamamoto S, Fukui K, Niino T** (2013) Cryopreservation of persimmon shoot tips using D cryo-plate procedure. *In* Abst. Second Intl. Symp. on Plant Cryopreservation, Fort Collins, USA
- Matsumoto T, Sakai A, Geibel M, Fischer M, Fischer C** (2000) Cryopreservation of *in vitro*-cultured axillary shoot tips of *Vitis* by vitrification. *Acta Horticulturae*: 173-175
- Matsumoto T, Yamamoto S-i, Fukui K, Rafique T, Engelmann F, Niino T** (2015) Cryopreservation of Persimmon Shoot Tips from Dormant Buds Using the D Cryo-plate Technique. *The Horticulture Journal* **84**: 106-110
- Maximow NA** (1912) Chemische Schutzmittel der Pflanzen gegen Erfrieren: 1. *In* Botanische gesellschaft, pp 52-65
- Maxted N, Ford-Lloyd BV, Hawkes JG** (1997) Complementary conservation strategies. *In* N Maxted, BV Ford-Lloyd, JG Hawkes, eds, *Plant Genetic Conservation*. Springer Netherlands, pp 15-39
- McMullen RL, Bauza E, Gondran C, Oberto G, Domloge N, Farra CD, Moore DJ** (2010) Image analysis to quantify histological and immunofluorescent staining of *ex vivo* skin and skin cell cultures. *International Journal of Cosmetic Science* **32**: 143-154
- Meijón M, Valledor L, Santamaría E, Testillano PS, Risueño MC, Rodríguez R, Feito I, Cañal MJ** (2009) Epigenetic characterization of the vegetative and floral stages of azalea buds: Dynamics of DNA methylation and histone H4 acetylation. *Journal of Plant Physiology* **166**: 1624-1636
- Michaux-Ferrière N, Schwendiman J** (1992) Histology of Somatic Embryogenesis. *In* DY Dattée, PDC Dumas, PDA Gallais, eds, *Reproductive Biology and Plant Breeding*. Springer Berlin Heidelberg, pp 247-259
- Mikuła A, Tomiczak K, Rybczyński JJ** (2011) Cryopreservation enhances embryogenic capacity of *Gentiana cruciata* (L.) suspension culture and maintains (epi)genetic uniformity of regenerants. *Plant Cell Reports* **30**: 565-574
- Mittler R, Vanderauwera S, Gollery M, Van Breusegem F** (2004) Reactive oxygen gene network of plants. *Trends in Plant Science* **9**: 490-498
- Mix-Wagner G** (1999) The conservation of potato cultivars. *Potato Research* **42**: 427-436
- Moges AD, Karam NS, Shibli RA** (2003) Slow growth *in vitro* preservation of African violet (*Saintpaulia ionantha* Wendl.) shoot tips. *Advanced Horticultural Science* **17**: 1-8
- Moghaddam AMB, Fucs J, Czauderna T, Houben A, Mette MF** (2010) Intraspecific hybrids of *Arabidopsis thaliana* revealed no gross alterations in endopolyploidy, DNA methylation, histone modifications and transcript levels. *Theor Appl Genet* **120**: 215-226

- Møller IM, Jensen PE, Hansson A** (2007) Oxidative Modifications to Cellular Components in Plants. *Annual Review of Plant Biology* **58**: 459-481
- Monette PL** (1987) Organogenesis and plantlet regeneration following *in vitro* cold storage of kiwifruit shoot tip cultures. *Scientia Horticulturae* **31**: 101-106
- Munier P** (1973) Le palmier dattier *In Techniques Agricoles et Productions Tropicales*. Maisonneuve et Larose, Paris 5eme, Paris, France, p 217
- Murashige T** (1974) Plant Propagation Through Tissue Cultures. *Annual Review of Plant Physiology* **25**: 135-166
- Murashige T, Skoog F** (1962) A Revised Medium for Rapid Growth and Bio Assays with Tobacco Tissue Cultures. *Physiologia Plantarum* **15**: 473-497
- Murch SJ, Ragone D, Shi WL, Alan AR, Saxena PK** (2008) In vitro conservation and sustained production of breadfruit (*Artocarpus altilis*, Moraceae): modern technologies for a traditional tropical crop. *Naturwissenschaften* **95**: 99-107
- Mycock DJ, Wesley-Smith J, Berjak P** (1995) Cryopreservation of Somatic Embryos of Four Species With and Without Cryoprotectant Pre-treatment. *Annals of Botany* **75**: 331-336
- Newman LA, Reynolds CM** (2005) Bacteria and phytoremediation: new uses for endophytic bacteria in plants. *Trends in Biotechnology* **23**: 6-8
- Niino T, Sakai A** (1992) Cryopreservation of alginate-coated in vitro-grown shoot tips of apple, pear and mulberry. *Plant Science* **87**: 199-206
- Niino T, Yamamoto S-I, Fukui K, Martínez CRC, Arizaga MV, Matsumoto T, Engelmann F** (2013) Dehydration Improves Cryopreservation of Mat Rush (*Juncus decipiens* Nakai) Basal Stem Buds on Cryo-plates. *CryoLetters* **34**: 549-560
- Niino T, Wunna, Watanabe K, Nohara N, Rafique T, Yamamoto S-i, Fukui K, Arizaga MV, Martinez CRC, Matsumoto T, Engelmann F** (2014) Cryopreservation of mat rush lateral buds by air dehydration using aluminum cryo-plate. *Plant Biotechnology* **31**: 281-287
- Nishizawa S, Sakai A, Amano Y, Matsuzawa T** (1993) Cryopreservation of asparagus (*Asparagus officinalis* L.) embryogenic suspension cells and subsequent plant regeneration by vitrification. *Plant Science* **91**: 67-73
- Nouaille C** (1991) La diversité génétique: terre à l'abandon? ou continent à découvrir? *Biofutur* **97**: 22-41
- Obert B, Benson EE, Millam S, Pref'ová A, Bremner DH** (2005) Moderation of morphogenetic and oxidative stress responses in flax in vitro cultures by hydroxynonenal and desferrioxamine. *Journal of Plant Physiology* **162**: 537-547
- OCDE** (2008) Regards sur l'éducation. *In LES INDICATEURS DE L'OCDE. ORGANISATION DE COOPÉRATION ET DE DÉVELOPPEMENT ÉCONOMIQUES*

- Örvar BL, Sangwan V, Omann F, Dhindsa RS** (2000) Early steps in cold sensing by plant cells: the role of actin cytoskeleton and membrane fluidity. *The Plant Journal* **23**: 785-794
- Othmani A, Bayoudh C, Drira N, Marrakchi M, Trifi M** (2009) Somatic embryogenesis and plant regeneration in date palm *Phoenix dactylifera* L., cv. Boufeggous is significantly improved by fine chopping and partial desiccation of embryogenic callus. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* **97**: 71-79
- Ouennoughi M, Dubost D** (2005) Le voyage forcé des dattiers en Nouvelle-Calédonie. *Science et changements planétaires / Sécheresse* **16**: 241-246
- Panis B, Swennen R, Engelmann F** (2000) Cryopreservation of plant germplasm. In S Sorvari, S Karhu, E Kanervo, S Pihakaski, eds, IV International Symposium on In Vitro Culture and Horticultural Breeding, Vol 1. Acta Hort. (ISHS), Tampere, Finland, pp 79-86
- Panis B, Piette B, Swennen R** (2005) Droplet vitrification of apical meristems: a cryopreservation protocol applicable to all Musaceae. *Plant Science* **168**: 45-55
- Panis B, Strosse H, Van Den Hende S, Swennen R** (2002) Sucrose preculture to simplify cryopreservation of banana meristem cultures. *CryoLetters* **23**: 375-384
- Paquier K** (2002) Embryogenèse somatique du palmier dattier (*Phoenix dactylifera* L.) à partir de plants immatures issus de culture de tissu et cryoconservation des embryons. Thèse de doctorat. Université d'Angers, Angers, France
- Parveez GKA, Masri MM, Zainal A, Abdul Majid Ni, Mat Yunus AM, Fadilah HH, Rasid O, Cheah S-C** (2000) Transgenic oil palm: production and projection. *Biochemical Society Transactions* **28**: 969-971
- Pence VC** (2001) Cryopreservation of Shoot Tips of *Selaginella uncinata*. *American Fern Journal* **91**: 37-40
- Peredo EL, Arroyo-García R, Reed BM, Revilla MÁ** (2008) Genetic and epigenetic stability of cryopreserved and cold-stored hops (*Humulus lupulus* L.). *Cryobiology* **57**: 234-241
- Pérez M, Viejo M, LaCuesta M, Toorop P, Cañal MJ** (2015) Epigenetic and hormonal profile during maturation of *Quercus Suber* L. somatic embryos. *Journal of Plant Physiology* **173**: 51-61
- Peyron G** (2000) Cultiver le palmier-dattier. Editions Quae, La librairie du CIRAD, France
- Plitta BP, Michalak M, Naskręć-Barciszewska MZ, Barciszewski J, Chmielarz P** (2014) DNA methylation of *Quercus robur* L. plumules following cryo-pretreatment and cryopreservation. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* **117**: 31-37
- Polge C, Smith AU, Parkes AS** (1949) Revival of Spermatozoa after Vitrification and Dehydration at Low Temperatures. *Nature* **164**: 666

- Popenoe W** (1920) Manual of tropical and subtropical fruits, excluding the banana, coconut, pineapple, citrus fruits, olive, and fig. The Macmillan Company, New York, USA
- Popova EV, Lee E-J, Wu C-H, Hahn E-J, Paek K-Y** (2009) A simple method for cryopreservation of *Ginkgo biloba* callus. *Plant Cell Tissue and Organ Culture* **97**: 337-343
- Poulain C, Rhiss A, Beauchesne G** (1979) Multiplication vegetative en culture in vitro du palmier-dattier (*Phoenix dactylifera* L.). *In* Comptes rendus des seances de l'Academie d'agriculture de France. , Vol 11, Paris, France, pp 1151-1154
- Quatrano RS** (1968) Freeze-Preservation of Cultured Flax Cells Utilizing Dimethyl Sulfoxide 1. *Plant Physiology* **43**: 2057-2061
- Rafique T, Yamamoto S-I, Fukui K, Mahmood Z, Niino T** (2015) Cryopreservation of sugarcane using the V cryo-plate technique. *CryoLetters* **36**: 51-59
- Rajmohan K** (2011) Date Palm Tissue Culture: A Pathway to Rural Development. *In* SM Jain, JM Al-Khayri, DV Johnson, eds, Date Palm Biotechnology. Springer Netherlands, pp 29-45
- Rall WF, Fahy GM** (1985) Ice-free cryopreservation of mouse embryos at -196 [deg]C by vitrification. *Nature* **313**: 573-575
- Ramon M, Geuns JMC, Swennen R, Panis B** (2002) Polyamines and fatty acids in sucrose precultured banana meristems and correlation with survival rate after cryopreservation. *CryoLetters* **23**: 345-352
- Reed BM** (2001) Implementing cryogenic storage of clonally propagated plants. **22**: 97-104
- Reed BM, Uchendu E** (2008) Controlled Rate Cooling. *In* BM Reed, ed, Plant Cryopreservation: A Practical Guide. Springer New York, pp 77-92
- Reed BM, Engelmann F, Dulloo ME, Engels JMM** (2004a) Technical guidelines for the management of field and in vitro germplasm collections, Ed International Plant Genetic Resources Institute. IPGRI, Rome, Italy
- Reed BM, Kovalchuk I, Kushnarenko S, Meier-Dinkel A, Schoenweiss K, Pluta S, Straczynska K, Benson EE** (2004b) Evaluation of critical points in technology transfer of cryopreservation protocols to international plant conservation laboratories. *CryoLetters* **25**: 341-352
- Reinert J** (1958) Morphogenese und ihre Kontrolle an Gewebekulturen aus Carotten. *Naturwissenschaften* **45**: 344-345
- Reinoud PJ, Iren Fv, Kijne JW** (2000) Cryopreservation of undifferentiated plant cells. *In* JIRCAS International Agriculture Series No.8. International Plant Genetic Resources Institute (IPGRI), pp 91-102

- Reinhold PJ, Uragami A, Sakai A, Iren FV** (1995) Vitrification of Plant Cell Suspensions. *In* JG Day, MW Pennington, eds, Cryopreservation and Freeze-Drying Protocols. Humana Press, pp 113-120
- Reynolds JF, Murashige T** (1979) Asexual Embryogenesis in Callus-Cultures of Palms. *In Vitro-Journal of the Tissue Culture Association* **15**: 383-387
- Rhiss A, Poulain C, Beauchesne G** (1979) La culture in vitro appliquée à la multiplication végétative du palmier dattier (*Phoenix dactylifera* L.). *Fruits* **34**: 551-554
- Ribeiro RCS, Jekkel Z, Mulligan BJ, Cocking EC, Power JB, Davey MR, Lynch PT** (1996) Regeneration of fertile plants from cryopreserved cell suspensions of *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. *Plant Science* **115**: 115-121
- Rival A, Beule T, Barre P, Hamon S, Duval Y, Noiroot M** (1997) Comparative flow cytometric estimation of nuclear DNA content in oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq) tissue cultures and seed-derived plants. *Plant Cell Reports* **16**: 884-887
- Rival A, Bertrand L, Beulé T, Combes MC, Trouslot P, Lashermes P** (1998) Suitability of RAPD analysis for the detection of somaclonal variants in oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq). *Plant Breeding* **117**: 73-76
- Roach T, Ivanova M, Beckett RP, Minibayeva FV, Green I, Pritchard HW, Kranner I** (2008) An oxidative burst of superoxide in embryonic axes of recalcitrant sweet chestnut seeds as induced by excision and desiccation. *Physiologia Plantarum* **133**: 131-139
- Rodríguez-Sanz H, Moreno-Romero J, Risueño MaC, Solís Ma-T, Köhler C, Testillano PS** (2014) Changes in histone methylation and acetylation during microspore reprogramming to embryogenesis occur concomitantly with BnHKMT and BnHAT expression and are associated to cell totipotency, proliferation and differentiation in *Brassica napus*. *Cytogenet Genome Res* **143**: 209-218
- Sagishima K, Kubota K, Ashihara H** (1989) Uptake and Metabolism of Sugars by Suspension Cultured *Catharanthus roseus* Cells. *Annals of Botany* **64**: 185-193
- Sakai A** (1956) Survival of plant tissue at super-low temperatures. *Low Temperature Science, Ser. B*: 17-23
- Sakai A** (1960) Survival of the twig of woody plants. *Nature, London* **185**: 393-394
- Sakai A** (1997) Potentially valuable cryogenic procedures for cryopreservation of cultured plant meristems. *Conservation of plant genetic resources in vitro* **1**: 53-66
- Sakai A** (2000) Development of cryopreservation techniques. *In* F Engelmann, H Takagi, eds, Cryopreservation of tropical plant germplasm, current progress and application. IPGRI, Rome, Italy, pp 1-7

- Sakai A, Engelmann F** (2007) Vitrification, encapsulation-vitrification and droplet-vitrification: a review. *CryoLetters* **28**: 151-172
- Sakai A, Kobayashi S, Oiyama I** (1990) Cryopreservation of nucellar cells of navel orange (*Citrus sinensis* Osb. var. *brasiliensis* Tanaka) by vitrification. *Plant Cell Reports* **9**: 30-33
- Sakai PA, Hirai D, Niino T** (2008) Development of PVS-Based Vitrification and Encapsulation–Vitrification Protocols. In BM Reed, ed, *Plant Cryopreservation: A Practical Guide*. Springer New York, pp 33-57
- Salma M, Fki L, Engelmann-Sylvestre I, Niino T, Engelmann F** (2014a) Comparison of droplet-vitrification and D-cryoplate for cryopreservation of date palm (*Phoenix dactylifera* L.) polyembryonic masses. *Scientia Horticulturae* **179**: 91-97
- Salma M, Engelmann-Sylvestre I, Collin M, Escoute J, Lartaud M, Yi J-Y, Kim H-H, Verdeil J-L, Engelmann F** (2014b) Effect of the successive steps of a cryopreservation protocol on the structural integrity of *Rubia akane* Nakai hairy roots. *Protoplasma* **251**: 649-659
- Sané D, Aberlenc-Bertossi F, Gassama-Dia YK, Sagna M, Trouslot MF, Duval Y, Borgel A** (2006) Histocytological Analysis of Callogenesis and Somatic Embryogenesis from Cell Suspensions of Date Palm (*Phoenix dactylifera*). *Annals of Botany* **98**: 301-308
- Sarasan V, Cripps R, Ramsay MM, Atherton C, McMichen M, Prendergast G, Rowntree JK** (2006) Conservation In vitro of threatened plants—Progress in the past decade. *In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant* **42**: 206-214
- Schafer-Menuhr A, Müller E, Mix-Wagner G** (1996) Cryopreservation: an alternative for the long-term storage of old potato varieties. *Potato Research* **39**: 507-513
- Schneider CA, Rasband WS, Eliceiri KW** (2012) NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nat Meth* **9**: 671-675
- Sekizawa K, Yamamoto S-i, Rafique T, Fukui K, Niino T** (2011) Cryopreservation of *in vitro* grown shoot tips of carnation *Dianthus caryophyllus* L.) by vitrification method using aluminium cryo-plates. *Plant Biotechnology* **28**: 401-405
- Sharma DR, Deepak S, Chowdhury JB** (1986) Regeneration Of Plantlets From Somatic Tissues Of The Date Palm *Phoenix dactylifera* Linn. *Indian Journal of Experimental Biology* **24**: 763-766
- Singh S, Anjum NA, Khan NA, Nazar R** (2008) Metal-binding peptides and antioxidant defence system in plants: significance in cadmium tolerance. In *Abiotic stress and plant responses*. IK International, New Delhi, pp 159-189
- Sipen P, Anthony P, Davey MR** (2011) Cryopreservation of Scalps of Malaysian Bananas Using a Pregrowth Method. *CryoLetters* **32**: 197-205

- Solís M-T, Rodríguez-Serrano M, Meijón M, Cañal M-J, Cifuentes A, Risueño MC, Testillano PS** (2012) DNA methylation dynamics and MET1a-like gene expression changes during stress-induced pollen reprogramming to embryogenesis. *Journal of Experimental Botany* **63**: 6431-6444
- Sprague GF** (1980) Germplasm Resources of Plants: Their Preservation and use. *Annual Review of Phytopathology* **18**: 147-165
- Stanzel M, Sjolund R, Komor E** (1988) Transport of glucose, fructose and sucrose by *Streptanthus tortuosus* suspension cells. *Planta* **174**: 201-209
- Steponkus P, Langis R, Fujikawa S** (1992) Cryopreservation of plant tissues by vitrification. *Advances in low-temperature biology* **1**: 1-61
- Steponkus PL** (1984) Role of the Plasma Membrane in Freezing Injury and Cold Acclimation. *Annual Review of Plant Physiology* **35**: 543-584
- Steward FC, Mapes MO, Mears K** (1958) Growth and Organized Development of Cultured Cells. II. Organization in Cultures Grown from Freely Suspended Cells. *American Journal of Botany* **45**: 705-708
- Steward MW, Steensgaard J** (1983) Antibody affinity: Thermodynamic aspects and biological significance Ed 1. CRC Press, Boca Raton, Florida, USA
- Stushnoff C, Seufferheld MJ, Creegan T** (1997) Oligosaccharides as Endogenous Cryoprotectants in Woody Plants. *In* PH Li, THH Chen, eds, *Plant Cold Hardiness*. Springer US, pp 301-309
- Sudharsan C, Abo El-Nil M, Al-Baiz A** (1993) Occurrence of direct somatic embryogenesis on the sword leaf of *in vitro* plantlets of *Phoenix dactylifera* L. cultivar Barhee. *Curr Sci* **65**: 887-888
- Suzuki M, Tandon P, Ishikawa M, Toyomasu T** (2008) Development of a new vitrification solution, VSL, and its application to the cryopreservation of gentian axillary buds. *Plant Biotechnology Reports* **2**: 123-131
- Suzuki T, Kaneko M, Harada T, Yakuwa T** (1998) Enhanced formation of roots and subsequent promotion of growth of shoots on cryopreserved nodal segments of *Asparagus officinalis* L. *Cryobiology* **36**: 194-205
- Swan TW, apos, Hare D, Gill RA, Lynch PT** (1999) Influence of preculture conditions on the post-thaw recovery of suspensioncultures of jerusalem artichoke (*Helianthus tuberosus* L.). *CryoLetters* **20**: 325-336
- Swennen R** (1998) La collection mondiale du bananier au Centre de Transit de l'INIBAP à la KULeuven: stratégies de conservation et mode d'opération. *Biotechnologie, agronomie, société et environnement* **2**: 36-45

- Swingle WT** (1928) Metaxenia In The Date Palm Possibly a Hormone Action by the Embryo or Endosperm. *Journal of Heredity* **19**: 257-268
- Taha HS, Bekheet SA, Saker MM** (2001) Factors Affecting In Vitro Multiplication of Date Palm. *Biologia Plantarum* **44**: 431-433
- Tanaka D, Nishiuchi A, Niino T, Matsumoto T** (2011) A Comparison of Vitrification and Droplet Vitrification Procedures for the Cryopreservation of In Vitro Grown Black Chokeberry Shoot Tips. *In International Symposium on Cryopreservation in Horticultural Species. International Society for Horticultural Science*, pp 325-330
- Tanaka D, Akimoto-Kato A, Niino T, Matsumoto T** (2014) C-2019: Cryopreservation of chrysanthemum using aluminium Cryo-plate protocol. *Cryobiology* **69**: 520-521
- Tandon P, Sharma J** (1986) Regeneration of Dendrobium from cold preserved protocorms. *In DA Somers, BG Gengenbach, DD Biesboer, H W.P., CE Green, eds, Abstr. 6th Intl. Cong. Plant Tissue and Cell Culture, Vol 425, Minneapolis, p 425*
- Tannoury M, Ralambosoa J, Kaminski M, Dereuddre J** (1991) Cryoconservation par vitrification d'apex enrobés d'oeillet (*Dianthus caryophyllus* L.) cultivé *in vitro*. *Comptes rendus de l'Académie des sciences. Série 3, Sciences de la vie* **313**: 633-638
- Taylor R, Adams GDJ, Boardman CFB, Wallis RG** (1974) Cryoprotection—Permeant vs nonpermeant additives. *Cryobiology* **11**: 430-438
- Teixeira JB, Söndahl MR, Nakamura T, Kirby EG** (1995) Establishment of oil palm cell suspensions and plant regeneration. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* **40**: 105-111
- Testillano PS, Solís M-T, Risueño MC** (2013) The 5-methyl-deoxy-cytidine (5mdC) localization to reveal in situ the dynamics of DNA methylation chromatin pattern in a variety of plant organ and tissue cells during development. *Physiologia Plantarum* **149**: 104-113
- Thomas AJ, Sherratt HSA** (1956) The isolation of nucleic acid fractions from plant leaves and their purine and pyrimidine composition. *Biochemical Journal* **62**: 1-4
- Tiang C-L, He Y, Pawlowski WP** (2012) Chromosome Organization and Dynamics during Interphase, Mitosis, and Meiosis in Plants. *Plant Physiology* **158**: 26-34
- Tisserat B** (1979) Propagation of Date Palm (*Phoenix dactylifera* L.) in vitro. *Journal of Experimental Botany* **30**: 1275-1283
- Tisserat B** (1982) Development of new tissue culture technology to aid in the cultivation and crop improvement of date palms. *In Proceedings first symposium on date palm, King Faisal University, Saudi Arabia*, pp 126-140
- Tisserat B** (1983) Tissue culture of date palm - A new method to propagate an ancient crop and a short discussion of the California date industry. *Prin* **27**: 105-117
- Tisserat B** (1984) Propagation of date palms by shoot-tip cultures. *HortScience* **19**: 230-231

- Tisserat B, Demason DA** (1980) A Histological Study of Development of Adventive Embryos in Organ Cultures of *Phoenix dactylifera* L. *Annals of Botany* **46**: 465-472
- Touchell D, Chiang V, Tsai CJ** (2002) Cryopreservation of embryogenic cultures of *Picea mariana* (black spruce) using vitrification. *Plant Cell Reports* **21**: 118-124
- Travert S, Valerio L, Fouraste I, Boudet AM, Teulieres C** (1997) Enrichment in Specific Soluble Sugars of Two Eucalyptus Cell-Suspension Cultures by Various Treatments Enhances Their Frost Tolerance via a Noncolligative Mechanism. *Plant Physiology* **114**: 1433-1442
- Turner S, Senaratna T, Touchell D, Bunn E, Dixon K, Tan B** (2001) Stereochemical arrangement of hydroxyl groups in sugar and polyalcohol molecules as an important factor in effective cryopreservation. *Plant Science* **160**: 489-497
- Uchendu EE, Leonard SW, Traber MG, Reed BM** (2010) Vitamins C and E improve regrowth and reduce lipid peroxidation of blackberry shoot-tips following cryopreservation. *Plant Cell Reports* **29**: 25-35
- Ulrich JM, Finkle BJ, Tisserat BH** (1982) Effects of Cryogenic Treatment on Plantlet Production from Frozen and Unfrozen Date Palm Callus. *Plant Physiology* **69**: 624-627
- UNCED** (1992) Convention on Biological Diversity. *In* United Nations conference on Environment and Development. UNCED Secretariat, Rome, Italy
- Uragami A, Sakai A, Nagai M, Takahashi T** (1989) Survival of cultured cells and somatic embryos of *Asparagus officinalis* cryopreserved by vitrification. *Plant Cell Reports* **8**: 418-421
- Veramendi J, Navarro L** (1996) Influence of physical conditions of nutrient medium and sucrose on somatic embryogenesis of date palm. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* **45**: 159-164
- Verdeil JL, Buffard-Morel J** (1995) Somatic Embryogenesis in Coconut (*Cocos nucifera* L.). *In* YPS Bajaj, ed, Somatic Embryogenesis and Synthetic Seed I, Vol 30. Springer Berlin Heidelberg, pp 299-317
- Verleysen H** (2005) Cryopreservation strategies for woody ornamental plants. Thèse de doctorat. Ghent University, Ghent, Belgium
- Volk GM, Walters C** (2006) Plant vitrification solution 2 lowers water content and alters freezing behavior in shoot-tips during cryoprotection. *Cryobiology* **52**: 48-61
- Volk GM, Caspersen AM** (2007) Plasmolysis and recovery of different cell types in cryoprotected shoot tips of *Mentha × piperita*. *Protoplasma* **231**: 215-226
- Waddington CH** (2012) The Epigenotype. *International Journal of Epidemiology* **41**: 10-13
- Walters AD, Bommakanti A, Cohen-Fix O** (2012) Shaping the nucleus: factors and forces. *Journal of cellular biochemistry* **113**: 2813-2821

- Wang Q, Gafny R, Sahar N, Sela I, Mawassi M, Tanne E, Perl A** (2002) Cryopreservation of grapevine (*Vitis vinifera* L.) embryogenic cell suspensions by encapsulation-dehydration and subsequent plant regeneration. *Plant Science* **162**: 551-558
- Wang Z-C, Deng X-X** (2004) Cryopreservation of shoot-tips of citrus using vitrification: effect of reduced form of glutathione. *CryoLetters* **25**: 43-50
- Ward ACW, Benson EE, Blackhall NW, Cooper-Bland S, Powell W, Power JB, Davey MR** (1993) Flow-cytometric assessments of ploidy stability in cryopreserved dihaploid *Solanum tuberosum* and wild *Solanum* species. *CryoLetters* **14**: 145-152
- Whaley WG, Mericle LW, Heimsch C** (1952) The Wall of the Meristematic Cell. *American Journal of Botany* **39**: 20-26
- Wilkins CP, Newbury HJ, Dodds JH** (1988) Tissue culture conservation of fruit trees. *Plant Genetic Resources Newsletter* **73/74**: 9-20
- Winkelmann T, Mußmann V, Serek M** (2004) Cryopreservation of embryogenic suspension cultures of *Cyclamen persicum* Mill. *Plant Cell Reports* **23**: 1-8
- Withers L** (1991) Cryo-91 - Plants Come into the Cold. *CryoLetters* **12**: 257-258
- Withers LA** (1980) The Cryopreservation of Higher-Plant Tissue and Cell-Cultures - an Overview with Some Current Observations and Future Thoughts. *CryoLetters* **1**: 239-250
- Withers LA** (1983) Germplasm storage in plant biotechnology. *In* SH Mantell, H Smith, eds, *Plant Biotechnology*, pp 187-218
- Withers LA** (1985) Cryopreservation of cultured plant cells and protoplasts. *In*. CRC Press, pp 243-267
- Withers LA, King P** (1980) A Simple Freezing Unit and Routine Cryopreservation Method for Plant-Cell Cultures. *CryoLetters* **1**: 213-220
- Withers LA, Engelmann F** (1998) In vitro conservation of plant genetic resources. *In* A Altman, RR Colwell, NL First, J Schell, IK Vasil, eds, *Agricultural biotechnology*. M. Dekker, New York, pp 58-88
- Wolfe J, Bryant G** (1999) Freezing, Drying, and/or Vitrification of Membrane– Solute–Water Systems. *Cryobiology* **39**: 103-129
- Wyatt GR** (1950) Occurrence of 5-Methyl-Cytosine in Nucleic Acids. *Nature* **166**: 237-238
- Yamamoto S, Rafique T, Fukui K, Sekizawa K, Koyama A, Ichihashi T, Niino T** (2012a) Development of an effective cryopreservation protocol using aluminium cryo-plates for in vitro-grown shoot tips of mulberries (*Morus* spp.) originated from the tropics and subtropics. *Sanshi-Konchu Biotechnology* **81**: 57-62

- Yamamoto S-i, Rafique T, Fukui K, Sekizawa K, Niino T** (2012b) V-Cryo-plate Procedure As an Effective Protocol for Cryobanks: Case Study of Mint Cryopreservation. *CryoLetters* **33**: 12-23
- Yamamoto S-i, Rafique T, Priyantha WS, Fukui K, Matsumoto T, Niino T** (2011) Development of a Cryopreservation Procedure Using Aluminium Cryo-plates. *CryoLetters* **32**: 256-265
- Yamamoto S-i, Fukui K, Rafique T, Khan NI, Castillo Martinez CR, Sekizawa K, Matsumoto T, Niino T** (2012c) Cryopreservation of *in vitro*-grown shoot-tips of strawberry by the vitrification method using aluminium cryo-plates. *Plant Genetic Resources* **10**: 14-19
- Yamamoto S-i, Wunna, Rafique T, Arizaga M, Fukui K, Gutierrez EC, Martinez CC, Watanabe K, Niino T** (2015) The Aluminum Cryo-plate Increases Efficiency of Cryopreservation Protocols for Potato Shoot Tips. *American Journal of Potato Research* **92**: 250-257
- Yap LV, Noor NM, Clyde MM, Chin HF** (2011) Cryopreservation of *Garcinia Cowa* Shoot Tips by Vitrification: the Effects of Sucrose Preculture and Loading Treatment on Ultrastructural Changes in Meristematic Cells. *CryoLetters* **32**: 188-196
- Young I, McEneny J** (2001) Lipoprotein oxidation and atherosclerosis. *Biochemical Society Transactions* **29**: 358-362
- Zaid A, Arias EJ** (2002) Date Palm Cultivation. *In Plant Production and Protection Paper Vol 156*. FAO, Rome, Italy
- Zaid A, De Wet PF** (1999) Pollination and bunch management. *Date palm cultivation*. FAO, Rome. Italy
- Zaid A, Tisserat B** (1983) *In vitro* shoot tip differentiation in *Phoenix dactylifera* L. *Date palm Journal* **2**: 163-182
- Zaid A, De Wet PF, Djerbi M, Oihabi A** (1999) Date palm propagation. *In Date palm cultivation, plant production and protection paper, Vol 156*. FAO
- Zarghami R, Pirseyedi M, Hasrak S, Sardrood BP** (2008) Evaluation of genetic stability in cryopreserved *Solanum tuberosum*. *African Journal of Biotechnology* **7**: 2798-2802
- Zeng J, Yi G, Zhang Q, Zhou B, Wu Y** (2005) Cell Ultra structure of Papaya Shoot-tip during Cryopreservation. *ACTA HORTICULTURAE SINICA* **32**: 15-19
- Zhang M, Kimatu JN, Xu K, Liu B** (2010) DNA cytosine methylation in plant development. *Journal of Genetics and Genomics* **37**: 1-12
- Zhao XY, Su YH, Cheng ZJ, Zhang XS** (2008) Cell Fate Switch during *In Vitro* Plant Organogenesis. *Journal of Integrative Plant Biology* **50**: 816-824

- Zhou X, Graumann K, Meier I** (2015) The plant nuclear envelope as a multifunctional platform LINCed by SUN and KASH. *Journal of Experimental Botany* **66**: 1649-1659
- Zhu G-Y, Geuns JMC, Dussert S, Swennen R, Panis B** (2006) Change in sugar, sterol and fatty acid composition in banana meristems caused by sucrose-induced acclimation and its effects on cryopreservation. *Physiologia Plantarum* **128**: 80-94
- Zilberman D, Gehring M, Tran RK, Ballinger T, Henikoff S** (2007) Genome-wide analysis of *Arabidopsis thaliana* DNA methylation uncovers an interdependence between methylation and transcription. *Nature Genetics* **39**: 61-69
- Zluvova J, Janousek B, Vyskot B** (2001) Immunohistochemical study of DNA methylation dynamics during plant development. *Journal of Experimental Botany* **52**: 2265-2273
- Zouine J, Bellaj M, Meddich A, Verdeil J-L, Hadrami I** (2005) Proliferation and germination of somatic embryos from embryogenic suspension cultures in *Phoenix dactylifera*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* **82**: 83-92

8. Annexes:

Annexe 1

FIXATION GLUTARALDÉHYDE – PARAFORMALDÉHYDE - CAFÉINE

- 1- Placer les échantillons dans le fixateur (cf. saccharose à ajouter ou non)
- 2- Mettre une goutte de tween 80
- 3- Faire le vide pendant 30 minutes
- 4- Placer à 4°C pendant 48 heures
- 5- Mettre dans éthanol 50/50 pendant 1 heure
- 6- Mettre dans éthanol 70%, renouveler l'éthanol une fois avant de le conserver une nuit à 4°C (à cette concentration les échantillons peuvent être stockés pendant plusieurs jours ou plusieurs mois)

DÉSHYDRATATION

Les échantillons sont placés comme suit à température ambiante et sous agitation:

Ethanol %	70	90	95	100
Durée (heures)	1	2	2	2
Butanol % / Ethanol %	50 / 50			
Durée (nuit)	1			
Butanol % / Ethanol %	80 / 20			
Durée (heures)	2			
Butanol %	100			
Durée (heures)	2			
Butanol %	100			
Durée (heures)	2			
Butanol %	100			
Durée (nuit)	1			
Butanol % / Résine %	50 / 50			
Durée (jour)	2			
Résine % (sans durcisseur)	100			
Durée (jour)	2 à 5			

Annexe 1

COMPOSITION DU FIXATEUR		
	AVEC SACCHAROSE (1.25M)	SANS SACCHAROSE
Tampon phosphate de Na 0,2 ph 7 (ml)	50	50
Paraformaldéhyde à 10% (ml)	20	20
Glutaraldéhyde à 50% (ml)	2	2
H2O distillée (ml)	28	28
Saccharose (g)	42.75	0
Caféine (g)	1	1

COMPOSITION DU TAMPON PHOSPHATE PH 7,2 0,2 M		
Solution A	NaH ₂ PO ₄ anhydre (g)	2.4
Solution B	Na ₂ HPO ₄ 12H ₂ O (g)	7.16
	H ₂ O distillée (ml)	100

Annexe 2

PROTOCLE DE FIXATION

- 1- Placer les échantillons dans le fixateur (paraformaldéhyde à 4% dans PBS 1X) dans un pilulier en verre (stérile)
- 2- Mettre une goutte de tween 80
- 3- Faire le vide pendant au minimum une heure
- 4- Changer le bain puis placer à 4°C pendant 48 heures
- 5- Le lendemain matin, pour éliminer le fixateur, Mettre dans PBS 1X+ glycine (0.1 M) pour 15 min
- 6- Renouveler l'étape /5/
- 7- Mettre dans PBS 1X pendant 15 min, renouveler une fois avant de le commencer la déshydratation

DÉSHYDRATATION

Ethanol %	50	70	70
Durée (minute)	30	30	60
Ethanol %	70		
Durée	1 heure à plusieurs jours à 4°C		

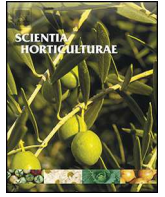
COMPOSITION DU TAMPON PBS 10X

Produit	Quantité	Molarité
Na ₂ HPO ₄ (g)	9,94	70 mM
NaH ₂ PO ₄ (g)	3,60	30 mM
NaCl (g)	70,13	1,2 M
KCl (g)	2,00	27mM
H ₂ O ultra pure DEPC (ml)	QSP 1000	0
Amener à pH 7,4		



Contents lists available at ScienceDirect

Scientia Horticulturae

journal homepage: www.elsevier.com/locate/scihorti

Comparison of droplet-vitrification and D-cryo-plate for cryopreservation of date palm (*Phoenix dactylifera* L.) polyembryonic masses



Mohammad Salma^{a,b}, Lotfi Fki^c, Isabelle Engelmann-Sylvestre^a, Takao Niino^d, Florent Engelmann^{a,*}

^a IRD, UMR DIADE, 911 Avenue Agropolis, BP 64501, 34394 Montpellier Cedex 5, France

^b Department of Horticulture, Faculty of Agronomy, University of Aleppo, Aleppo, Syria

^c Laboratory of Plant Biotechnology, Faculty of Sciences of Sfax, University of Sfax, Route Sokra, BP 1171, 3000 Sfax, Tunisia

^d Gene Research Center, University of Tsukuba, Tsukuba 305-8572, Japan

ARTICLE INFO

Article history:

Received 26 February 2014

Received in revised form 5 September 2014

Accepted 8 September 2014

Keywords:

Date palm

Polyembryonic masses

Cryopreservation

Droplet-vitrification

D cryo-plate

ABSTRACT

In this work we tested the efficiency of two techniques, droplet-vitrification (DV) and dehydration (D) cryo-plate, for cryopreservation of polyembryonic masses (PEMs) of two date palm varieties, Sokary and Sultany. With DV, recovery of non-precultured, cryopreserved PEMs was nil without treatment with the PVS2 vitrification solution, which contained 3.3 M glycerol + 2.4 M ethylene glycol + 0.4 M sucrose + 1.9 M dimethylsulfoxide. Following PVS2 treatments between 15 and 120 min, it was comprised between 90.9–98.6% and 85.6–88.0% for varieties Sokary and Sultany, respectively. Sucrose preculture (3 days, 0.5 M) led to 21.1% recovery of cryopreserved PEMs of variety Sokary only without PVS2 treatment, and slightly reduced recovery in all other experimental conditions with both varieties, compared with non-cryopreserved PEMs. Regrowth intensity of cryopreserved PEMs was generally lower with variety Sultany compared to variety Sokary. With the D cryo-plate technique, no recovery of cryopreserved PEMs was achieved without sucrose preculture. Sucrose preculture (3 days, 0.5 M) had a positive effect on recovery of cryopreserved PEMs. For variety Sokary, the highest recovery (92.0–95.8%) was achieved for desiccation periods between 60 and 120 min. Recovery was between 67.0 and 74.6% after desiccation periods of 90–120 min for variety Sultany. With the D cryo-plate technique, regrowth intensity of cryopreserved PEMs was higher with variety Sokary compared to variety Sultany.

© 2014 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Date palm plays a key role in the ecology of arid and desert zones of the Maghreb, Sahara, the Arabic peninsula, Iran as well as the Indus valley in Pakistan. It has a very high socio-economic importance for the populations of these regions, both due to its own production (dates and other products) and because it allows the development of oasis agriculture. The large genetic diversity of date palm, which includes over 2000 identified varieties (Zaid et al., 2002) is threatened due to the large-scale dissemination of a low number of elite varieties (Jaradat, 2006). The conservation of this biodiversity has been identified as an important priority by the Date Palm Biotechnology Network (Zaid et al., 2002).

Since vegetative propagation of date palm varieties is very slow, due to the low number of offshoots produced per palm, micropropagation protocols based on organogenesis and embryogenesis have been developed (Fki et al., 2011a,b). Such protocols are applied for the large-scale propagation of elite varieties and for the conservation and multiplication of threatened varieties (Bekheet, 2010).

Cryopreservation (liquid nitrogen [LN], -196°C) is currently the only technique available to ensure the safe and cost-effective long-term conservation of biotechnology products such as embryogenic calli, cell suspensions, somatic embryos and multiple bud cultures produced for date palm micropropagation (Engelmann, 2011). Two main types of cryopreservation techniques exist, including two-step controlled cooling protocols and vitrification-based protocols. In the latter category, the droplet-vitrification (DV) technique has been developed in 2005 (Panis et al., 2005). In this technique, explants are treated with a loading solution (LS), then with a highly concentrated vitrification solution (VS), placed in minute droplets of VS on aluminium foils and immersed in LN. For rewarming,

* Corresponding author. Tel.: +33 0 4 67 41 63 80; fax: +33 0 4 67 41 62 52.
E-mail address: florent.engelmann@ird.fr (F. Engelmann).

aluminium foils with the explants are plunged directly in unloading solution (ULS). The achievement of very high cooling and warming rates is one of the keys to the high efficiency of DV, where explants are in direct contact with LN during cooling and with the ULS during warming (Engelmann, 2014). The DV technique has been successfully applied to a range of different plant species (Panis et al., 2011).

Very recently, a further improvement to DV has been made with the development of the cryo-plate technique (Yamamoto et al., 2011; Niino et al., 2013). In this technique, explants are placed in the wells of aluminium cryo-plates to which they are made to adhere by encapsulating them in minute droplets of calcium alginate. They are then treated with LS, dehydrated osmotically with a VS (the so-called V cryo-plate protocol) or dehydrated physically by placing them in the air current of a laminar flow cabinet (the so-called D cryo-plate protocol) before immersion in LN. The main advantage of this technique lies with the facilitated manipulation of explants, which adhere to the cryo-plate. The V cryo-plate protocol has been experimented with Dalmatian chrysanthemum (Yamamoto et al., 2011), mint (Yamamoto et al., 2012a), mulberry (Yamamoto et al., 2012b), strawberry (Yamamoto et al., 2012c), carnation (Sekizawa et al., 2011) and mat rush (Niino et al., 2013) shoot tips. There are currently only two reports on utilization of the D cryo-plate protocol with shoot tips of mat rush (Niino et al., 2013) and persimmon (Matsumoto et al., 2013).

Only a limited amount of work has been performed on cryo-preservation of date palm. Two-step controlled cooling protocols have been developed for callus cultures (Ulrich et al., 1982) somatic embryos (Mycock et al., 1995) and apices (Bagniol and Engelmann, 1992; Bagniol et al., 1992). Recently, vitrification and DV protocols have been established with proembryogenic masses (PEMs) of date palm variety Barhee (Fki et al., 2011a).

The objective of our work was to test the DV protocol tested by Fki et al. (2011a) using two new date palm varieties, Sokary and Sultany, and to experiment the D cryo-plate protocol with these varieties.

2. Methodology

2.1. Plant material

The plant material used in this study consisted of PEMs of two date palm commercial varieties Sokary and Sultany, which were provided by Dr. Lotfi Fki from the Plant Biotechnology Laboratory of the Faculty of Sciences, Sfax, Tunisia. These PEMs were produced from juvenile leaves sampled from offshoots according to Fki et al. (2011b).

2.2. Methods

2.2.1. In vitro culture

PEMs were cultured on standard medium containing MS (Murashige and Skoog, 1962) salts and vitamins, 0.15 M sucrose, 8 g l⁻¹ agar (Sigma) and 0.3 mg l⁻¹ 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D), with a pH of 5.75. Cultures were maintained in a growth chamber at 27 ± 2 °C under a 12 h light/12 h dark photoperiod and a light intensity of 50 μmol m⁻² s⁻¹. Subcultures were performed every 6–8 weeks. PEMs used for cryopreservation experiments were sampled 1 week after last subculture.

2.3. Cryopreservation

PEMs employed for cryopreservation had a diameter of approximately 3–5 mm. They consisted of aggregates of approximately 15 proembryos, of a size of around 500 μm each (Fig. 1).

2.4. Droplet-vitrification

For D-V, the protocol developed by Fki et al. (2011a) was employed. PEMs were precultured for 3 days on standard medium containing 0.5 M sucrose. They were treated for 20 min at room temperature with a loading solution (LS) containing 2.0 M glycerol and 0.4 M sucrose (Matsumoto et al., 1994), then for 0–120 min at 0 °C with PVS2 solution (3.3 M glycerol + 2.4 M ethylene glycol + 0.4 M sucrose + 1.9 M DMSO; Sakai et al., 1990). A few min before the end of the PVS2 treatment, PEMs were transferred in droplets of PVS2 placed on aluminium foil strips (7 × 20 mm, 10 PEMs per strip), which were immersed rapidly in liquid nitrogen (LN). After 1 h storage at –196 °C, PEMs were rewarmed rapidly by plunging the aluminium foils in unloading solution (ULS) containing 1.2 M sucrose for 15 min. PEMs were then transferred on a filter paper placed on standard medium with 0.3 M sucrose in the dark for 3 days, then transferred on standard medium with 0.15 M sucrose under a 12 h light/12 h dark photoperiod.

2.5. D cryo-plate

The D cryo-plate protocol established by Niino et al. (2013) was applied to PEMs. PEMs were precultured for 3 days on standard medium containing 0.5 M sucrose. The aluminium cryo-plates used (7 mm × 37 mm × 0.5 mm with 10 wells of 1.5 mm diameter and 0.75 mm depth) were provided by Dr. Niino, NIAS, Tsukuba. Droplets of around 2 μl of 3% sodium alginate solution in calcium-free standard medium were poured in the wells of the cryo-plates. PEMs were transferred one by one in the wells with a scalpel blade and covered with 2 μl droplets of sodium alginate solution. The calcium chloride solution (0.1 M calcium chloride in standard medium) was poured drop-wise on the section of the cryo-plates until PEMs were covered. Polymerization was complete after 15 min and the calcium chloride solution was removed by sucking it gently with a micropipette. PEMs on the cryo-plates were treated for 20 min at room temperature with LS containing 2.0 M glycerol and 0.4 M sucrose (Matsumoto et al., 1994). Cryo-plates were removed from LS, blotted dry on filter paper in a Petri dish and then dehydrated under the laminar air flow cabinet for 0 to 300 min at 23 °C, 40–50% RH. After dehydration, cryo-plates were plunged in uncapped cryotubes previously filled with LN. After 1 h storage in LN, PEMs were rewarmed by immersing the cryo-plates in 2 ml cryotubes filled with ULS containing 1.2 M sucrose for 15 min. PEMs were then detached from the cryo-plates with a scalpel blade, transferred on a filter paper placed on standard medium with 0.3 M sucrose in the dark for 3 days, then transferred on standard medium with 0.15 M sucrose under a 12 h light/12 h dark photoperiod.

2.6. Evaluation of recovery and of regrowth intensity

Recovery % was evaluated by counting the number of surviving proembryos/PEM 15 days after transfer to the standard culture medium. Proembryos were considered surviving when their size had increased during the 15-day culture period on standard medium. In preliminary experiments, it had been observed that all PEMs considered alive at that time proliferated and produced somatic embryos (Fig. 2), which germinated and developed into rooted plantlets (Fig. 3).

To evaluate regrowth intensity, a picture of each treated PEM was taken when it was transferred on standard medium with 0.15 M sucrose using a Leica EZ4HD stereomicroscope and again after 15 days of culture. The surface of each PEM was measured using the free access software Image-J, developed by the National Institute of Health, USA (<http://rsb.info.nih.gov/ij/>). Recovery intensity was calculated using the following formula: (surface at 15

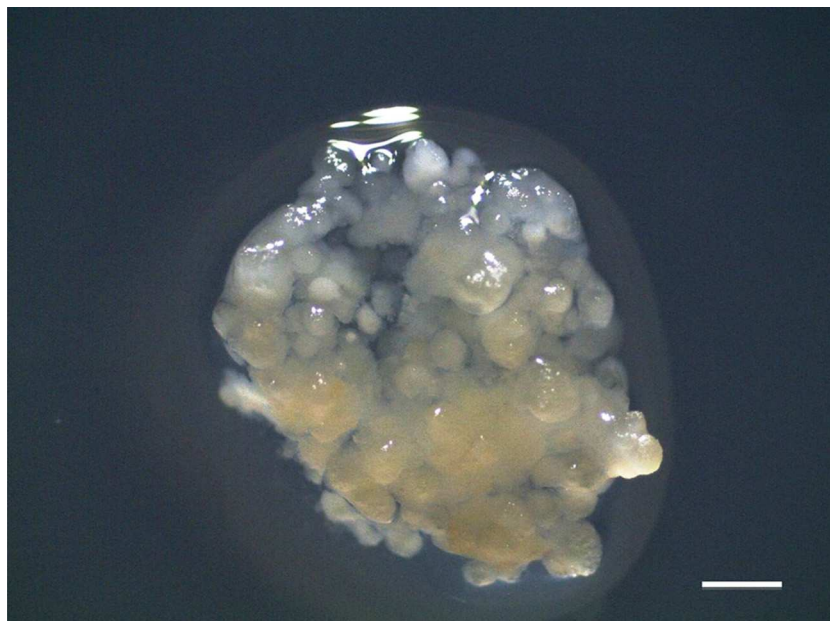


Fig. 1. View of a PEM employed for cryopreservation experiments (Bar: 1 mm).

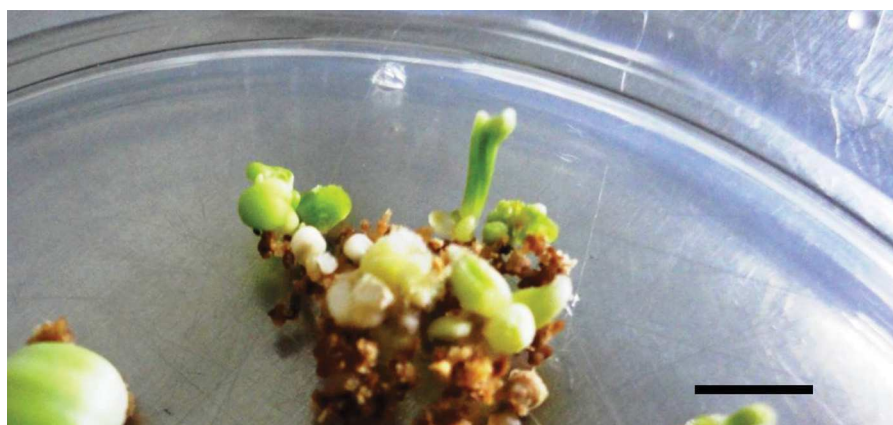


Fig. 2. Regeneration of plantlet and somatic embryos from a cryopreserved PEM after 6 months of culture on multiplication medium (Bar: 1 cm).

days – surface at transfer on standard medium) \times 100/surface at transfer on standard medium.

2.7. Measurement of PEM moisture content during D cryo-plate procedure

The evolution of PEM moisture content (MC, fresh weight basis) was followed by measuring the fresh weight of 10 encapsulated PEMs on three individual cryo-plates after the loading treatment and all dehydration durations tested. The dry weight of encapsulated PEMs was measured after drying for 24 h at 103 °C.

2.8. Statistical analyses

Statistical analyses of data were performed with the nonparametric Mann–Whitney (*U* test) test using the SPSS 21 software. $P < 0.05$ was considered as statistically significant. Forty to eighty replicates were used with the DV protocol and 20 to 30 with the D cryo-plate protocol. The recovery % results were thus based on the observation of 600 to 1200 proembryos with the DV protocol and on that of 300 to 450 proembryos with the D cryo-plate, as each PEM included approx. 15 proembryos. The recovery intensity

results were based on the observation of 40–80 PEMs for the DV protocol and on that of 20–30 PEMs for the D cryo-plate protocol.

3. Results

3.1. Droplet-vitrification

Without sucrose preculture, recovery of control (–LN) PEMs of variety Sokary was very high (97.3–100.0%) whatever the PVS2 treatment duration tested (Table 1). Recovery of cryopreserved (+LN) PEMs was nil without PVS2 treatment and comprised between 90.9 and 98.6% for PVS2 treatments between 15 and 120 min. Following sucrose preculture, high recovery ($\geq 91\%$) of control (–LN) PEMs was achieved in all conditions except after 30 min PVS2 treatment (79.6%). In case of cryopreserved (+LN) PEMs, 21.1% recovery was achieved without PVS2 treatment and it was between 68.1 and 85.8% for the other treatment durations.

In case of non-pretreated PEMs of variety Sokary, regrowth intensity of control (–LN) explants was highest without PVS2 treatment and was high, but significantly lower for the other treatment durations tested (Table 1). Following cryopreservation (+LN), no regrowth was noted without PVS2 treatment and

Table 1
Effect of sucrose preculture (3 days, 0.5 M sucrose) and of PVS2 treatment duration (min) on recovery (%) and regrowth intensity (% surface increase at 15 days compared to initial PEM surface) of non-cryopreserved (–LN) and cryopreserved (+LN) PEMs of date palm variety Sokary. Data followed by the same letter within the same line are not significantly different according to Duncan's test ($P < 0.05$).

	Sucrose preculture		PVS2 treatment duration (min)				
			0	15	30	60	120
Recovery (%)	–	–LN	97.3a	100.0a	100.0a	100.0a	98.5a
	–	+LN	0.0c	90.9b	98.6a	92.4b	92.5b
	+	–LN	99.2a	91.0b	79.6c	95.5ab	91.2b
	+	+LN	21.1c	68.1b	85.8a	81.1a	68.7b
Regrowth intensity	–	–LN	105.1a	90.3b	83.8bc	77.4c	89.8b
	–	+LN	–1.3b	85.8a	92.5a	83.4a	83.8a
	+	–LN	77.5a	39.9c	38.5c	58.3b	68.4ab
	+	+LN	21.7c	51.7b	73.1a	67.3a	70.4a



Fig. 3. Rooted plantlet obtained from a somatic embryo regenerated from cryopreserved PEMs (Bar: 1 cm).

regrowth intensity varied between 83.4 and 95.5% following PVS2 treatment. Following sucrose preculture, regrowth intensity of non-cryopreserved controls (–LN) was 77.5% without PVS2 treatment and between 38.5 and 68.4% for the other durations.

Cryopreserved PEMs (+LN) displayed a regrowth intensity of 21.7% without PVS2 treatment. It was between 51.7 and 70.4% for the other PVS2 treatment durations tested.

In case of variety Sultany, recovery % of non-precultured control (–LN) PEMs was between 96.0% (no PVS2 treatment) and 82.6% (120 min PVS2 treatment) (Table 2). Recovery of cryopreserved PEMs (+LN) was nil without PVS2 treatment and between 85.6 and 88.0% for the other PVS2 treatment durations. Following sucrose preculture, recovery of non-cryopreserved PEMs (–LN) was between 95.6 and 85.9%. In case of cryopreserved PEMs, recovery was only marginal (1.3%) without PVS2 treatment and comprised between 69.3 and 86.6% for the other PVS2 treatment durations tested.

Regrowth intensity of non-sucrose precultured and non-cryopreserved (–LN) PEMs was between 71.0 and 60.8% and that of cryopreserved (+LN) PEMs between 61.1 and 84.6% (Table 2). Following sucrose preculture, regrowth intensity of non-cryopreserved (–LN) PEMs was significantly lower after PVS2 treatment, whatever the treatment duration, compared to non-treated PEMs. Regrowth intensity of cryopreserved (+LN) PEMs was negative without PVS2 treatment and comprised between 61.1 and 84.6% following PVS2 treatment.

3.2. D cryo-plate

When the D cryo-plate technique was applied to non-sucrose precultured and non-cryopreserved (–LN) PEMs of variety Sokary, recovery was between 71.1 and 45.5% for dehydration durations between 0 and 150 min (Table 3). It dropped to 0% after 300 min dehydration. In case of cryopreserved (+LN) PEMs, recovery was nil without dehydration; it increased progressively to 70.9% after 90 min dehydration ($15 \pm 3\%$ MC), then decreased to 0% after 300 min dehydration. Following sucrose preculture, recovery of non-cryopreserved (–LN) PEMs was between 91.3 (no dehydration) and 82.7% (90 min dehydration), then decreased progressively to 40.3% after 300 min dehydration. Following cryopreservation (+LN), recovery increased from 1.6% without dehydration to a maximum of 97.9% after 90 min dehydration ($17 \pm 1\%$ MC), then decreased to 47.7% after 300 min dehydration.

Regrowth intensity of non-sucrose precultured and non-cryopreserved (–LN) PEMs of variety Sokary varied between 31.2 and 60.3% for dehydration durations between 0 and 150 min and was only 1.5% after 300 min dehydration (Table 3). After cryopreservation (+LN), it increased from 3% without dehydration to a maximum of 71.2% after 90 min, then decreased to 2.6% after 300 min dehydration. Following sucrose preculture, regrowth intensity of non-cryopreserved (–LN) PEMs varied between 56.1 and 88.9 for dehydration durations between 0 and 150 min, and dropped to 26.6% after 300 min dehydration. After cryopreservation (+LN), regrowth intensity increased from 2% without dehydration

Table 2

Effect of sucrose preculture (3 days, 0.5 M sucrose) and of PVS2 treatment duration on recovery (%) and on regrowth intensity (% PEM surface increase at 15 days compared to initial surface) of non-cryopreserved (–LN) and cryopreserved (+LN) PEMs of date palm variety Sultany. Data followed by the same letter within the same line are not significantly different according to Duncan's test ($P < 0.05$).

	Sucrose preculture		PVS2 treatment duration (min)				
			0	15	30	60	120
Recovery (%)	–	–LN	96.0a	95.2a	92.9ab	91.5b	82.6b
	–	+LN	0.0b	85.6a	88.0a	87.8a	87.4a
	+	–LN	95.6a	92.2bc	90.0bc	92.4ab	85.9c
	+	+LN	1.3c	77.7b	86.6a	78.3b	69.3b
Regrowth intensity	–	–LN	71.8b	71.5b	82.8a	71.0b	60.8c
	–	+LN	–1.3c	68.2b	65.1b	61.1b	84.6a
	+	–LN	67.9a	45.6c	49.4bc	53.8b	54.0b
	+	+LN	–0.4c	46.8b	58.5a	49.1ab	46.2ab

Table 3

Effect of sucrose preculture (3 days, 0.5 M sucrose) and of air dehydration duration (min) on recovery (%) and regrowth intensity (% surface increase compared to initial PEM surface) of non-cryopreserved (–LN) and cryopreserved (+LN) PEMs of date palm variety Sokary cryopreserved using the D-cryo-plate method. Data followed by the same letter within the same line are not significantly different according to Duncan's test ($P < 0.05$).

	Sucrose preculture		Dehydration duration (min)						
			0	30	60	90	120	150	300
Recovery (%)	–	–LN	66.9ab	71.1a	55.4ab	45.5b	53.4ab	57.1ab	0.0c
	–	+LN	0.0c	44.5b	56.7ab	70.9a	55.0ab	43.1b	0.0c
	+	–LN	91.3a	91.0a	96.4a	82.7ab	70.9b	70.3b	40.3c
	+	+LN	1.6e	63.3cd	92.0ab	97.9a	95.8ab	79.8bc	47.7d
Regrowth intensity	–	–LN	49.4ab	49.6ab	31.2b	45.9ab	55.2a	60.3a	1.5c
	–	+LN	3.0d	41.5c	62.0abc	71.2a	65.4ab	46.3bc	2.6d
	+	–LN	56.1b	71.4ab	88.9a	68.0ab	64.5ab	78.3ab	26.6c
	+	+LN	2.0e	52.1cd	92.5ab	113.0a	90.6b	70.7bc	38.2d

to 113% after 90 min dehydration, then decreased to 38.2% after 300 min dehydration.

In case of variety Sultany, recovery of non-sucrose precultured and non-cryopreserved (–LN) PEMs was between 73.3 and 56.6% for dehydration durations between 0 and 150 min and decreased to 26.8% after 300 min (Table 4). After cryopreservation (+LN), recovery increased from 0.6% without dehydration to a maximum of 56.0% after 90 min dehydration ($22 \pm 10\%$ MC), then dropped to 27.1% after 300 min dehydration. After sucrose preculture, recovery of non-cryopreserved (–LN) PEMs was between 68.1 and 74.2% for dehydration durations between 0 and 90 min, then decreased progressively to 17.5% after 300 min. After cryopreservation (+LN), recovery increased from 0.0% without dehydration to 74.6% after 120 min dehydration ($11 \pm 2\%$ MC) and the decreased to 21.5% after 300 min dehydration.

Regrowth intensity of non-sucrose precultured and non-cryopreserved (–LN) PEMs was between 48.8 and 63.8% for dehydration between 0 and 150 min and decreased to 37.4% after 300 min (Table 4). After cryopreservation (+LN), regrowth intensity was nil without dehydration. It increased to a maximum of 46.0% after 120 min dehydration, then dropped to 27.2% after 300 min dehydration. Following sucrose preculture, regrowth intensity of non-cryopreserved (–LN) PEMs varied between 36.7 and 46.5% for dehydration durations between 0 and 150 min, and dropped to 14.7% after 300 min dehydration. After cryopreservation (+LN), regrowth intensity increased from 7.0% after 30 min dehydration to 36.1–58.3% after 90–150 min dehydration, then decreased to 20.7% after 300 min dehydration.

4. Discussion

In this study, we successfully cryopreserved PEMs of two date palm varieties, Sokary and Sultany, using two different techniques, DV and D cryo-plate. The DV protocol employed was that published by Fki et al. (2011a) and the D cryo-plate protocol was adapted from

that published by Niino et al. (2013). This work represents the third published report of application of D cryo-plate and the first report of application of this technique to embryogenic tissues such as PEMs.

With both techniques studied, we expressed the results both in terms of recovery % and of regrowth intensity. This allowed us to provide a more precise and accurate description of the response of PEMs to cryopreservation and to better discriminate between experimental conditions. The importance of combining different parameters to evaluate the response of the plant material to a cryopreservation protocol has already been highlighted notably with soybean callus (Engelmann, 1992) and citrus embryogenic cell suspensions (Aguilar et al., 1993).

Several differences were noted between our results and those obtained by Fki et al. (2011a) with PEMs of variety Barhee using the DV technique. Recovery was higher in our experiments, reaching 98.6% with variety Sokary and 88.0% with variety Sultany, compared to a maximum of 63.3% in case of variety Barhee (Fki et al., 2011a). This reflects the variability generally observed between genotypes in response to a cryopreservation protocol (Engelmann, 2011). In the work of Fki et al. (2011a), sucrose preculture (3 days on medium with 0.5 M sucrose) increased recovery from 43.0% without preculture to 63.3% with preculture. By contrast, in our experiments the same sucrose preculture had generally a negative effect on recovery, especially in terms of regrowth intensity. This may reflect the sensitivity to sucrose exposure of the two date palm varieties employed in our study. Sucrose preculture had a positive effect on recovery only when PEMs were cryopreserved directly after the loading treatment, without any PVS2 treatment. In such conditions, recovery reached 21.1%. Sucrose preculture is an integral part of cryopreservation protocols, as it generally leads to improved recovery after LN exposure (Engelmann, 2014). It usually consists of a 1–2 day culture on medium with 0.3–0.5 M sucrose, but there are examples of longer treatment durations (Mari et al., 1995) and of higher sucrose concentrations in the preculture medium (Kim et al., 2010). Sucrose acts by osmotically dehydrating the

Table 4
Effect of sucrose preculture (3 days, 0.5 M sucrose) and of air dehydration duration (min) and regrowth intensity (% surface increase compared to initial PEM surface) on recovery (%) of non-cryopreserved (–LN) and cryopreserved (+LN) PEMs of date palm variety Sultany cryopreserved using the D cryo-plate method. Data followed by the same letter within the same line are not significantly different according to Duncan's test ($P < 0.05$).

	Sucrose preculture		Dehydration duration (min)						
			0	30	60	90	120	150	300
Recovery (%)	–	–LN	73.3a	71.7a	67.0a	65.1a	68.4a	56.6a	26.8b
	–	+LN	0.6c	21.1b	40.8ab	56.0a	50.6a	46.8a	27.1b
	+	–LN	68.1a	72.2a	73.4a	74.2a	52.1b	43.7b	17.5c
	+	+LN	0.0e	14.2d	34.2bc	67.0a	74.6a	42.6b	21.5cd
Regrowth intensity	–	–LN	59.9a	62.5a	63.8a	56.5a	48.8a	51.6a	37.4b
	–	+LN	0.0c	14.8b	38.2ab	39.1ab	46.0a	32.3ab	21.2b
	+	–LN	40.4a	44.9a	42.4a	46.5a	38.2a	36.7a	14.7b
	+	+LN	–2.1cd	7.0c	24.1b	47.5a	58.3a	36.1a	20.7bc

explants but it is also absorbed by cells, leading to an increase in intracellular sugar and starch concentration (Dumet et al., 1994; Zhu et al., 2006).

In optimal conditions, the D cryo-plate and the DV protocols led to similar recovery % with variety Sokary but regrowth intensity was higher with D cryo-plate compared to DV, with 113.0% and 92.5% regrowth intensity, respectively. In case of variety Sultany, recovery was slightly lower with D cryo-plate compared to DV, with 74.6% and 88.0% recovery, respectively. Differences between the two techniques were more marked when comparing the highest regrowth intensity achieved, which was 84.0% with DV against only 47.5% with D cryo-plate. This is an additional illustration of the differences in reactivity between genotypes cryopreserved using the same protocol. It also highlights the interest of having more than one technique at disposal to cryopreserve a range of genotypes, which may respond differently to the available techniques (Engelmann, 2011). It should be noted that, contrarily to what was observed with DV, when the D cryo-plate was employed, no recovery was achieved with PEMs, which were cryopreserved immediately after the LS treatment. This may be because the calcium alginate matrix, which encapsulates the explants, slowed down the dehydration incurred by exposure to LS compared to explants, which are in direct contact with the LS in the DV protocol.

Several differences were noted between the D cryo-plate employed with date palm PEMs and those published by Niino et al. (2013) for mat rush shoot tips and by Matsumoto et al. (2013) for persimmon shoot tips. The LS and ULS solutions employed with mat rush and persimmon were composed of 2.0 M glycerol + 1.0 M sucrose and of 1.0 M sucrose, respectively (Niino et al., 2013), whereas in case of date palm PEMs they were composed of 2.0 M glycerol + 0.4 M sucrose and of 1.2 M sucrose for LS and ULS, respectively. Another difference concerned the duration of dehydration leading to optimal recovery after cryopreservation. Recovery was highest after 120–180 min dehydration in case of mat rush (Niino et al., 2013) and after 30 min in case of persimmon (Matsumoto et al., 2013), whereas intermediate optimal durations were noted with date palm, between 60 and 120 min for variety Sokary and between 60 and 150 min for variety Sultany. As in the D cryo-plate technique dehydration is performed in the air current of a laminar flow cabinet, the air flow rate (and therefore the desiccation rate of the samples) may vary between different models of laminar flow hoods. Another important parameter is the relative humidity of air in the laboratory, which may greatly vary between locations and between seasons (particularly between the dry and humid seasons in tropical countries) and therefore also modify the dehydration rate. It may thus be advisable to dehydrate samples in air-tight containers filled with silica gel as in the encapsulation-dehydration technique (Gonzalez Arnao and Engelmann, 2006) or containing saturated salt solutions, as for cryopreservation of non-orthodox seeds (Engelmann and Dussert, 2012). Such devices allow

achieving highly reproducible desiccation rates, provided that the temperature at which desiccation is performed remains constant between experiments. The last important difference between the experiments of Niino et al. (2013) with mat rush and our own experiments with date palm pertains to the size and structure of explants used for cryopreservation. In case of mat rush, 1.5–2.0 mm long and 1.0 mm wide buds, with a complex structure including the meristem, leaf primordia, base sheaths and a basal part were employed. By contrast, in case of date palm PEMs, individual proembryos were around 500 μm in diameter and had a simple structure.

In conclusion, we have shown that cryopreservation of date palm PEMs can be efficiently performed using both the DV and D cryo-plate techniques. Our results will contribute to the long-term conservation and safeguarding of date palm biodiversity.

References

- Aguilar, M.E., Engelmann, F., Michaux-Ferrière, N., 1993. Cryopreservation of embryogenic cell suspensions of *Citrus deliciosa* Tan. and histological study. *CryoLetters* 14, 217–228.
- Bagniol, S., Engelmann, F., 1992. Effect of thawing and recovery conditions on the regrowth of meristems of date palm (*Phoenix dactylifera* L.) after cryopreservation in liquid nitrogen. *CryoLetters* 13, 253–260.
- Bagniol, S., Engelmann, F., Michaux-Ferrière, N., 1992. Histo-cytological study of apices from in vitro plantlets of date palm (*Phoenix dactylifera* L.) during a cryopreservation process. *CryoLetters* 13, 405–412.
- Bekheet, S.A., 2010. In vitro culture techniques for conservation of date palm germplasm in Arab countries. *Acta Hort.* 882, 211–217.
- Dumet, D., Engelmann, F., Chabrilange, N., Dussert, S., Duval, Y., 1994. Effect of various sugars and polyols on the tolerance to desiccation and freezing of oil palm polyembryonic cultures. *Seed Sci. Res.* 4, 307–313.
- Engelmann, F., 1992. Effects of freezing in liquid nitrogen on the properties of a soybean (*Glycine max.* L. var. acme) strain used as a bioassay for cytokinin activity. *CryoLetters* 13, 331–336.
- Engelmann, F., 2011. Use of biotechnologies for the conservation of plant biodiversity. *In Vitro Cell. Dev. Biol.—Plant* 47, 5–16.
- Engelmann, F., 2014. Cryopreservation of clonal crops: a review of key parameters. *Acta Hort.* 1039, 31–39.
- Engelmann, F., Dussert, S., 2012. Cryopreservation. In: Normah, M.N., Chin, H.F., Reed, B.M. (Eds.), *Conservation of Tropical Plant Species*. Springer Verlag, Berlin, pp. 107–120.
- Fki, L., Bouaziz, N., Sahnoun, N., Swennen, R., Drira, N., Panis, B., 2011a. Palm cryobanking. *CryoLetters* 32, 451–462.
- Fki, L., Bouaziz, N., Kriaa, W., Benjemaa-Masmoudi, R., Gargouri-Bouzi, R., Rival, A., Drira, N., 2011b. Multiple bud cultures of 'Barhee' date palm (*Phoenix dactylifera*) and physiological status of regenerated plants. *J. Plant Physiol.* 168, 1694–1700.
- Gonzalez Arnao, M.T., Engelmann, F., 2006. Cryopreservation of plant germplasm using the encapsulation-dehydration technique: review and case study on sugarcane. *CryoLetters* 27, 155–168.
- Jaradat, A., 2006. Date palms of Arabia: a multifunctional genetic resource. In: *Abst. Int. Conf. on Date Palm Production and Processing Technology*, 9–11 May 2006, Muscat, Oman, p. 8.
- Kim, H.H., Popova, E.V., Lee, J.Y., Park, S.U., Lee, S.C., Engelmann, F., 2010. Cryopreservation of hairy roots of *Rubia akane* (Nakai) using a droplet-vitrification procedure. *CryoLetters* 31, 473–484.
- Mari, S., Engelmann, F., Chabrilange, N., Huet, C., Michaux-Ferrière, N., 1995. Histo-cytological study of coffee (*Coffea racemosa* and *C. sessiliflora*) apices of in vitro plantlets during their cryopreservation using the encapsulation-dehydration technique. *CryoLetters* 16, 289–298.

- Matsumoto, T., Sakai, A., Yamada, K., 1994. Cryopreservation of *in vitro* grown apical meristems of wasabi (*Wasabia japonica*) by vitrification and subsequent high plant regeneration. *Plant Cell Rep.* 13, 442–446.
- Matsumoto, T., Yamamoto, S., Fukui, K., Niino, T., 2013. Cryopreservation of persimmon shoot tips using D cryo-plate procedure. In: *Abst. Second Intl. Symp. on Plant Cryopreservation*, 11–14 August 2013, Fort Collins, USA.
- Murashige, T., Skoog, F., 1962. A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.* 15, 473–497.
- Mycock, D.J., Wesley-Smith, J., Berjak, P., 1995. Cryopreservation of somatic embryos of four species with and without cryoprotectant pre-treatment. *Ann. Bot.* 75, 331–336.
- Niino, T., Yamamoto, S., Fukui, K., Castillo Martinez, C.R., Matsumoto, T., Engelmann, F., 2013. Dehydration improves cryopreservation of mat rush (*Juncus decipiens* Nakai) on cryo-plates. *CryoLetters* 34, 549–560.
- Panis, B., Piette, B., Swennen, R., 2005. Droplet vitrification of apical meristems: a cryopreservation protocol applicable to all *Musaceae*. *Plant Sci.* 168, 45–55.
- Panis, B., Piette, B., André, E., Van den houwe, I., Swennen, R., 2011. Droplet vitrification: the first generic cryopreservation protocol for organized plant tissues? *Acta Hortic.* 908, 157–163.
- Sakai, A., Kobayashi, S., Oiyama, I., 1990. Cryopreservation of nucellar cells of naval orange (*Citrus sinensis* Osb. var. *brasiliensis* Tanaka) by vitrification. *Plant Cell Rep.* 9, 30–33.
- Sekizawa, K., Yamamoto, S., Rafique, T., Fukui, K., Niino, T., 2011. Cryopreservation of *in vitro*-grown shoot tips of carnation (*Dianthus caryophyllus* L.) by vitrification method using aluminium cryo-plates. *Plant Biotechnol.* 28, 401–405.
- Ulrich, J.M., Finkle, B.J., Tisserat, B., 1982. Effect of cryogenic treatment on plant-let production from frozen and unfrozen date palm callus. *Plant Physiol.* 69, 624–627.
- Yamamoto, S., Rafique, T., Priyantha, W.S., Fukui, K., Matsumoto, T., Niino, T., 2011. Development of a cryopreservation procedure using aluminium cryo-plates. *CryoLetters* 32, 256–265.
- Yamamoto, S., Fukui, K., Rafique, T., Khan, N.I., Castillo Martinez, C.R., Sekizawa, K., Matsumoto, T., Niino, T., 2012a. Cryopreservation of *in vitro*-grown shoot tips of strawberry by the vitrification method using aluminium cryo-plates. *Plant Genet. Res.: Charact. Util.* 10, 14–19.
- Yamamoto, S., Rafique, T., Fukui, K., Sekizawa, K., Koyama, A., Ichihashi, T., Niino, T., 2012b. Development of an effective cryopreservation protocol using aluminium cryo-plates for *in vitro*-grown shoot tips of mulberries (*Morus* spp.) originated from the tropics and subtropics. *Sanshi-Konchu Biotechnol.* 81, 57–62 (in Japanese).
- Yamamoto, S., Rafique, T., Fukui, K., Sekizawa, K., Niino, T., 2012c. V-cryo-plate procedure as an effective protocol for cryobanks. Case study of mint cryopreservation. *CryoLetters* 33, 12–23.
- Zaid, A., Arias, E.J., Taher, F., 2002. Date Palm Global Network. Project Document. <http://Dpgn.Uaeu.Ac.Ae/Index.Htm>
- Zhu, G.Y., Geuns, J.M.C., Dussert, S., Swennen, R., Panis, B., 2006. Change in sugar, sterol and fatty acid composition in banana meristems caused by sucrose-induced acclimation and its effects on cryopreservation. *Physiol. Plant.* 128, 80–94.



Society for Conservation Biology

A global community of conservation professionals

This certifies that

Mr Mohammad SALMA

Attended the 27th International Congress for Conservation Biology and the
4th European Congress for Conservation Biology (ICCB-ECCB):

Mission Biodiversity: Choosing new paths for conservation

In Montpellier, France, 2-6 August 2015.

A handwritten signature in black ink, reading "Geri E. Unger", is positioned in the bottom left area of the page.

Ms Geri Unger
Executive Director, Society for Conservation Biology





Cryopreservation for long-term conservation of date palm (*Phoenix dactylifera* L.) diversity

Mohammad SALMA & Florent ENGELMANN
IRD, UMR DIADE, BP 64501, 34394 Montpellier Cedex 5, France



Introduction Date palm (*Phoenix dactylifera* L.) has a great ecological and socio-economical importance in arid and semi-arid areas of the globe. This specie displays a large diversity, which is threatened by various diseases and by large-scale dissemination and intensive cultivation of elite varieties. These factors may result in the loss of many local and important varieties. The conservation of date palm diversity is thus a major challenge for date palm cultivation at the global level. This plant is usually propagated using offshoots sampled on mother-plants. However, the number of offshoots produced per mother-plant is low and highly dependent on the variety. Therefore, *in vitro* propagation protocols have been developed, which allow the rapid and large-scale production of high quality materials. However, large-scale *in vitro* propagation bears the risk of off-type production caused by the occurrence of somaclonal variation. Cryopreservation, i.e. the conservation of biological material at ultra low temperature (liquid nitrogen -196°C), is currently the only technique available to achieve long-term conservation of local and elite varieties of date palm and to overcome the risk of somaclonal variation.

Advantages of cryopreservation:

- 😊 Conservation of biological material for extended durations without any modification or alteration.
- 😊 Storage of biological material in small volume, protected from contaminations, with limited maintenance.

Cryopreservation techniques:

1. Methods with extracellular crystallization: based on ice crystallization in extracellular space.
2. Methods without extracellular crystallization: based on vitrification (amorphous, glassy state) of intracellular solutes.

Cryopreservation of date palm:

- Techniques with extracellular crystallization: embryonic callus (Ulrich *et al.* 1982), meristems (Bagniol *et al.* 1992)
- Techniques without extracellular crystallization: cell suspensions (Al-Bahrany & Al-Khayri 2012), proembryogenic masses (PEMs) (Fki *et al.* 2011).

Materials & Methods

Plant material:

Proembryogenic masses (PEMs) of two date palm commercial varieties: Sokary and Sultany (Fig. 1).

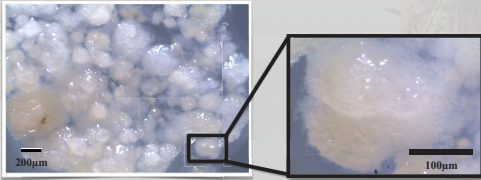


Fig. (1) PEMs area of the variety Sokary.

Techniques:

Two techniques of cryopreservation had been used (Fig. 2):

1. Droplet-vitrification (blue path)

Advantage:
😊 provides ultra-rapid cooling and warming rates

Disadvantage:
😞 needs experienced personnel to perform certain steps

2. D cryo-plate (orange path)

Replacement of osmotic dehydration by physical dehydration

Advantages:
😊 provides ultra-rapid cooling and warming
😊 does not require experienced personnel

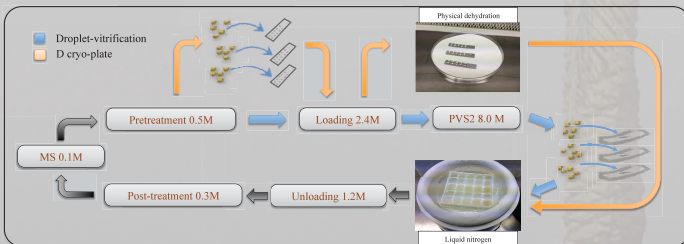


Fig. (2) The two cryopreservation techniques used: DV (Blue path) and D cryo-plate (orange path).

Measured parameters:

1. Recovery %
2. Regrowth intensity % = $\frac{\text{Surface after 15 days} - \text{Initial surface}}{\text{Initial surface}} \times 100$

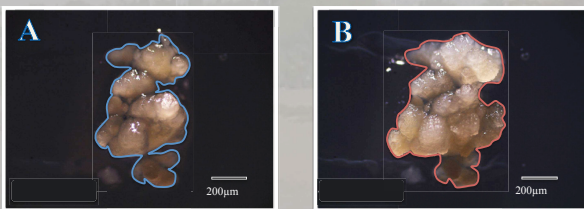


Fig. (3) Changes in PEMs area of the variety Sokary. A) PEMs area immediately after cryopreservation; B) PEMs area 15 days after cryopreservation.

Results

1) Recovery of PEMs

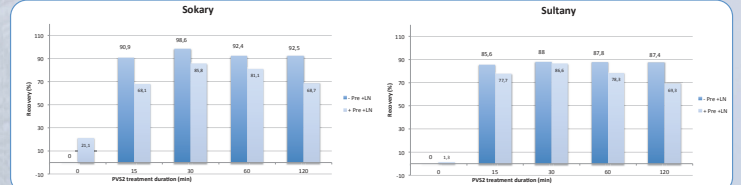


Fig. (4) Effect of sucrose preculture (3 days, 0.5 M sucrose) and of PVS2 treatment duration (min) on recovery (%) of non-cryopreserved (-LN) and cryopreserved (+LN) PEMs of varieties Sokary and Sultany. -/+ pre: without / with sucrose preculture.

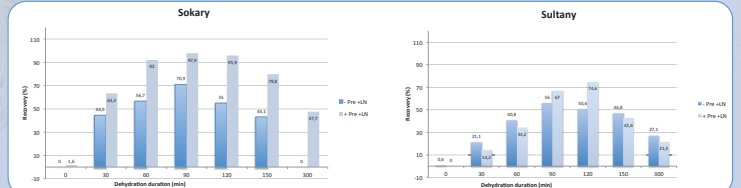


Fig. (5) Effect of sucrose preculture (3 days, 0.5 M sucrose) and of air dehydration duration (min) on recovery (%) of non-cryopreserved (-LN) and cryopreserved (+LN) PEMs of varieties Sokary and Sultany. -/+ pre: without / with sucrose preculture.

2) Comparison between recovery and regrowth intensity of PEMs

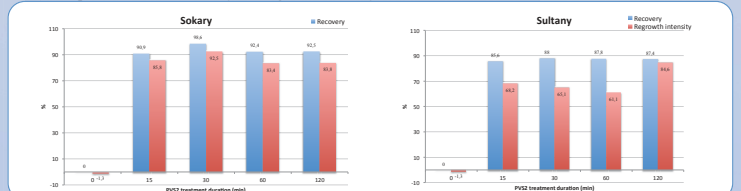


Fig. (6) Comparison between recovery and regrowth intensity of cryopreserved (+LN) PEMs of varieties Sokary and Sultany using the droplet-vitrification technique without sucrose preculture (-pre).

- Recovery of cryopreserved PEMs was very high (90.9-98.6%) with both techniques in case of variety Sokary. With variety Sultany, droplet-vitrification (DV) led to 85.6-88.0% recovery, while D cryo-plate led to 67.0-74.6% recovery (Fig. 4).
- With the D cryo-plate technique, sucrose preculture (3 days, 0.5 M) had a positive effect on recovery of cryopreserved PEMs (Fig. 5), while for DV this positive effect was observed without PVS2 treatment (21% recovery) with variety Sokary (Fig. 4).
- Regrowth intensity of cryopreserved PEMs was generally lower with variety Sultany compared to variety Sokary (Fig. 6).
- Using DV, the highest regrowth intensity (92.5%) was obtained after 30 min PVS2 treatment for variety Sokary. For variety Sultany the highest regrowth intensity (84.6%) was achieved after 120 min PVS2 treatment (Fig. 6).

Conclusions

We have shown that cryopreservation of date palm PEMs can be efficiently performed using both the DV and D cryo-plate techniques. We have also illustrated the importance of combining different parameters to evaluate the response of the plant material to a cryopreservation protocol. Our results will contribute to the long-term conservation and safeguarding of date palm biodiversity.

References:

- Al-Bahrany AM, Al-Khayri JM (2012) Optimizing *In vitro* Cryopreservation of Date Palm (*Phoenix dactylifera* L.). *Biotechnology* 11: 59-66
- Bagniol S, Engelmann F, Mihaux-Ferrière N (1992) Histo-Cytological Study Of Apices From *In Vitro* Plantlets Of Date Palm (*Phoenix dactylifera* L.) During A Cryopreservation Process. *CryoLetters* 13: 405-412
- Bekheet SA, Taha HS, Suliman ME, Hassan NA (2007) Cryopreservation of date palm (*Phoenix dactylifera* L.) cultured *in vitro*. In A Zaid, V Hegarty, HHS AlKabi, eds. Proceedings of the Third International Date Palm Conference. International Society Horticultural Science, Leuven 1, pp 283-291
- Fki L, Bouaziz N, Sahoun N, Swennen R, Drira N, Panis B (2011) Palm Cryobanking. *CryoLetters* 32: 451-462
- Ulrich JM, Finkle BJ, Tisserat BH (1982) Effects of Cryogenic Treatment on Plantlet Production from Frozen and Unfrozen Date Palm Callus. *Plant Physiology* 69: 624-627