

UNIVERSITE MONTPELLIER II

THESE

Pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE MONTPELLIER II

Discipline : Biologie cellulaire et moléculaire
Formation Doctorale : Biologie, Diversité et Adaptation des plantes
Ecole Doctorale : Biologie Intégrative

Sujet

**Détermination du sexe chez le palmier dattier :
Approches histo-cytologiques et moléculaires**

Présenté et soutenu publiquement par

ABDOURAHMAN DAHER MERANEH

Le 3 Décembre 2010

Devant le jury composé de :

Pascal Gantet	Professeur	Université de Montpellier II
Sophie Nadot	Professeur	Université Paris-Sud
Charlies Scutt	HDR	ENS de Lyon
Fred Stauffer	Chercheur	Jardin botanique de Genève
James Tregear	DR	IRD
Frédérique Aberlenc-Bertossi	Chercheur	IRD
Nabil Mohamed	DR	CERD

Remerciements

Le travail présenté ici a été réalisé en alternance entre l'IRD de Montpellier et le Centre d'étude et de Recherche de Djibouti dans le cadre d'une thèse en alternance à l'Université de Montpellier II dans l'école doctorale SIBAGHE à raison de 7 mois par an de présence en France. Elle est le fruit d'une collaboration entre l'équipe « Biologie du Développement des Palmiers » de l'IRD et l'Institut des Sciences de la vie du CERD.

Les travaux de la thèse ont été réalisés au laboratoire GeneTrop de l'IRD de Montpellier, au sein de la Plateforme d'Histologie et d'Imagerie Cellulaire (PHIV) du CIRAD de Montpellier, au laboratoire de microscopie électronique de l'UMR BGPI du CIRAD et au laboratoire de biotechnologies végétales du ISV /CERD

Ce travail a été rendu possible grâce au soutien financier du Département Soutien et Formation *via* les projets CORUS et JEAI Djibpalm ainsi du CERD et sans qui rien n'aurait été possible.

Mes remerciements s'adressent à **Mr Pascal Gantet**, Professeur à l'université de Montpellier II, pour l'honneur qu'il me fait en acceptant de participer à mon jury de thèse malgré ses multiples occupations. Ses suggestions et ses critiques lors des comités de thèse ont permis d'avancer dans nos réflexions et travaux.

Je remercie infiniment et exprime toute ma reconnaissance à **Mme Sophie Nadot**, Professeur à l'université Paris-Sud, pour avoir accepté d'être rapporteur malgré un emploi du temps très chargé lié à ses fonctions de Professeur. J'ai été très touché par la spontanéité avec laquelle elle a accepté de lire et de juger ce travail.

Je suis reconnaissant et exprime toute ma gratitude envers **Mr Charlies Scutt**, Chercheur CNRS de Lyon, pour accepter de juger ce travail et d'en être rapporteur et de l'intérêt qu'il porte à notre travail de thèse.

Je remercie infiniment à **Mr Fred Stauffer**, pour avoir accepté de participer à ce jury malgré ses multiples charges et la distance qui nous sépare. Je lui suis très reconnaissant pour l'intérêt qu'il porte à notre travail.

J'exprime également toute ma reconnaissance et mes remerciements à **Mr James Tregear**, (DR) à l'IRD Montpellier, Responsable de l'équipe Palmier, pour m'avoir accueilli au sein de son équipe et codirigé cette thèse. Ses conseils et suggestions ainsi que son soutien dans mes différentes démarches ne m'ont jamais fait défaut. Qu'il soit assuré de ma profonde et respectueuse gratitude. Sa patience et son encouragement m'ont grandement aidé tout durant ces années.

Je tiens à remercier particulièrement et exprime toute ma gratitude à **Mme Frédérique Aberlenc-Bertossi**, Chercheur à l'IRD Montpellier, Responsable du Projet palmier dattier à l'IRD, Responsable Nord des projet des recherche CORUS et JEAI Djibpalm, pour sa Codirection de la thèse et son encadrement scientifique. Ce projet de thèse a vu le jour, a pu se développer et aboutir grâce à sa détermination sans faille. Je vous dois beaucoup et voudrais que vous soyez assurés, en ces quelques lignes, de toute ma reconnaissance pour vos conseils qui ont participé à la pertinence et à la clarification du mémoire, votre implication et votre entière disponibilité durant toutes ces années de thèse. J'espère que votre rigueur scientifique aura fait de moi un meilleur chercheur qu'à mes débuts. *Soyez assurées de ma reconnaissance*

Je tiens particulièrement à remercier et exprime également toute ma gratitude à **Mr Nabil Mohamed**, Directeur de l'institut des sciences de la vie du CERD, Responsable Sud du projet CORUS et JEAI Djibapalm, pour m'avoir donné l'occasion d'effectuer cette thèse et d'évoluer en alternance. Ce projet de recherche fondamentale n'aurait pu être mené de façon efficace et rigoureuse en parallèle à mon activité professionnelle, sans votre appui et votre soutien sans faille. Vos conseils et suggestions ainsi que votre soutien dans mes différentes démarches ne m'ont jamais fait défaut. J'ose espérer que les résultats auxquels nous avons abouti combleront en partie vos espérances. Je vous remercie du fond du cœur et puissent ces lignes être l'expression de ma plus profonde reconnaissance.

Je suis reconnaissant et exprime mes vifs remerciements à **Mlle Hélène Adam**, Chercheur dans l'équipe palmier, pour sa contribution fructueuse en réalisant une partie déterminante de nos travaux, l'hybridation *in situ*. J'ai été particulièrement honoré de l'intérêt qu'elle a porté, durant toutes ces années, à notre sujet de recherche. Ses critiques constructives et ses suggestions ont grandement contribué à l'aboutissement de ce travail.

Je suis reconnaissant et exprime mes vifs remerciement à **Mme Françoise Monéger** (ENS Lyon), **Mr Serge Hamon** (Dir. UMR DIAPC) et **Mr Jean-luc Verdeil** (CIRAD) et **Mr Alain Rival** (CIRAD) pour l'intérêt qu'ils ont porté à notre sujet de recherche lors des comités de thèse. Leurs critiques constructives et leurs suggestions ont grandement contribué à l'aboutissement de ce travail. Je remercie particulièrement **Jean-luc** pour m'avoir accueilli à la plateforme PHIV (CIRAD)n pour acquérir les techniques d'immunodétection. Qu'il en soit vivement remercié.

Mes vifs remerciements et toute ma reconnaissance à **Marc Lartaud** (PHIV CIRAD) et **Daniel Gargani** (UMR BGPI du CIRAD) pour leur précis appui technique durant les travaux de la thèse.

J'adresse également toute ma reconnaissance à **Mr Jalludin Mohamed** (Directeur Général du CERD), **Mr Ali Abdillahi** (Agent comptable du CERD) et **Mme Maguida Houssein** (Secrétaire et comptable de l'ISV) pour l'appui sans faille et avec une grande spontanéité qu'ils ont apporté pour réaliser ce travail dans les meilleures conditions possibles.

Je ne saurais oublier d'adresser mes vifs remerciements à mes collègues particulièrement **Sabira Abdoukader**, **Adwa Abdou** et **Omar Osman** pour leur soutien, leur encouragement et leur convivialité. Je leur dois beaucoup et j'ai eu la chance de les avoir à mes côtés.

Ce travail a été réalisé avec l'aide précieuse d'une équipe de terrain efficace pour la recherche et la dissection des palmiers que je tiens à remercier à **Houssein Awaleh**, **Hassan ali**, **Idriss A.**, **Abdoulkarim**, **Gawad**, **Nasser M.**, **Mohamoud. W.** du CERD.

Mes remerciements s'adressent au **Commandant Mohamed Kayad**, à **Kassem Haissama**, **Mohamed Ali** et **Faysal Abdoulgalil** pour leur permission à échantillonner dans leurs palmeraies et à **Mathieu Gonin** pour sa participation à l'acquisition des résultats de l'étude de la méthylation. Soyez assurés de ma reconnaissance.

J'adresse mes vifs remerciements et exprime toute ma gratitude à **Mr Alain Borgel**, Directeur du centre IRD de la Réunion, un homme engagé pour la vocation Sud de l'IRD, de m'avoir fait découvrir l'IRD pour la première fois et de tout l'intérêt qu'il porte à ce travail ainsi qu'au projet de développement du palmier à Djibouti.

Mes remerciements tous les membres de l'équipe « Palmiers », **Nathalie Chabrilange**, **Jean-Christophe Pintaud**, **Stéfan Jouannic**, **Thierry Beule**, **Pascal Ilbert**, **Tim Tranbarger**, **Estelle Jaligot**, **Sylvie Doulbeau**, **Frédérique Richaud**, **Isabelle Herault**, **Virginie Champion**, pour la bonne entente et leur collaboration durant toutes ces années passées à l'IRD.

Mes remerciements s'adressent également aux collègues et amis du Centro Studi e Ricerche per le Palme - Sanremo (Italie), Messieurs **Robert Castellana** et **Claudio Littardi** pour leur soutien et l'intérêt qu'ils ont porté à ce travail.

Dans ce même registre, je remercie infiniment Monsieur **Yves Duval**, Directeur du centre de l'IRD de Montpellier pour l'intérêt qu'il a porté au programme Palmier dattier de Djibouti et le soutien qu'il n'a cessé d'apporter à notre projet de thèse.

Je ne saurais finir sans adresser mes remerciements aux collègues et amis du réseau Réseau « AUF-Dattier » : Pr. **Nadia Bouguedoura** et **Djamila Chabane** de l'USTHB d'Alger, **Michel Ferry** (Dir. Station Phoenix d'Elche), **Djibril Sané** (Maître de conférence UCAD), **Mohamed Ould Kneyta**, **Salwa Zehdi**, **Feu Mokhtar Triffi**, **Emira Cherif**, et pour leur soutien et l'intérêt qu'ils ont porté à ce travail. Dans l'espoir que ces résultats contribueront à l'avancement de leur programme de recherche sur le palmier dattier.

Enfin, au terme de ces remerciements, je souhaiterai rendre hommage aux membres de ma Famille pour leur soutien incommensurable tout au long de mes études. Pour finir, je tiens particulièrement à exprimer tout mon respect et toute ma gratitude à mon père **Daher**, ma mère **Hawa** et mon frère aîné **Abdi** qui ont toujours été là et qui m'ont toujours soutenu dans mes études et ma vie : MERCI.

Résumé

Le palmier dattier (*Phoenix dactylifera* L.) est une espèce fruitière dioïque tropicale qui revêt une importance capitale sur le plan alimentaire, socio-économique et écologique pour les régions arides du globe. Malgré l'intérêt de disposer d'un outil moléculaire pour discriminer les plantes mâles et femelles pour les programmes d'amélioration génétique, aucun marqueur spécifique du sexe n'a été identifié et validé à ce jour. Afin de pouvoir étudier et comprendre le déterminisme sexuel du palmier dattier, nous avons entrepris la description et la caractérisation des processus cellulaires et moléculaires associés à la différenciation des organes sexuels.

L'étude histologique du développement reproducteur a montré que le bourgeon floral est d'apparence bisexuelle jusqu'à l'initiation des primordia de l'androcée et du gynécée. Le premier dimorphisme sexuel observé à ce stade correspondant à un gynécée plus large dans les fleurs femelles résulterait d'une activité mitotique plus importante dans les cellules du gynécée fertile par rapport à son équivalent non fonctionnel. Les organes sexuels stériles, staminodes et pistillodes, cessent ensuite leur développement et présentent une différenciation incomplète.

Des études d'hybridation *in situ* de l'expression du gène codant l'histone *H4*, marqueur de l'activité mitotique, ont montré que le blocage du développement des staminodes et des pistillodes serait dû à un arrêt des divisions cellulaires. Nos investigations de l'intégrité cellulaire par des observations en microscopie électronique à transmission et par coloration de l'ADN confirmeraient que l'avortement des organes stériles ne résulte pas d'un processus de dégradation cellulaire et nucléaire. De plus, l'étude de la méthylation de l'ADN par immunodétection des cytosines méthylées révèle que, par rapport aux organes fertiles, les pistillodes et les staminodes se distinguent par leur niveau plus élevé de méthylation. Ces résultats sont en cohérence avec la réversibilité du blocage de ces organes observés *in planta* ou *in vitro* en réponse à une induction hormonale.

L'ensemble de ces données montrent que l'unisexualisation des fleurs de palmier dattier est associée à une hyperméthylation globale de l'ADN suivi d'un arrêt des divisions cellulaires dans les organes sexuels stériles. Cette étude a permis d'améliorer nos connaissances sur les mécanismes qui gouvernent la différenciation des organes sexuels et permettra d'ouvrir des perspectives pour l'identification de marqueurs moléculaires du sexe chez le palmier dattier.

Mots clés : Palmier dattier - fleur - détermination du sexe - arrêt des divisions – méthylation d'ADN

Abstract

The date palm (*Phoenix dactylifera L.*) is a dioecious tropical fruit crop plant which has vital dietary, socio-economic and ecological importance in arid regions of the world. Despite the interest of developing molecular tools to discriminate male and female plants for the benefit of biodiversity preservation and genetic improvement programs, no sex-specific markers have been identified and validated to date. To study and understand the sex determination of date palm, we undertook to characterise the cellular and molecular processes underlying sex organ differentiation in this plant.

A histological study of date palm reproductive development showed that the immature flower is bisexual in appearance until the initiation of the androecium and gynoecium. The first sign of sexual dimorphism is observed at this stage, namely a wider gynoecium in female flowers resulting from greater mitotic activity in the functional gynoecium of female flowers compared to the pistillode of male ones. The sterile sex organs (pistillode and staminodes) were observed to cease their development by progressive loss of cell proliferation and ultimately displayed incomplete differentiation.

Cell division patterns and the nuclear integrity of reproductive organs were investigated respectively by RNA *in situ* hybridization to a histone H4 gene probe and by DNA coloration combined with scanning electron microscopy. The results obtained revealed an absence of cell cycle activity and nuclear degradation in the residual sex organs. In addition, a study of DNA methylation, by immunodetection of methylated cytosines revealed that compared to the fertile reproductive organs, staminodes and pistillodes displayed relatively high levels of global DNA methylation. These results are consistent with the observed reversibility of sterile organ developmental arrest observed *in planta* or *in vitro* in response to hormonal induction.

Overall, these data demonstrate that the floral unisexuality of date palm is characterized by cell cycle arrest, higher DNA methylation in sterile sexual organs and an absence of cell degeneration rather than a cell death process. This study has improved our understanding of the mechanisms that govern the differentiation of sex organs and forms a useful starting point for research on the identification of molecular markers of sex determination in date palm.

Keywords: Date palm - flower - sex determination - cell cycle - DNA methylation

Introduction générale

Contrairement au règne animal dont les espèces présentent majoritairement des organes sexuels séparés, la plupart des plantes à fleurs sont hermaphrodites et produisent à la fois des organes sexuels mâles et femelles (étamines et carpelles) au sein de la même fleur. Cependant, certaines espèces végétales (10%) montrent une séparation physique entre les organes reproducteurs mâles et femelles, soit dans des fleurs séparées sur la même plante (espèces monoïques), soit sur des plantes distinctes (espèces dioïques) (Ainsworth, 2000). L'intérêt principal de cette séparation des sexes est de promouvoir l'allogamie, favorisant ainsi le brassage génétique et l'hétérosis, ce qui constitue un avantage adaptatif.

Tandis que les mécanismes génétiques et moléculaires contrôlant la détermination du sexe chez les mammifères ont été bien étudiés (Fraser et al, 2006), très peu de données sont disponibles sur le déterminisme du sexe chez les plantes. La dispersion phylogénétique des espèces dioïques et monoïques semble s'opposer à l'existence d'un seul type de mécanisme de détermination. En effet, la présence de la dioécie dans plus de 38 familles d'angiospermes suggère qu'elle est apparue à plusieurs reprises et de façon indépendantes au cours de l'évolution (Weiblen et al., 2000). Les travaux réalisés chez les plantes les plus étudiées à ce sujet (maïs, compagnon blanc, melon, et concombre) confortent cette hypothèse et montrent que les facteurs génétiques à la base de la dioécie sont différents entre les espèces (Calderon-Urrea et Dellaporta al., 1999 ; Boualem et al, 2008 ; Martin et al., 2009).

Les processus de détermination du sexe impliquent l'établissement d'un dimorphisme sexuel de la fleur qui résulterait de l'absence ou l'arrêt de développement des organes sexuels inappropriés. De nombreux gènes, notamment certains appartenant à la famille MADS box, ont été impliqués dans la mise en place de la structure florale ; cependant, jusqu'à ce jour, aucune évidence génétique n'a été obtenue pour un rôle direct des gènes MADS box de l'identité des organes floraux dans le déterminisme du sexe chez les plantes. Néanmoins, différents gènes impliqués dans l'expression du sexe ont été caractérisés chez le melon, le concombre et le maïs. Dans l'ensemble, nos connaissances des processus cellulaires et moléculaires à la base du déterminisme du sexe des plantes restent pour le moment très limitées.

De nombreuses espèces pérennes cultivées (papaye, kiwi, asperge, cannabis, palmier dattier, etc.) sont dioïques et seules les individus femelles produisent des fruits alors qu'un faible nombre d'individu mâle est nécessaire pour obtenir un rendement maximal. Ainsi, la détermination du sexe joue un rôle capital dans la productivité des espèces d'importance agro-économique.

Dans ce contexte, deux intérêts d'ordre fondamental et agronomique justifient notre choix d'étudier la détermination du sexe chez le palmier dattier (*Phoenix dactylifera L.*).

En premier lieu, le palmier dattier pourrait apporter des informations originales sur l'étude de la détermination du sexe. Il appartient à un genre composé uniquement d'espèces dioïques, ce qui suggère l'existence d'un ancêtre commun dioïque. De plus, dans l'arbre phylogénétique des palmiers, les *Phoenix* s'ancrent dans des taxons hermaphrodites, ce qui suggère que dans ce genre la dioécie aurait évolué à partir de l'hermaphrodisme (Weiblen et al., 2000). De plus, cette dioécie aurait été acquise par les espèces très anciennement, car des fossiles de fleurs mâles de *Phœnix* présentant un dimorphisme floral très prononcé ont été identifiés dans des sédiments du Miocène moyen, soit il y a 50 millions d'années. Cela suggère une spécialisation importante des caractères sexuels primaires et secondaires de la famille des Arécacées en général et du genre *Phœnix* en particulier.

La seconde motivation est d'ordre agronomique. Le palmier dattier est une espèce pérenne cultivée depuis la haute antiquité qui joue un rôle capital sur le plan socio-économique. Vu que le palmier dattier est la seule espèce à pouvoir offrir à la fois production des fruits et la protection contre les sécheresses dans des contrées les plus arides, tout en résistant aux variations climatiques, l'Etat djiboutien a initié un projet d'envergure de développement de la phoeniciculture. Ce projet comprend la sauvegarde et l'extension de la culture du palmier dattier dans tout le pays. Il s'inscrit dans le cadre de l'initiative nationale de sécurité alimentaire et de lutte contre la pauvreté rurale. Pour la réussite de ce projet, l'Etat djiboutien a doté l'Institut des Sciences de la Vie (ISV) du Centre d'étude et de recherche de Djibouti d'un laboratoire de biotechnologies végétales. Les principales missions de ce laboratoire sont la sélection et la multiplication des palmiers dattiers présentant des caractéristiques d'adaptation aux conditions édapho-climatiques du pays (sécheresse, contraintes hydriques, salinité des eaux et des sols), la caractérisation, la conservation et la valorisation de la diversité génétique, et l'amélioration du germplasm phoenicicole djiboutien. Une amélioration de nos connaissances sur la biologie de cette espèce, de ses caractéristiques botaniques et de son cycle phénologique s'avère indispensable. Cependant, l'un des freins à la mise en place

de programmes de sélection de palmiers dattiers résistants aux stress biotiques et abiotiques est la durée du cycle de reproduction de la plante. En effet, le palmier dattier est une espèce dioïque et les inflorescences mâles et femelles sont portées par des individus distincts. Une période de 5 à 8 ans est nécessaire pour obtenir la première floraison et connaître le sexe des plants. Etant donné qu'une descendance est composée autant d'individus mâles que femelles, et que seuls les pieds femelles produisent des fruits, une identification précoce du sexe chez le palmier dattier s'avère indispensable pour éliminer les plants mâles excédentaires et ouvrir ainsi de nouvelles perspectives pour les programmes d'amélioration génétique de cette espèce.

INDEX DES SIGLES ET ABREVIATIONS

2,4-D	Acide 2,4-Dichlorophénoxyacétique
ABA	Acide abscissique
ADN	Acide désoxyribonucléique
ANA	Acide Naphtalène-1-acétique
BAP	6-Benzyl amino-purine
ARN	Acide ribonucléique
CERD	Centre d'étude et de recherche de Djibouti
CIRAD	Centre de Coopération Internationale en Recherche Agronomique
DSF	Département Soutien et Formation à la Communauté Scientifique du Sud
PAS	Acide périodique Schiff
MEB	Microscopie électronique à balayage
MET	Microscopie électronique à transmission
NBB	Naphthol Blue Black
UCAD	Université Cheikh Anta DIOP de Dakar
UM2	Université de Montpellier 2
UMR	Unité Mixte de Recherche

Liste des figures

- Figure 1** : Un palmier dattier en fructification
- Figure 2** : Représentation schématique du palmier dattier (d'après Munier, 1973)
- Figure 3**: Modèle architectural de TOMLINSON
- Figure 4** : Différents types de feuilles produites par le palmier dattier au cours de son cycle de développement.
- Figure 5**: Détail de la base d'une palme détachée du stipe
- Figure 6** : Différents types de racines rencontrées chez le palmier dattier (d'après Peyron, 2000)
- Figure 7**: Schéma illustrant les différentes phases du cycle de développement du palmier dattier (d'après Bouguedoura, 1991).
- Figure 8**: bourgeons axillaires d'une palme adulte
- Figure 9** : Inflorescences femelle (A) et mâle (B) du palmier dattier
- Figure 10** : Diagramme florale des fleurs du palmier dattier.
- Figure 11** : Pollinisation des fleurs femelles dans une palmeraie de Djibouti
- Figure 12**: Stade de développement de la datte
- Figure 13**: Structure de la datte.
- Figure 14** : Classification des dattes selon leur teneur en eau et en sucres (d'après Estanove, 1990).
- Figure 14** : Répartition géographique du palmier dattier
- Figure 15** : Principaux pays producteurs de dattes
- Figure 16** : Voies majeures de l'induction florale chez *Arabidopsis thaliana*
- Figure 17** : Modèle de développement floral ABCDE d'*Arabidopsis thaliana*
- Figure 18** : Systèmes de reproduction chez les palmiers
- Figure 19** : La localisation des principales palmeraies de Djibouti
- Figure 20** : Palmier dattier en cours de floraison.
- Figure 21** : Evolution de la température pendant l'année et de l'émergence des inflorescences de palmier dattier à Djibouti.
- Figure 22** : Période de floraison des palmiers dattier à Djibouti
- Figure 23** : Palmier dattier à double émission florale
- Figure 24** : Schéma de dissection d'un palmier.
- Figure 25** : La production d'inflorescences des palmiers dattiers adultes pendant l'année 2008 /2009.
- Figure 26**: Cinétique de production inflorescentielle
- Figure 27** : Schéma de production axillaire d'un palmier adulte mature.
- Figure 28** : L'appareil reproducteur du palmier dattier
- Figure 29**: Initiation et développement des inflorescences.
- Figure 30** : Jeune inflorescence.
- Figure 31** : Jeune inflorescence au stade d'initiation des méristèmes floraux et d'environ 10 mm de longueur
- Figure 32** : Cinétique de développement inflorescentiel femelle (A) et mâle (B)
- Figure 33**: Stades de développement floral chez le palmier dattier.
- Figure 34** : Analyse biométrique des boutons floraux après l'initiation de tous les primordiums des organes floraux
- Figure 35** : Analyse biométrique des boutons floraux après l'initiation de tous les primordia des organes floraux au stade V (bisexuel).
- Figure 36**: histogramme d'aire moyenne des cellules des primordiums du gynécée des fleurs femelle et mâle (a) ainsi que leur nombre moyen de cellules (b) au stade V
- Figure 37**: Développement de l'androcée chez les fleurs mâle et femelle
- Figure 38**: Développement du gynécée chez les fleurs femelle et mâle.
- Figure 39** : La répartition des espèces selon le moment de l'arrêt des organes sexuels stériles constitue un continuum (modifié d'après Dellaporta et Calderon-Urrea, 1993).
- Figure 40** : Arbre mâle produisant des inflorescences à fleurs unisexuées et des inflorescences à fleurs « bisexuelles ».
- Figure 41** : Inflorescences mâles « bisexuelles».
- Figure 42**: Cinétique de développement des fleurs mâles « bisexuelles».

- Figure 43** : Changement d'ordre de symétrie dans une fleur mâle « bisexuelle »
- Figure 44** : Caractéristiques morphologiques et histologiques des fleurs mâles « hermaphrodites »
- Figure 45** : Coupes histologiques des organes mâles des fleurs bisexuelles prélevées *in vitro* et *in planta*
- Figure 45** : Coupes histologiques des fleurs mâles *in vitro*
- Figure 46**: Fruits anormales produites par des individus femelles régénérés *in vitro*. On observe la transformation des staminodes en pseudocarpelles comparables carpelles ou des pseudocarpelles en forme de languettes et la perte de symétrie 3 par le verticille 4.
- Figure 47** : Culture *in vitro* des fleurs mâle et femelle.
- Figure 48** : Effet de la composition hormonale des milieux de culture sur l'évolution des fleurs mâles et femelles en fleurs hermaphrodites en fonction de la taille des épillets. Composition des milieux de culture.
- Figure 49**: Fleurs mâles cultivées en présence de 2,4-D (a), d'ANA (b) et de 5-azaC (c) et présentant un développement carpellaire.
- Figure 50** : histologies des fleurs mâles *in vitro*
- Figure 51**: Diverses perturbations du développement floral obtenu en condition *in vitro*.
- Figure 52** : Coloration de l'ADN au DAPI sur des coupes longitudinales des fleurs de palmier dattier à trois stades de développement.
- Figure 53** : Observation des noyaux au DAPI sur des coupes longitudinales des organes floraux du palmier dattier au stade VII.
- Figure 54**: Ultrastructure des cellules de la fleur femelle au stade VI (F1, a, c) et au stade VII (F2,b,d).
- Figure 55**: Ultrastructure des cellules de la fleur mâle au stade VI (M1, e,g) et au stade VII (M2,f,h).
- Figure 56** : Organites intracellulaires des cellules des organes sexuels stériles.
- Figure 57** : analyse de l'hybridation *in situ* de l'expression du gène *H4* dans des coupes longitudinales des fleurs de palmier dattier à trois stades de développement (V, VI et VII).
- Figure 58**: Pattern de méthylation d'ADN des méristèmes floraux du palmier dattier à différents stades de développement
- Figure 59**: Quantification du marquage de méthylation des résidus de cytosine de l'ADN génomique au niveau des primordia des organes sexuels fertiles (carpelles et étamines) et stériles (staminodes et pistillodes) des fleurs femelles (A-B) et mâles (C-D) à deux stades de développement IV (A-C) et V (B-D).
- Figure 60** : Schéma de synthèse sur l'unisexualité des fleurs du palmier dattier

Liste des tableaux et des annexes

- Tableau 1**: Liste de 19 espèces du genre *Phoenix* regroupées par continent
- Tableau 2** : Caractéristiques de chaque stade de développement de la datte
- Tableau 3** : Différentes utilisations des fruits et sous-produits du palmier dattier
- Tableau 4** : Différents systèmes de reproductions chez les plantes à fleurs
- Tableau 5**: Types de floraison des individus de palmier dattier à Djibouti
- Tableau 6** : Accumulation d'amidon dans les organes reproducteurs du palmier dattier.
- Tableau 7** : Principaux événements morphologiques observées au cours de la formation des fleurs unisexuées chez le palmier dattier.

ANNEXE 1 : Différentes conditions hormonales pour les essais de culture *in vitro* des fleurs mâles de palmier dattier.

ANNEXE 2 : Article Daher et al., 2010

SOMMAIRE

Introduction bibliographique	1
MATERIELS ET METHODES	42
CHAPITRE 1 : LE DEVELOPPEMENT REPRODUCTEUR DU PALMIER DATTIER	48
I. FLORAISON DU PALMIER DATTIER	49
A. L'INDUCTION DE LA FLORAISON	49
B. CINETIQUE DE DEVELOPPEMENT DES INFLORESCENCES	55
II. DISCUSSION	61
CHAPITRE 2 : ETUDE DU DEVELOPPEMENT FLORAL	64
I. LA MORPHOGENESE DE L'INFLORESCENCE	65
A. L'ORGANISATION DE LA STRUCTURE DE L'APPAREIL REPRODUCTEUR	65
B. LA STRUCTURE D'UN BOURGEON INFLORESCENTIEL	65
C. LA STRUCTURE DE LA JEUNE INFLORESCENCE APRES LA MISE EN PLACE DES AXES DE CROISSANCE SECONDAIRES	68
D. LE DIMORPHISME INFLORESCENTIEL	68
II. LA MORPHOGENESE FLORALE	69
A. STADES DE DEVELOPPEMENT DE LA FLEUR	69
B. LA MISE EN PLACE DU DIMORPHISME SEXUEL DES FLEURS	76
C. LA DIFFERENCIATION DES ORGANES REPRODUCTEURS MALE ET FEMELLE	80
1. Le développement de l'androcée des fleurs mâle et femelle	80
2. Développement du gynécée des fleurs femelle et mâle	83
III. DISCUSSION	86
CHAPITRE 3 : LES VARIATIONS DE LA MORPHOGENESE FLORALE	90
I. VARIATION FLORALE <i>IN PLANTA</i>	91
A. FLEURS MALES « BISEXUELLES » IN PLANTA	91
B. FLEURS FEMELLES PRESENTANT DES CARPELLES SURNUMERAIRES IN PLANTA	96
II. VARIATION FLORALE <i>IN VITRO</i>	99
A. CULTURE IN VITRO DES FLEURS MALES	99
B. CULTURE IN VITRO DES FLEURS FEMELLES	106
III. DISCUSSION	107

CHAPITRE 4 : CARACTERISATION DES PROCESSUS CELLULAIRES ASSOCIES A	
L'UNISEXUALITE.....	110
I. ABSENCE DE DEGENERESCENCE CELLULAIRE DANS LES ORGANES SEXUELS	
STERILES	112
A. ETAT DES NOYAUX DES CELLULES DES ORGANES FERTILES ET STERILES	112
B. INTEGRITE DES ORGANITES INTRACELLULAIRES DES CELLULES DES ORGANES FERTILES ET STERILES	114
II. L'ARRET DES DIVISIONS CELLULAIRES DANS LES ORGANES SEXUELS STERILES	119
A. ARRET DES DIVISIONS DANS LES PRIMORDIA DES STAMINODES DE LA FLEUR FEMELLE	119
B. ARRET DES DIVISIONS DANS LES PRIMORDIA DES PISTILLODES DE LA FLEUR MALE	120
III. ROLE DE LA METHYLATION DANS L'UNISEXUALITE FLORALE.....	122
IV. SYNTHESE	126
V. DISCUSSION	128
CONCLUSIONS GENERALES ET PERSPECTIVES	137
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	139
ANNEXE	141

Introduction bibliographique

I. Le palmier dattier

A. La présentation de la plante

Le palmier dattier (*Phoenix dactylifera* L.) est une plante pérenne de la famille des Arecaceae (figure 1). Cultivé depuis plus de 4000 ans, le palmier demeure une ressource vitale dans les zones arides et semi-arides du globe. Il fut propagé en dehors de son aire de culture non seulement pour ses fruits mais aussi pour ses intérêts culturels et ornementaux.

La première description du palmier dattier est le fruit du travail du botaniste suédois Linné qui, en 1753, attribue le nom botanique de *Phoenix dactylifera* (Munier, 1973). Son nom de genre *Phoenix* dérive de phoinix, nom donné à cette plante par les grecs de l'antiquité qui le considéraient comme l'arbre des phéniciens (un peuple à la peau de couleur rouge foncé, de tradition phoenicicole et originaire du pays de Pount ou corne de l'Afrique). Une autre origine du nom de Phoenix fait allusion à un oiseau mythique égyptien, le phénix, qui renaît de ses cendres après l'incendie, comme se régénère le palmier après le passage d'un feu (Ouennoughi et al., 2005). Son nom d'espèce *dactylifera* comprend les mots latins *dactylus* signifiant doigt par référence à la forme des fruits semblables à des doigts et *fera* signifiant « je porte ». Cette appellation fait référence aux phéniciens, porteurs de dattes, qui auraient participé à la diffusion de la culture du palmier dattier au sein de la Mésopotamie.

Le palmier dattier est le nom commun en français de cette plante. Il est aussi appelé *nakhil* en arabe, *timir* en afar et en somali (en référence au nom du fruit).

B. L'origine

L'origine géographique précise du palmier dattier paraît très controversée. Elle fait l'objet de plusieurs hypothèses. Selon Munier (1973), le palmier dattier résulterait de l'hybridation de plusieurs types de Phoenix et sa domestication aurait eu lieu dans la région orientale du Sahara. Cependant, des travaux de Zohary et Hopf (1988) ont rapporté l'existence d'un ancêtre sauvage du palmier dattier, qui serait localisé dans la région méridionale chaude et sèche du Proche Orient, au Nord Est du Sahara et au Nord du désert d'Arabie. Des travaux plus récents ont montré que le palmier dattier proviendrait de la domestication d'une population sauvage de la même espèce (Pintaud et al., 2010). Sur la base d'études

archéobotaniques, la domestication du palmier dattier remonterait vers 6000 ans avant J.C. dans la région du Golf Persique comme témoignent des fossiles de graines trouvées dans la région de Dalma aux Emirats (Newton et al, 2008). Cette domestication serait associée à la naissance des premières civilisations agricoles du croissant fertile, entre la Mésopotamie et l’Egypte, vers 4000 ans avant JC. Depuis ce lieu d’origine, la culture du palmier dattier s’est étendue vers l’Est et vers l’Afrique orientale (XV^e siècle) et du nord (XI^e siècle). Dès le XX^e siècle, le palmier dattier est introduit en Amérique et en Australie. Sa propagation s’est effectuée en suivant plusieurs voies : par les navigateurs arabes, par la colonisation et par les anciennes transactions commerciales où les dattes étaient utilisés comme monnaie d’échange (Ouennoughi et al., 2005).



Figure 1 : Un palmier dattier en fructification

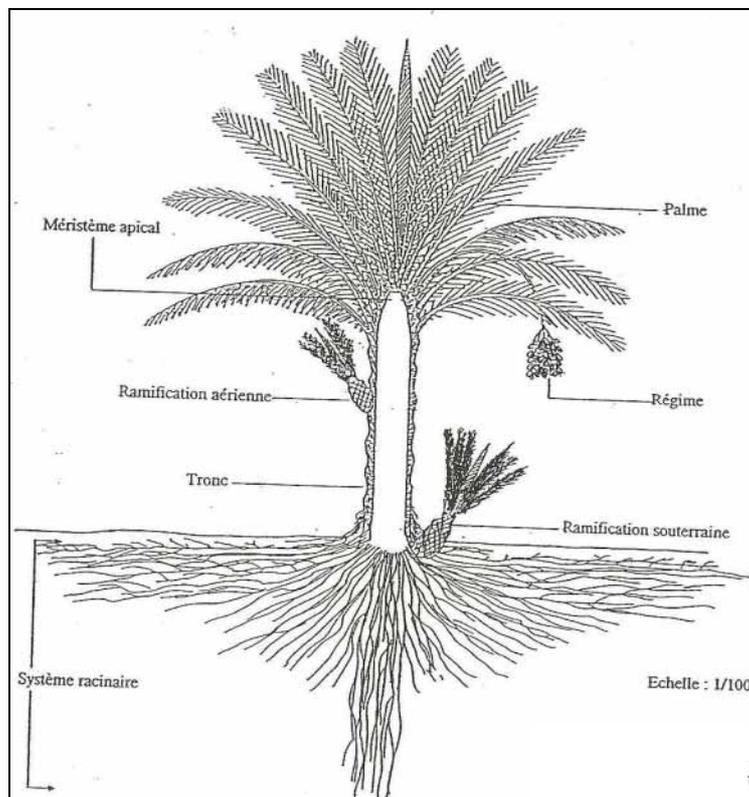


Figure 2 : Représentation schématique du palmier dattier (d'après Munier, 1973)

C. Systématique

1. Le genre *Phoenix*

Le genre *Phoenix* appartient à la famille des Arecaceae (anciennement *Palmaceae*), de l'ordre des Arecales. La famille des palmiers est l'une des plus importantes des monocotylédones et une des plus anciennes des angiospermes (Dransfield et al., 2008). Elle a aussi la particularité de détenir de nombreux records d'ordre morphologiques. Les palmiers possèdent les feuilles les plus grandes du règne végétale (jusqu'à 15 m), les inflorescences les plus longues (environ 5 m), parmi les fruits les plus gros (environ 18 kg) et les graines les plus grosses (*Lodoica Maldivica*) (Dransfield et al., 2008).

La famille des Arecaceae comprend environ 2500 espèces présentant des morphologies diverses (Dransfield et al., 2008). Moore (1973) subdivise les palmiers en 15 groupes taxonomiques distincts sur la base des caractères morphologiques des feuilles, des fleurs et de leur répartition géographique. Le genre *Phoenix* est inclus dans le groupe des palmiers Phoenicoïdés. Pour Moore et Uhl (1973), les Phoenicoïdés partagent, entre autres, certains caractères reproducteurs, comme des inflorescences interfoliaires, fleurs sessiles et trimères, et gynécée apocarpique, avec le groupe des Coryphoïdés, ce qui explique leur étroite proximité phylogénétique.

Dans une nouvelle classification basée à la fois sur l'analyse de données morphologiques et de séquences de l'ADN nucléaire, Asmussen et al. (2006) ont proposé une subdivision de la famille des Arecaceae en cinq sous-familles au lieu des six présentés dans les travaux antérieurs de Dransfield et Uhl (1998) : *Coryphoideae*, *Calamoideae*, *Nypoideae*, *Ceroxyloideae* et *Arecoideae*. Le genre *Phoenix* est ainsi classé actuellement dans la sous famille des Coryphoideae Griffith. Les espèces de *Phoenix* sont caractérisées par des longues feuilles pennées dont les folioles de la base sont modifiées en épines.

2. Les espèces de Phœnix

Le genre *Phoenix* comprend 12 espèces botaniques réparties depuis l'Asie du Sud (Indonésie, Philippines) jusqu'aux îles Canaries en passant par la Chine, l'Inde, le Moyen-Orient et l'Afrique (Dransfield et al., 2008 ; Moore 1973). Kaci-Aissa Benchaba (1988) a proposé de ramener le nombre d'espèce à 12 compte tenu des fortes similitudes constatées entre plusieurs espèces d'appellations différentes, comme *P. canariensis* et *P. atlantica*. La confusion sur le nombre exact d'espèces réside non seulement dans la difficulté de distinguer les espèces entre elles, mais également dans le fait que tous les Phœnix possédant 36 chromosomes peuvent s'hybrider très facilement entre eux (Kaci-Aissa Benchaba, 1988 ; Munier, 1973). Ainsi, il a été rapporté l'existence de nombreux hybrides naturels ou effectués intentionnellement : c'est le cas de *Phoenix dactylifera* L. x *Phoenix reclinata* Jacq. (Sénégal) ; *Phoenix dactylifera* L. x *Phoenix canariensis* B. Chab. (Algérie, Maroc).

Tableau 1: Liste de 19 espèces du genre *Phoenix* regroupées par continent

<i>Phoenix</i> africains	<i>Phoenix</i> asiatiques	<i>Phoenix</i> européens
<i>atlantica</i> , A. Chev.	<i>acaulis</i> , Bush.	<i>theophrasti</i> , Greuter
<i>dactylifera</i> L.	<i>dactylifera</i> L.	<i>dactylifera</i> L.
<i>baoulensis</i> , A. Chev.	<i>arabica</i> , M. Burret	
<i>caespitosa</i> , Chiov	<i>farinifera</i> , W. Roxb.	
<i>canariensis</i> , B. Chab.	<i>humilis</i> , Royle	
<i>comorensis</i> , O. Becc.	<i>paludosa</i> , W. Roxb.	
<i>djalonensis</i> , A. Chev.	<i>reobelinii</i> , O'Brien	
<i>dibowskii</i> , A. Chev.	<i>rupicola</i> , T. Anderson	
<i>reclinata</i> , Jacq.	<i>sylvestris</i> , W. Roxb.	
<i>spinosa</i> , Thonn.	<i>zeylanica</i> , H. Trimen	

La majorité des espèces de ce genre (Tableau 1) présente de multiples intérêts d'ordre économique et ornemental. Elles sont utilisées comme source de fibres textiles, d'amidon, de sucres ainsi que d'huile et de chaume. Six espèces (*P. dactylifera*, *P. canariensis*, *P. reclinata*, *P. farinifera*, *P. humilis* et *P. acaulis*) sont cultivées pour leurs fruits comestibles. Les deux espèces les plus connues sont le *Phoenix dactylifera*, le vrai dattier, et le *Phoenix canariensis*, le " faux " dattier des Canaries, utilisé pour son intérêt ornemental dans de nombreux pays du monde.

D. Botanique

Le palmier dattier est une monocotylédone arborescente considérée comme une herbe géante pour ses caractéristiques morphologiques. On distingue quatre parties : le stipe, les racines, les feuilles et l'appareil reproducteur (figure 2).

1. Le stipe

Le stipe du palmier dattier est un axe orthotrope monopodial et cylindrique issu du méristème apical de l'embryon zygotique, dont l'activité végétative est indéfinie durant toute la vie de la plante (figure 2). Ce seul bourgeon terminal (apex ou phyllophore) assure la croissance de la plante. La hauteur du stipe augmente avec l'âge et peut atteindre plus de 30 m. Le stipe est constitué d'un parenchyme amylofère dans lequel les faisceaux vasculaires sont distribués de façon dense dans la région corticale lignifiée et plus lâche dans la région centrale (Bouguédoura, 1991). Ces faisceaux sont entourés d'un tissu fibreux assurant souplesse et résistance au tronc. Le diamètre du tronc est établi grâce à la présence dans la zone apicale d'un méristème épaisseur primaire qui est responsable non seulement de son élargissement mais aussi de l'épaississement des feuilles et de l'allongement des entrenœuds (Bouguédoura, 1991). Le méristème épaisseur fonctionne durant les premières années de la vie du jeune arbre puis cesse de proliférer. Le stipe a atteint alors son diamètre définitif tout en s'allongeant vers le haut. Du fait de cette absence d'épaississement en largeur avec le temps, les palmiers ne forment pas de véritables troncs contenant du bois mais des tiges géantes. Le diamètre moyen du stipe adulte est d'environ 60 cm, mais il peut présenter des zones de rétrécissements, conséquences d'une perturbation de la croissance suite à une période de sécheresse ou de froid (Munier, 1973).

Le stipe du palmier dattier demeure droit et élancé, avec une couronne de feuilles à son sommet. Il présente également des ramifications axillaires d'ordre I situées principalement à sa base et très rarement en hauteur. Les ramifications de base sont appelés rejets et celles en hauteur gourmands. Les gourmands ont un développement limité et une floraison très difficile, alors que les rejets présentent une croissance indéfinie et peuvent fleurir et produire à leur tour de nouvelles ramifications basales. Ainsi, la morphologie du palmier dattier peut être représentée par le modèle architectural de TOMLINSON (figure 3).

2. Les feuilles

Les feuilles, longues de plus de 6 m, forment la couronne du palmier dattier au sommet du stipe. Leur nombre varie de 100 à 200 pour un palmier adulte en bonne végétation (Munier, 1973 ; Peyron, 2000). Le palmier dattier produit trois sortes de feuilles au cours de sa vie : juvéniles, semi-juvéniles et adultes (figure 4; Bouguedourra, 1991).

- Les feuilles juvéniles s’observent chez les jeunes plants âgés de moins de 2 ans. Au nombre de 10 à 12, elles sont constituées d’un rachis engainant et d’un limbe entier, lancéolé et plissé (chaque pli correspondant à une nervure médiane).
- Dès la troisième année du développement de la plante se produit une segmentation partielle du limbe en folioles. Les folioles de la base de la feuille ont déjà l’aspect d’épines. Ces feuilles sont considérées comme des feuilles semi-juveniles.
- Les feuilles adultes, appelées palmes, sont formées d’un limbe complètement segmenté en folioles disposées en paripennés le long du rachis. Chaque foliole est pliée longitudinalement en gouttière (folioles indupliquées). Les folioles inférieures sont transformées en épines plus ou moins dures et longues. La base du rachis ou pétiole est large et engainante (figure 5). La gaine, constituée d’un tissu fibreux, le fibrillum (tissage végétal), recouvre le tronc du palmier.

Les palmes adultes demeurent actives durant trois à sept ans selon la variété et le mode cultural (Peyron, 2000). Puis, elles se dessèchent et tombent en laissant sur le tronc une cicatrice correspondant aux bases pétiolaires, lesquelles servent de protection et d’escalier pour grimper sur le palmier lors de la pollinisation ou de la récolte.

La longueur et le nombre de feuilles varient en fonction des cultivars et des conditions agroclimatiques. Elles constituent des descripteurs morphologiques variétaux.

3. Les racines

Le système racinaire du palmier dattier est de type fasciculé - disposé en faisceaux de racines très peu ou pas ramifiées – (figure 6). On distingue trois types de racines selon leur profondeur et leur fonction :

- Les racines respiratoires: localisées au pied de l’arbre, elles comprennent les racines aériennes adventives (0 à 150 cm au dessus du sol) et les racines de la couche superficielle du sol (0 à -20cm). Munies de nombreuses structures aérifères, ces racines jouent un rôle

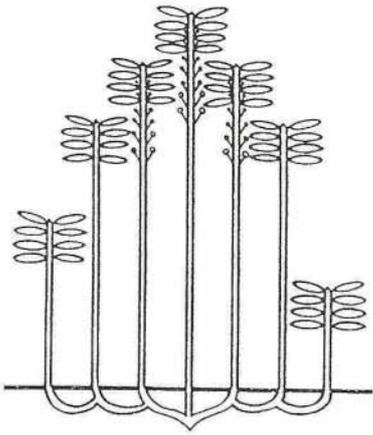


Figure 3: Modèle architectural de TOMLINSON

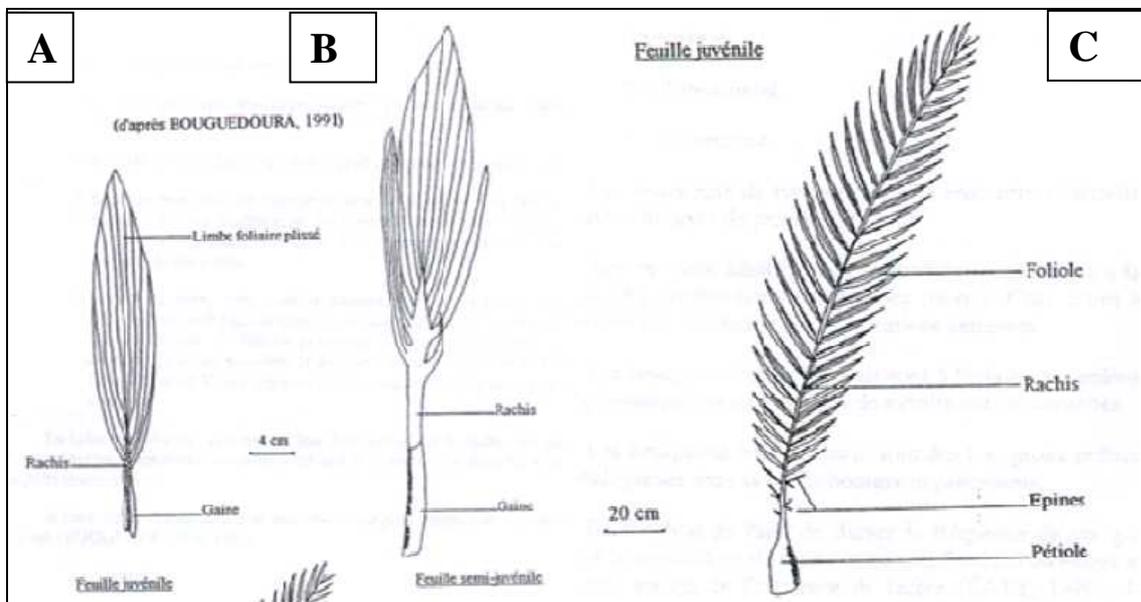


Figure 4 : Différents types de feuilles produites par le palmier dattier au cours de son cycle de développement. a : feuille juvénile, b : feuille semi-juvénile, c : feuille adulte ou palme (d'après Bouguedoura, 1991)

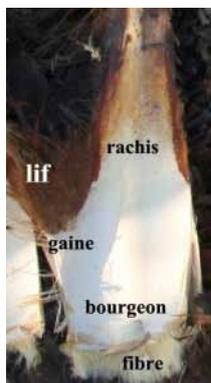


Figure 5: Détail de la base d'une palme détachée du stipe

important dans les échanges gazeux avec le sol (Bougedoura, 1991). Leur développement est affecté par les sols asphyxiants, comme les sols limoneux ou argileux.

- Les racines nutritives : elles se développent de façon plus profonde et plus étendue horizontalement, entre 20 cm à 1 m. Elles sont pourvues de nombreuses radicules et constituent la plus forte proportion du système racinaire.

- Les racines d'absorption : ce sont les racines de profondeur (de 1 m à 17 m) ayant pour fonction de chercher l'eau. Leur taille est fonction de la nature du sol et de la profondeur de la nappe phréatique, le palmier dattier étant une plante phréatophile. Le pivot des racines d'absorption peut atteindre 17 mètres de profondeur (Peyron, 2000).

Le développement et l'importance du système racinaire dépendent du mode de culture, des caractéristiques physico-chimiques du sol, de la profondeur de la nappe phréatique mais aussi du cultivar. Toutes les racines sont liées au système vasculaire au niveau de la base du stipe.

E. Le cycle de développement

Le développement du palmier dattier se caractérise par trois phases distinctes (figure 7):

- une **phase juvénile** : durant ses 2 premières années, la plante porte des feuilles juvéniles sans produire des bourgeons axillaires
- une **phase végétative** : de la 3^{ème} année jusqu' à l'apparition de la première floraison. Chez un plant issu de semis, la première floraison peut survenir entre la 5^{ème} et la 8^{ème} année de plantation alors que, chez un vitroplant, elle est beaucoup précoce et se produit dès la 4^{ème} année, après émission d'une dizaine de palmes actives. Les palmiers portent des feuilles adultes à l'extérieur et des feuilles juvéniles au niveau de l'apex. Les feuilles adultes portent à leur aisselle une production très hétérogène de bourgeons axillaires de type stérile (figure 8a) et de type végétatif (figure 8b) à l'origine des rejets et des gourmands.
- une **phase reproductive** qui s'étend de la première floraison jusqu'à la fin de la vie de la plante. La majorité des palmes photosynthétiques portent des bourgeons axillaires inflorescentiels. Quelques rares bourgeons végétatifs fonctionnels (rejets ou gourmands) peuvent être produits.

L'ensemble des bourgeons axillaires dérivent d'un bourgeon indéterminé, structure originelle. Ce bourgeon indéterminé issu d'un méristème d'ordre II présente un haut potentiel morphogénétique. La présence de ces différents types de bourgeons dépend de l'âge la plante

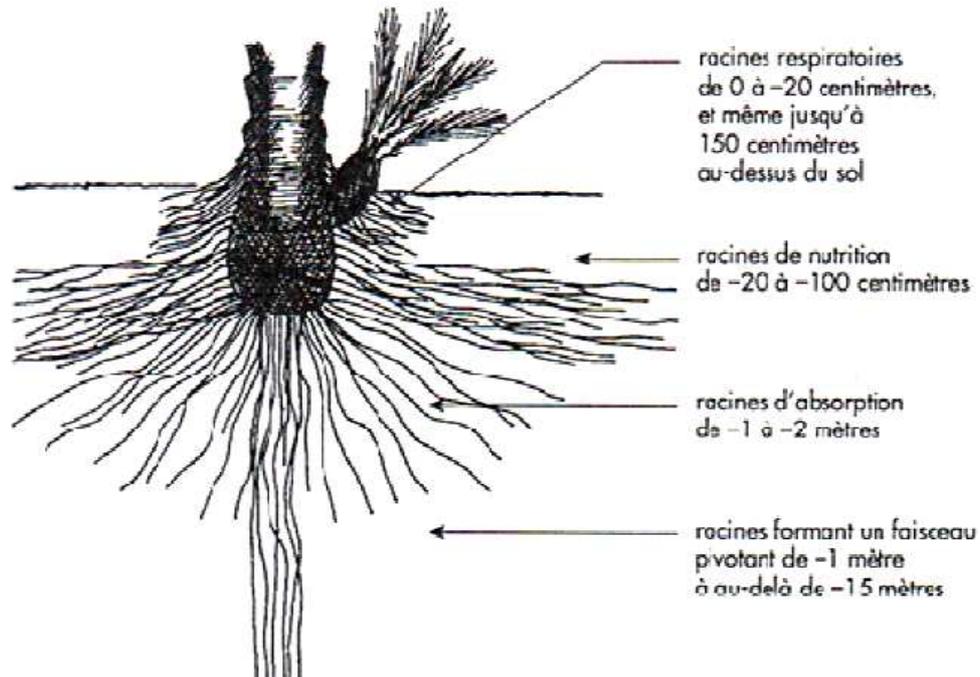


Figure 6 : Différents types de racines rencontrées chez le palmier dattier (d'après Peyron, 2000)

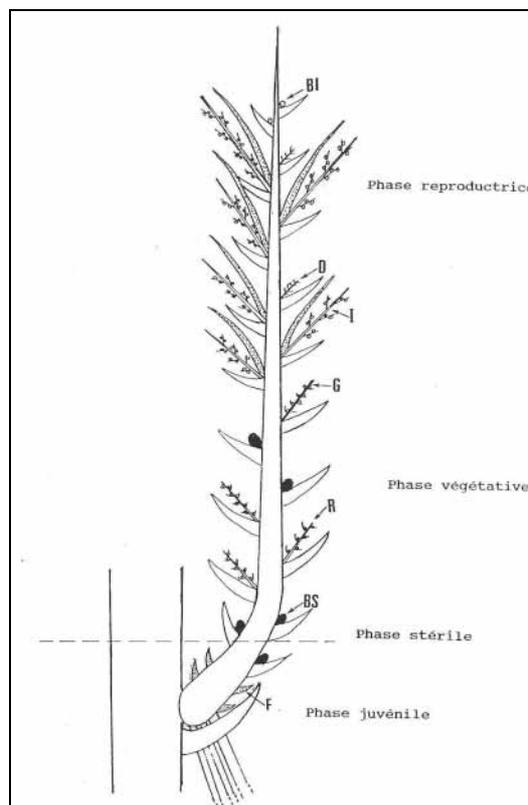


Figure 7: Schéma illustrant les différentes phases du cycle développement du palmier dattier (d'après Bouguedoura, 1991). R : réjet ; G : gourmand ; I : inflorescence ; BI : bourgeon inflorescentiel ;

et des conditions d'environnement. Le ratio bourgeons végétatifs / bourgeons inflorescentiels décroît avec le vieillissement du palmier (Ferry, 2003; Jahiel, 1996.).

F. L'appareil reproducteur

Le palmier dattier commence à fleurir après une longue phase juvénile, entre 5 et 8 ans après la germination des graines dans des conditions de culture favorables. La floraison est généralement annuelle et dure durant toute la vie de la plante. Les organes reproducteurs ou inflorescences naissent du développement des bourgeons axillaires situés à l'aisselle des palmes adultes. Les inflorescences mâle et femelle de palmier dattier (figure 9), dont la longueur peut atteindre plus de 1m, sont composées d'un axe, la hampe ou (d'un point de vue botanique) le rachis, sur lequel sont insérés de nombreux épillets (rachillae) portant des fleurs sessiles (sans pédoncules). L'ensemble est enveloppé dans une grande bractée ligneuse ou spathe qui s'ouvre à maturité, permettant l'épanouissement de l'inflorescence.

Le palmier dattier est une espèce dioïque car les inflorescences mâles et femelles sont portées par des individus différents. Avant l'ouverture, la forme des spathes permet de reconnaître le sexe des inflorescences. Les spathes mâles (figure 9b) demeurent plus courtes et plus renflées que les spathes femelles (figure 9a). Les fleurs mesurent environ 50 mm et se distinguent, à maturité, par leur forme et leur couleur. Les fleurs mâles ont une forme légèrement allongées et de couleur blanche ivoire persistante. A maturité, elles attirent de nombreux insectes, particulièrement les abeilles. Les fleurs femelles, inodores, se caractérisent par leur forme globulaire et leur couleur entre l'ivoire et le vert clair, laquelle s'estompe après l'ouverture des spathes.

L'agencement des pièces florales est conforme à l'organisation trimérique des Monocotylédones (figure 10):

- Fleur mâle : trois sépales, trois pétales, 2 verticilles de 3 étamines et 3 pseudo-carpelles ou pistillodes
- Fleur femelle : trois sépales, trois pétales, 2 verticilles de 3 staminodes et 3 trois carpelles.

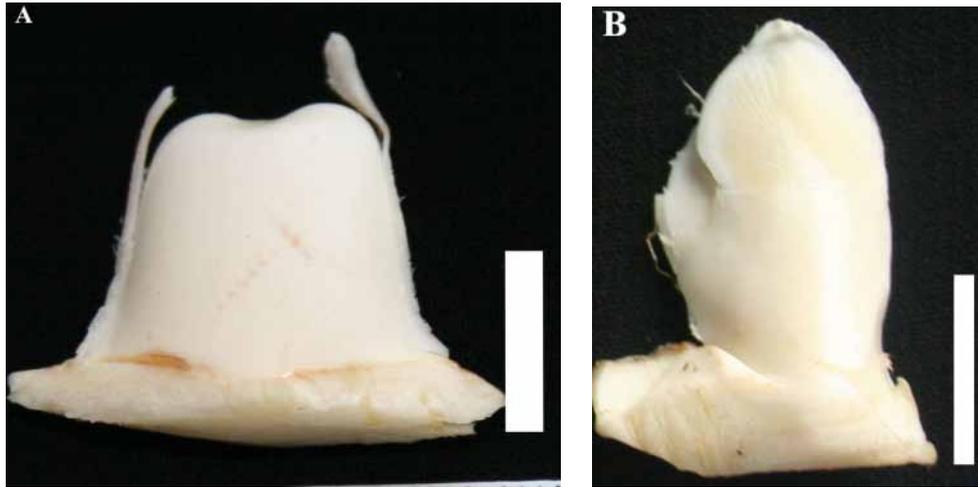


Figure 8: bourgeons axillaires d'une palme adulte. A : bourgeon stérile, B : bourgeon végétatif



Figure 9 : Inflorescences femelle (A) et mâle (B) du palmier dattier

G. La pollinisation

La pollinisation est effectuée soit naturellement par le vent ou les insectes¹ dans les jardins oasiens familiaux et dans les palmeraies spontanées, soit artificiellement par les exploitants qui placent quelques épillets de fleurs mâles (1 à 12) au sein des épillets femelles (figure 11) (Enaimi et Jafer, 1980). Dans les plantations industrielles, la pollinisation est mécanisée (poudre de pollen diluée avec du talc ou de la cendre de bois tamisé afin d'améliorer la nouaison (Monciero, 1954, 1961 ; Ben-Abdalla, 1990).

A l'ouverture des spathes, le pollen des fleurs mâles est mature et peut se conserver pendant plusieurs années, à condition que l'on garde dans un endroit sec, frais et à l'abri de la lumière afin de préserver la qualité de son pouvoir germinatif.

Des études de pollinisation ont montré l'absence d'incompatibilité pollen / carpelle chez le palmier dattier (Ben-Abdalla, 1990 ; Leroy, 1958). Cependant, tous les pollens n'ont pas la même capacité de fécondation. Le pourcentage de nouaison dépend de la qualité du pollen, du cultivar et des conditions de température et d'humidité régnant lors de la pollinisation. La nouaison est maximale (90 à 100%) lorsque la pollinisation est effectuée dès l'ouverture de la spathe femelle. Elle décroît ensuite car la réceptivité des fleurs femelles est limitée à une semaine au maximum (Leroy, 1958).

La fructification

La fleur femelle fécondée évolue en fruit, les dattes (figure 12). Au cours de cette évolution vers la maturité, le jeune fruit passe par des stades distincts dont les caractéristiques sont sommairement résumées dans le tableau 2.

¹ Le palmier dattier a toujours été cité comme plante présentant une pollinisation entièrement anémogame. Cependant, nous avons constaté que de nombreuses abeilles viennent envahir les inflorescences mâles dès l'éclatement jusqu'à l'épuisement du pollen en deux jours. Il n'existe pas de caractère évident d'anatomie florale caractéristique de l'entomogamie, contrairement à beaucoup d'espèces de palmier (Uhl, 1977). L'importance de cette entomogamie putative reste à évaluer chez le dattier.

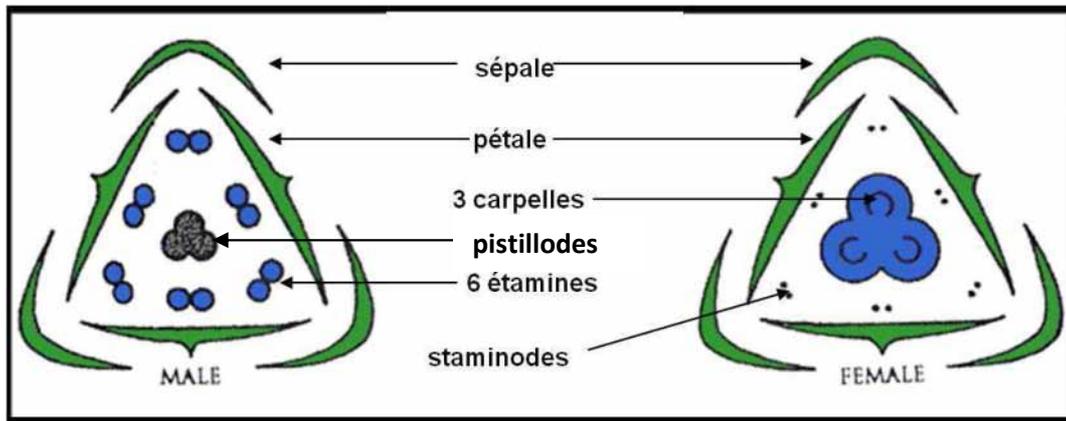


Figure 10 : Diagramme florale des fleurs du palmier dattier.



Figure 11 : Pollinisation des fleurs femelles dans une palmeraie de Djibouti. A : pollinisation manuelle ; B : épis mâles placés au sein de l'inflorescence femelle.

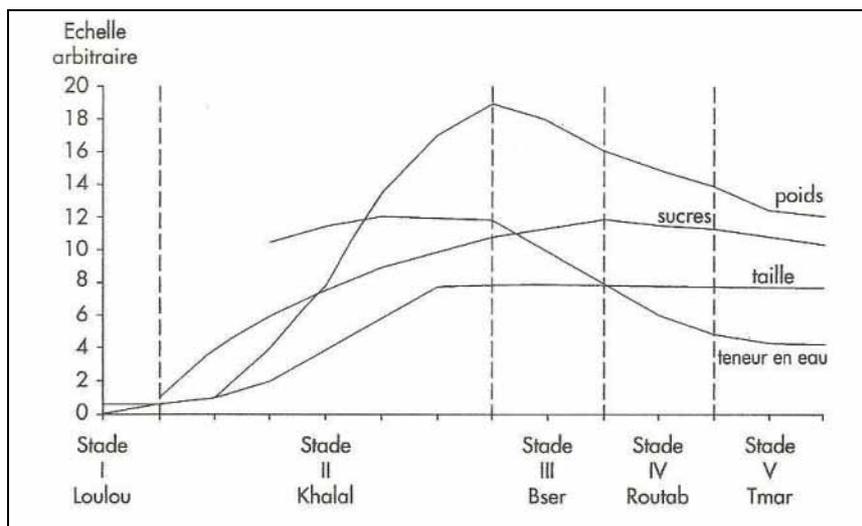


Figure 12: Stade de développement de la datte (d'après Munier, 1973)

Tableau 2 : Caractéristiques de chaque stade de développement de la datte

Stade	Stade I Loulou	Stade II Khalal	Stade III Bser	Stade IV Routab	Stade V Tamar
Durée en semaines	1	5 à 17	17 à 25	25 à 28	29
Couleur	entre verte clair et blanc cassé	vert vif	jaune ou rouge	rouge	rouge foncé ou noir
Forme	sphérique	sphérique	ovoïde ou allongé	allongée	allongée
Taille et poids	léger grossissement des fruits jusqu'atteindre la taille d'un petit pois	grossissement et croissance maximales	diminution de la teneur en eau	diminution de la teneur en eau	teneur résiduelle finale en eau (variable selon les cultivars)
Sucres et autres constituants (minéraux, vitamines, fibres et tanins)	Légère accumulation de sucres	Importante accumulation de sucres	Accumulation maximale des sucres et des autres composés	Concentration des constituants	Datte mature
Consistance		dure	Demi-molle	Molle	Sec, molle, demi-molle
Graine (embryon)		Petit noyau allongé et tendre	Noyau plus allongé et dur	Graine mature et très dur	Graine mature et très dur

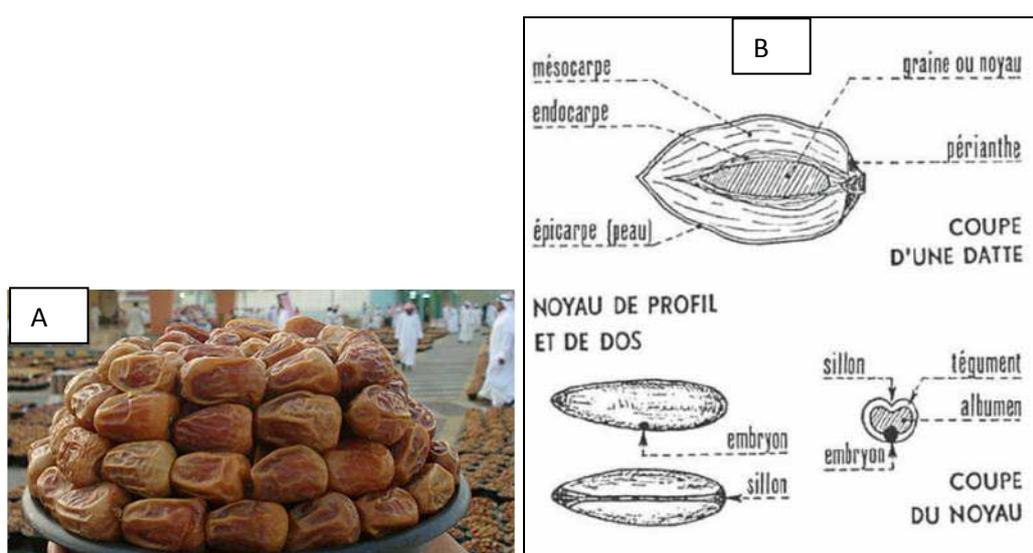


Figure 13: Structure de la datte. A : dattes. B : structure. (d'après Munier, 1973)

Selon les cultivars et les conditions climatiques, la durée de fructification est de 120 à 200 jours (Munier, 1973). Durant cette période, l'obtention des dattes matures exige une quantité importante de chaleur (ou indice thermique²) et une hygrométrie basse.

La datte ou fruit mature est une drupe avec un mésocarpe charnu et fibreux entourant la graine (figure 13). Elle sera d'autant plus appréciée et recherchée que le rapport de la chair sur la graine est élevée et que sa maturation se produit plus tôt : ces critères d'intérêt agronomique sont fortement tributaires de la métaxénie³ ainsi que des conditions climatiques de fructification (Nixon, 1934).

Il est possible de rencontrer des dattes sans graine (dattes parthénocarpiques) qui résultent de la transformation de la fleur non fécondée. Les dattes parthénocarpiques (trois carpelles développées) sont très fragiles et ne présentent aucune valeur commerciale, du fait qu'elles atteignent difficilement le stade Tamar. Les phoeniculteurs ne leur accordent donc que peu d'intérêt.

Des analyses physico-chimiques effectuées sur la datte mature montrent que la pulpe ou chair se compose (Estanove, 1990) :

- d'eau : 5 à 40 %
- de sucres réducteurs (glucose et fructose) ou non réducteurs (saccharose) : 50 à 95%
- et autres constituants (protéines, lipides, vitamines, fibres, et sels minéraux) : 2 à 35 %

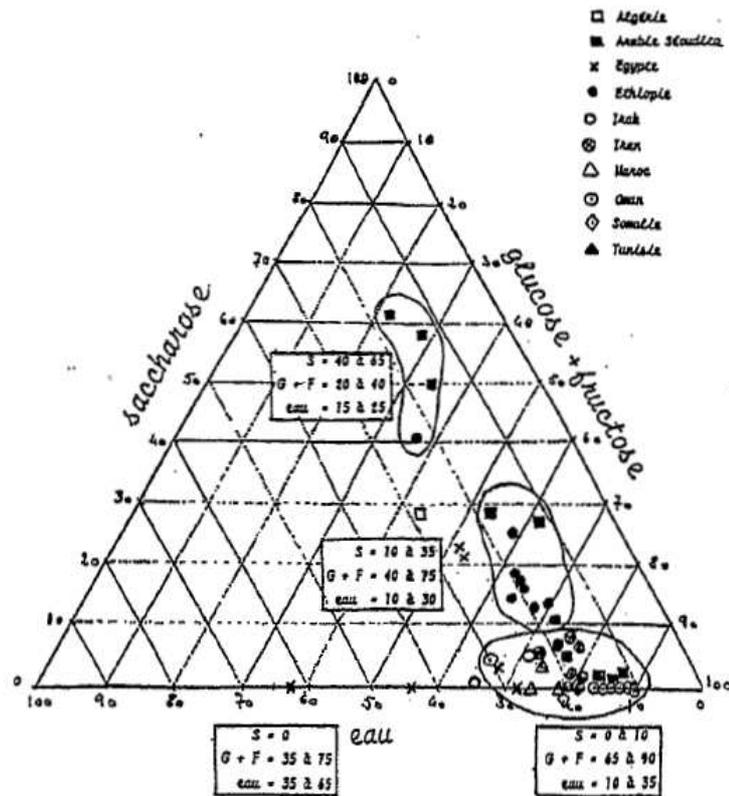
Selon la teneur en eau et les proportions sucres réducteurs/sucres non réducteurs, on distingue quatre classes de dattes de qualité différentes (figure 14). Ces variations de qualité de dattes sont à mettre en relation aux différentes variétés ainsi que leurs provenances ou origines géographiques.

H. Répartition géographique du palmier dattier et production mondiale

Le palmier dattier est cultivé sur une vaste zone s'étendant du 44° parallèle Nord (SanRemo, Italie) jusqu'à 33° Sud (Petra, Australie). L'aire de prédilection du palmier dattier se situe principalement entre le 24° et le 35° Nord. Sur un patrimoine phoenicole couvrant 1 264 611 ha, environ 98 % (soit 1 257 649 ha) correspondent aux zones arides et semi-arides d'Asie (67 %) et d'Afrique (31 %) (figure 15). Ces régions sont composées essentiellement de

²Indice de chaleur correspond à la somme des températures journalières moyennes pendant la période de fructification. Elle est variable selon le cultivar et les régions du monde (Munier, 1973).

³ La métaxénie correspond à l'effet direct du pollen sur le développement de la datte (forme, grosseur (pulpe/noyau), couleur) ainsi que sur la précocité ou le retard de sa maturation.



Classe 1

Saccharose = 40 à 65%
 Glucose + fructose = 20 à 40%
 Eau = 15 à 25 %

Classe 2

Saccharose = 10 à 35%
 Glucose + fructose = 40 à 75%
 Eau = 10 à 30%

Classe 3

Saccharose = 0 à 10 %
 Glucose + fructose = 65 à 90%
 Eau = 10 à 35 %

Classe 4

Saccharose = 0%
 Glucose + fructose = 35 à 75%
 Eau = 35 à 65%

Figure 14 : Classification des dattes selon leur teneur en eau et en sucres (d'après Estanove, 1990). Plus la datte est grosse et plus elle contient de saccharose, meilleure est sa qualité. S : saccharose, G : glucose, F : fructose.

pays arabo-musulmans (Arabie Saoudite, Bahreïn, Emirats, Iran, Iraq, Kuwait, Oman, Pakistan, Yémen, Algérie, Egypte, Libye, Maroc, Tunisie) lesquels se partagent la majeure partie de la production mondiale des dattes (estimé à 7 millions de tonnes en 2008). Les pays du Moyen-Orient et d'Asie mineure totalisent 67 % de la production totale suivi des pays d'Afrique du Nord avec 36 %, c'est une production à caractère traditionnelle et culturelle (Figure 15 ; Faostat, 2008).

Le palmier dattier est cultivé à moindre degré dans d'autres régions désertiques d'Afrique notamment au Sahel, région sub-saharienne allant de Sénégal à Djibouti. La limite méridionale de l'aire de culture en Afrique serait située vers la Namibie et l'Afrique du Sud. Dans toutes ces régions intertropicales, la culture du palmier dattier est présente sous forme de peuplements oasiens caractérisés par une faible productivité.

Le palmier dattier se rencontre :

- En Amérique principalement aux Etats-Unis (Californie, Arizona, Texas) et au Mexique, au Chili et au Pérou
- En Australie (au Queensland, Northern Territory)
Dans ces régions, la création récente de grandes plantations de dattier est exclusivement à vocation commerciale.
- En Europe, particulièrement en Espagne (Elche) et Italie (Bordighera, SanRemo).
Dans ces régions, la culture du palmier dattier est marginale (hormis en Israël où existent des plantations industrielles). Les dattes ne mûrissent pas ou partiellement à cause des conditions climatiques inférieures au seuil de coefficient thermique nécessaire pour la maturation. Ainsi le dattier est plutôt cultivé comme plante ornementale et est associée à des pratiques religieuses ou traditionnelles

I. La consommation

L'essentiel de la production mondiale est consommé par les pays producteurs, qui constituent ainsi le principal marché de la dattier. Les niveaux de consommation varient très largement d'un pays à un autre. Ce sont les pays du Moyen-Orient qui enregistrent la plus forte consommation, suivi par l'Afrique du Nord et quelques pays sahéliens.

Les dattes sont préférentiellement consommées à l'état naturel dans 90% des cas et le reste (10%) est consommé après transformation en sirop, farines, gâteaux, etc.... (Chetto *et al.*, 2005). Le pic de consommation se situe aux moments festifs notamment le Ramadan, les fêtes religieuses, les festivités et lors de la récolte des dattes (Chetto *et al.*, 2005).

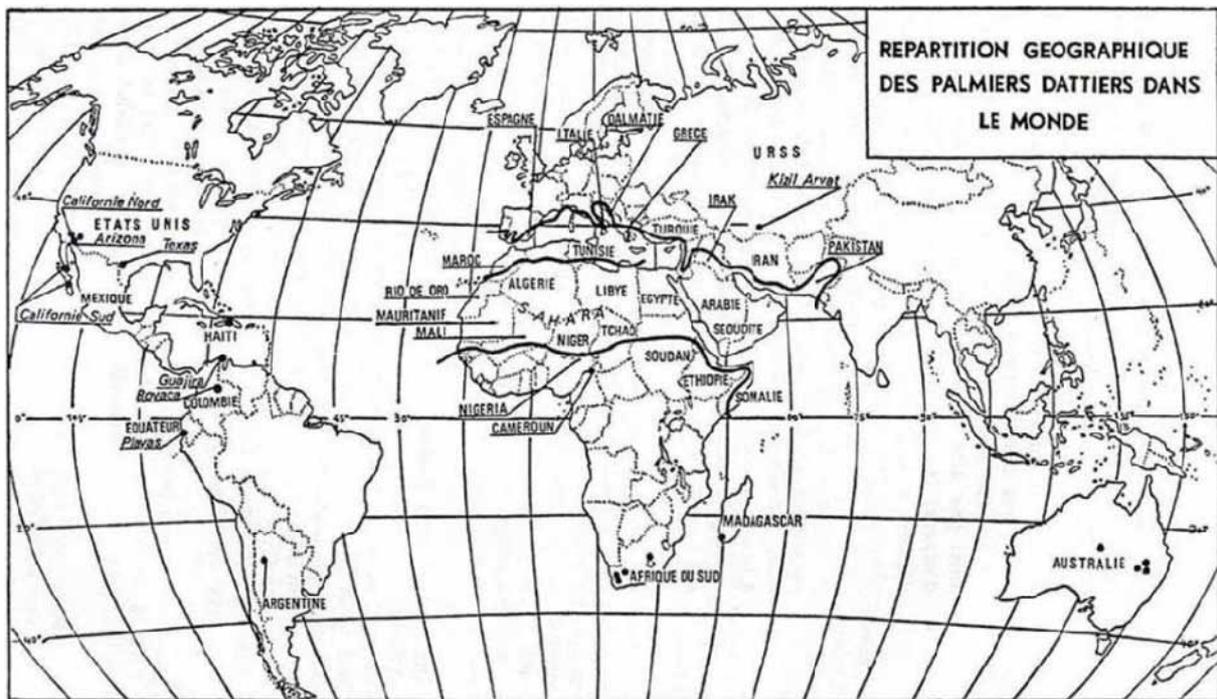


Figure 14 : Répartition géographique du palmier dattier (d'après Branton et Blake, 1989)

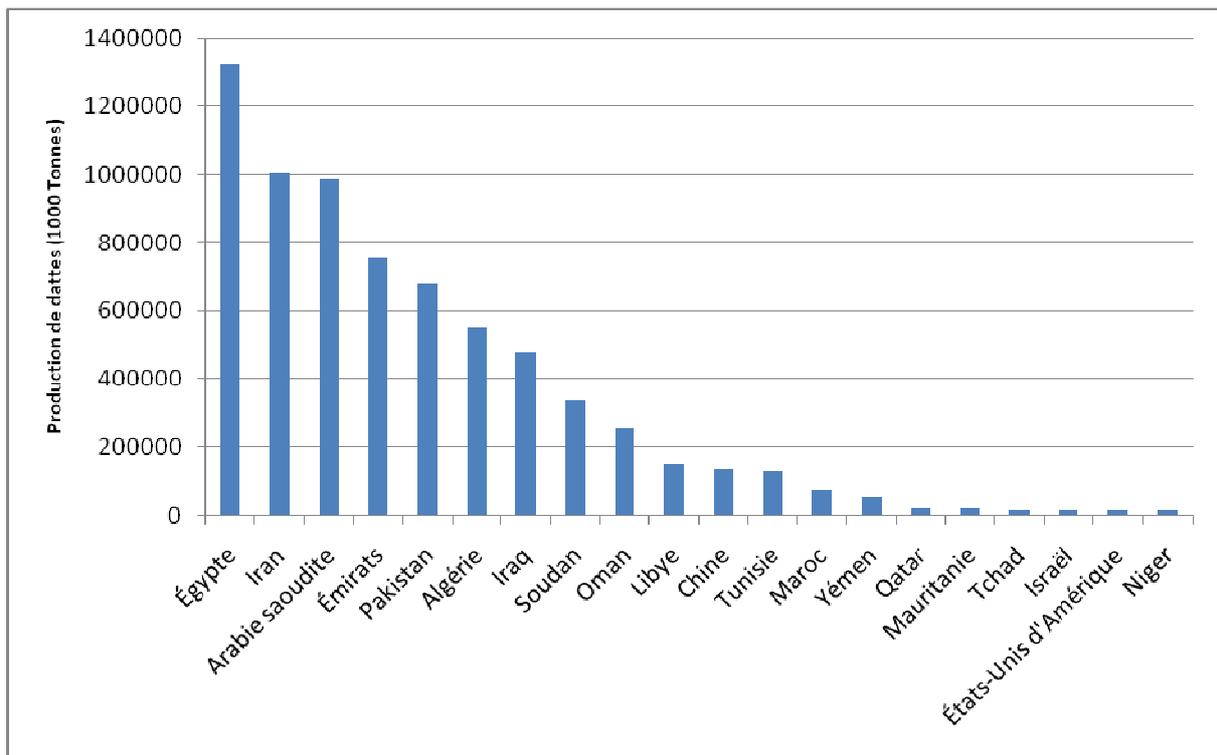


Figure 15 : Principaux pays producteurs de dattes. Le tableau représente la production annuelle de dattes en milliers de tonnes par pays.

J. Les multiples intérêts socio-économiques et culturels

1. Intérêt agro-écologique

Le palmier dattier s'est adapté aux conditions extrêmes des régions chaudes et arides du globe. Selon le vieil adage arabe, « le palmier vit le pied dans l'eau et la tête au feu du soleil ». Avec un maximum d'activité végétative se situant autour de 38°C, il ne produit des fruits que lorsqu'il reçoit suffisamment d'eau. Le palmier s'accommode de sols très pauvres mais à condition qu'ils soient suffisamment drainants pour limiter la toxicité des sels comme les chlorure de sodium ou de magnésium. A noter que le palmier dattier peut tolérer jusqu'à 15 g/l de chlorures de sodium, au-delà il dépérit et ne produit plus.

Force est de constater que cette espèce, par sa faible exigence en ressources hydriques, et en terre fertile, pousse là où d'autres espèces ne peuvent se développer. De plus, il crée en dessous de lui un microclimat autorisant le développement des cultures sous-jacentes. Dans les oasis où la disponibilité en eau et terres arables est satisfaisante, on peut observer une stratification des cultures en trois étages : en hauteur les palmiers dattier puis les arbres fruitiers et enfin les cultures basses (céréales et maraîchage). Ainsi, le palmier constitue l'ossature de l'écosystème oasien de régions arides.

2. Intérêt socio-économique

Le palmier dattier produit annuellement des dattes, fruits mielleux qui constituent l'aliment vital pour les populations du désert. Sa haute valeur énergétique (300 Kcal, 5 fois l'orange et 4 fois le raisin), sa richesse en fibre, en minéraux et en vitamines (A, B) font de la datte un aliment d'un grand intérêt nutritif. Sur le plan pharmaceutique, les dattes pourraient être utilisées comme calmants contre les insomnies et les ballonnements. Des suspensions de pollen de palmier dattier sont traditionnellement utilisées contre l'infertilité masculine dans l'ancienne Egypte dans les contrées du Golfe persique (Belmanpour *et al.*, 2006).

Le palmier dattier fournit aux oasiens en complément de cheptel, une gamme très large de produits vitaux. En effet, toutes les parties de la plante sont valorisées (tableau 3.).

Tableau 3 : Différentes utilisations des fruits et sous-produits du palmier dattier

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 (fig.)	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

3. Intérêt culturel

Le palmier dattier a bénéficié auprès de générations successives d'hommes, de beaucoup d'admiration, d'estime et de louanges. En terre d'Islam, le palmier dattier jouit d'une considération singulière. Il est l'ami sincère de l'homme, son allié et son compagnon de tout le temps lors que tous les autres végétaux s'éclipsent devant l'immense agressivité de l'environnement. Le palmier demeure un don du ciel, un arbre béni. Ses fruits sont la denrée la plus convoitée par les jeûneurs pour son caractère sacré et pour sa valeur nutritionnelle. Dans la Bible, le palmier dattier est riche de bénédictions divines. C'est ainsi qu'on rapporte que l'enfant chrétien portant dans sa septième année un collier de sept noyaux de dattes enfilées sur un fil rouge ne sera jamais victime d'injustice tout au long de sa vie. Enfin, le palmier dattier est sans conteste l'un des supports les plus importants du symbolisme. Il est l'image naturelle de la solidité et de la force et de la victoire. Il constitue un signe de reconnaissance social et un facteur déterminant de l'identité oasisienne.

4. Intérêt économique

Les dattes constituent la principale production de rente des palmeraies. Elles font l'objet d'un marché international important par son volume et par les revenus en devises qu'elles permettent d'obtenir pour les pays exportateurs (Grenier *et al*, 1998). Bien que la production dattière représente 1% du PNB pour les principaux producteurs, la datte occupe une place importante dans les productions fruitières des régions arides et arides. La production de datte détient le cinquième rang après les olives, les agrumes, les rosacées, les raisins au Maroc

(Harrak et al, 2001). En Tunisie, elle constitue la troisième exportation agricole (Greiner, 1998). Le marché de la dattes reconnaît un regain d'intérêt avec les produits de transformation. Ainsi de nouveaux produits à haute valeur ajoutée sont développés, parmi lesquels on distingue le milk-shake, les glaces, les biscuits aux dattes, les confitures et surtout le nakhoil, un bioéthanol à base de dattes. Ce sont autant d'initiatives qui pourraient entraîner une extension de la culture du palmier dattier. Du fait de ses intérêts socio-économiques multiples et de sa bonne adaptation aux conditions sahéliennes, plusieurs pays dont le Mali, le Niger, le Sénégal et Djibouti ont placé le développement de la phoeniciculture comme priorité nationale, pour lutter contre la pauvreté et améliorer les conditions de vie des populations les plus vulnérables.

K. Les limites

Le développement de la phoeniciculture est menacé par différents facteurs abiotiques tels que la désertification, l'ensablement et la salinisation ou les sécheresses récurrentes. Il est également freiné par l'apparition de différents ravageurs (cochenille blanche, pourriture de l'inflorescence, pyrale des dattes, maladie de la feuille cassante et enfin le Bayoud) (Ben Abdallah, 1990). La propagation inquiétante de certains ravageurs comme le charançon rouge (*Rhyncophorus ferrugineus*) est facilitée par le commerce mondial des palmiers d'ornement et le non-respect des périodes de mise en quarantaine (Rochat *et al*, 2006).

L. La multiplication du palmier dattier

1. La reproduction asexuée

✓ Par rejets

C'est la voie de propagation végétative la plus utilisée pour la création de nouvelles palmeraies. La reproduction par rejet permet une conservation des caractères génétiques du pied mère. Elle assure une homogénéité du sexe, de la variété, de la vigueur et de la qualité des fruits. La production des rejets dépend de l'âge de la plante et du cultivar. Les rejets sont produits pendant la phase juvénile de la plante (5 à 15 ans) et leur nombre varie de 5 à 30 par individu (AboEl-nil *et al*, 1986 ; Bouguedoura, 1991).

Ce mode de multiplication conforme s'avère limitant pour la création des palmeraies intensives et pour les programmes d'amélioration génétique du fait :

- de la méthode laborieuse et coûteuse
- du nombre de rejets limité

- du risque de transmission de maladies
- de la nécessité d'un savoir-faire pour le sevrage et la transplantation des rejets (Al-Khayri *et al.*, 2001).

✓ **Par culture *in vitro***

Pour contourner les faiblesses des techniques traditionnelles de reproduction (faible nombre de rejets, transfert de maladies,..) et pour mieux répondre à la demande croissante en plants pour le renouvellement et l'extension des palmeraies, le recours aux méthodes de multiplication végétative *in vitro* demeure la seule alternative permettant la multiplication en masse et la diffusion rapide des cultivars aux phoeniculteurs. Depuis 1970, de nombreux travaux de recherche ont été entrepris qui ont permis de proposer différentes stratégies de clonage *in vitro* par organogénèse (Rhiss *et al.* 1979 ; Drira *et al.*, 1985 ; Ferry, 2001) et par embryogénèse somatique (Fki *et al.*, 2003 ; Sané *et al.*, 2006). De nombreuses variétés de palmiers dattiers à haute valeur marchande ont été ainsi multipliées aussi bien par embryogénèse somatique que par organogénèse.

Aux cours des dernières années, plusieurs auteurs ont décrit des améliorations des procédés d'embryogénèse somatique par passage en milieu liquide agité. Ainsi, des cultures de tissus embryogènes en milieu liquide ont déjà été obtenues à partir de jeunes feuilles de rejets ou à partir d'inflorescences immatures sur quelques variétés commercialisées dans le Maghreb comme Medjoul, Kadrawy (Daguin et Letouzé, 1998), et Deglet Nour (Fki *et al.*, 2003). Des cultivars adaptés à l'environnement sahélien de l'Afrique occidentale comme Amsekhsi ont été également régénérés à partir de suspensions cellulaires embryogènes issues des jeunes feuilles immatures (Sané *et al.*, 2006). Ce procédé d'embryogénèse somatique par culture des cellules en milieu liquide permet l'obtention d'embryons individuels et synchrones avec une capacité de production de masse et une durée de culture *in vitro* plus courte (Aberlenc-Bertossi *et al.*, 1999). Ainsi, cette technique optimisée demeure une méthode de choix pour la propagation à grande échelle des cultivars d'intérêt.

2. La reproduction sexuée

La multiplication par semis de graines est la méthode traditionnelle la plus anciennement pratiquée par les phoeniculteurs. Elle a permis la création de nombreuses palmeraies et l'extension des cultures en dehors de son aire d'origine. C'est la méthode la plus simple et la moins coûteuse d'où son recours actuel pour la création d'oasis dans plusieurs pays sahéliens (Ferry *et al.*, 1998). En revanche, ce mode n'est pas approprié pour la phoeniculture commerciale à cause de la nature dioïque et du haut degré d'hétérozygotie de l'espèce. La

descendance issue de semis est composée de 50% d'individus femelles et de 50% d'individus mâles. Bien que cette reproduction sexuée soit source de diversité génétique, les caractères agronomiques (qualité et quantité des dattes, période floraison, récolte, etc) des plants femelles issus de semis s'avère différentes voire inférieurs à ceux du pied-mère.

II. La floraison

La floraison est un processus très complexe permettant à la plante de passer de l'état végétatif à l'état reproducteur. L'aptitude à la floraison est dépendante du génotype et de l'environnement. La date de floraison conditionne l'adaptation des plantes à leur environnement et demeure un critère important des programmes de sélection variétale du fait de son influence sur le rendement.

Le déclenchement de la floraison est souvent induite en réponse à des signaux hormonaux (gibbérellines) et environnementaux (lumière – photopériode ; température ou vernalisation) perçus par les différentes parties de la plante. Le processus d'induction florale est contrôlé par différents gènes nommés « flowering time genes » qui mettent en jeu diverses voies de signalisation (figure 16 ; Jack, 2004). Des gènes, impliqués dans la précocité ou la tardivité de la floraison, ont été rapportés chez certaines espèces. Par exemple, les plantes mutantes pour le gène *DAY NEUTRAL FLOWERING (DNF)* fleurissent beaucoup indépendamment de la saison (Morris et al., 2010). En effet, le gène *DNF* réprime le gène *CONSTANS* qui est activé, suite à la perception de la photopériode, *via* les phytochromes le mutant de ce gène ne fleurissant pas en condition de jour long (Chuck et Hake, 2005). En ce qui concerne la vernalisation, elle active d'autres voies qui conduisent à inhiber le « *FLOWERING LOCUS C* » (*FLC*), un répresseur de la floraison (Jack, 2004). En somme, ces diverses voies de signalisation sont intégrées au niveau de trois gènes intégrateurs, *FLOWERING LOCUS T* (*FLT*), *SUPPRESSOR OF OVEREXPRESSION OF COI* (*SOCI*) et *LEAFY* (*LFY*) (Blasquez, 2000). Ces derniers agiraient comme déclic génétique de la transition du développement végétatif vers le développement reproducteur (Blasquez, 2000).

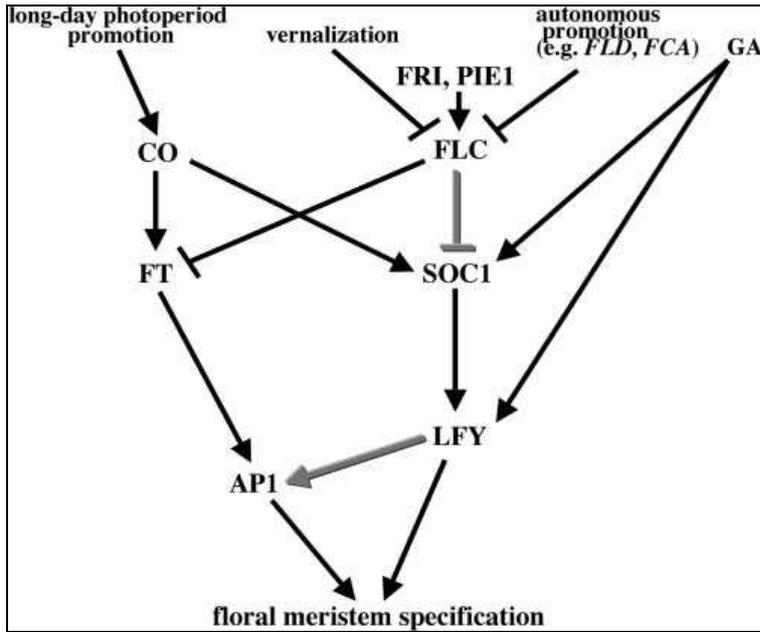


Figure 16 : Voies majeures de l'induction florale chez *Arabidopsis thaliana* (Jack, 2004).

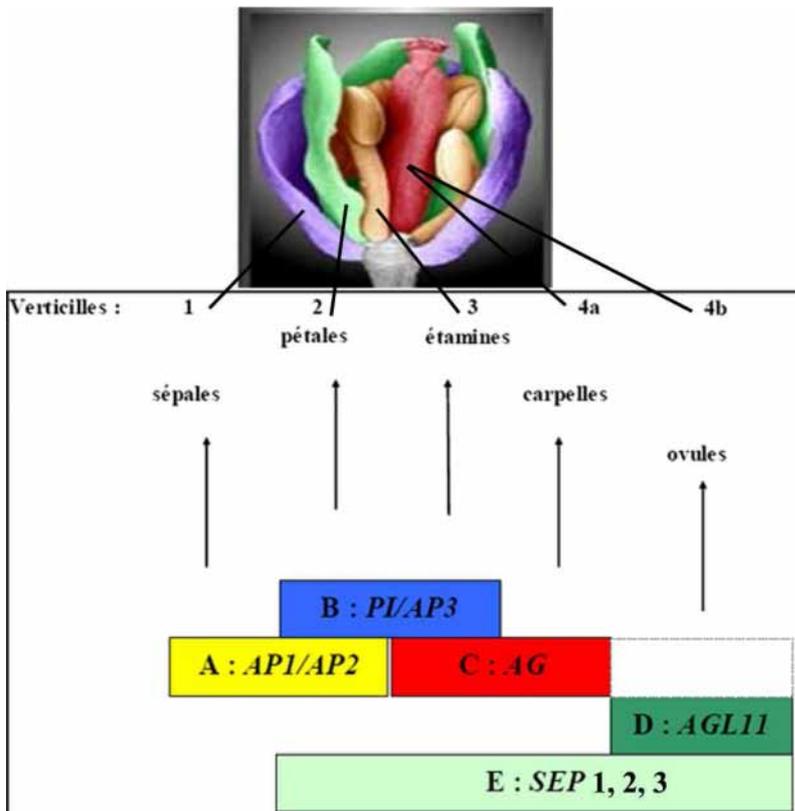


Figure 17 : Modèle de développement floral ABCDE d'*Arabidopsis thaliana*. (Teissen et al., 2001)

A. La morphogenèse de l'inflorescence

1. Initiation des méristèmes inflorescentiels et floraux

Les différentes voies de signalisation de l'induction florale vont mener, *via* les gènes intégrateurs, à l'activation de gènes d'identité inflorescentielle et florale (*LEAFY*, *APETALA1* (*API*), et *CAULIFLOWER* (*CAL*)). Ces derniers activent les gènes impliqués dans la morphogénèse florale tout en réprimant le gène *TERMINAL FLOWER 1* (*TFL1*) qui assure le maintien de l'activité végétative du méristème (Blasquez et al., 2006).

2. Morphogenèse florale

Les fleurs sont constituées de quatre types d'organes, répartis sur quatre zones concentriques: de l'extérieur vers l'intérieur, on distingue les sépales, les pétales, les étamines et les carpelles. L'identité de ces organes est déterminée par la combinaison des actions de plusieurs gènes homéotiques suivant le modèle de commutation génétique ABCDE établi chez *Arabidopsis thaliana* (Coen et Meyerowitz, 1991 ; Ferrario et al., 2004). Les gènes de classe A comprennent *APETALA1* et *APETALA2*, la classe B les gènes *APETALA3* et *PISTILLATA*, la classe C le gène *AGAMOUS*, la classe D les gènes *AGL11* ou *SEEDSTICK* (*STK*) et la classe E les gènes *SEPALLATA1*, 2 et 3. L'identité des sépales est spécifiée par l'activité des gènes A, celle des pétales par les gènes A+B+E, celle des étamines par les gènes B+C+E, celle des carpelles dont ovules inclus par C+D+E (figure 17). La majorité des gènes MADS codent pour des facteurs de transcription ou protéines à domaine MADS contenant en position N-terminal une séquence conservée de 56 acides aminés.

Chez le palmier à huile, espèce appartenant à la famille des Palmiers, quatre gènes MADS box qui seraient impliqués dans la mise en place des organes floraux dans le cadre du modèle ABC ont été caractérisés. Il s'agit des *EgDEF1* et *EgGLO2* qui auraient une fonction de type B ; *EgAG2* de type C et D et *EgS1* de type E. Globalement le modèle ABC d'*Arabidopsis thaliana* semble être conservé chez le palmier à huile, notamment par rapport à la distinction moléculaire des sépales et des pétales (Adam et al., 2007), ce qui n'est pas le cas chez certaines monocots (Kanno et al., 2003).

III. Détermination du sexe

A. Apparition de la dioécie

Avec environ 183 genres différents, les plantes à fleurs forment la plus grande partie des végétaux sur la terre (Govaerts et Dransfield, 2005 ; Dransfield *et al.*, 2008). Ces plantes présentent une très grande diversité dans leurs systèmes de reproduction (tableau 4).

Tableau 4 : Différents systèmes de reproductions chez les plantes à fleurs

<i>Plant term</i>	<i>Definition of plant term</i>	<i>Occurrence in plants, and examples</i>
<i>Sexually monomorphic</i> Hermaphrodite	Flowers have both male and female organs	90% of flowering plants (eg roses)
Monoecious	Separate sex flowers on the same individuals	5% of flowering plants, often those with catkins (eg hazel), and many gymnosperms (eg pines)
Gynomonoecious (male-sterility)	Individuals have both female and hermaphrodite flowers	eg daisies
Andromonoecious (female-sterility)	Individuals have both male and hermaphrodite flowers	
<i>Sexually polymorphic</i> Dioecious	Separate sex individuals (male and female plants)	5% of flowering plants (eg holly), and some gymnosperms
Gynodioecious	Individuals either female or hermaphrodite	eg ribwort plantain (<i>Plantago lanceolata</i>) bladder campion (<i>Silene vulgaris</i>)
Androdioecious	Individuals either male or hermaphrodite	very rare

D'après leur structure, deux principaux types de fleurs sont rencontrés :

- Les fleurs peuvent être hermaphrodites et les organes mâles (androcée) et femelles (gynécée) sont présents au sein de la même fleur. L'hermaphrodisme constitue la forme dominante puisqu'elle est rencontrée dans 90% des espèces (Ainsworth, 2000).
- Les fleurs unisexuées qui ne renferment qu'un seul organe sexuel fonctionnel. Une minorité d'espèces (10%) portent des fleurs unisexuées.

Les espèces portant des fleurs unisexuées peuvent être divisées en deux classes principales : les espèces monoïques (comme le maïs, le palmier à huile, le melon) qui portent des fleurs mâles et femelles sur le même individu et qui représentent 6% des plantes à fleurs; et les espèces dioïques (comme le chanvre, le compagnon blanc et le palmier dattier) qui portent les fleurs mâles et femelles sur des individus différents (Ming *et al.*, 2007). Les espèces dioïques représentent 4% des angiospermes (Ming *et al.*, 2007).

- Chez certaines espèces, les individus portent des fleurs unisexuées et des fleurs hermaphrodites. C'est le cas des espèces andromonoïques et les espèces gynomonoïques qui portent respectivement, des fleurs mâles ou des fleurs femelles, aussi bien que des fleurs hermaphrodites (Ainsworth, 2000).

La dioécie est présente chez de nombreuses espèces appartenant à différentes familles, ce qui suggère qu'elle soit apparue à plusieurs reprises et de façon indépendante au cours de

l'évolution des plantes à fleurs. Trois modèles pour expliquer l'origine de la dioécie à partir de l'état hermaphrodite ont été proposés avec comme étape intermédiaire la monœcie, la distylie ou la gynodioécie (Ainsworth, 2000). Les scénari à la base des deux premières voies sont peu documentés. Le passage de la monœcie vers la dioécie a pu se réaliser *via* des mutations altérant le ratio mâle/femelle. Dans le cas de la voie de la distylie, la dioécie résulterait d'une stratégie évitant l'autofécondation ou auto-incompatibilité (Tcherkez, 2002).

La troisième hypothèse est la plus largement partagée ou admise par les biologistes dans le contexte de l'évolution du sexe des plantes. Elle consiste en la transition de l'hermaphrodisme (forme reproductrice ancestrale vers la dioécie (forme de sexualité spécialisée) avec comme étape intermédiaire la gynodioïcie (Dellaporta et Calderon-Urrea., 1993 ; Ainsworth, 2000). Deux mutations indépendantes seraient à l'origine de cette transition. Une première mutation d'origine mitochondriale causerait la perte de la fonction mâle pour une partie des individus et conduirait à l'apparition d'une population gynodioïque. La dioécie serait achevée par l'apparition d'une seconde mutation chez les individus hermaphrodites de la population gynodioïque qui conduirait à l'obtention des individus mâles (Dellaporta et Calderon-Urrea., 1993 ; Laprade *et al*, 2010)

B. Transition du bourgeon floral vers l'état unisexué

Certaines espèces dioïques produisent des bourgeons floraux qui sont dépourvues de vestiges d'organes du sexe opposé (androcée ou gynécée), comme c'est le cas chez l'épinard et le palmier *Nypa fruticans* (Sherry *et al.*, 1993; Uhl, 1972). Cependant, chez un grand nombre d'espèces dioïques, le bourgeon floral est initialement « bisexuel » avec l'initiation des primordiums des organes sexuels mâle et femelle. Par conséquent, l'unisexualité des fleurs de ces espèces dioïques résulte de l'arrêt du développement de l'androcée (organe reproducteur mâle) ou du gynécée (organe reproducteur femelle) (Dellaporta and Calderon-Urrea, 1993). Cet arrêt du développement peut se produire très précocement par l'avortement d'organes sexuels stériles de sexe opposé. C'est le cas du compagnon blanc (*Silene latifolia*) ou du maïs (*Zea mays*) pour lesquels il a été observé l'arrêt prématuré du développement des pistillodes des fleurs mâles (Cheng *et al.*, 1983; Farbos *et al.*, 1997). Chez d'autres espèces, le dimorphisme sexuel peut s'exprimer très tardivement, comme chez la vigne (*Vitis vinifera*) où le carpelle des fleurs mâles (pistillode) deviendrait stérile par avortement du sac embryonnaire de l'ovule mature (Caporali *et al.*, 2003). De même, les fleurs femelles de

Rhapis subtilis (palmier nain natif d'Asie) sont devenues unisexuées après altération de la maturation du pollen dans les anthères (Giddey et al., 2008).

C. Marqueurs génétiques et moléculaires du sexe

Chez les espèces dioïques étudiées, il existe un déterminisme sexuel basé sur la présence des chromosomes sexuels a été décrit (Yanan et al, 2004). Deux principaux types de chromosomes sexuels ont été observés chez ces plantes.

La plupart possède un système de chromosomes sexuels hétéromorphes de type XX/XY. Les mâles et les femelles portent des chromosomes XY et XX respectivement. C'est le cas du compagnon blanc (Vyskot et al., 2004), de l'asperge (Gebler et al., 2007) et de l'igname (Terauchi and Kaul, 1999). Comme chez les mammifères, la présence d'un chromosome Y chez le compagnon blanc provoque l'activation du développement des organes mâles et l'inhibition des organes femelles. En son absence, chez les plants femelles, seuls les gynécées se développent (Monéger, 2001).

En revanche, chez d'autres espèces dioïques, comme l'oseille (*Rumex acetosa*) et le houblon (*Humulus japonicus*), le sexe est déterminé par le rapport entre le chromosome X et les autosomes (Yanan et al, 2004). Pour l'oseille et le houblon, les femelles sont XX et les mâles XY₁Y₂. Contrairement au *S. latifolia*, le chromosome Y de ces espèces n'est pas requis pour le développement des étamines et l'inhibition du développement du gynécée (Yanan et al, 2004).

Des marqueurs spécifiques du sexe ont été identifiés chez un certain nombre d'espèces dioïques cultivés pour lesquelles l'identification précoce des individus femelles est recherchée. Ainsi, dix marqueurs AFLP spécifiques du génome mâle ont été mis en évidence chez l'igname (Terauchi and Kaul, 1999). Des marqueurs de sexe de type RAPD et microsatellite (GATA)₄ ont été rapportés chez la papaye (Sondur et al., 1996 ; Parasnis et al, 1999 ; Ming et al, 2007).

Au cours de la dernière décennie, la détermination du sexe a fait l'objet de nombreux travaux chez plusieurs espèces dioïques. La détermination du sexe peut être associée à une région chromosomique spécifique et non recombinante du chromosome Y chez la papaye, (Ming et al., 2007) ou basé sur la ségrégation d'un simple locus chez *Ecballium elaterium* (Mather et al, 1949) ou plusieurs loci chez le concombre (Terefe et al., 2005).

Chez le compagnon blanc, Délichère et al. (1999) ont caractérisé le gène *SIY1* localisé sur le chromosome Y. Ce dernier, qui s'exprime préférentiellement dans les fleurs mâles, code une protéine à domaine « WD-repeat » et présente de fortes similitudes de séquence avec un autre gène (appelé *SIX1*) localisé sur le chromosome X. Ce dernier présente un niveau d'expression comparable dans les deux types de bourgeons floraux. En ce qui concerne le processus même de différenciation chez *S. latifolia*, les études de Zluvova et al. (2006) ont montré que le stade de divergence morphologique des fleurs mâle et femelle est précédé par un arrêt de l'expression des gènes apparentés à *SHOOTMERISTEMLESS* et *CUC1/CUC2* d'*Arabidopsis*.

Une étude récente a montré que la détermination du sexe du melon est contrôlée par l'action de deux gènes, *CmACS-7* (*Cucumis 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid synthase*), codant une enzyme de la voie de biosynthèse de l'éthylène qui conduit au développement de fleurs femelles par répression du développement des étamines (Boualem et al., 2008) et *CmWIP1*, un gène qui codant un facteur de transcription en doigt de zinc impliqué dans l'avortement du carpelle de la fleur mâle (Martin et al., 2009).

Chez la vigne, un locus du sexe a été identifié par une approche QTL. Ce locus joue un rôle important dans le développement des inflorescences et colocaliserait dans le génome avec un gène codant une enzyme ACS similaire à celle du concombre (Marguerit et al., 2009).

Chez les plantes monoïques, le maïs est l'une des espèces végétales chez qui les mécanismes moléculaires de la détermination de sexe ont été partiellement élucidés. Ainsi, un groupe de gènes appelés « *TASSELSEED* » ont été identifiés et impliqués dans la masculinisation des fleurs (Chuck, 2010). Les gènes *TASSELSEED 1* et *2* (codant une lipoxygénase et une alcool déshydrogénase à chaînes courtes respectivement) sont requis très précocement dans un processus de mort cellulaire du pistil des fleurs mâles (Calderon-Urrea and Dellaporta, 1999 ; Delong et al., 1993). Deux autres gènes, identifiés *via* les mutants *tasselseed 6* et *4*, codent respectivement un facteur de transcription de type APETALA2 et un microARN régulateur associé similaire à *miR172* d'*Arabidopsis*. Ces derniers semblent jouer un rôle non seulement dans la détermination du sexe, mais aussi dans la régulation de la ramification inflorescentielle.

D. Rôle des régulateurs de croissance dans l'expression du sexe

Chez un grand nombre d'espèces, l'expression du sexe peut être affectée par des facteurs tels que les régulateurs de croissance (Dellaporta et Calderon-Urrea, 1993). Le rôle des hormones dans la différenciation du sexe a été déterminé par l'étude de l'effet de l'application et par la caractérisation des gènes impliqués dans la biosynthèse de ces hormones.

L'éthylène

L'éthylène est une molécule produite par tous les tissus végétaux (Kende et Zeevaart 1997). Elle joue un rôle régulateur dans les processus de développement de la plante comme la formation, la maturation et l'abscission des fruits (Yang et Hoffman 1984). L'application exogène d'ethrel, molécule libératrice d'éthylène, sur des plants de concombre, a entraîné une augmentation du nombre des fleurs femelles et une inhibition des organes mâles dans les fleurs hermaphrodites des lignés monoïques (Perl-treves, 1999). Inversement, les inhibiteurs la biosynthèse de l'éthylène, comme l'aminooéthoxyvinyl glycine (AVG) ou l'acide amino-oxyacétique (AOA), provoquent la masculinisation des plants. Chez le melon, le gène de l'andromonoecie, lequel est requis pour le développement des fleurs femelles, code pour une enzyme, l'acide 1-aminocyclopropane-1-carboxylique synthase (ACS) qui catalyse la première étape de la biosynthèse de l'éthylène (Boualem et al., 2008).

Les gibbérellines

Plusieurs études menées pour élucider les effets de l'acide gibbérellique sur le développement des fleurs ont montré des effets contradictoires selon les espèces. L'application exogène de gibbérelline (sous forme de GA3) induit la masculinisation des fleurs femelles du concombre (Krishnamoorthy et Talukdar, 1976). De même, elle favoriserait l'initiation des boutons floraux mâles et la réduction des boutons floraux femelles chez le houblon (Perl-Treves, 1999). Inversement, chez le maïs, les gènes mutants *dwarf d1-d8* impliqués dans la suppression des organes mâles des fleurs femelles affectent la biosynthèse de la GA, et les mutants présentent un niveau faible de GA (Neuffer et al., 1997 ; Chuck, 2010).

Les auxines et cytokinines

Bien que les auxines et les cytokines jouent un rôle important et bien démontré dans la régulation des processus de divisions cellulaires, de différenciation tissulaire et d'élongation

cellulaire (Nemhauser et al., 1998), très peu de données existent quant à leur rôle éventuel dans la régulation de l'expression du sexe chez les plantes. Cependant, les auxines et les cytokines seraient impliquées dans le développement floral en favorisant le développement du carpelle chez la vigne et le cannabis (Delaporta et Calderon-Urrea, 1993).

En somme, cette variation des effets des hormones révèlent que les mécanismes à la base de la détermination du sexe seraient différents entre les espèces. Il est à noter que, chez le *S. latifolia*, l'application d'hormone n'a pas eu d'effet sur la sexualité des fleurs.

E. Facteurs à l'origine de l'unisexualisation des fleurs

Les mécanismes cellulaires et moléculaires associées à l'arrêt du développement des organes sexuels stériles sont encore très peu connus pour la majorité des espèces dioïques et monoïques.

1. L'apoptose

Après l'initiation des organes floraux, l'établissement du dimorphisme sexuel de la fleur passe par l'élimination des organes sexuels inappropriés. La mort cellulaire programmée (programmed cell death ou PCD) est un processus génétiquement contrôlé qui serait impliqué dans l'élimination des organes sexuels stériles non nécessaires. Cette avortement par apoptose pourrait survenir très tôt dans le développement floral au niveau des primordia ou plus tard au niveau des organes reproducteurs entiers, pistil ou pollen (Wu et al., 2000).

L'avortement des primordia du gynécée des fleurs mâles du maïs résulte d'un processus de dégénérescence cellulaire initié au niveau des régions sous épidermiques. Les cellules de ce territoire avorté, observés par microscopie électronique à transmission, sont dépourvues de tout organite intracellulaire (Cheng et al., 1983). Ce processus d'apoptose chez le maïs requiert l'action du gène *TASSELSEED 2* (Calderon-Urrea *et al.*, 1999). La stérilité des organes mâles des fleurs femelles du kiwi et du riz serait due à une dégénérescence des cellules tapétales de l'anthere par apoptose, conduisant à la formation de pollens collapsés (Ku et al., 2000 ; Coimbra *et al.*, 2004). Sur le plan cytologique, le processus d'apoptose se traduit par de profonds changements structuraux comme la rétraction du cytoplasme, la rupture vacuolaire et la fragmentation de l'ADN. Woltering *et al.* (2002) suggèrent l'existence de médiateurs biochimiques telles que des protéines caspase-like dans ce processus de mort cellulaire sans toutefois qu'une activité de caspase n'aient été mise en évidence chez les

plantes. Les altérations ultrastructurales sont létales et empêchent la réversibilité du phénomène.

2. La dégradation de l'ADN nucléaire

La chromatine constitue la macromolécule la plus complexe et dynamique de la cellule. Elle est formée de l'assemblage d'unités nucléosomiques (ADN génomique entourant un octamère d'histone-2H2A, 2H2B, 2H3, 2H4) à laquelle est associée à l'histone H1. En fonction de l'état de la cellule et sous l'action de paramètres environnementaux, la chromatine peut prendre différentes conformations. L'état ouvert qui est transcriptionnellement actif correspond à un état faiblement condensé, l'euchromatine. En revanche, une forte condensation de la chromatine (hétérochromatine compacte) réduit de manière importante l'accessibilité de l'ADN à la machinerie de la transcription. Une corrélation a été mise en évidence entre l'état structural des cellules et l'unisexualisation des bourgeons floraux. Ainsi, chez le concombre (*Cucumis sativus*), Hao *et al.* (2003) ont démontré que l'arrêt du développement des organes mâles stériles des fleurs femelles serait étroitement associé à une condensation de la chromatine et une forte vacuolisation des cellules. De plus, une dégradation partielle de l'ADN nucléaire est observée dans les cellules des organes avortés comme l'atteste l'effet TUNEL positif (Hao *et al.* 2003).

3. L'arrêt des divisions cellulaires

Le développement des organes floraux implique une augmentation des divisions et une différenciation cellulaire. Lors de l'activité mitotique, les cellules passent par différentes phases, G1-S-G2-M, qui s'accompagnent de modifications de l'expression de certains gènes spécifiques du cycle cellulaire. Le gène de l'histone H4 est exprimé spécifiquement au cours de la phase S. Les cyclines D et B sont des régulateurs des transitions G1-S et G2-M respectivement. Ces diverses molécules sont utilisées comme des marqueurs du cycle cellulaire. Ainsi, chez le maïs, il a été récemment montré une absence d'expression du gène codant pour une cycline B et une accumulation des transcrits de *WEE1* (un inhibiteur de la mitose) dans les primordia des organes mâles des fleurs femelles. Les fleurs unisexuées femelles du maïs résultent donc d'un arrêt du cycle cellulaire (Kim *et al.*, 2007).

4. La méthylation

Le développement de la plante dépend fortement des mécanismes épigénétiques qui agissent sur la conformation de la chromatine, ainsi régulant l'expression des gènes. L'acétylation des histones confère à la chromatine une conformation active permettant la transcription des gènes (Fransz *et al.*, 2002). Inversement, la méthylation d'ADN peut jouer un rôle répressif sur l'expression des gènes. La méthylation correspond à l'ajout d'un groupement méthyle (CH_3) à la place d'un atome d'hydrogène de l'une des quatre bases azotées (thymine, adénine, guanine et cytosine). La présence des groupements méthyle (CH_3) dans un site spécifique de l'ADN entraîne une modification de la structure de la chromatine. Ces sites méthylés sont reconnus par des protéines chromosomales (MeCP2, par exemple) possédant une forte affinité pour les nucléotides méthylés ($\text{CH}_3\text{-CpG}$) (Meehan *et al.*, 1992). Ces protéines contrôlent la condensation de la chromatine et le déplacement des histones H1 du nucléosome (Kass *et al.*, 1997). Cette modification structurale s'achève par une conformation répressive stable de la chromatine. Cette dernière empêche l'interaction entre la machinerie de transcription (ARN polymérase, protéines activatrices, promoteur) et l'ADN (Kass *et al.*, 1997).

Le patron dynamique de méthylation de la plante au cours de son développement résulte de l'intervention de trois mécanismes :

- « Deméthylation globale » du pattern de méthylation des parents juste après la fécondation durant les premiers stades de l'embryogenèse zygotique
- « méthylation de *novo* » pour établir une nouvelle distribution des groupements méthyles sur des sites spécifiques de l'ADN
- « méthylation de maintenance » pour reproduire fidèlement ce nouveau pattern de méthylation spécifique.

La transition de l'état végétatif vers l'état reproducteur s'accompagne de changements épigénétiques. Contrairement aux processus d'apoptose, les processus épigénétiques tels que la méthylation sont réversibles. L'administration des substances chimiques (comme la 5-azacytidine) a permis de mieux comprendre le rôle de la méthylation dans le développement végétatif et reproducteur de la plante (Janousek *et al.*, 1996). Des plants de maïs et de tabac régénérés après traitement à la 5-azaC ont montré une hypométhylation globale de l'ADN de 8% et 20% respectivement. Ces plants présentent de profondes anomalies de développement incluant, entre autres, nanisme et transformations homéotiques des organes floraux (Vyskot *et al.*, 1995).

Cubas *et al.* (1999) ont montré que la perte de symétrie florale chez *Linaria vulgaris* était associée à une hyperméthylation du gène *LCYC*, orthologue de *CYCLOIDEA* d'*Arabidopsis majus*. Les gènes du développement floral de *Silene latifolia* sont également très sensibles à la méthylation de l'ADN. L'application de 5-azacytidine (5-azaC) durant la germination précoce des plants mâles a induit une réversion de sexe chez 21% de ces plants qui produisent alors des fleurs mâles normales et des fleurs bisexuelles fertiles alors qu'aucun changement de phénotype n'est observable chez les plantes femelles (Janousek *et al.*, 1996). De plus, ces plants androhermaphrodites présentent un génome hypométhylé comparativement aux plants non traités à la 5-azaC. Ces résultats démontrent que la suppression des organes femelles (pistillodes) des fleurs mâles est fortement associée à une hyper-méthylation de l'ADN.

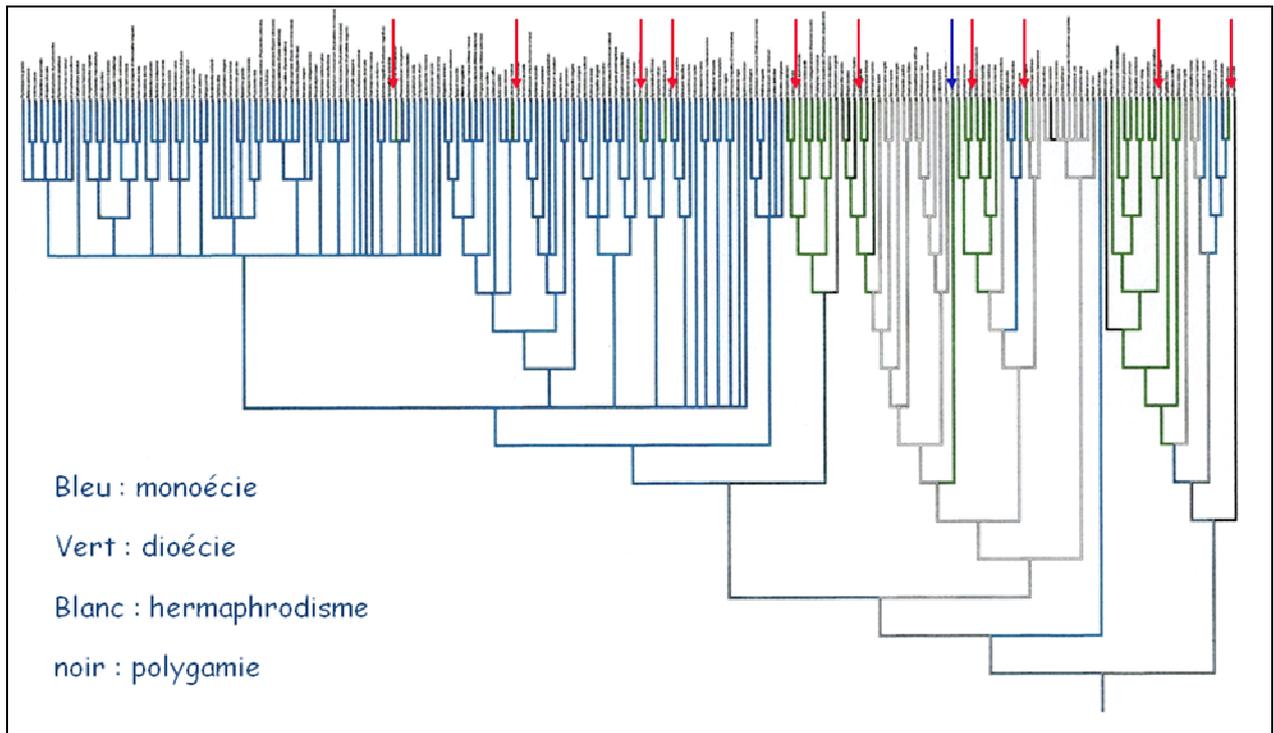


Figure 18 : Systèmes de reproduction chez les palmiers (d'après Julie Sannier et Sophie Nadot). Les flèches orange indiquent les événements indépendants d'apparition de la dioécie dans la famille. La flèche bleue indique que le genre *Phoenix*, entièrement dioïque, s'ancre dans des taxons hermaphrodites.

IV. Etat de l'art sur la détermination du sexe chez le palmier dattier

La famille des Palmacées constitue un groupe d'espèces particulièrement intéressant en matière de biologie de la reproduction puisqu'elle présente une grande diversité de systèmes reproducteurs. Contrairement à la majorité des groupes d'angiospermes, plus de 85 % des espèces de palmiers portent des fleurs unisexuées (Dransfield *et al.*, 2008). La distribution de la dioécie au sein des palmiers suggère qu'elle est apparue à différents moments au cours de l'évolution à partir de événements indépendants (figure 18) (Weiblen *et al.*, 2000).

Mes travaux de thèse ont porté sur le palmier dattier (*Phoenix dactylifera L.*) qui appartient au genre *Phoenix* composé exclusivement d'espèces dioïques. Les *Phoenix* s'ancrent dans des taxons hermaphrodites dans l'arbre phylogénétique des palmiers, ce qui suggère que dans ce genre la dioécie aurait évolué à partir de l'hermaphrodisme. Malgré son importance socio-économique et écologique considérable, très peu de données sont disponibles sur le développement reproducteur et sur la détermination du sexe chez le palmier dattier.

A. La phénologie

La floraison du palmier dattier intervient quand l'individu a atteint sa phase reproductrice entre 3 et 8 ans (Bouguedoura, 1991). Dans les zones de culture traditionnelle, le palmier dattier fleurit une fois par an et pendant une période limitée à quelques mois. Des facteurs abiotiques tels que la température, l'hygrométrie, l'évapotranspiration et la pluviométrie ont été cités comme déterminantes pour la floraison du palmier dattier (Jahiel *et al.*, 1996). La floraison du palmier dattier ne se déclenche qu'après une période fraîche ou lorsque la température journalière descend en dessous du zéro de floraison (seuil variant selon la localité 22°C pour Djibouti et 17°C pour Elche en Espagne) (Munier, 1973).

Les conditions climatiques (températures et pluies) qui autorisent un abaissement de la température en dessous du seuil de floraison peuvent être réunies une à plusieurs fois par an selon les régions. Ainsi, au Niger, au Mali, et en Colombie, des palmiers dattiers présentant deux cycles annuels de floraison et de fructification ont été rapportés (Jahiel, 1996). Munier (1973) a attribué la première floraison de septembre à une baisse des températures dues à la saison des pluies et à la seconde à une baisse des températures pendant les saisons fraîches d'hiver (janvier-février). Cette double floraison est également observée chez un peuplement de dattier en Italie, au Sud de l'Europe. Ces régions (Sahel, Italie) situés à la limite de l'aire de culture du palmier dattier constituent des zones marginales. Elles présentent des conditions

de température et de précipitation qui peuvent influencer sur le début de l'émergence des premières spathes ainsi que sur la durée de la floraison. En Italie, les palmiers dattier fleurissent en 160 jours tandis que dans le Sahel (Djibouti) la floraison est plus courte et dure 60 à 120 jours (Daher et al, 2010).

Selon les conditions climatiques, la durée de la fructification des dattes peut varier de 4 à 7 mois environ et nécessite une somme importante de chaleur et une baisse de l'hygrométrie pour que les fruits atteignent une pleine maturité (Munier, 1973). Dans certaines zones du Sahel, comme le Sénégal, le Niger et le Mali, les saisons de pluies interviennent pendant la période critique de maturation des dattes, ce qui entraîne la perte totale de la récolte (Sané et al. 2006). Le développement de la culture du palmier dattier dans ces zones nécessite donc la sélection de cultivars précoces ou tardifs. Cette sélection s'effectuera selon la date de fructification qui dépend de l'initiation de la floraison et qui constitue un élément déterminant de la phénologie de l'espèce.

B. Le développement floral

De Mason et al. (1982) ont rapporté la première description du développement floral du palmier dattier. Ils ont pu identifier l'existence d'un stade « bisexuel » précoce du bourgeon floral et ont montré que l'androcée correspond à deux verticilles de trois étamines. Bouguedoura (1991) a décrit les différents types de bourgeons rencontrés chez un jeune palmier en croissance. Elle a montré que le « bourgeon axillaire indéterminé » est la structure originelle qui évoluera en inflorescence dès que l'individu atteint l'âge reproductif. La morphogénèse florale a été sommairement décrite en 5 stades de développement. Plus récemment, Masmoudi et al. (2008) ont distingué huit stades de différenciation de l'inflorescence femelle sur la base d'une description morphologique et d'une étude histologique. Cependant, aucune étude comparée des développements des inflorescences mâles et femelles n'a été rapportée.

C. Les variations de la morphogénèse florale

Deux variations naturelles de la fleur du palmier dattier ont été décrites. La première variation correspond à la présence *in planta* de fleurs d'apparence bisexuelle sur des individus mâles (De Mason et al., 1980). Les organes femelles de la fleur mâle se développent, ce qui conduit à la formation de fruits parthénocarpiques. Le développement des pièces femelles sur des fleurs mâles a également pu être induit *in vitro* en présence de 2,4-D, une auxine synthétique (De Mason et al., 1980). Inversement, Masmoudi *et al.*, (2008) ont rapporté le développement *in vitro* des organes mâles des fleurs femelles en étamines après application

d'une combinaison hormonale auxines-cytokinines. Ces données suggèrent un rôle important de ces hormones dans la mise en place des organes sexuels, et donc la différenciation sexuelle chez le palmier dattier.

Le second type de variation florale est observé sur des individus issus de plants femelles produits *in vitro*. Les fleurs femelles montrent une transformation des staminodes en des structures carpellaires ou la formation des carpelles surnuméraires (Cohen *et al.*, 2004). Les variations d'ordre agronomique (fruits parthénocarpiques, absence de maturité pour les dattes, faibles résistances aux maladies,...) s'accompagnent assez souvent de variations morphologiques (malformation des folioles et du rachis, nombreux rejets et gourmands ; nanisme ; chute des fruits). Ces anomalies sont observées chez les vitroplants de palmier dattier dans certaines plantations d'Arabie Saoudite (Djerbi, 2000), du Maroc (Azeqour *et al.*, 2002) et en Afrique du sud (McCubin *et al.*, 2000). Elles seraient réversibles au cours du temps, et disparaîtraient après (Djerbi, 2000 ; Cohen *et al.*, 2004).

Il se pose alors la question de savoir si ces anomalies sont les résultats de l'influence des conditions environnementales ou/et des aberrations génétiques survenues lors du processus de clonage. Certains auteurs ont proposé qu'elles sont dépendantes des conditions de culture *in vitro* : concentration élevée de l'auxine (Bhargava *et al.*, 2003), longueur de la phase non morphogène et nature de l'explant mis en culture (Azeqour *et al.*, 2002), stérilité du carpelle (Cohen *et al.*, 2004) ou de nature épigénétique (Rival *et al.*, 1998).

D. La détermination du sexe

Chez le palmier dattier, une descendance issue de graines est composée de 50% de mâles et 50% de femelles, ce qui suggère que le déterminisme sexuel est de nature génétique. De plus, Siljak-Yakovlev (1996) sur la base d'études cytologiques réalisées à l'aide de la technique de coloration à la chromomycine A3, suggère l'existence de chromosomes sexuels qui seraient marqués différemment. Des chromocentres homomorphes sont observés chez les individus femelles alors que chez les mâles ce sont des chromocentres hétéromorphes qui sont observés. Cependant, aucun chromosome sexuel Y ou X n'a été clairement identifié chez le palmier dattier. Les mécanismes ou facteurs génétiques du déterminisme sexuel demeurent également inconnus pour cette espèce.

Les taux d'acide gibbérelline contenus dans les feuilles et les inflorescences sont constatés significativement supérieurs chez l'individu femelle par rapport au mâle (Leshem and Ophir, 1977). Une recherche de marqueurs du sexe par RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA) n'a pas permis d'identifier de séquences spécifiques du sexe (Zaher *et al.*, 2006). A ce

jour, aucun marqueur spécifique du sexe n'a été isolé et les processus à l'origine de l'unisexualité des fleurs demeurent inconnus.

V. Objectif de la thèse

Nous avons entrepris une description histologique et moléculaire des inflorescences mâles et femelles de palmier dattier afin de décrire et de caractériser en détail les différents événements cellulaires et moléculaires à la base de l'unisexualité florale chez le palmier dattier. Le projet de recherche a permis de traiter plusieurs questions scientifiques liées au développement reproducteur:

1. Quelles sont les caractéristiques de la floraison dans les conditions environnementales de Djibouti ?
2. Quelles sont les étapes clés et la cinétique de la différenciation des organes reproducteurs ?
3. A quel stade du développement floral émergent les premiers signes de dimorphisme sexuel?
4. Quels sont les événements cellulaires et moléculaires associés au développement d'une fleur unisexuée ?

Les travaux présentés dans ce mémoire tentent d'apporter des premières réponses à ces questions. Ils comportent quatre parties :

1. L'étude de la phénologie du palmier dattier. Nous décrivons les principales caractéristiques de la floraison dans les conditions sahéliennes.
2. La description du développement reproducteur du palmier dattier. Nous décrivons la morphogénèse des inflorescences et des fleurs, l'apparition des premières différences visibles liées au sexe ainsi que les événements cellulaires associés à l'unisexualisation.
3. La perturbation de la morphogénèse florale. La caractérisation des fleurs présentant un phénotype variant *in planta* et *in vitro* sera réalisée.
4. L'étude du blocage des organes sexuels stériles et l'unisexualisation des fleurs. Nous nous focaliserons sur les processus associés à l'arrêt du développement des organes sexuels stériles, leur intégrité cellulaire ainsi que leur niveau de méthylation globale de leur ADN nucléaire.

Après une discussion générale à la fin de chaque chapitre, nous terminerons par une conclusion générale et nous présenterons les perspectives ouvertes par ce travail d'étude associés à la détermination du sexe chez le palmier dattier.

Matériels et méthodes

I. Etude phénologique

Des observations phénologiques ont été réalisées sur 149 individus pendant la saison de floraison 2009/2010. Ces individus inventoriés phénologiquement sont des arbres adultes et sexuellement matures qui sont localisés dans des palmeraies aux conditions pédoclimatiques similaires. La date d'apparition de chaque inflorescence ainsi que le nombre d'individus en floraison sont notés. La fréquence et la cinétique de l'émergence des inflorescences ont été suivies à l'échelle individuelle durant la période de floraison.

II. Matériel végétal

Les fleurs utilisées dans cette étude ont été récoltées à partir de palmiers dattiers (*Phoenix dactylifera* L.) sélectionnés dans les palmeraies d'Ambouli (Djibouti) et de Bordighera (Italie) durant les saisons de floraison de 2008, 2009 et 2010. Plus de 34 individus de palmiers issus des graines ont été sélectionnés pour leur taille (supérieures à 4 m), leur âge (avoisinants la vingtaine d'année) et leur phase reproductive bien établie. Pour pouvoir obtenir les inflorescences les plus jeunes possibles, une dissection de la couronne orientée vers l'intérieur est opérée pour chaque arbre. L'ensemble des bourgeons axillaires rencontrés à l'aisselle des palmes détachées du tronc ont été prélevés dans l'ordre. Les inflorescences dépourvues de bractée ont été fixées pour les études histo-cytologiques.

III. Culture *in vitro* des boutons floraux

Préparation des explants

Les essais de réversion *in vitro* de sexe ont été réalisés à partir de jeunes inflorescences de différents stades de développement récoltés durant les travaux de dissection. Ces inflorescences ont été désinfectées superficiellement à l'aide d'une solution d'éthanol 70°. Sous la hotte à flux laminaire et à l'aide des scalpels et des pinces stériles, les spathes ont été dégagées et les branches inflorescentielles sont sectionnées en petits segments de 2 à 3 cm de longueur. Les inflorescences, étant complètement enfermées dans la spathe, sont par défaut stériles. C'est pourquoi nous avons transférés directement les petits segments épillets dans les

différents milieux de culture sans désinfection. Durant les essais, aucune contamination de ces matériels n'a été relevée.

Composition des milieux de culture

Les milieux de culture de base utilisés sont celui Murashige et Skoog (MS) additionnés de 30 g/L de saccharose, des vitamines de Morel et Wetmore (1951) et 100mg/l de Myoinositol et 100mg/l d'acide ascorbique (De Touchet *et al.*, 1991). Les différents milieux de culture ont les compositions hormonales suivantes :

- M 0 : MS de base
- M 0CA : 0 mg/l de 2,4-D + 3g/l charbon actif
- M 30CA : 30 mg/l de 2,4-D + 3g/l charbon actif (Demasson *et al.*, 1981)
- M 10AZA : 10 μ M de 5- Azacytidine (Siroky *et al.*, 1998)
- M IBA- BAP : 1 mg/l IBA et 1 mg/l BAP (Masmoudi *et al.*, 2008)
- M IBA 1 mg/l
- M BAP 1 mg/l
- M ANA 54 μ M

Les milieux sont solidifiés à l'aide de l'agar 0,8%. Le pH des milieux est ajusté à 5,8 puis les milieux sont autoclavés à 112°C et à 0,12MPa pendant 20 min.

Conditions de culture *in vitro*

Les explants floraux ont été mis en culture dans des tubes à essais et ont été incubées à l'obscurité dans une chambre de culture thermostatée à 27 °C \pm 1 °C et avec une hygrométrie relative de 30 à 40 %. Les explants ont été cultivés dans les différents milieux pendant huit semaines. Puis, les explants floraux ayant réagis ont été fixés en vue d'une étude histologique.

IV. Histologie classique

Les différents échantillons floraux récoltés (bourgeon indéterminés, bourgeon indéterminé et jeune inflorescence) ont été aussitôt fixés à l'aide de paraformaldehyde (PFA) 4 % - Tampon de phosphate (phosphate-buffered saline ou PBS) 2X. Pour une meilleure pénétration du fixateur dans les tissus floraux, plusieurs opérations de mise sous vide pendant 10 à 15 minutes chacune ont été opérées avant de laisser les échantillons dans le fixateur pendant 16h au minimum à 4°C. Ensuite, les échantillons ont été rincés dans des solutions de PBS 1X-glycine puis PBS 1X. Ils sont ensuite déshydratés par une série de solution d'éthanol (30, 50, 70, 80, 90 et 100 %, v/v). Puis, ils sont transférés dans du butanol absolu pour une durée d'une semaine à plusieurs mois en fonction de la taille des organes. Ils sont finalement inclus dans la résine (Technovit, LKP Pharmacia, Suède). Des coupes histologiques de 3.5 µM ont été réalisées à l'aide d'un microtome rotatoire (Microm HM 355 S). Les coupes ont été doublement colorées avec du réactif de Schiff acide périodique (Sigma-Aldrich, France) et du Naphthol blue-Black (NBB, Sigma-Aldrich, France). Les observations ont été réalisées à l'aide du microscope Leitz DMRB équipé d'une caméra Leica DFC300FX. Les observations ont été effectuées sur des échantillons de plantes différentes. Trois répétitions ont été effectués et les planches photographiques sélectionnées par stade sont représentatives des tissus observés.

V. Microscopie électronique à transmission (MET)

Les fleurs à différents stades de développement prélevées pour l'étude ultrastructurale ont été fixés dans du glutaraldehyde à 4% dans un tampon cacodylate de sodium 0,1M pH 7,2 pendant 5 heures à 4°C. Ensuite, trois rinçages ont été réalisés dans le même tampon. La post-fixation a eu lieu dans le tétr oxyde d'osmium dilué à 1% dans du tampon cacodylate pendant 1h à 4°C. Suite à cette post-fixation, trois rinçages dans le tampon cacodylate ont été réalisés. Les échantillons ont ensuite été déshydratés dans des solutions d'acétone en série de gradient acétone /eau (50, 70, 90 100%). Les échantillons ont ensuite été imprégnés dans de la résine époxy TAAB 812 avec un gradient dans l'acétone : 25, 50, 75% puis 100% résine selon la méthode décrite par Glauert (1975). L'inclusion dans la résine à 100% à lieu pendant 1 nuit à 56° C. Des coupes fines de 60 nm d'épaisseur ont été réalisées et déposées sur des grilles de cuivre 50 mesh revêtues d'un film de collodion carboné. Elles ont été contrastées à l'acétate d'uranyle à 5% (dans l'eau) puis dans une solution aqueuse de citrate de plomb. Enfin, les

observations ont été réalisées au Microscope Electronique à Transmission (MET) Jeol 100CXII à 80 KV (CIRAD, Baillarguet).

VI. Microscopie électronique à balayage (MEB)

Des fleurs mâles et femelles de différents stades de développement ont été fixées selon le protocole d'histologie classique décrit précédemment. Les échantillons ont été déshydratés par des bains successifs d'éthanol 30° et 70°, d'une durée de 2 heures chacun. Après dissection sous la loupe binoculaire des sépales et pétales, les échantillons ont été déshydratés dans un bain d'éthanol pur (30 min) suivi de 2 min dans un bain de hexamethyldisilazine (HMDS). Les échantillons sont ensuite ombrés à l'or palladium (fine couche de 10nm) et examinés à l'aide d'un microscope électronique à balayage Hitachi S4000 au Centre de Ressources en Imagerie Cellulaire à Montpellier.

VII. Immunolocalisation du groupement cytosine méthylée de l'ADN

Les fleurs prélevées à différents stades de développement fixés dans le PFA (paraformaldehyde) 4 % - 2X PBS (Tampon de phosphate) puis ont été coupées à 15 µm d'épaisseur à l'aide d'un vibratome (Microm HM 650 V) puis rincés au PBS 1X. Les tissus ont été incubés pendant 1 nuit à 4°C sous agitation dans une solution de Sérum Veau Foetal à 6% afin de saturer les sites non spécifiques. Les échantillons ont été traités avec une protéase (pepsin P6887, Sigma, France) pendant 15 minutes à 37°C, afin de détruire toutes les protéines autour de l'ADN, et de permettre un accès plus facile de l'anticorps à l'ADN. Ensuite, les échantillons ont été immergés dans une solution de formamide à 80°C pendant 3 minutes afin d'assurer la dénaturation complète de l'ADN.

Les échantillons ont ensuite été incubés dans une solution contenant un anticorps primaire dilué au 1/200. Pour l'étude de la méthylation de l'ADN des noyaux des cellules des organes sexuels, un anticorps primaire 5 - méthyl cytidine (ab 10805-50 Abcam) dilué dans le TNB (amortisseur Tris-HCl et NaCl) a été appliqué. Celui-ci reconnaît le groupement méthyle de l'ADN et s'y fixe. L'incubation avec l'anticorps primaire *souris* dure 1 nuit à 4°C sous agitation et est suivi de 4 rinçages au TNB froid (5min chacun).

Puis l'incubation avec l'anticorps secondaire spécifique *antisouris* couplé au marqueur fluorescent Alexa 488 (*Molecular Probe* ; Alexa 488 goat antimousse PGAMOTTGY 488) et dilué au 1/400 est réalisée pendant 1h à 37°C. Les coupes sont ensuite lavées 4 fois (10 min pour chaque lavage) dans du TNB froid toujours à l'obscurité pour éviter l'affaiblissement du signal fluorescent par la lumière. Les échantillons ont été colorés au DAPI dilué à 1/200 et puis montés entre lame et lamelle dans une solution de montage antifading constituée de Mowiol (12 g de glycérol, 4,8 g de Mowiol, 24 ml de Tris 0,2 M à pH 8,5 pour un volume final de 45 ml).

Les préparations (coupes marquées et montées entre lame et lamelle) ont été observées en microscopie confocale (Axioplan 2 imaging Zeiss LSM 510 Meta) du CRBM15 de Montpellier.

Les observations à différents grossissements ont nécessité l'utilisation de trois objectifs (x 40, x 63) à immersion d'eau, combinés à des filtres adéquats. Les longueurs d'onde d'excitation des deux fluorochromes utilisés, à savoir l'Alexa 488, le DAPI sont respectivement de 488 et 359 nm. L'autofluorescence des tissus des fleurs de palmier dattier est observée en dehors du spectre de référence de l'Alexa 488, cela explique le choix de ce fluorochrome.

Un logiciel LSM d'analyse d'images et permettant déterminer les pixels contenant l'émission de deux fluorochromes à la fois est utilisé pour les observations photoniques ainsi que pour la reconstitution d'une série d'images.

Pour les expériences, pour chaque stade et chaque sexe, nous avons utilisés 5 fleurs différentes provenant de différents individus. La méthylation d'ADN est évalué à raison d'une trentaine de cellules par primordia et par sexe. Trois répétitions ont été réalisées pour s'assurer de la reproductivité des résultats.

VIII. Hybridation *in situ*

Les inflorescences de palmier dattier, placées dans le tampon de fixation (4% paraformaldéhyde, tampon phosphate 0,1M; pH 7), ont été fixées pendant 16 heures à température ambiante. Les échantillons ont été alors déshydratés par des bains successifs d'éthanol pendant 1 heure chacun (10, 30, 50, 70, 90, 100% v/v) puis dans du butanol pendant 2 jours. Les échantillons ont ensuite été inclus dans la paraffine (Paraplast X-Tra, Oxford Labware) et coupés à 7µm à l'aide d'un microtome (HM355S, Microm). Les coupes ont été déparaffinées avec du safesolv (LaboNord France), réhydratés par des bains successifs d'éthanol (100, 70, 50, eau DEPC) puis traités la Protéinase K (0,1U/mL dans 0,1 M Tris-HCL pH 7,5) à 37°C pendant 15 minutes. La digestion a été stoppée par des lavages au PBS+0,2% glycine puis 2 fois au PBS 1X pendant 2 minutes. Après une déshydratation des échantillons par des bains successifs d'éthanol, l'hybridation a été réalisée à 42°C pendant une nuit avec 0,2 µg/ml de la sonde ARN spécifique H4 marqué à la digoxigénine dans une solution d'hybridation (50% formamide, 2X SSC, 4X Denhardt, 20% Dextran, 2mg/mL tRNA). Après hybridation, les lames ont été lavées une fois dans du 2X SSC à 50°C pendant 45 min et 2 fois dans du 1X NTE (Tris HCl 1mM, NaCl 0,5M, EDTA, 1mM pH 7,5) à 37°C pendant 2 min. Une digestion à la RNase (20µg/ml dans le tampon NTE) a été réalisée pendant 30 min à 37°C et stoppée dans du NTE à 37°C. Des lavages ont ensuite été réalisés dans du SSC 2X, SSC 1X et SSC 0,5X pendant 15 min chacun et à 50°C. Les sites aspécifiques ont été bloqués dans une solution de blocage (« blocking agent » Roche; 10% dans le tampon PBS) pendant 1 heure puis les échantillons ont été mis en présence de l'anticorps anti-DIG couplé à la phosphatase alcaline (Roche) dilué au 1/500 pendant 30 min dans la solution de blocage. Les anticorps en excès ont été éliminés par 3 rinçages successifs de PBS. Après équilibration dans du tampon de coloration (100 mM Tris-HCl pH 9,5, 100 mM NaCl, 50 mM MgCl₂), les échantillons ont été mis à incuber dans le même tampon complété avec 0,2 mM NBT and 0,2 mM BCIP jusqu'à révélation d'un signal pourpre. Les coupes ont été observées à l'aide du microscope Leitz DMRB équipé d'une caméra Leica DFC300FX

Chapitre 1 : Le développement reproducteur du palmier dattier

Le palmier dattier se caractérise par sa croissance lente et par sa longévité (plus de 100 ans). Le sexe de la plante n'est identifiable qu'à partir de sa première floraison qui se produit en moyenne entre 3 et 8 ans d'âge. Pendant la floraison, les bourgeons axillaires situés à l'aisselle des palmes adultes évoluent en organes reproducteurs ou inflorescences (Bouguédoura, 1991). Au Sahel, la baisse des températures, l'arrivée des saisons des pluies estivales et la hausse du niveau des nappes phréatiques ont été cités comme déterminantes pour l'induction florale chez le palmier dattier (Jahiel et al., 1996). Dans les zones de culture traditionnelle comme le Maghreb, il a été proposé que la floraison du palmier dattier serait liée à la diminution de l'activité végétative pendant la période hivernale (Saaidi, 1979).

Même si le palmier dattier revêt une importance agro-économique considérables pour les pays du Sud, les connaissances disponibles sur le mécanisme de régulation de sa floraison restent très limitées. Aucune donnée n'est rapportée sur les différents facteurs endogènes et exogènes influençant l'induction florale pour les zones de culture traditionnelle ainsi que pour les zones de culture marginales comme Djibouti, Soudan, Mali, etc. De plus, peu de données existent sur la cinétique de développement des inflorescences à l'aisselle des palmes ainsi que le nombre d'inflorescences émis par an. Chez le palmier à huile, le développement inflorescentiel dure plus de 2 ans, mais au moment où ce projet de thèse a démarré, aucune étude similaire n'avait été réalisée chez le palmier dattier. Dans ce contexte, l'objectif de ce chapitre est d'apporter, en étudiant les caractéristiques du cycle de floraison à Djibouti, des réponses aux questions sus mentionnés sur le mode d'induction florale ainsi que sur la cinétique de production inflorescentielle.

I. Floraison du palmier dattier

Pour déterminer les caractéristiques du cycle de floraison des palmiers dattiers à Djibouti, nous avons effectué :

- Des observations sur la production inflorescentielle d'un peuplement de palmier dattier durant deux saisons de floraison consécutives (2009 et 2010) dans les palmeraies d'Ambouli situé à proximité de la ville de Djibouti (figure 19). Ce peuplement comprend 149 individus, dont 107 femelles et 42 mâles. Un suivi bimensuel de l'émergence des inflorescences a été effectué durant toute la période de floraison. Puis, des dissections à l'échelle individuelle ont été opérées à différents moments pendant la saison de floraison.
- Un suivi météorologique à l'aide de la station météo de l'aéroport d'Ambouli, situé à 3 km des palmeraies, qui a permis d'enregistrer les variables climatiques (températures moyenne journalière; pluviométrie) du site d'observation.

L'ensemble des données acquises lors des observations phénologiques a permis d'apporter des éléments de réponses à ces questions :

- Quels sont les facteurs climatiques susceptibles d'influencer l'induction florale chez le palmier dattier ?
- Quelles sont les étapes-clé de la cinétique de la production des inflorescences ?
- Quelle est la durée du développement d'une inflorescence ?

A. L'induction de la floraison

Nous avons cherché à comprendre les facteurs qui influencent l'induction florale chez le palmier dattier.

Les caractéristiques morphologiques du palmier dattier comme la grandeur de sa taille et la haute protection des inflorescences par les palmes de la couronne rendent difficiles l'identification précise de la date de l'initiation inflorescentielle, et donc de l'initiation florale. C'est pourquoi l'apparition des inflorescences dans les axils des feuilles est généralement utilisée comme le premier point indicatif d'entrée en floraison du palmier dattier (figure 20).

Les facteurs exogènes

La superposition de la courbe de l'évolution de la température et celle du cycle floral des palmiers dattiers suggèrent que la date de début de floraison pourrait dépendre des conditions climatiques pendant les mois les plus frais de l'année au cours desquels les températures sont les plus basses (figure 21). Sachant que le début de cycle de floraison correspond à la première émergence

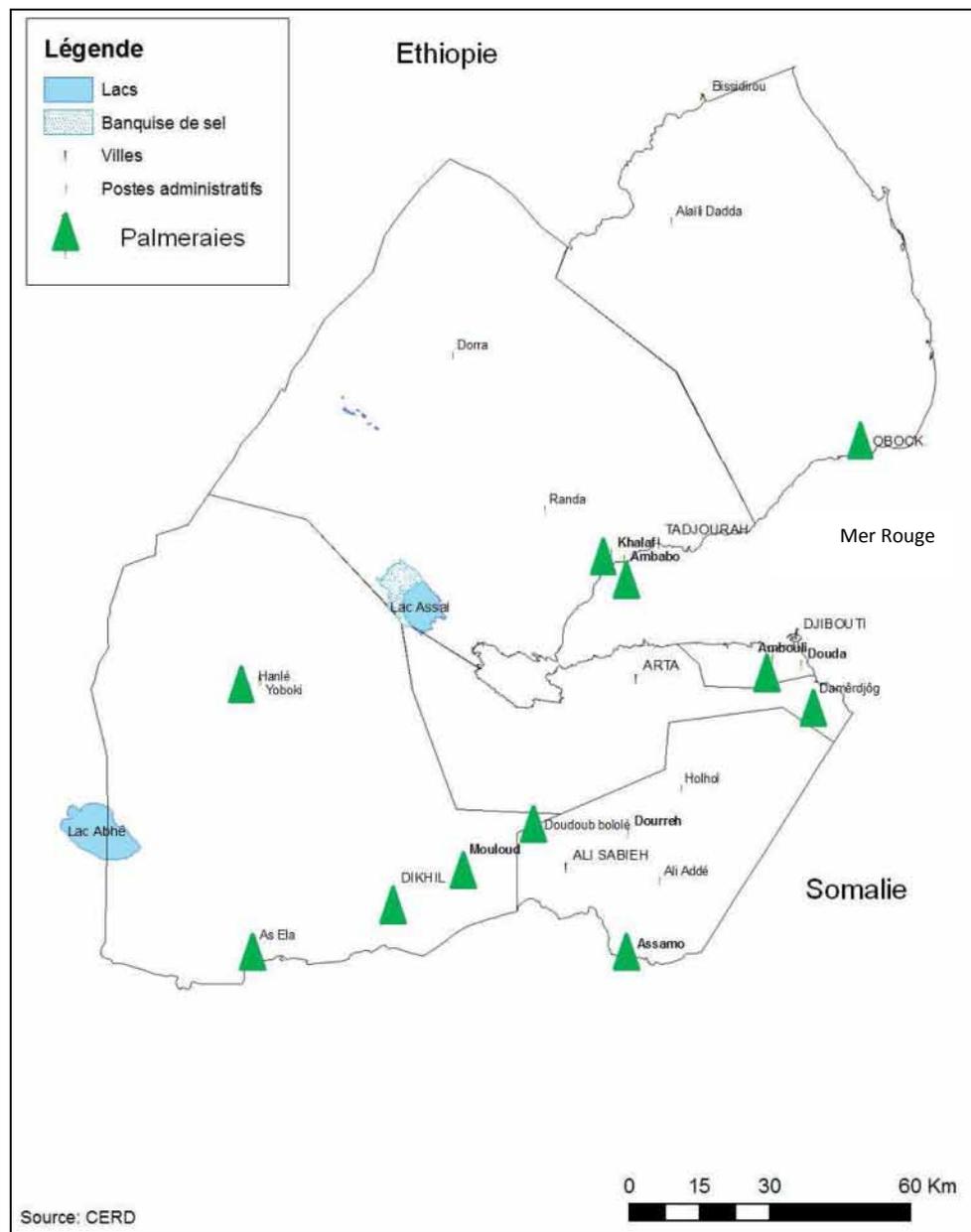


Figure 19 : La localisation des principales palmeraies de Djibouti.

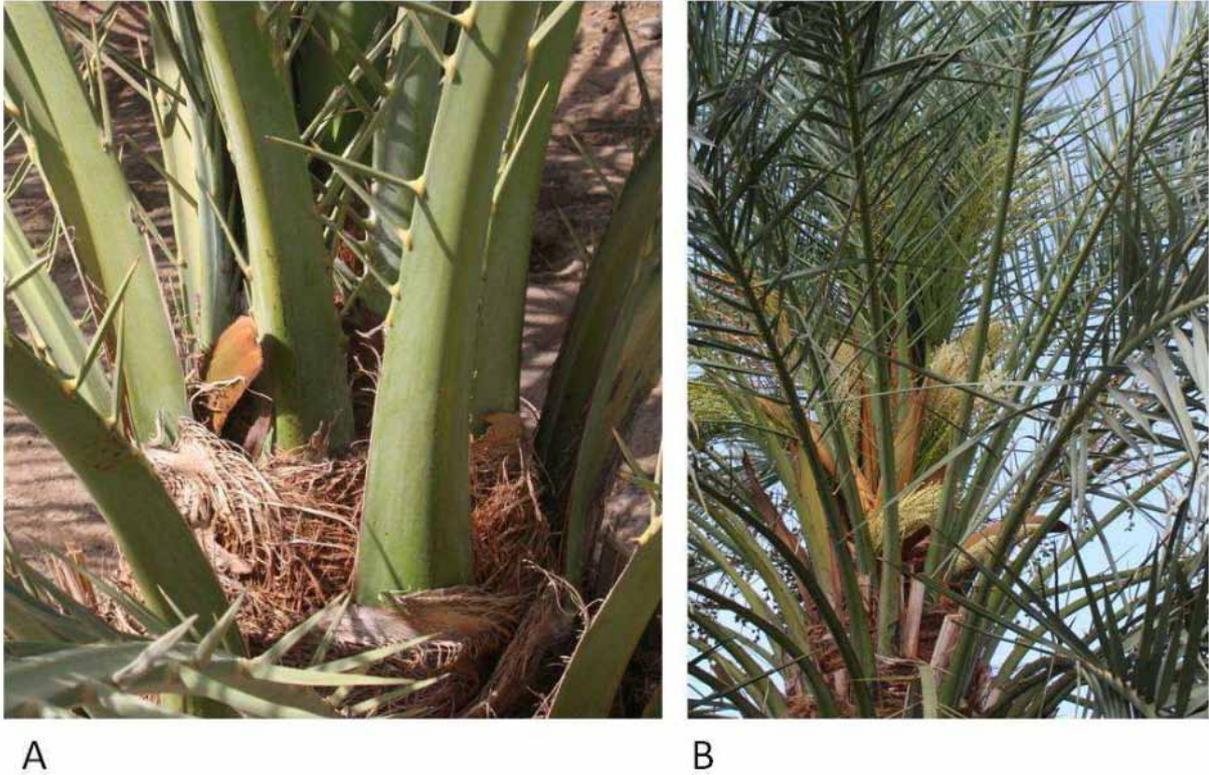


Figure 20 : Palmier dattier en cours de floraison. A : Les inflorescences en début d'émergence. B : Les inflorescences après ouverture de la spathe.

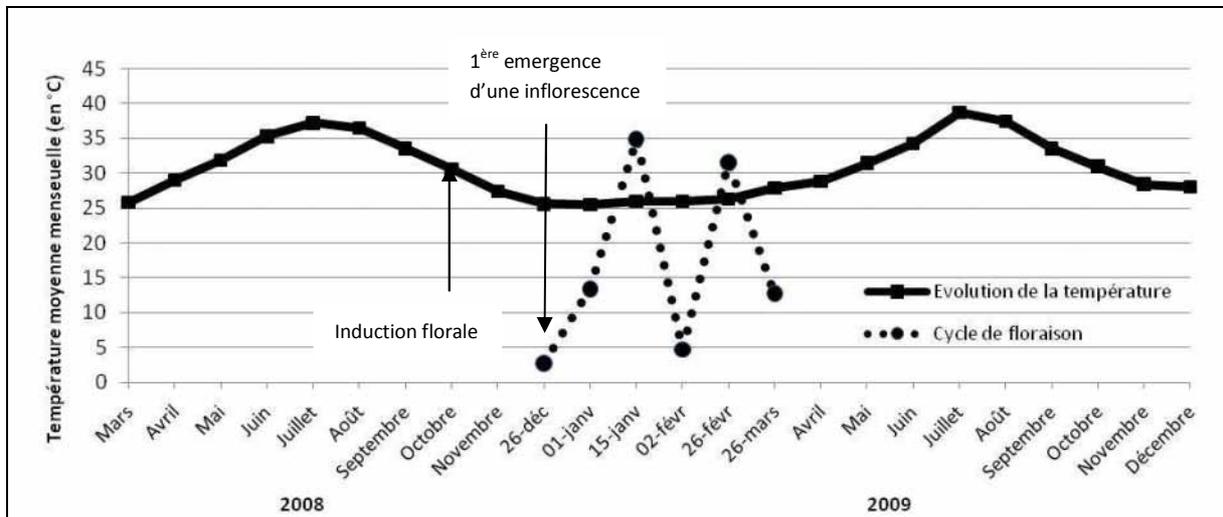


Figure 21 : Evolution de la température pendant l'année et de l'émergence des inflorescences de palmier dattier à Djibouti. Les fluctuations de température permettent de distinguer deux saisons principales : la saison fraîche d'octobre à avril avec une température moyenne de 26°C et la saison chaude de mai à septembre avec une température moyenne de 38°C. L'induction florale intervient pendant la baisse des températures.

visible d'une inflorescence, pour repérer le début de l'induction florale il faut prendre en compte le temps d'élongation de cette inflorescence que Jahiel (1996) a estimé à 50 jours. Soit une induction florale qui aurait lieu vers mi-octobre. Cette date coïncide avec la baisse des températures. De plus, aucune pluviométrie n'est enregistrée durant le mois d'octobre. Ces résultats confortent l'hypothèse d'une relation entre l'induction de la floraison et la diminution de la température chez le palmier dattier. **Dans les conditions environnementales de Djibouti, la baisse des températures constitue le principal facteur exogène qui serait associé à l'induction de la floraison.**

Les facteurs génétiques

Le suivi de l'émergence des inflorescences des 149 palmiers issu de graines a permis de déterminer la durée de la période de floraison ainsi que la fréquence et la date d'émission des inflorescences.

La figure 22 montre l'évolution de l'émergence des inflorescences pendant la période de floraison. On observe que la floraison débute mi-décembre par la première apparition de spathe et s'achève à la fin du mois d'avril ; elle s'étale donc sur une durée de 4 à 5 mois environ. Cette floraison est courte et se produit sur une seule période annuelle.

De plus, le pattern de floraison de ces palmiers présente un profil bimodal avec deux pics d'émission inflorescentielle bien distincts (figure 22 ; figure 23). La première série d'émission se produit vers mi-janvier et la seconde vers la fin février. Les palmiers dattiers présentent quatre comportements différents durant la période de floraison (figure 22) :

- les floraisons précoces
- les floraisons tardives
- les doubles émissions florales
- les floraisons intermédiaires

Les palmiers précoces représentent 39 % de la population et fleurissent entre la fin décembre et la fin du mois janvier de l'année suivante alors que les inflorescences des palmiers à floraison tardive (37 %) émergent entre la fin février et la fin du mois de mars (Tableau 4). Les palmiers qui présentent un seul pic d'émission floral précoce ou tardif sont majoritaires (76 %) (Tableau 3). Les palmiers qui présentent une double émission florale représentent environ 14 % de la population. Le dernier groupe à floraison intermédiaire comprend une dizaine de palmiers (10 %) qui fleurissent pendant la période de ralentissement de la production florale globale, entre la fin du mois janvier et la fin du mois février.

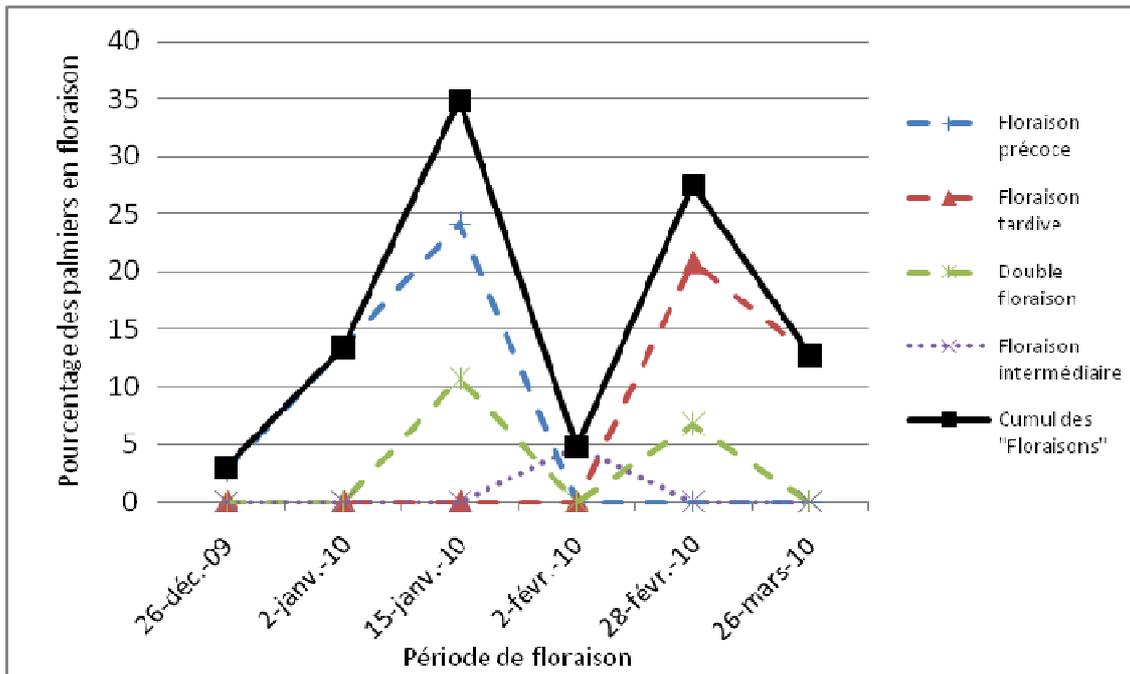


Figure 22 : Période de floraison des palmiers dattier à Djibouti.



Première émergence inflorescentielle vers mi-janvier

Seconde émergence inflorescentielle vers fin -février

Figure 23 : Palmier dattier à double émission florale. Les fruits issus de la première émission florale sont en stade khalal alors que les fleurs de la seconde émission florale sont à l'anthèse.

Tableau 5: Types de floraison des individus de palmier dattier à Djibouti

Type de floraison	Pourcentage des palmiers dattiers en floraison		
	Mâles	Femelles	Total
Précoce ou première émission inflorescentielle (vers mi-janvier)	31	46	39
Tardive ou seconde émission inflorescentielle (vers fin février)	38	37	37
Double émission florale	17	11	14
Intermédiaire (entre fin janvier et fin-février)	14	6	10

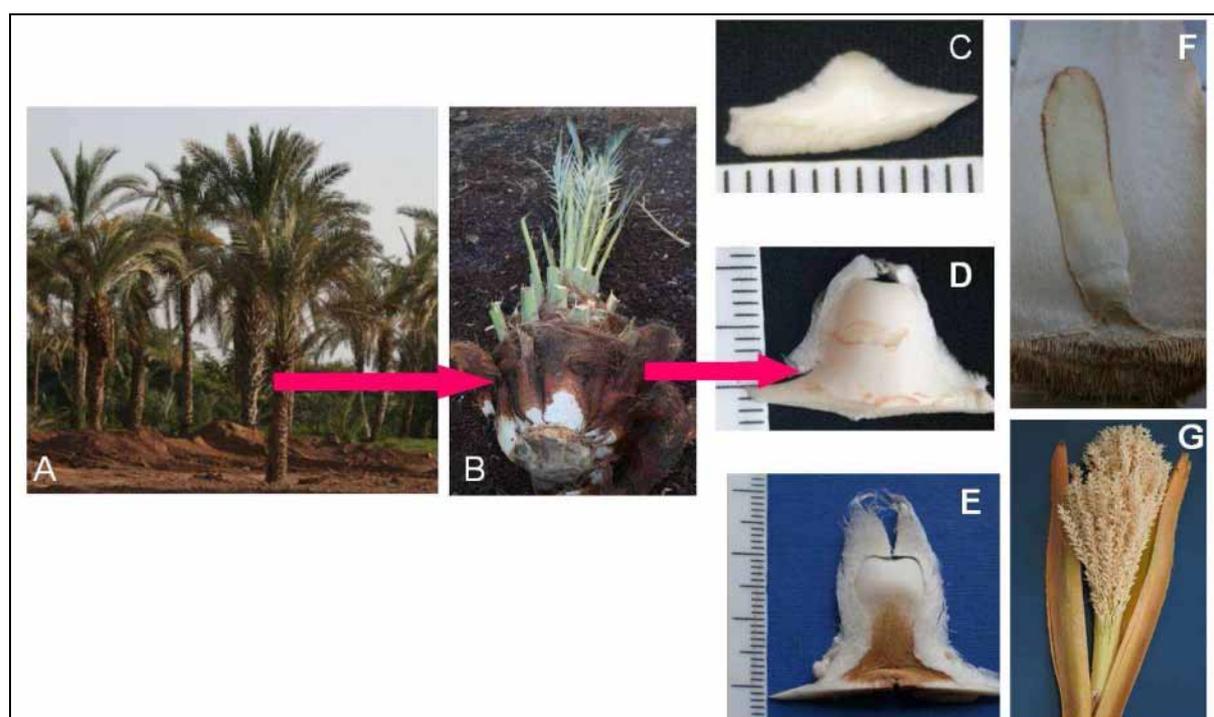


Figure 24 : Schéma de dissection d'un palmier. A : palmier adulte ; B : palmier disséqué ; C : bourgeon indéterminé; D : bourgeon inflorescentiel ; E : bourgeon inflorescentiel avorté ; F : palme portant à son aisselle une jeune inflorescence entourée de la spathe ; G : inflorescence mature à l'anthèse.

Ces différents comportements n'ont pas pu être reliés à un environnement donné mais dépendraient plutôt du génotype des individus.

Il est intéressant de noter que les mâles montrent une floraison plus précoce d'une à deux semaines et une aptitude plus élevée pour la double émission florale, soit 17 % contre 11 % chez les individus femelles (tableau 5). En revanche, presque la moitié des palmiers femelles (46 %) ont une floraison précoce.

En conclusion, les résultats de nos observations montrent que l'induction florale du palmier dattier peut varier en fonction des génotypes (précocité, tardivité ou double) ainsi que du sexe.

B. Cinétique de développement des inflorescences

Différents types de bourgeons

La dissection complète de la couronne foliaire opérée sur une trentaine d'individus mâles et femelles nous a permis d'observer précisément la production axillaire d'un palmier pendant la période de floraison. Les dissections ont eu lieu à différents moments durant la floraison afin d'identifier un maximum de stades de la morphogenèse inflorescentielle. Lors de la dissection, tous les bourgeons axillaires ont été prélevés de la palme la plus externe vers la palme la plus interne (figure 24).

Nos résultats montrent qu'un palmier dattier adulte produit quatre types de bourgeons axillaires (figure 24):

- des bourgeons indéterminés à l'aisselle des palmes non chlorophylliennes (figure 24c). Ils ont une forme triangulaire et une structure tendre et très fragile. Leur longueur est généralement inférieure à 0,5 cm et leur diamètre varie de 0,5 à 1 cm. Leur morphologie conforte l'idée que le bourgeon indéterminé serait la structure originelle.
- des bourgeons inflorescentiels à l'aisselle des palmes chlorophylliennes avec des folioles non ouvertes (figure 24d). Ils ont une forme trapézoïdale et une structure compacte (figure 24d). Leurs dimensions varient de 2 à 3 cm en hauteur et de 1 à 2 cm en largeur. Leur nombre varie de 10 à 30 selon l'individu et les conditions environnementales.
- des bourgeons inflorescentiels avortés à l'aisselle des palmes adultes chlorophylliennes et étalées (figure 24 e,f)

- des inflorescences à l'aisselle des palmes adultes chlorophylliennes avec des palmes étalées (figure 24g)

La nature du bourgeon axillaire semble donc dépendre de l'état de développement de la palme. Le passage du bourgeon de l'état indifférencié à l'état inflorescentiel correspondrait à l'ouverture et à l'étalement de la palme.

Nombre d'inflorescences émises

L'ensemble des 36 dissections montrent que les palmiers dattiers mâles et femelles étudiés émettent en moyenne 9 et 12 inflorescences respectivement (figure 25 a,b). Nous avons constaté que le nombre d'inflorescences émises peut varier en fonction du sexe, des conditions d'environnement (disponibilité en eau, terre arable) et des pratiques culturales (élagage des palmes). Par exemple, les individus femelles (DF7, DF14) ou mâles (DM5, DM8) se distinguant par leur nombre d'inflorescence élevé sont issus des palmeraies bien irriguées et correctement entretenues. De plus, ils n'ont subi aucun élagage des palmes et portent une couronne foliaire importante.

L'examen des patterns d'émergence des inflorescences à l'échelle individuelle montre la présence d'une grande hétérogénéité dans l'émergence entre les individus de palmier dattier (figure 26). Les différents profils d'émission inflorescentielle observés sont les suivants :

- les inflorescences peuvent émerger l'une après l'autre de la palme la plus âgée vers la palme la plus jeune (figure 26a).
- les inflorescences émergent l'une après l'autre de la palme la plus jeune vers la palme la plus âgée (figure 26b).
- les premières inflorescences émergent simultanément à l'aisselle des palmes les plus jeunes et les plus âgées et les inflorescences tardives sont portées par les palmes intermédiaires (figure 26c).
- Les inflorescences émergent simultanément à l'aisselle de toutes les palmes actives (figure 26d).

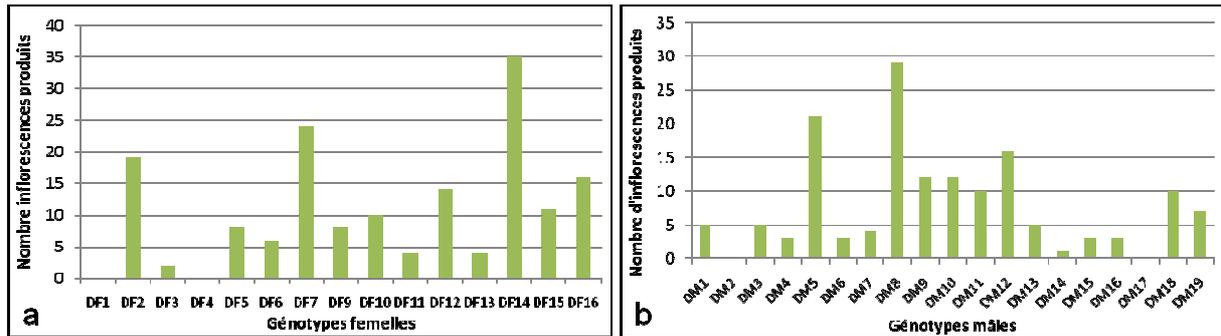


Figure 25 : La production d'inflorescences des palmiers dattiers adultes pendant l'année 2008 /2009. Production inflorescentielle des mâles (a) et des femelles (b). Nombre moyen d'inflorescences produit est de 9 pour les mâles et de 12 pour les femelles. On observe une grande variabilité génotypique dans la production inflorescentielle. Il n'y a pas de différence significative entre la production inflorescentielle des mâles et celle des femelles

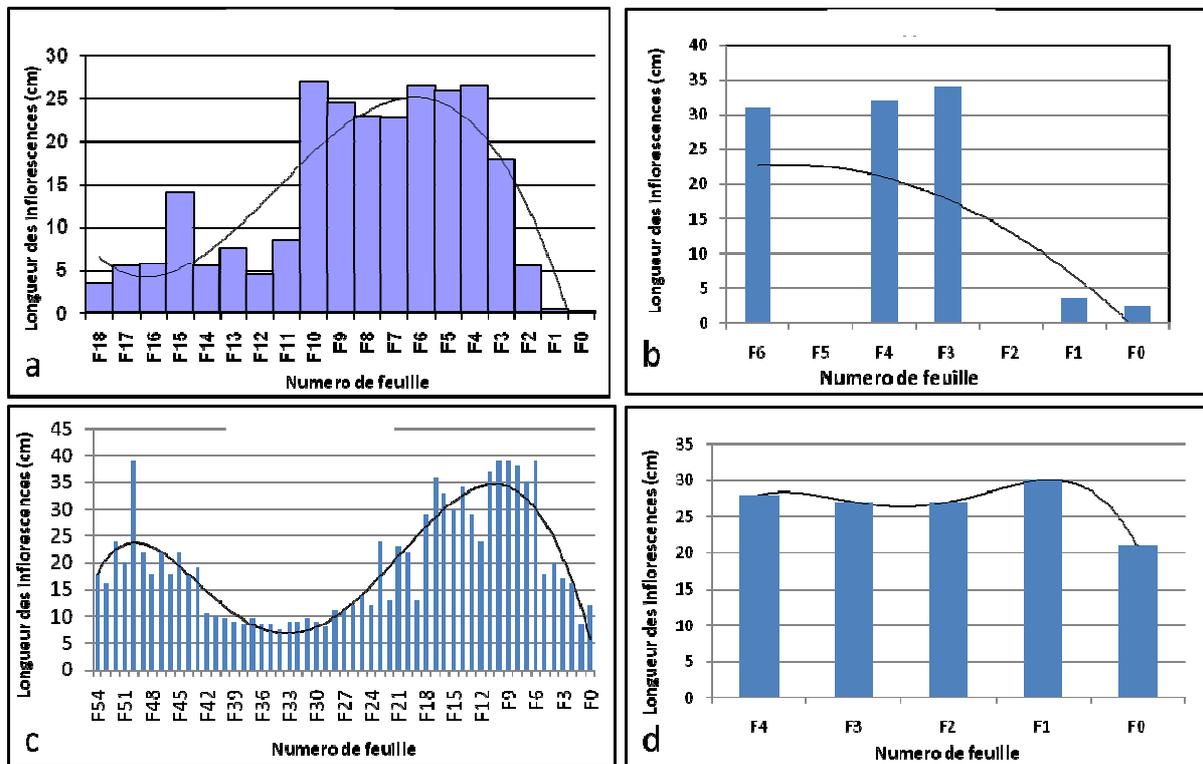


Figure 26: Cinétique de production inflorescentielle. L'émergence des inflorescences peut s'effectuer selon un gradient bien défini (a et b) ou de façon très hétérogène (c-d).

Pattern de développement des inflorescences

La figure 27 montre un schéma de la distribution des bourgeons axillaires à l'aisselle des palmes de la couronne à un moment donné de la vie de la plante, au moment de la dissection. L'analyse de cette distribution de la couronne vers le cœur du palmier nous indique que :

- les palmes les plus externes portent les vestiges des inflorescences de l'année précédente
- les palmes suivantes portent les inflorescences produites au cours de l'année
- les palmes internes portent les bourgeons inflorescentiels
- les palmes les plus internes portent les bourgeons indéterminés.

Il est intéressant à noter la présence de bourgeons inflorescentiels avortés, soit au sein d'une série d'émissions inflorescentielles, soit entre deux émissions inflorescentielles de deux années consécutives. De plus, cette analyse montre que pour chaque floraison un certain nombre de palmes est recruté pour produire des inflorescences. Deux questions se posent donc : de quel bourgeon (indéterminé ou inflorescentiel) provient l'inflorescence ? Quelle est la durée de développement d'une inflorescence ?

L'analyse de cette distribution ainsi que les observations réalisées lors des dissections nous permettent de répondre à ces questions et de proposer l'hypothèse d'une évolution en deux temps (figure 27):

- Le bourgeon indéterminé évolue en bourgeon inflorescentiel. C'est une phase longue qui peut durer plusieurs années. Pendant cette phase, le bourgeon indéterminé croît en épaisseur et en taille et devient bourgeon inflorescentiel. La taille des bourgeons inflorescentiels varie en fonction de l'état du développement des palmes axillantes. Les palmes les plus internes peu étalées portent des bourgeons inflorescentiels peu développés avec un court pédoncule. Ainsi l'évolution d'un bourgeon indéterminé vers un bourgeon inflorescentiel ne dépendrait que des facteurs endogènes de type nutritionnel (photosynthèse de la palme).
- Le bourgeon indéterminé évolue en jeune inflorescence. Cette transition semble être très rapide, de l'ordre de quelques jours où le bourgeon inflorescentiel connaît un changement morphologique profond. Cette seconde phase correspond à l'acquisition de caractères liés à la reproduction sexuée. Cette transition dépend des facteurs d'induction de la floraison

d'ordre environnementale. Les dissections réalisées en dehors de la période de floraison, en saison chaude, ont montré que les palmiers dattiers ne portaient des bourgeons inflorescentielles et/ou des bourgeons d'inflorescences avortées.

Conclusion

L'ensemble de nos observations phénologiques suggèrent que, dans les conditions d'environnement sahélien, la variabilité de la date de floraison du palmier dattier peut être associée à une baisse hivernale des températures ainsi qu'à un effet génotypique. Le développement des inflorescences montre une cinétique en deux temps : une longue phase d'initiation du bourgeon inflorescentiel et une phase rapide de différenciation de l'inflorescence. Il conviendrait d'investiguer par des études complémentaires les facteurs endogènes ou exogènes dans la régulation de la phase d'induction florale.

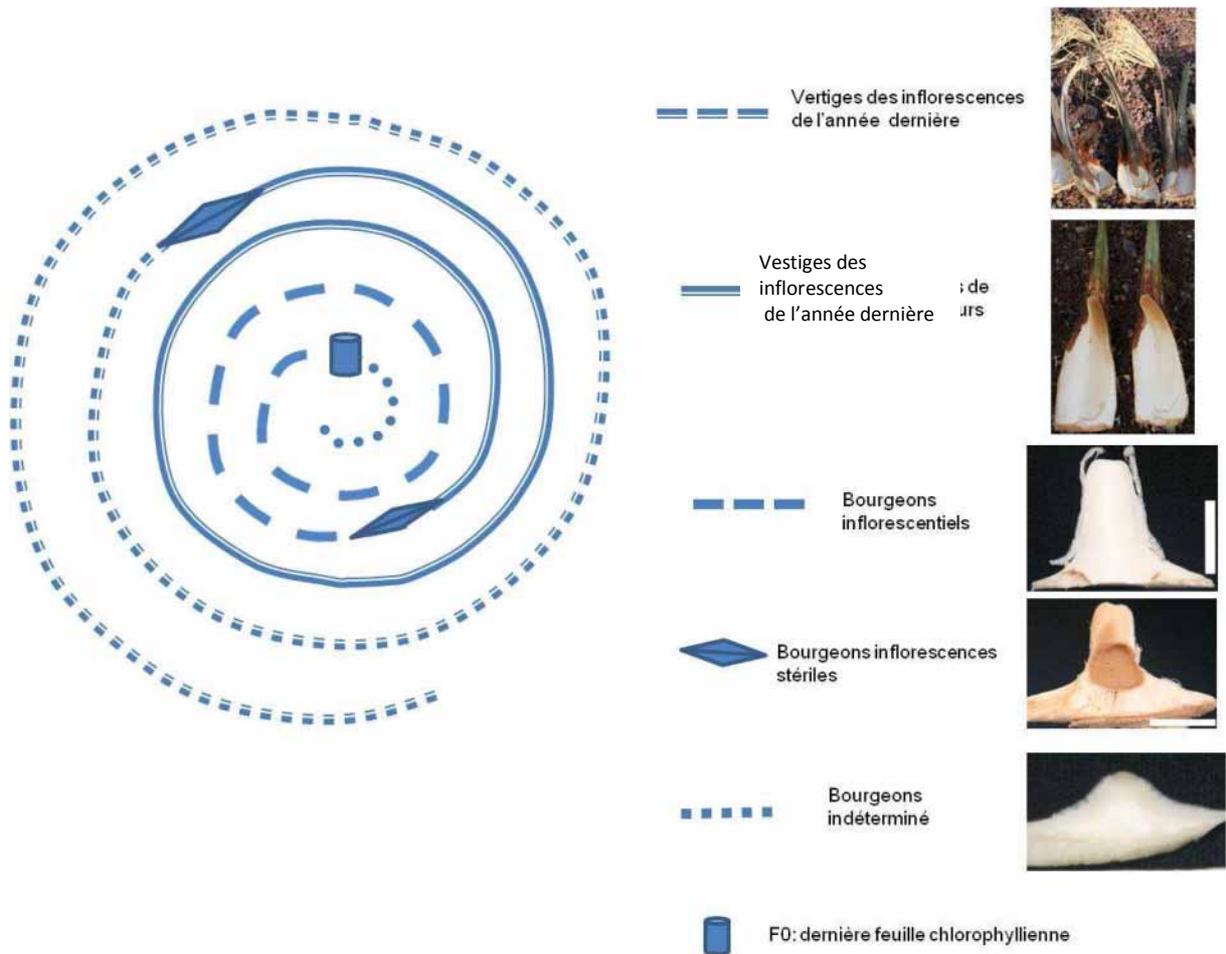


Figure 27 : Schéma de production axillaire d'un palmier adulte mature. Les différentes feuilles portent des bourgeons axillaires différents selon l'état de la palme axillante. Les palmes les plus externes et complètement ouvertes portent les vestiges des inflorescences de l'an passé. Les palmes internes proche de la lancée et aux folioles non ouvertes portent des inflorescences bourgeons inflorescentiels. Entre ces deux types de palmes, on trouve des palmes aux folioles ouvertes qui portent les inflorescences de l'année. Des bourgeons inflorescentiels avortés sont observables très souvent entre deux cycles de floraison consécutifs.

II. Discussion

La floraison du palmier dattier est saisonnière comparativement à d'autres palmiers, comme *Elaeis guineensis* ou *Geonoma epitiolata*, dont la floraison peut s'étaler sur toute l'année (Dransfield et al., 2008). La date de début et la durée de floraison varient en fonction des régions de culture. La nature exacte des facteurs responsables de cette variabilité sont jusqu'à présent malconnus.

Dans les conditions environnementales de Djibouti, le développement inflorescentiel du palmier dattier est très court, de l'ordre de quelques mois à partir de l'apparence du bourgeon inflorescentiel. Il est étroitement relié à l'état de croissance de la palme axillante. Le modèle de développement inflorescentiel du dattier présente des similarités avec celui du palmier à huile tant sur la chronologie de l'émergence inflorescentielle que sur l'organisation structurale de l'inflorescentielle. Cependant, le développement de l'inflorescence du palmier à huile dure 2 à 3 ans et se caractérise par une phase de différenciation très longue (plus de 2 ans) et une phase d'organogénèse florale très courte (4 à 8 mois) (Adam et al., 2005). Il serait intéressant de connaître et de comprendre les mécanismes ou facteurs contrôlent les différentes phases du développement des inflorescences chez le palmier dattier.

Le comportement florifère des palmiers dattiers de Djibouti démontrent l'absence d'une double floraison puisque les deux séries d'émissions florales conduisent à une seule fructification. En effet, les conditions climatiques de Djibouti freinent l'aptitude à réaliser deux cycles de floraison dans la même année. La double floraison observée chez certains cultivars au Niger et au Mali a été également constatée chez un autre palmier apparenté au dattier, il s'agit de *Phoenix reclinata* au Soudan (Munier, 1981).

Nos résultats ont montré que très peu d'individus fleurissent entre les deux pics d'émission alors que les conditions de température sont favorables. La cause de ce comportement demeure inconnue, mais on peut émettre l'hypothèse selon laquelle les facteurs régulateurs de la floraison ne seraient pas réunis pour obtenir une floraison pendant cette période.

Il a été rapporté l'existence d'un seuil de sensibilité individuel aux facteurs inducteurs de la floraison (Munier, 19734). Cela pourrait expliquer la grande variabilité de la fréquence et de la cinétique de production inflorescentielle constatée entre les individus de palmier dattier. L'induction florale apparait également dépendante des facteurs intrinsèques tels que la photosynthèse (masse végétale critique), la nutrition et les hormones (Bouguédoura, 1990).

Depuis plusieurs décennies, le Sahel connaît une baisse progressive des pluviométries et des sécheresses accrues. De plus, face à la variabilité des conditions climatiques et pour s'assurer des rendements suffisants, les paysans doivent choisir des variétés adaptés. Dans le cas du palmier dattier, la précocité de floraison est recherchée non seulement pour des raisons économiques mais aussi pour éviter l'arrivée des pluies estivales qui compromettent la maturation des dattes, et donc la récolte. Des gènes impliqués dans l'adaptation aux différentes conditions climatiques ont été rapportés chez certaines espèces. Chez le riz, il a été montré que la mutation du gène *PHYTOCHROME B* (*PhyB*) conduit à un phénotype de floraison précoce (Takano et al., 2005). Le gène *PHYTOCHROME C* d'*Arabidopsis thaliana* jouerait un rôle important dans les variations de floraison des populations naturelles (Balasubramanian et al. 2006). Par ailleurs, une étude récente a rapporté l'identification chez le mil d'un gène *PHYC*, codant la protéine PHYTOCHROME C, qui serait associé à phénotype floraison précoce et qui jouerait un rôle dans l'adaptation du mil aux différents climats (Saïdou et al, 2009). Dans un tel contexte, il serait intéressant de rechercher les facteurs génétiques contrôlant la floraison chez le palmier dattier, ce qui permettra de sélectionner les variétés les plus précoces.

D'autre part, une étude fonctionnelle des gènes MADS box de palmier à huile a montré la présence des transcrits du gène *EgSQUA1* (*Elaeis guineensis SQUAMOSA 1*) spécifiquement dans les méristèmes inflorescenciels et floraux et pas dans l'apex végétatif (Adam et al., 2007). Dans cette optique, il serait intéressant d'utiliser les connaissances acquises sur le palmier à huile, pour pouvoir déterminer l'identité précise des différents types de bourgeons axillaires rencontrés chez le palmier dattier.

Enfin, cette étude a permis de décrire pour la première fois les conditions associées à la cinétique de développement florale de différents cultivars de palmier dattier à Djibouti. Les connaissances acquises vis-à-vis du volume de production inflorescentielle, ainsi que la date et la durée de l'émission des inflorescences, sont essentielles pour la maîtrise de la production et la gestion des dattes dans les palmeraies. Les études décrites ici seront complétées par des travaux sur la caractérisation génétique et morphologique des cultivars qui est envisagé dans le cadre d'un stage de Master. L'ensemble de ces données contribuera à la préservation du patrimoine phœnicicole local. De plus, les données phénologiques acquises dans les conditions environnementales de Djibouti s'intègrent dans un projet d'établissement d'un modèle global de la phénologie du palmier dattier. Ce dernier a pour objet de récolter des

données phénologiques de différents sites qui, après standardisation, serviront de base à la constitution du modèle phénologique global. Cette démarche permettra à terme de déterminer l'importance respective de la part génétique et environnementale dans la régulation du cycle reproducteur du dattier et dans l'induction florale en particulier.

Chapitre 2 : Etude du développement floral

La précédente étude des paramètres phénologiques de la floraison du palmier dattier nous a permis d'obtenir les premières indications sur l'influence des conditions environnementales sur l'initiation et la différenciation des inflorescences. En revanche, les facteurs endogènes contrôlant le dimorphisme sexuel sont encore inconnus. L'un des obstacles est l'absence d'une description détaillée de la cinétique du développement reproducteur mâle et femelle. Tel est l'objectif de ce chapitre. Afin de caractériser le processus de différenciation sexuelle, le développement reproducteur a été étudié à partir du bourgeon inflorescentiel jusqu'à la maturation des organes reproducteurs (gynécée et androcée). Cette étude nous a permis de définir le stade le plus précoce où le sexe de l'inflorescence est distinguable ainsi que les événements histo-cytologiques accompagnant l'apparition du dimorphisme sexuel de la fleur.

Une étude histo-cytologique de la cinétique du développement de l'inflorescence depuis le bourgeon axillaire originel jusqu'à l'inflorescence mature a été réalisée. De nombreuses dissections de palmiers dattiers en cours de floraison ont été nécessaires pour obtenir l'ensemble des stades de la cinétique du développement de l'inflorescence.

I. La morphogénèse de l'inflorescence

A. L'organisation de la structure de l'appareil reproducteur

La floraison du palmier dattier est de type pléonanthique car les inflorescences naissent du développement des bourgeons axillaires alors que la plante poursuit sa croissance monopodiale grâce à son seul bourgeon végétatif apical. L'organe reproducteur du palmier dattier est une inflorescence composée, sur le plan structural, d'un axe principal ou rachis qui se ramifie en un certain nombre d'axes d'ordre secondaire ou « épillets » qui portent les fleurs solitaires (figure 28). L'ensemble est enveloppé dans une grande bractée ligneuse ou spathe. A l'anthèse, les inflorescences ainsi que les fleurs montrent un fort dimorphisme morphologique (figure 28b-g).

Dans le chapitre précédent, nous avons établi que le bourgeon indéterminé devient bourgeon inflorescentiel avant d'évoluer en inflorescence mature au cours de l'induction florale. Dans ce chapitre, nous avons mené une caractérisation histologique des bourgeons inflorescentiels et des inflorescences afin de rechercher les modifications structurales associées à la transition florale et de caractériser les différents stades de développement de l'inflorescence.

B. La structure d'un bourgeon inflorescentiel

Le terme « bourgeon inflorescentiel » est utilisé ici pour décrire la structure engagée dans la voie du développement floral, avant que la ramification ne soit constatée. Ils sont de structure compacte et de couleur blanc cassé. Ils ont une forme trapézoïdale (figure 29a). Des coupes histologiques réalisées montrent que ces bourgeons inflorescentiels sont organisés en une zone apicale méristématique et une région basale parenchymateuse (figure 29b). Cette dernière zone contient des cellules vacuolisées riches en amidon et de nombreux éléments vasculaires. A ce stade, aucune différence morphologique n'est observée entre les bourgeons inflorescentiels mâle et femelle.

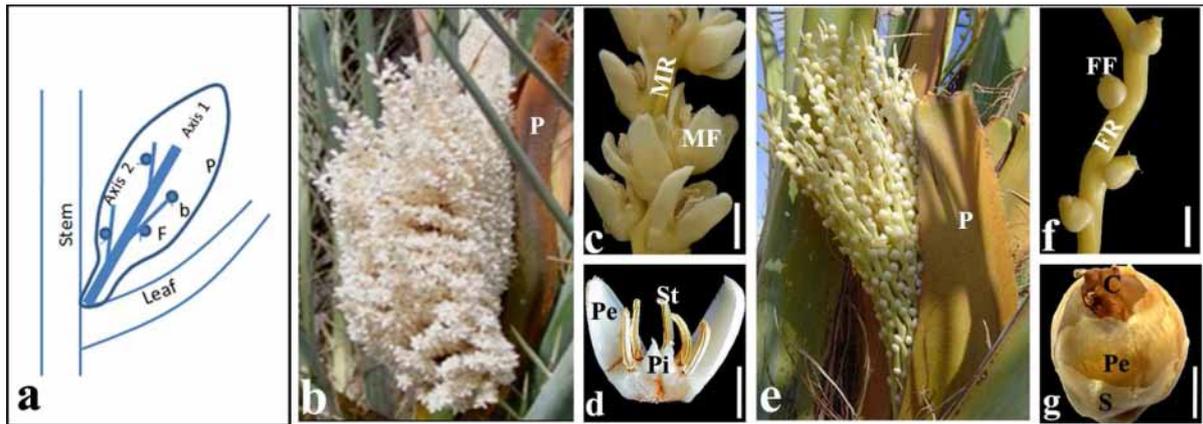


Figure 28 : L'appareil reproducteur du palmier dattier. a : structure de l'inflorescence. b : l'inflorescence mâle à l'ouverture de la spathe ; c : fleurs matures densément distribuées sur l'axe de l'épillet ; d : coupe longitudinale d'une fleur mâle mature ; e : inflorescence femelle à l'anthèse; f : épillet femelle ; g : fleur femelle mature ; les axes 1 et 2 correspondent au rachis et aux épillets respectivement. Abréviations : b: bractée; C:carpelle; F:fleur ; FF: fleur femelle; FM: fleur mâle; FR: épillet femelle; MR: épillet mâle; P:prophyll; Pe:pétale; Pi:pistillode S:sépale; St:étamines. Barres : 500 μ m (c, f) and 250 μ m (d, g).

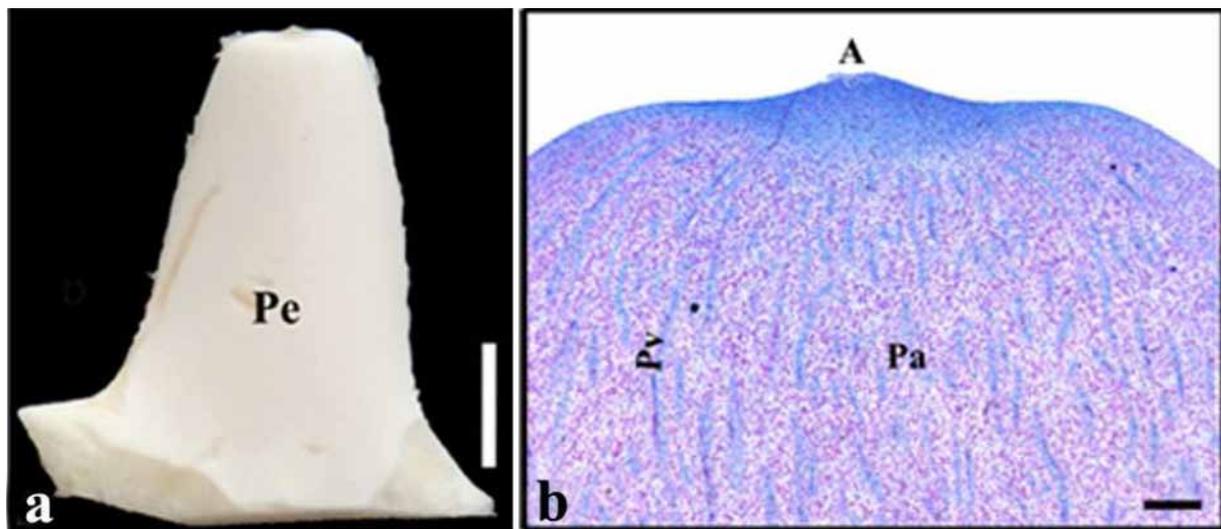


Figure 29: Initiation et développement des inflorescences. a: bourgeon inflorescentiel à l'aisselle des palmes adultes c: coupe longitudinale d'un bourgeon inflorescentiel. Abréviations: A: apex; Pa: Parenchyme; Pe : pédoncule de l'inflorescence Pv: faisceaux provasculaires. Barres: 250 μ m (a); 300 μ m ; 5 mm (b).

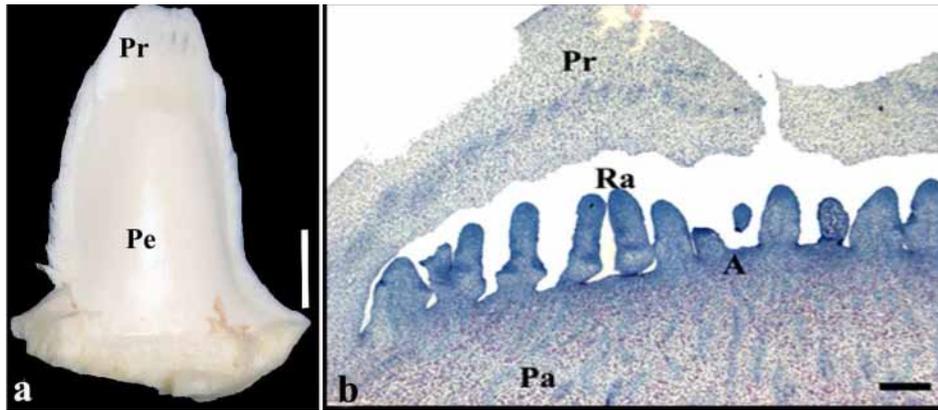


Figure 30 : Jeune inflorescence. a: la plus jeune inflorescence obtenue lors des dissections. On observe l'élongation du pédoncule et la formation de la spathe ; b : coupe longitudinale d'une jeune inflorescence femelle. Abréviations: A: apex; Pa: Parenchyme; Pe : pédoncule de l'inflorescence; Pr: prophyll ou bractée; Ra: rachillae ou épillets. Barres : 300 μ m (e); 5 mm (b).

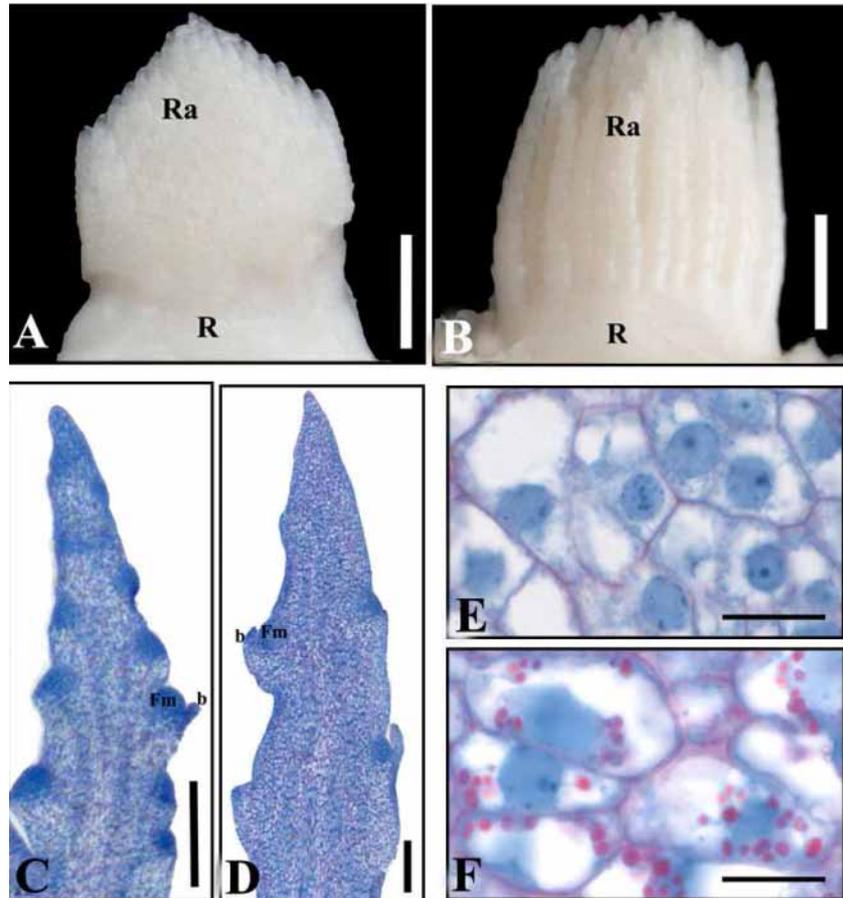


Figure 31 : Jeune inflorescence au stade d'initiation des méristèmes floraux et d'environ 10 mm de longueur; A: inflorescence mâle ; B: inflorescence femelle ; C: coupe histologique d'un épillet mâle ; D: coupe histologique d'un épillet femelle. E-F: ultra-structure des cellules d'un épillet mâle montrant l'absence d'accumulation d'amidon (E) alors que celles d'un épillet femelle montre une forte accumulation (F, amidon en rose). Abréviations: b: bractée; Fm: méristème floral; R: rachis; Ra: rachillae ou épillets. Barres : 300 μ m (C, D); 5 mm (A, B) et 20 μ m (E, F).

C. La structure de la jeune inflorescence après la mise en place des axes de croissance secondaires

Les bourgeons inflorescentiels se développent et se différencient lorsque les conditions nécessaires sont réunies (figure 30a). Au cours des premiers stades, on peut noter une excroissance du côté apical et un allongement du pédoncule.

L'histologie des jeunes inflorescences montre que leur partie basale présente la même organisation structurale que celle des bourgeons inflorescentiels (figure 30b). Cependant, l'apex du bourgeon inflorescentiel se différencie et se ramifie pour initier simultanément l'enveloppe de la spathe et les épillets sur lesquels vont s'initier les primordiums floraux. La spathe est constituée d'un parenchyme vacuolisé parcouru par de nombreux éléments provasculaires. La forte coloration par le naphthol blue-black (NBB) de l'apex montre que cette zone est en phase de croissance active (figure 30b).

D. Le dimorphisme inflorescentiel

La différenciation des axes de croissance secondaires (rachillae) s'effectue au niveau de l'apex de l'inflorescence. On peut noter l'absence de bractée à la base de ces ramifications. Les jeunes inflorescences mâle et femelle présentent la même organisation structurale globale (figure 31). Cependant, plusieurs différences morphologiques et cytologiques sont observées entre les deux sexes dès l'initiation des primordiums floraux :

- Durant le développement inflorescentiel précoce et alors que leurs tailles sont similaires, les jeunes inflorescences mâles et femelles ont des formes distinctes. Les inflorescences mâles sont de forme conique et les inflorescences femelles sont plus arrondies. Cela peut être relié à une différence de ramification au niveau de leurs épillets (figure 31a,b).
- Des coupes longitudinales de jeunes inflorescences montrent des différences de densité de méristèmes floraux, lesquels se développent latéralement le long des épillets. Les méristèmes floraux sont plus densément distribués sur l'axe secondaire de inflorescence mâle par rapport à son équivalent femelle (figure 31c,d).
- La troisième différence observée entre les jeunes inflorescences mâle et femelle avant l'organogénèse florale est le pattern d'accumulation des polysaccharides dans les épillets. De nombreux grains d'amidon sont observés dans les cellules parenchymateuses des rachillae

femelles alors que leurs équivalents mâles n'en contiennent que très peu (figure 31 e,f). L'accumulation d'amidon augmente avec le développement et la croissance des rachillae (tableau 6). Les organes floraux sont dépourvus de réserves amylicées durant le développement floral précoce. En revanche, une accumulation d'amidon devient visible dans les pétales et sépales durant la différenciation sexuelle des organes floraux.

Conclusion

Les premiers stades de développement des inflorescences mâles et femelles de palmier dattier montrent des différences morphologiques importantes, suggérant que le dimorphisme sexuel des inflorescences se déclenche précocement avant le stade d'initiation des méristèmes floraux, donc avant la différenciation sexuelle des boutons floraux.

III. La morphogénèse florale

Les premiers signes du dimorphisme inflorescentiel que nous avons établi précédemment correspondraient à des caractères sexuels secondaires, potentiellement associés à la future mobilisation énergétique nécessaire à la production des fruits. Cependant, étant donné que la dioïcie n'est pas dû à la structure inflorescentielle, *sensu stricto*, nous nous sommes focalisés sur les caractères sexuels primaires directement liés au sexe, c'est-à-dire au niveau de la fleur. A quel stade de développement de l'inflorescence, le sexe de la fleur est-il mis en place ? Nous avons recherché des éléments de réponse à cette question dans l'étude de la morphogénèse florale du palmier dattier. Pour ce faire, une étude histologique des fleurs a été réalisée afin de déterminer les stades clés de développement floral ainsi que les principales différences structurales entre les fleurs mâles et femelles.

A. Stades de développement de la fleur

La dissection d'une trentaine de palmiers dattiers a été nécessaire pour disposer du matériel inflorescentiel représentant la totalité des stades requis pour établir une cinétique de développement floral (figure 32).

Une étude histologique et des observations en microscopie électronique à balayage (MEB) ont été réalisées sur les bourgeons floraux portés par les différentes inflorescences de tailles différentes et échantillonnés lors des dissections (figure 32). Cet étude nous a permis d'identifier **9 stades principaux** de développement floral allant du bourgeon floral jusqu'à l'émergence d'une fleur mature unisexuée (figure 33; tableau 7). Les différents stades sont référencés par rapport à la taille de leurs inflorescences puisqu'il est pratiquement impossible de donner un âge aux inflorescences avant leur émergence (inaccessibilité à cause de la haute protection de la couronne foliaire).

Les bourgeons floraux mâles et femelles sont initiés à partir d'une zone latérale méristématique du rachilla et à l'aisselle d'une courte bractée (figure 31c,d). L'apparition du bourgeon floral est définie afin de correspondre le stade initial (I) de la morphogenèse florale (figure 33a,e; tableau 7). Les bourgeons floraux sont constitués de cellules intensément colorées au NB, indicateur d'une forte activité de division cellulaire. Ils se développent de façon longitudinale et radiale par des divisions anticlines et périclines respectivement. L'initiation des primordiums des organes floraux (sépales, pétales, étamines et carpelles) s'effectue de manière acropète et aboutit à l'établissement des quatre verticilles successivement opposés. L'émergence des primordiums des sépales, des pétales, des étamines et des carpelles se produit successivement. Chaque organe floral se caractérise par une structure histologique bien déterminée. Nous désignons un stade évolutif pour la mise en place d'un nouvel organe floral. Ainsi, les stades II, III, IV et V correspondent à l'ontogénèse des sépales, pétales, étamines et carpelles respectivement (stade III : figure 33b,f; stade IV: figure 33c,g ; stade V : figure 33d,h ; tableau 7).

Le développement des bourgeons floraux mâles et femelles est similaire jusqu'à l'émergence du dernier verticille (carpelle ou gynécée) au stade V (figure 33d,h). Le bourgeon floral est alors d'apparence bisexuelle à ce stade.

A partir du stade VI (figure 33i,m) puis au VII (figure 33j,n), les fleurs mâles et femelles ont des morphologies différentes. Les organes sexuels fertiles (carpelle pour les fleurs femelles et étamines pour les fleurs mâles) s'accroissent en taille et se développent.

Aux stades VIII (figure 33k,o) et IX (figure 33l,p), alors que les organes sexuels fertiles atteignent leur phase de maturité avec des structures reproductrices matures (ovule pour les carpelles et sac polliniques pour les étamines), les organes sexuels stériles (staminodes des

fleurs femelles et pistillodes des fleurs mâles) apparaissent rudimentaires et montrent un développement incomplet (figure 331,p; tableau 7).

Conclusion

Le développement floral chez le palmier dattier qui comprend **9 stades** clés peut être subdivisé en deux phases distinctes :

- La première phase (du stade I au stade V) correspond à la mise en place des organes floraux sexuels et stériles. Durant cette phase, les bourgeons floraux mâles et femelles sont morphologiquement indistinguables (stade V). Le bourgeon floral est d'apparence bisexuelle
- La seconde phase (du stade VI au stade IX) se caractérise par la différenciation des organes reproducteurs. Les organes sexuels mâles et femelles suivent des voies morphogénétiques différentes qui accentuent le dimorphisme sexuel.

Ces résultats viennent compléter et préciser les observations du développement floral rapportées par DeMasson et al (1980) et les 8 stades de différenciation pour l'inflorescence femelle proposés par Masmoudi et al (2008). De plus, cette description histologique nous montre clairement que **le sexe de la fleur du palmier dattier commence à se mettre en place avant le stade VI, donc probablement au stade V ou peut être plus tôt**. Afin d'approfondir cette question, les stades « bisexuels » V et IV des bourgeons floraux mâles et femelles ont été étudiés plus en détails afin de rechercher les premières différences morphologiques visibles liées au sexe.

Tableau 6 : Accumulation d'amidon dans les organes reproducteurs du palmier dattier. Ce tableau correspond à un récapitulatif de la présence (+) ou absence (0) de réserves amylacées dans les structures reproductives mâle et femelle. Les organes reproducteurs (fertiles et non fertiles) sont dépourvus d'amidon jusqu'au stade VI où les carpelles de la fleur femelle montrent la présence de quelques grains d'amidon. Cependant, les rachillae montrent une accumulation d'amidon dès le stade d'initiation du bourgeon floral. Le pattern d'accumulation est différent entre les inflorescences mâles et femelles. Les femelles montrent une plus forte accumulation que les mâles. Le nombre de signe + indique une idée d'abondance

Fleurs		Stade de développement					
		I	II	III	IV	V	VI
Femelle	épillets	+	++	++	+++	+++	+++
	Organes non sexuels (sépalés et pétales)	0	0	0	0	0	+
	Organes sexuels (Carpelles, staminodes)	0	0	0	0	0	+(carpelles)
Mâle	épillets	0	+	+	++	++	++
	Organes non sexuels (sépalés et pétales)	0	0	0	0	0	+
	Organes sexuels (Etamines et pistillodes)	0	0	0	0	0	0

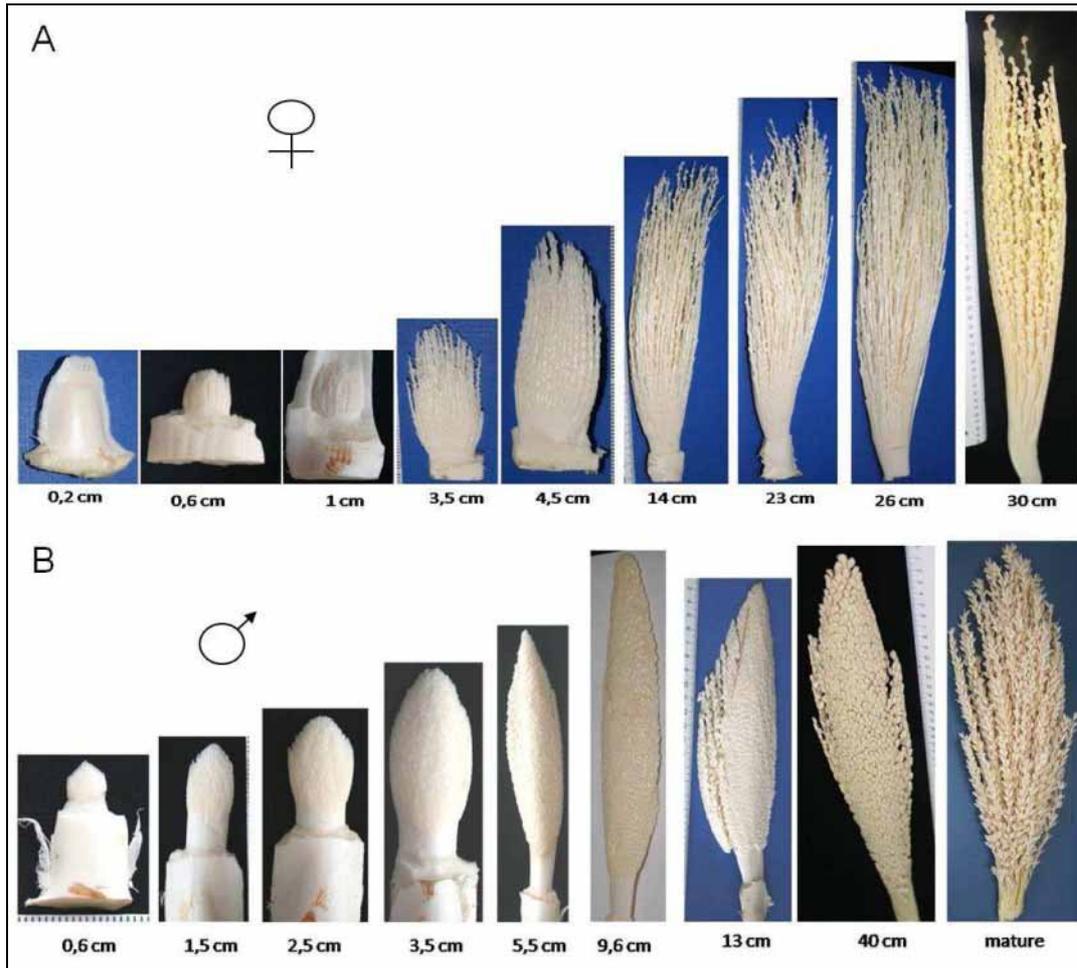


Figure 32 : Cinétique de développement inflorescentiel femelle (A) et mâle (B)

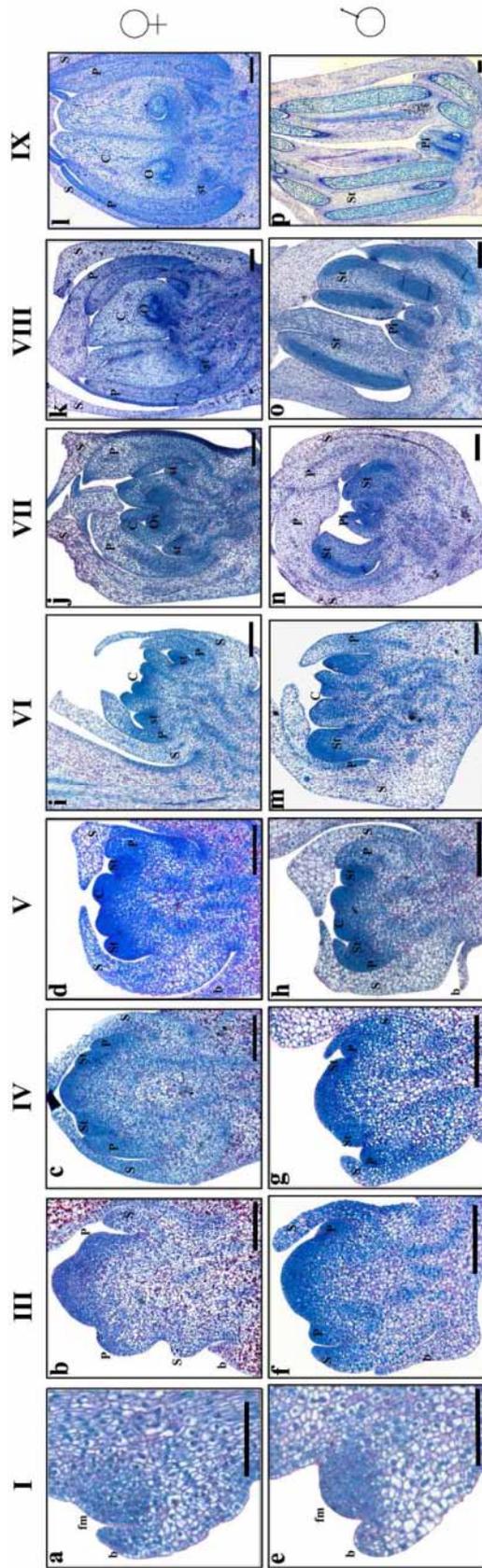


Figure 33: Stades de développement floral chez le palmier dattier. Coupes histologiques des fleurs femelles (a-h, m-p). Stade I (a, e), Stade III (b, f), Stade IV (c, g), Stade V (d, h), Stade VI (i, m), Stade VII (j, n), Stade VIII (k, o), Stade IX (l, p). Pour la description de chaque stade ainsi la taille inflorescentielle correspondante, voir le tableau 7. Abréviations: b: bractée; C:carpelle; fm: méristème; O: ovule; Ov: méristème ovulaire; P:pétale; Pi: pistillodes; St: étamines; st: staminodes; S:sépales. Barres : 100µm (a, e) and 200µm (b-d,f-p).

Tableau 7 : Principaux événements morphologiques observées au cours de la formation des fleurs unisexuées chez le palmier dattier.

Stage	sexe	Événements morphologiques	Longueur moyenne des épillets (cm)	Figures
0	F-M	Initiation du méristème de l'inflorescence; initiation du rachis et des épillets	0,2- 0,5	
1	F-M	Initiation du méristème floral	0,5 - 1	Fig.31a, 3e
2	F-M	Emergence des primordiums des sépales	1,5 - 3	
3	F-M	Emergence des primordiums des pétales	2,5 – 3,5	Fig.31b, 3f
4	F-M	Initiation des primordiums des étamines	3 – 4,5	Fig.31c, 3g
5	F-M	Initiation des primordiums des carpelles	3,5-4,5	Fig.31d, 3h
		Forme et taille comparable pour les primordiums de carpelles de deux sexes (stade bisexuel)		
		Elargissement des primordiums des carpelles des fleurs femelles (première différence morphologique)		
6	M	Elongation des primordiums des étamines et du pistillodes	5,5-7	Fig.31m, 5a
	F	Elargissement des primordiums des carpelles suivie d'une légère différenciation. primordiums des staminode avec des cellules actives		Fig.31i, 6a
7	M	Etamines se différencient en anthère and filament	7-13	Fig.31n
	F	Carpelle s'allonge. Initiation du méristème ovulaire. Arrêt de développement des staminodes		Fig.31j
8	M	Différenciation des loges polliniques. Division méiotique visible dans les anthères. Pistillodes: carpelle s'est légèrement allongée. Initiation du méristème ovulaire	13-20	Fig.31o
	F	Initiation du nucelle et les téguments internes dans l'ovule. Le style se différencie dans la partie apicale de l'ovaire Staminodes montrent une différenciation cellulaire.		Fig.31k
9	M	Etamines augmentent de taille; des pollens bi-nucléaires apparaissent dans les sacs polliniques. Pistillodes: tailles inchangées mais méristème ovulaire forme le nucelle. Aucun développement ultérieur n'est observé.	23-30	Fig.31p
	F	Initiation des stigmates. Téguments externes sont formés, la macrospore est visible. Staminodes: cellules se vacuolisent et certaines se différencient en faisceaux vasculaires		Fig.31l

B. La mise en place du dimorphisme sexuel des fleurs

Afin de déterminer les premières différences visibles entre le développement des fleurs mâles et femelles, des mesures morphométriques du verticille 4 des bourgeons floraux aux stades IV et V d'initiation des organes sexuels ont été réalisées (figure 34a, b). Ces mesures comprennent la largeur et la hauteur du verticille 4 ou gynécée.

Au stade IV

Alors que les sépales et les pétales continuent de s'allonger, les bourgeons floraux mâles et femelles produisent chacun six primordia d'androcée entourant un méristème central. Nous avons constaté que les largeurs et les hauteurs du méristème central sont comparables entre les bourgeons mâles et femelles ($P=0,5$, pour les largeurs ; $P=0,54$, pour les hauteurs ; figure 34c).

Au stade V

Nos observations en microscopie électronique à balayage (MEB) montre que, au stade V, le méristème central du gynécée s'est élargi et s'est subdivisé en trois mamelons ou primordiums similaires et de forme triangulaire, et qui émergent en alternance avec le verticille interne de l'androcée (figure 35a, b). Une petite dépression se creuse au centre du méristème floral et sépare les trois primordia du gynécée. Au début du stade V, le gynécée est comparable entre les deux sexes. Cependant, dès que les primordia du gynécée ont émergés, les premières différences morphologiques visibles commencent à apparaître entre les bourgeons floraux mâle et femelle.

Les mesures morphométriques effectuées montrent que les largeurs et les hauteurs des primordia du gynécée sont significativement différentes entre les bourgeons mâles et femelles. Ces résultats révèlent que les primordia du gynécée des bourgeons femelles sont plus large que ceux des bourgeons mâles au stade « bisexuel » ($P=0,0016$, pour les largeurs ; $P=0,005$, pour les hauteurs ; figure 35c).

Nous avons ensuite recherché les causes de l'élargissement du gynécée des bourgeons femelles par rapport à celui des fleurs mâles. Deux hypothèses peuvent être proposées :

l'élargissement du gynécée serait liée soit à une différence de la taille soit à leur nombre de cellules.

Pour ce faire, nous avons réalisé des mesures de la taille et du nombre total des cellules par primordium sur des coupes histologiques médianes des bourgeons floraux mâle et femelle.

Nos résultats montrent que les tailles des cellules des gynécées mâle et femelle ne sont pas significativement différents à ce stade V ($P = 0,59$; figure 36a). Cependant, nos résultats montrent une différence du nombre total de cellules par primordium de gynécée entre les bourgeons de sexe opposé. L'élargissement du gynécée serait dû à un nombre de cellules plus important dans le bourgeon femelle par rapport au mâle ($P = 0,0001$; figure 36b).

En conclusion

Ces résultats montrent que les premiers signes de dimorphisme sexuel entre les bourgeons mâle et femelle sont observables au stade V. Ils résulteraient d'une différence d'activité mitotique du bourgeon floral au niveau du verticille 4, qui est plus large dans le bourgeon femelle, ce qui constituerait le premier signe du processus de différenciation sexuelle de la fleur chez le palmier dattier.

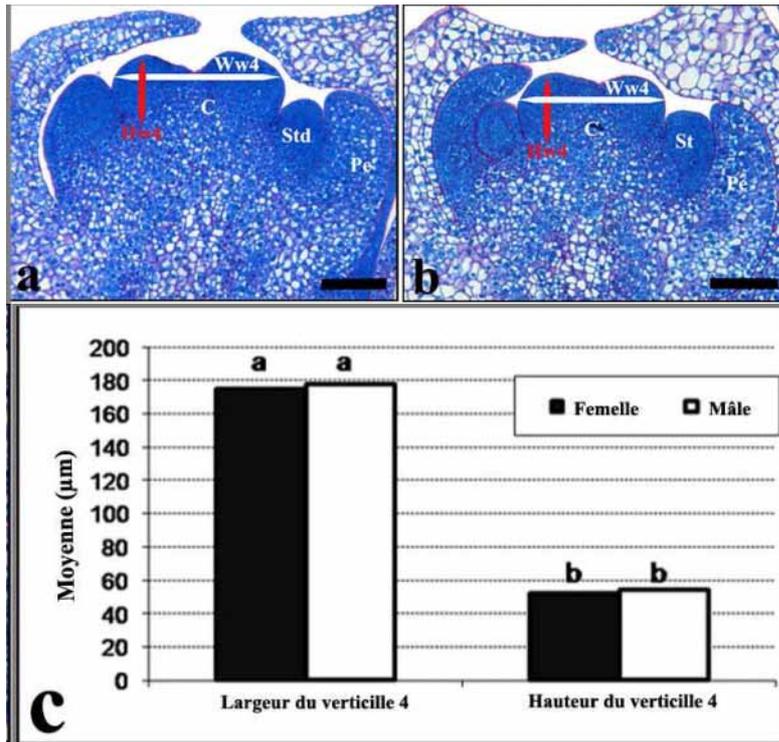


Figure 34 : Analyse biométrique des boutons floraux après l'initiation de tous les primordiums des organes floraux. a : coupe longitudinale d'une fleur femelle au stade bisexuel (V). b: coupe longitudinale d'une fleur mâle au stade bisexuel (V). c : Histogramme de la moyenne de largeur et de la hauteur du gynécée des fleurs mâle et femelle. Abréviations: carpelle; Pe: pétales; St: étamines; Hw4: Hauteur du verticille 4; Ww4: Largeur du verticille 4. Barre : 100 µm (a-b).

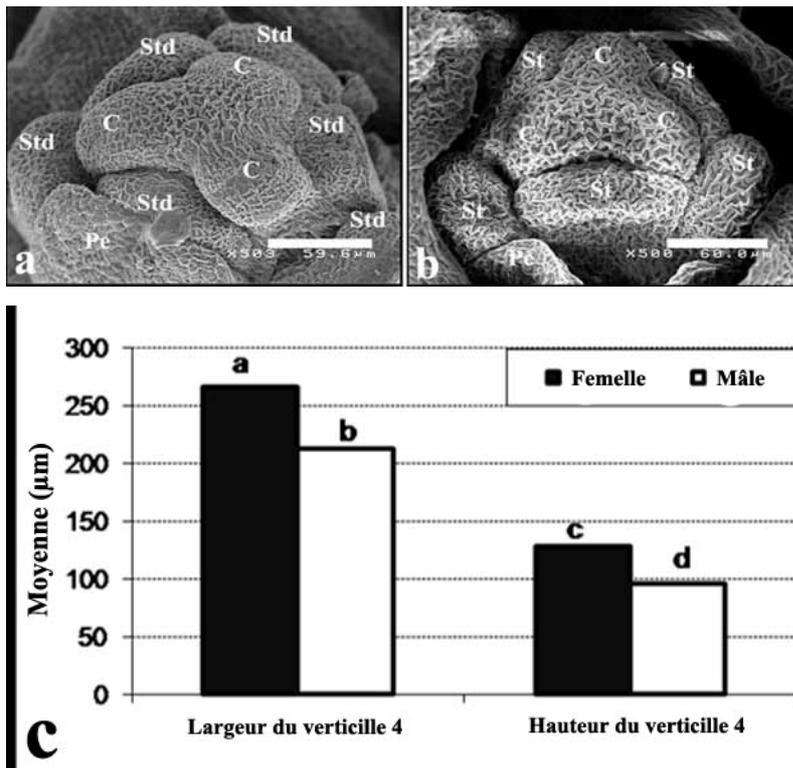


Figure 35 : Analyse biométrique des boutons floraux après l'initiation de tous les primordia des organes floraux au stade V (bisexuel). a-b : Organes sexuels des fleurs femelle (a) et mâle (b) en microscopie électronique à balayage (MEB). A ce stade, chaque fleur montre l'émergence de trois primordia des carpelles de forme triangulaire au verticille interne entouré de six primordiums d'étamines. c : Histogramme de moyenne de la largeur et de la hauteur du gynécée des fleurs mâle et femelle. Au stade bisexuel V, les tailles sont significativement différentes entre les gynécées femelle et mâle (c ; $p = 0,0016$). Abréviations: carpelle; Pe: pétales; St: étamines.

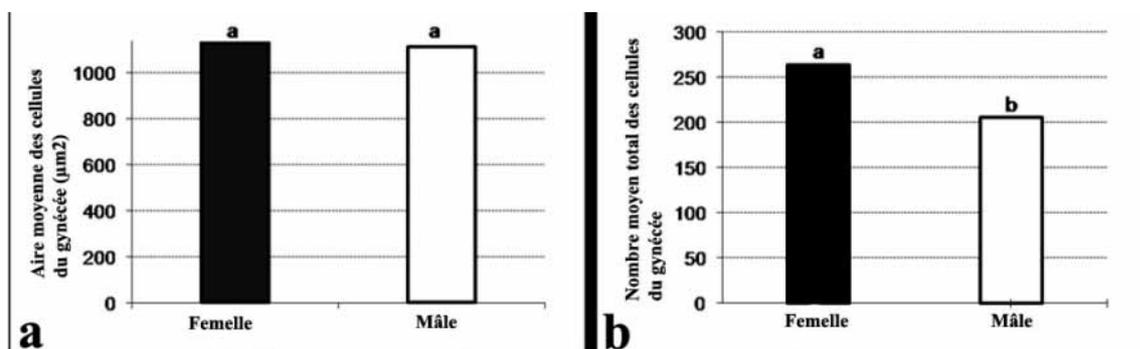


Figure 36: histogramme d'aire moyenne des cellules des primordiums du gynécée des fleurs femelle et mâle (a) ainsi que leur nombre moyen de cellules (b) au stade V. Les résultats montrent que les tailles des cellules ne sont pas significativement différentes ($p = 0,59$). L'élargissement du gynécée des fleurs femelles par rapport à celui des fleurs mâles résulte d'un nombre de cellules significativement plus important ($p : 0,0001$).

C. La différenciation des organes reproducteurs mâle et femelle

Afin de préciser les bases cellulaires caractérisant l'unisexualisation des fleurs, l'évolution des bourgeons d'apparence bisexuelle vers des fleurs unisexuées a ensuite été étudiée en comparant le développement des organes floraux fertiles (carpelles et étamines) avec les organes floraux stériles (pistillodes et staminodes).

1. Le développement de l'androcée des fleurs mâle et femelle

Une étude histologique comparative entre le développement de l'androcée fertile des fleurs mâles et l'androcée stérile des fleurs femelles a été réalisée pour les stades de différenciation sexuelle (VI à IX) (figure 37).

Description de l'androcée fertile

Au stade VI, les primordia des étamines des fleurs mâles s'accroissent *via* des divisions anticlines et périclines (figure 37a). Les ébauches s'allongent. Les cellules des étamines sont constituées de larges noyaux entourés de cytoplasme très densément colorés par le NBB (figure 37a). Le développement précoce des étamines en particulier est associé à une forte activité de division cellulaire.

Au stade VII, les étamines observées sont allongées et présentent un rétrécissement de leur base (figure 37b). C'est le premier signe de différenciation des étamines en anthères et filet. De plus, on observe une polarisation zonale de l'anthère. Le côté abaxial de l'anthère renferme des cellules densément colorées au NBB. Ces dernières évolueront en tissu sporogène avant de former le sac pollinique. Du côté adaxial de l'anthère s'individualisent des cellules parenchymateuses plus vacuolisées. Les étamines apparaissent bilobées.

Au stade VIII, la croissance des anthères s'accroît (figure 37c). On note la présence de nombreuses figures méiotiques dans le tissu microsporogène. A la fin de ce stade de développement, des cellules tétranuclées sont observables.

Au stade IX mature, les étamines ont atteint presque leur taille finale (figure 37d). Les tétrades ont évolué en microspores qui seront à l'origine du pollen.

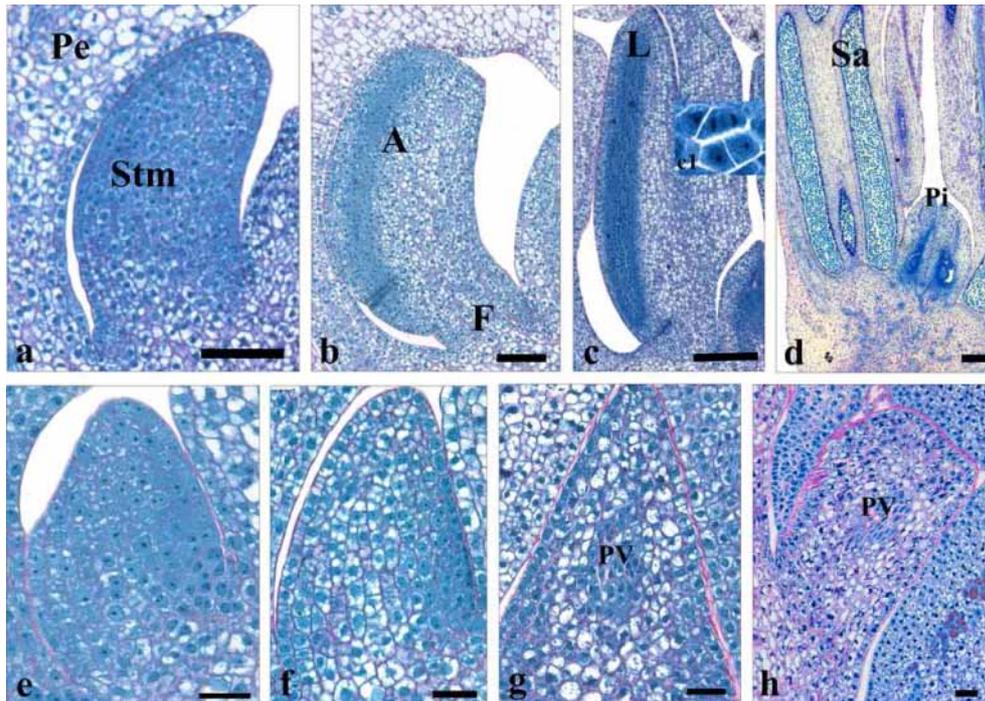


Figure 37: Développement de l'androcée chez les fleurs mâle et femelle. a-f : Développement de l'androcée fertile des fleurs mâles. a: primordiums d'étamines au stade VI. b: différenciation précoce des étamines en anthère and filament au stade VII. c: étamines bilobés au stade VIII. c1: Des divisions méiotiques visibles dans les locules des anthères. d: étamines matures au stade IX avec des sacs polliniques développés. e-h : Développement de l'androcée stérile des fleurs femelles. Légère croissance des primordiums des staminodes au stade VI. Aucune élongation des staminodes n'est observable comparativement aux étamines de même stade (a). f: au stade VII, les cellules des staminodes deviennent vacuolisés. Cela correspond aux premiers signes de différenciation. g-h : la vacuolisation cellulaire augmente considérablement durant les stades VIII et IX. De plus, certaines d'entre elles se différencient en faisceaux provasculaires (PV). Abréviations: A: anthère; F: filament; L: locule des anthères; Pe: petale; Pi: pistillodes; PV: faisceaux provasculaires; Sa: sac pollinique. Barres : 30 μm (e-h), 90 μm (a-b) and 200 μm (c-d).

Description de l'androcée stérile

Contrairement aux étamines des fleurs mâles, les staminodes des fleurs femelles montrent un arrêt de développement. Des investigations histologiques ont été réalisées pour caractériser en détail les événements cellulaires associés à cet arrêt.

Au stade VI, les ébauches des staminodes se sont très légèrement allongées par rapport au stade V « bisexuel » sans toutefois égaler la taille des étamines au même stade de développement (figure 37a). Les cellules des staminodes se distinguent par de gros noyaux visibles par la coloration au NBB et des cytoplasmes denses (figure 37e). Ces cellules demeurent à ce stade dans un état indifférencié.

Au stade VII, aucune élongation ni élargissement des ébauches des staminodes n'est observée (figure 37f). Cela indique que le développement des staminodes est bloqué.

Durant les stades VII à IX, les staminodes présentent une différenciation cellulaire qui se traduit par une augmentation de la vacuolisation et par une diminution de la densité de coloration au NBB des cytoplasmes (figure 37g,h). Les cellules montrent des vacuoles larges et des noyaux excentrés. On note la différenciation de certaines cellules en faisceaux provasculaires (figure 37g,h).

En conclusion, l'arrêt de développement des staminodes des fleurs femelles serait associé à une perte progressivement des caractéristiques méristématiques des cellules suivi de leur différenciation précoce. Cette dernière constituerait un élément essentiel de la formation d'une fleur femelle unisexuée.

2. Développement du gynécée des fleurs femelle et mâle

Le développement du gynécée a été comparé entre les fleurs mâle et femelle afin de déterminer les principaux changements histo-cytologiques qui se produisent durant l'établissement du dimorphisme sexuel.

Description du gynécée fertile

Dès le stade VI, les primordia du gynécée fertile des fleurs femelle subissent un accroissement de leur épaisseur ainsi que de leur taille (figure 38a). Leurs cellules apicales sous épidermiques se caractérisent par de gros noyaux centraux et des cytoplasmes très denses liés à l'accumulation de composés protéiques. Cet élargissement des ébauches du gynécée entraîne la formation d'une petite dépression entre les trois carpelles visualisés MEB.

Au stade VII, l'élongation des ébauches carpellaires se poursuit et le méristème ovulaire est initié du côté intérieur du carpelle (figure 38b). Les cellules du carpelle se différencient en accroissant leur vacuolisation. En revanche, les cellules du méristème ovulaire présentent un noyau volumineux, un cytoplasme dense ainsi qu'un rapport nucléo-cytoplasmique relativement élevé. A fort grossissement, une augmentation de la taille des nucléoles est observée. Ainsi, les cellules du méristème ovulaire montrent les caractéristiques d'un métabolisme actif. A la fin du stade VII, le nucelle ovulaire est formée (figure 38c). Il est composé principalement de cellules hautement méristématiques. Il est à noter que l'ovule immature présente un axe de symétrie proximal/distal.

Au stade VIII, une croissance substantielle des carpelles des fleurs femelles est observée (figure 38d). Le style et l'ovule sont clairement distinguables. Les téguments internes ainsi que les tissus sporogène sont initiés au sein du nucelle. L'ovule est placé en position anatrophe. Durant sa différenciation, l'ovule a acquis un nouvel axe de symétrie de type abaxial/adaxial.

Au stade IX, les carpelles se sont élargis et allongés considérablement (figure 38f). Ils ont atteint leur taille et leur forme définitives. La mise en place des stigmates différenciés, d'un placenta hautement vascularisé et de téguments ovulaires sont observables. Du côté du micropyle ovulaire, le sac embryonnaire provenant des cellules de macrospore s'individualise (figure 38e). A l'anthèse, le gynécée fertile des fleurs femelles est fonctionnel. Il est composé de trois carpelles uniovulaires.

Description du gynécée stérile

Comparativement au gynécée fertile des fleurs femelles, les pistillodes des fleurs mâles présentent un développement moins important.

Dès le stade VI, les primordiums des pistillodes s'accroissent légèrement en taille. Leurs cellules présentent une diminution des caractéristiques méristématiques. Elles apparaissent beaucoup moins denses que celles du gynécée fertile (figure 38f).

Au stade VII, les pistillodes s'épaississent et se différencient (figure 38g). Les méristèmes ovulaires s'individualisent du côté basal et renferment des cellules actives.

Au stade VIII, le style et les stigmates sont initiés dans la partie distale des pistillodes (figure 38h). Le nucelle ovulaire est formé. Il est constitué des cellules vacuolisées avec de gros noyaux centraux, des caractéristiques des cellules quiescentes (figure 38j).

Au-delà du stade VIII, un arrêt du développement des pistillodes est constaté (figure 38i). Il se traduit au niveau de l'ovule par l'absence des téguments et du sac embryonnaire. Aucune différenciation de la chalaze n'est observée. Ainsi au stade IX, le développement des pistillodes apparaît incomplet ou juvénile comparativement au gynécée fertile des fleurs femelles. A ce stade, l'axe de symétrie de l'ovule est de type proximal/distal (figure 38j).

Conclusion

Cette étude comparative de la différenciation du gynécée des fleurs femelle et mâle a montré un développement similaire entre les fleurs mâle et femelle aux stades VI et VII. Ensuite, les carpelles fertiles et les pistillodes se distinguent progressivement. **L'arrêt de développement des pistillodes des fleurs mâles résultent d'une diminution des caractéristiques méristématiques suivi d'une différenciation partielle de l'ovule et du style au stade VII. Cet arrêt de développement des pistillodes serait le caractère le plus marquant associé l'unisexualisation des fleurs mâles chez le palmier dattier.**

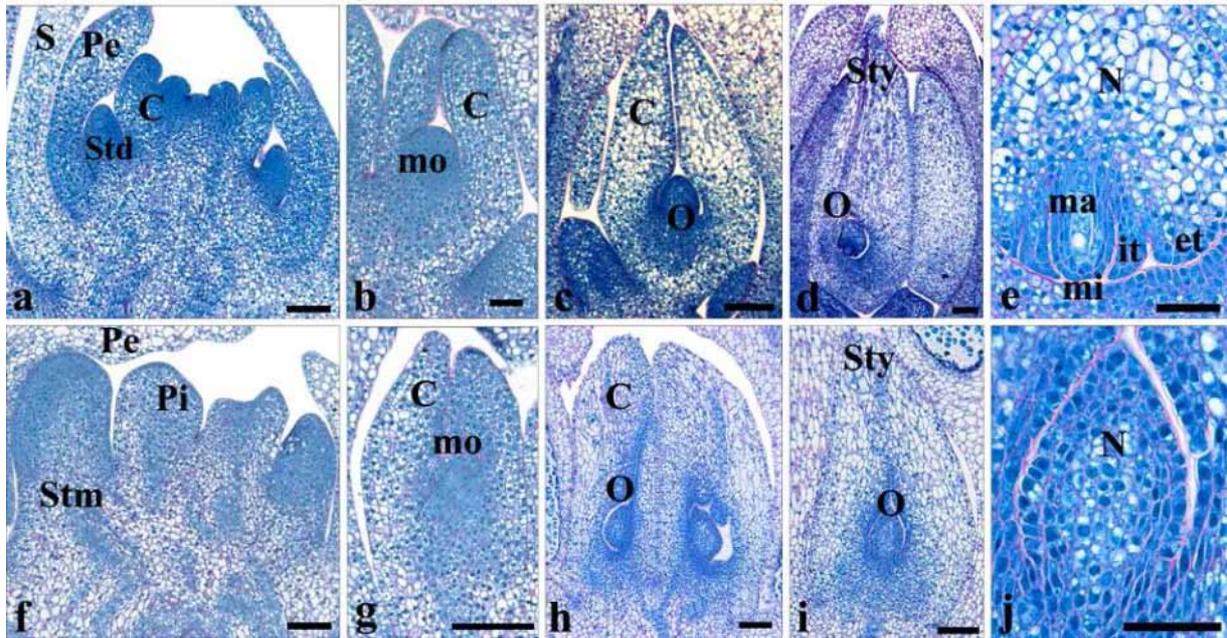


Figure 38: Développement du gynécée chez les fleurs femelle et mâle.

a-e: différenciation sexuelle et maturation du gynécée fertile des fleurs femelles. a: Elargissement précoce des primordia de carpelle au stade VI. b: élongation des primordiums des carpelles durant le stade VII. c: l'initiation de l'ovule s'accompagnant de la mise en place d'un axe de symétrie proximale/distale au stade VII. d: au stade VIII, élongation des primordia de carpelles et initiation des téguments externes de l'ovule, laquelle est observable en position anatrope. Acquisition d'un nouvel axe de symétrie de type abaxial/adaxial. e : détail de l'ovule au stade IX. Les téguments internes sont formés. La macrospore demeure au stade prémeiotique.

f-j: développent du gynécée stérile des fleurs mâles. f: au stade VI, les primordia des pistillodes se sont légèrement allongés. g: au stade VII, initiation du bourgeon ovulaire. h: au stade VIII, initiation du nucelle ovulaire. i : au stade IX, pistillodes développés. A ce stade, la mise en place d'un axe de symétrie proximal/distal caractérise les pistillodes. j: Détail du tégument interne de l'ovule des pistillodes. Abréviations: C: carpelle; et: tégument externe; it: tégument interne; mi: micropyle; mo: méristème ovulaire; ma: macrospore; N: nucelle ; O: ovule; pe: pétale; Pi: pistillode; S: sépale; Std: staminodes; Stm: étamines; sty: style. Barres: 50 μ m (b, g, e, j), 100 μ m (a, c-d, f, h-i).

IV. Discussion

Développement de l'inflorescence

Les inflorescences de palmier dattier sont très grandes plus d'un mètre, de structure monopodiale avec une ramification d'ordre 1. Leur ontogénèse implique le développement du bourgeon inflorescentiel en inflorescence. Cette transition développementale est très rapide et semble durer quelques semaines seulement. Les processus moléculaires régulant la mise en place des inflorescences et des rachillae restent inconnus. Cependant, plusieurs gènes susceptibles d'intervenir dans la régulation du développement inflorescentiel ont été caractérisés chez les palmiers, notamment des orthologues putatifs des gènes *SHOOTMERISTEMLESS* et *CUC1/CUC2/CUC3* d'*Arabidopsis* (Jouannic et al., 2007). Durant les premiers stades de développement, les inflorescences mâles et femelles du palmier dattier se distinguent par le nombre de ramifications de l'axe inflorescentiel, par la densité des méristèmes floraux ainsi que par l'accumulation de réserve en polysaccharidiques. Ce dernier caractère pourrait être associé à leur future fonction de production des fruits. Le phénomène de dimorphisme morphologique entre inflorescences mâle et femelle est visible chez de nombreuses espèces dioïques. Par exemple, chez la papaye, le pied mâle produit de longues inflorescences portant de nombreuses fleurs comparativement au pied femelle qui se distingue par de très courtes inflorescences portant un nombre réduit de fleurs femelles (Ming et al., 2007). Chez le palmier à huile, l'inflorescence femelle porte moins de ramifications et de bractées florales que l'inflorescence mâle (Adam et al., 2005). Les inflorescences mâle et femelle du palmier *Phytelephas equatorialis* diffèrent par le nombre de rachillae produits (quatre branches pour l'inflorescence mâle et une seule pour l'inflorescence femelle) ainsi que par le nombre de fleurs par rachilla (Uhl et Dransfield, 1984).

Les différences de structure inflorescentielle entre les deux sexes d'une plante constituent des caractères sexuels secondaires, du fait qu'ils ne soient pas directement liés au développement du gynécée et de l'androcée (Lloyd et Webb, 1977; Dellaporta et Calderon-Urrea, 1993). Très peu de gènes impliqués dans le contrôle des caractères sexuels secondaires ont été rapportés chez les espèces dioïques. Toutefois, chez le maïs, les gènes *TASSELSEED 4* et *TASSELSEED 6* seraient impliqués dans la ramification principale de l'inflorescence (Juarez et Banks, 1998). Plus récemment, des QTL contrôlant les caractères morphologiques

inflorescentiels (taille et nombre) ont été identifiés et localisés à proximité du locus du sexe de la vigne (Marguerit et al., 2009).

L'acquisition ancienne de la dioécie chez les *Phoenix*, comme l'attestent des fossiles de fleurs, trouvés dans des sédiments datant d'il y a environ 50 millions d'années (Dransfield et al, 2008) confortent la thèse selon laquelle les espèces auraient eu le temps nécessaire de pouvoir accumuler plus des caractères sexuels secondaires. Cependant, les liens entre le développement de caractères sexuels secondaires et les gènes de la détermination du sexe chez les espèces dioïques en général et chez le palmier dattier en particulier restent à être élucidées.

Dimorphisme sexuel de la fleur

Les premières différences morphologiques visibles liées au sexe sont observables dès le 5^{ème} stade avec les gynécées des fleurs femelles sont significativement plus larges que ceux des fleurs mâles. Bien que leurs tailles soient comparables, cet élargissement résulterait d'une différence d'activité mitotique, plus importante au niveau des organes sexuels fertiles. Un dimorphisme sexuel similaire est observé chez les fleurs de *S. latifolia*. Au stade d'initiation du verticille correspondant aux étamines, le gynécée des bourgeons femelles montre une augmentation importante de son diamètre qui est 5 fois plus large que celui des bourgeons mâles, ce qui suggère un arrêt de la prolifération du territoire correspondant au gynécée de la fleur mâle (Grant et al., 1994 ; Farbos et al., 1997). De plus, une étude réalisée chez cette espèce a révélée une expression différentielle des gènes *STM* (*SHOOTMERISTEMLESS*) et *CUC* (*CUC SHAPED COTYLEDON 1* et *2*) entre les bourgeons mâles et femelles avant toute différenciation des organes floraux (Zluvova et al., 2006). Le territoire du gynécée des bourgeons mâles du *S. latifolia* se caractérise par une expression spécifique des gènes *SICUC* et une absence d'accumulations des transcrits des gènes *SISTM 1* et *2* (Zluvova et al., 2006).

De plus, un certain nombre de mutations qui affectent la taille du méristème floral ont été identifiées. Par exemple, les mutations du gène *CLAVATA 3* chez *Arabidopsis* et du gène *FLORAL ORGAN NUMBER 1* du riz se traduisent par une prolifération et un élargissement du méristème floral, et une augmentation du nombre d'organes floraux (Suzaki et al, 2004; Kazama et al., 2009). Les gènes *AGAMOUS* et *SUPERMAN* sont requis pour la régulation de prolifération cellulaire des verticilles 3 et 4 de la fleur d'*Arabidopsis* (Jenik et irlandais, 2000; Meyerowitz, 1997). Plus récemment, le gène *INHIBITOR OF MERISTEM ACTIVITY*

(IMA), qui agit comme répresseur des gènes de l'identité méristématique (WUS, STM, KN1) et qui participe par conséquent dans le processus de la terminaison du méristème floral, a été décrite chez la tomate (Sicard et al., 2008)

La mise en place des fleurs unisexuées chez le palmier dattier montre clairement une cinétique de développement différente entre les organes sexuels stériles mâles (androcée ou staminodes) et femelle (gynécée ou pistillodes). Les staminodes présentent un arrêt d'élongation et une différenciation cellulaire précoce dès le stade VI. En revanche, les pistillodes présentent une croissance partielle suivie d'un blocage du développement carpellaire plus tardif, au stade VII. Cette différence dans le moment de l'arrêt du développement des organes sexuels stériles selon le sexe est observable et très variable selon les espèces dioïques présentant un bourgeon floral bisexuel. Chez le palmier à l'huile, les staminodes et les pistillodes forment des structures rudimentaires alors que, chez *S. latifolia* et *C. sativus* les staminodes avortent plus tardivement, après la différenciation des étamines en anthères et en filaments (Farbos et al, 1997 ; Bai et al, 2004 ; Adam et al, 2005). Chez la vigne (*Vitis vinifera*), les pistillodes montrent un développement similaire du gynécée fertile mais deviennent stériles par dégénérescence du sac embryonnaire (Caporali et al., 2003). Dans un continuum qui répartit les espèces selon le moment d'arrêt de leurs organes sexuels stériles (figure 39), le palmier dattier entre dans le groupe 3 composé de *S. latifolia*, *C. sativus.*, *Raphis*, *A. officinalis* et *E. guineensis* , malgré quelques différences mineures dans la différenciation des organes résiduels.

Ces variations dans l'arrêt des organes sexuels résiduels suggèrent que, pour chaque espèce, le dimorphisme sexuel résulte de modifications à des niveaux différents de la voie de régulation de la mise en place des organes reproducteurs (Irish et Nelson, 1989).

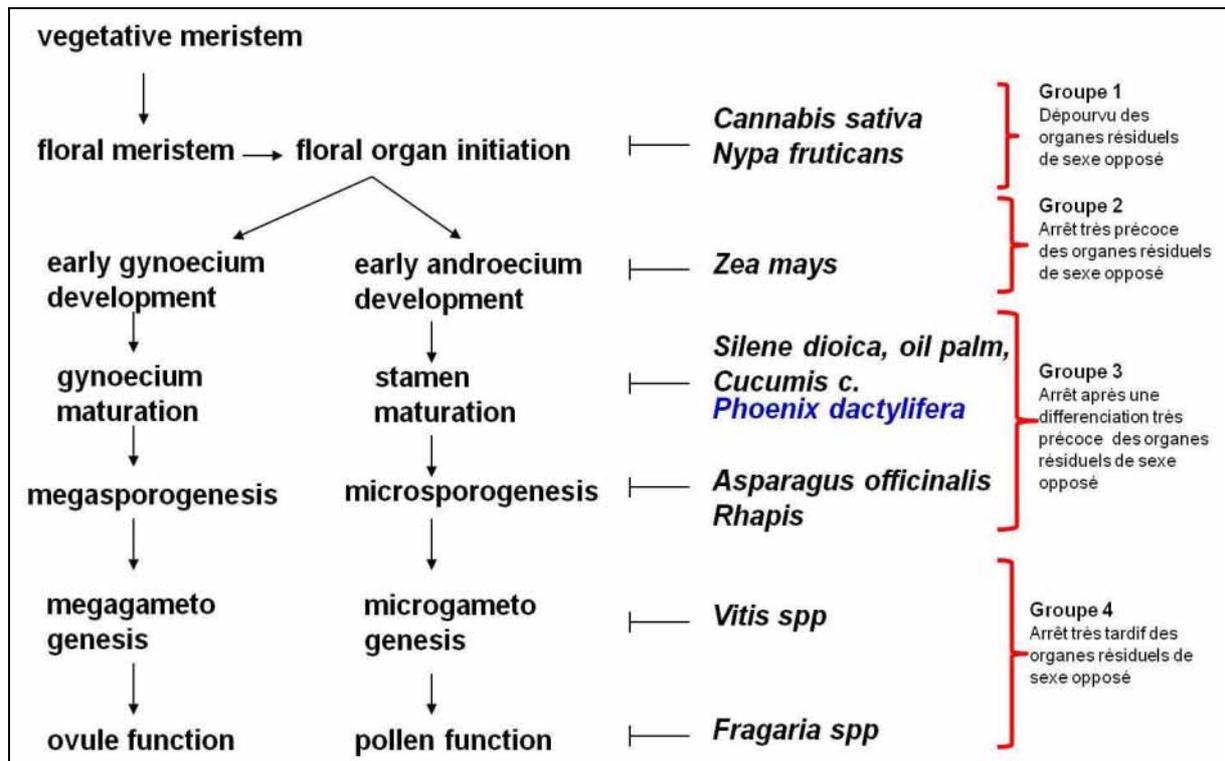


Figure 39 : La répartition des espèces selon le moment de l'arrêt des organes sexuels stériles constitue un continuum (modifié d'après Dellaporta et Calderon-Urrea, 1993).

Chapitre 3 : Les variations de la morphogénèse florale

En l'absence de mutants floraux identifiés et caractérisés chez le palmier dattier, les variants floraux constituent un matériel intéressant pour l'étude de la régulation du développement reproducteur. L'inventaire des variants de la morphogénèse florale nous a permis de constater l'existence de deux types d'anomalies florales *in planta* : des fleurs mâles « bisexuelles » observées sur des individus mâles et des fleurs femelles portant des pseudo-carpelles surnuméraires observés chez des individus femelles.

Les fleurs mâles « bisexuelles » montrent une variation naturelle atypique de la morphogénèse florale. Elles ont été observées uniquement sur des individus mâles dans diverses régions du monde, notamment en Irak et en Californie (DeMasson et al., 1980 ; Kgazal et al., 1990). Ce phénotype floral variant se caractérise par le développement des pistillodes des fleurs mâles en fruits parthénocarpiques. L'apparition *in planta* de ce phénotype d'apparence bisexuelle a suscité diverses affirmations. Certains indiquèrent l'existence de « changement de sexe » chez le palmier dattier d'une année sur l'autre alors que d'autres parlèrent de palmiers dattiers monoïques avec la coexistence des inflorescences mâles et des inflorescences femelles chez le même individu (Monciero, 1954 ; Munier, 1973). L'absence de données d'ordre histologiques, génétiques et biochimiques n'a pas permis d'expliquer l'origine et les mécanismes responsable de ce dysfonctionnement floral.

Ce phénotype a également été décrit *in vitro*. Il s'agit du développement de fleurs « hermaphrodites » obtenues à partir de fleurs mâles après un traitement au 2,4-D, une auxine de synthèse ou à partir de fleurs femelles traitées avec une combinaison auxine/cytokine (AIB et à la BAP) (DeMasson et al., 1980 ; Masmoudi et al., 2008).

Le second phénotype variant concerne des fleurs femelles anormales sont observées à une fréquence plus ou moins élevée sur des individus femelles issus de plants régénérés *in vitro*. Ce phénotype variant s'apparente à une variation somaclonale (Cohen et al., 2004). Il a été observé dans plusieurs plantations de palmiers issus de vitroplants en Arabie saoudite, aux Emirats et en Israël.

Cependant, dans les différents cas de variation de la morphogénèse florale décrits, la fonctionnalité ou la fertilité des organes sexuels stériles n'ont pas été établies. Ainsi, nous avons réalisé une caractérisation histologique des variants floraux *in planta* et *in vitro* afin de

décrire les événements morphologiques associés à l'apparition des phénotypes variants variation et de mieux comprendre la plasticité du développement floral.

I. Variation florale *in planta*

A. Fleurs mâles « bisexuelles » *in planta*

Durant les deux dernières saisons de floraison (2008/2009 et 2009/2010), les observations portées sur 265 individus mâles des palmeraies de Djibouti nous permis d'identifier l'existence de 6 individus mâles présentant une variation de la morphogène florale, soit 2,3 % des individus mâles, La caractérisation morphologique et histologique de ces fleurs mâles anormales a été réalisée.

Description morphologique du phénotype mâle variant

Les individus mâles de palmier dattier peuvent porter soit uniquement des inflorescences mâles normales ou des inflorescences « bisexuelles » soit les deux à la fois (figure 40 et 41). Les inflorescences mâles portant des fleurs « bisexuelles » présentent la même morphologie générale que les inflorescences mâles normales qui portent uniquement des fleurs unisexuées. La forme de l'inflorescence à fleurs «bisexuelles » est conique du fait de la ramification acropétale des épillets floraux sur l'axe des rachis (figure 41a,b). Les fleurs « bisexuelles » sont densément réparties sur l'épillet (figure 41c). Cependant, certaines différences distinguent une inflorescence « variante » d'une inflorescence normale :

- Au niveau de l'appareil reproducteur, la répartition florale montre dans certains cas la présence d'**un gradient de développement**. Les fleurs « bisexuelles » sont rencontrées à la base alors que des fleurs mâles normales occupent le sommet de l'inflorescence (Figure 41a,c). Les fleurs mâles bisexuelles sont persistantes sur l'axe alors que les fleurs mâles normales sont caduques. A noter que lors du développement des carpelles, les fleurs ne sont plus caduques. Les conditions endogènes sont probablement différentes le long de l'axe de l'épillet pour pouvoir expliquer l'apparition de ces deux phénotypes sur un même axe. Cette variation florale peut être transmise par la propagation végétative. Ainsi, nous avons observé des rejets issus d'arbre mâle « hermaphrodite » qui avaient reproduit le même phénotype floral variant que leur pied mère. Au cours de leur première floraison, les jeunes rejets produisent une inflorescence hybride qui présente à la fois des épillets mâles normales et des épillets portant des fleurs mâles « bisexuelles ». Lorsque le rejet devient plus âgé, il ne produit plus d'inflorescence hybride mais uniquement des inflorescences avec des fleurs variantes.



Figure 40 : Arbre mâle produisant des inflorescences à fleurs unisexuées et des inflorescences à fleurs « bisexuelles ».

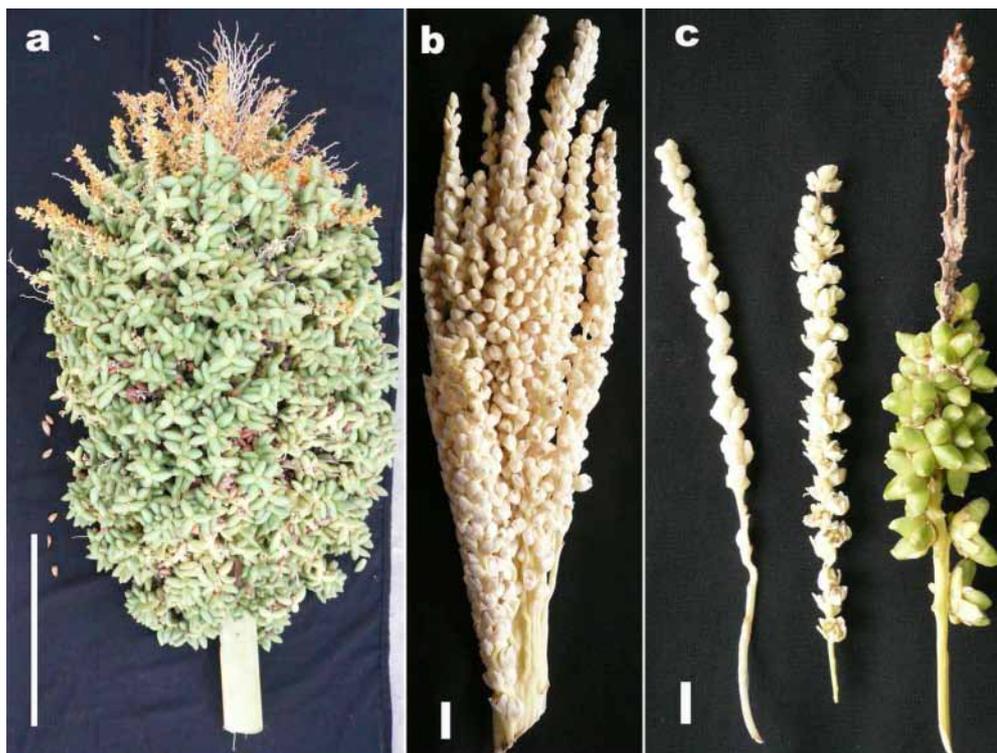


Figure 41 : Inflorescences mâles « bisexuelles ». a : inflorescence mâle présentant un important développement carpellaire ou fruits parthénocarpiques ; b : inflorescence mâle « bisexuelle » au moment de l'ouverture de la spathe; c : Epillets à trois stades de développement différents, le gradient de développement carpellaire est observable clairement sur le dernier épillet de droite, à la base se trouve les fleurs mâles « bisexuelles » et au sommet les fleurs mâles normales caduques. Barres : 20 cm (a) et 1 cm (b,c).

- Au niveau de la fleur, l'architecture d'une fleur mâle « bisexuelle » mature présente le développement des organes des deux sexes. Pendant les stades précoces de la morphogenèse, le bourgeon mâle est semblable à celui d'une fleur mâle normale à l'échelle macroscopique (figure 42a,b). Les étamines s'accroissent et s'allongent alors que les pistillodes demeurent rudimentaires. Dans les **prémices de l'anthèse, les pistillodes connaissent une forte croissance** (figure 42c). Plus tard, ils évoluent en fruits parthénocarpiques similaires aux fruits issus de pieds femelles non pollinisés (figure 42d,e). En effet, nous avons un développement floral normal puis lors de l'anthèse le signal du déblocage du développement des pistillodes intervient et la fleur mâle évolue en fruit parthénocarpique. Les facteurs inducteurs de ce développement anormal sont inconnus.
- La parthénocarpié à trois carpelles est majoritaire mais d'autres phénotypes variants avec 4 carpelles peuvent être observés (figure 43). Ces **pseudocarpelles surnuméraires** peuvent s'accompagner d'**un changement d'ordre de symétrie de 3 à 4** ou plus (figure 43).

Fertilité du phénotype mâle variant

Les observations histologiques effectuées sur les fleurs mâles « bisexuelles » au stade mûr montrent que les pistillodes sont constituées d'un tissu parenchymateux (figure 44 a-c). Ce dernier renferme une ovule vestigiale dépourvue des téguments et de sac embryonnaire. Ce développement incomplet de l'ovule est comparable à celui constaté dans les pistillodes des fleurs normales (figure 44d-f). Cela démontre **la stérilité des pistillodes** des fleurs mâles « bisexuelles » par comparaison avec le carpelle fertile de la fleur femelle (figure 44g-i).

Le développement carpellaire des fleurs mâles « bisexuelles » s'accompagne d'une persistance des étamines après l'anthèse. La déhiscence des anthères est bloquée. De plus, la stérilité morphologique des étamines persistantes se constate au niveau des sacs polliniques, contenant des grains de pollens immatures, aplatis et malformés entourés d'une couche tapétale persistante (figure 45a,b). Ces grains de pollens sont totalement différents de grains de pollens normaux qui sont plutôt sphériques et possèdent deux noyaux (figure 45c,d). Ces observations démontrent la **stérilité des organes reproducteurs mâles**.

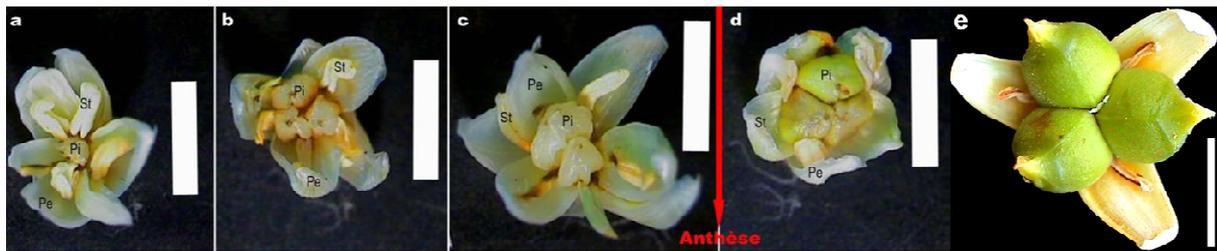


Figure 42: Cinétique de développement des fleurs mâles « bisexuelles». Les pistillodes demeurent rudimentaires (a, b) jusqu'à l'approche de l'anthèse où ils s'accroissent fortement (c). Après l'anthèse les étamines persistent et les fleurs prennent l'apparence de fleurs bisexuelles ou hermaphrodites (d,e).



Figure 43 : Changement d'ordre de symétrie dans une fleur fleur mâle « bisexuelle ».

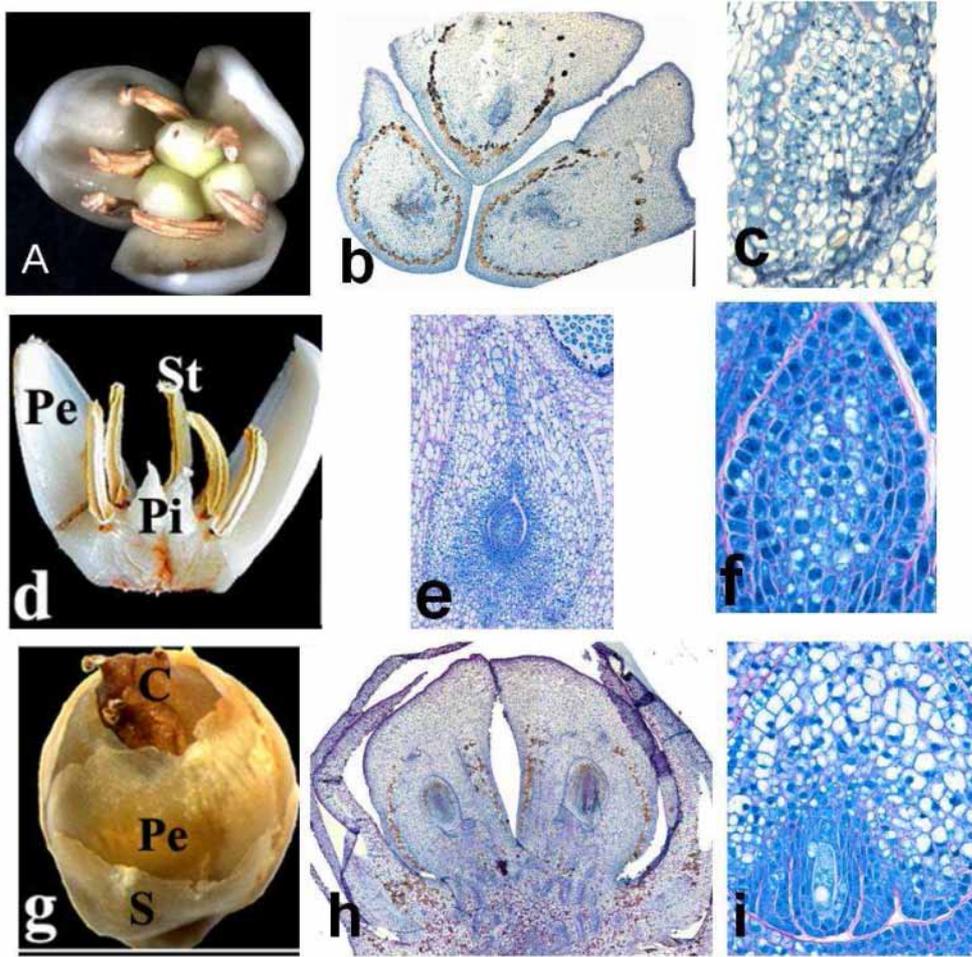


Figure 44 : Caractéristiques morphologiques et histologiques des fleurs mâles « hermaphrodites » (a-c) en comparaison avec celles des fleurs normales mâles (d-f) et femelles (g-i)

En somme, les fleurs mâles « bisexuelles » présentent une double stérilité (carpelles dépourvus d'ovule mature et des sacs polliniques portant des grains de pollen anormaux). Le développement carpellaire des pistillodes conduit à une parthénocarpie plutôt qu'à un à hermaphrodisme fonctionnel. Cependant, les facteurs génétiques, hormonaux ou environnementaux à l'origine de l'apparition des variants « hermaphrodites » restent à identifier.

B. Fleurs femelles présentant des carpelles surnuméraires *in planta*

Nous avons suivi la floraison des individus femelles issus de vitroplants de palmier dattier pendant les saisons florales de 2008-2009 et 2009-2010 dans les différentes palmeraies de Djibouti.

Nous avons observé la présence de fruits mais surtout de nombreux pseudofruits anormaux chez ces individus femelles (figure 46). L'anomalie constatée probablement de perturbations induites au stade floral. Ce phénotype variant se caractérise par la formation de structures carpellaires supplémentaires ou surnuméraires. L'apparition de ces carpelles surnuméraires pourrait avoir deux origines possibles :

- Un changement de l'identité du verticille 3 (staminodes). Les staminodes rudimentaires se développent en pseudocarpelles en forme de languette pour la plupart des cas (figure 46). Cela semble correspondre à une modification homéotique des organes mâles.
- Un changement d'ordre de symétrie supérieur à 3 pour le gynécée.

Ces phénotypes caractérisés par des fruits anormaux sont qualifiés de « variations somaclonales » puisqu'elles sont portées par les plants régénérés *in vitro*. Nous avons constatée que, pour la saison de floraison 2009-2010, cette variation somaclonale affectait 100% des vitroplants du CERD, 91 % des individus de Damerjog et 47 % de ceux d'Ali-Sabieh. Cette variation entraîne une perte importante de la production de dattes.

En conclusion, la modification des organes mâles des fleurs femelles anormales se caractérise par une transformation homéotique des staminodes et/ou s'accompagnent d'un changement de symétrie du gynécée.

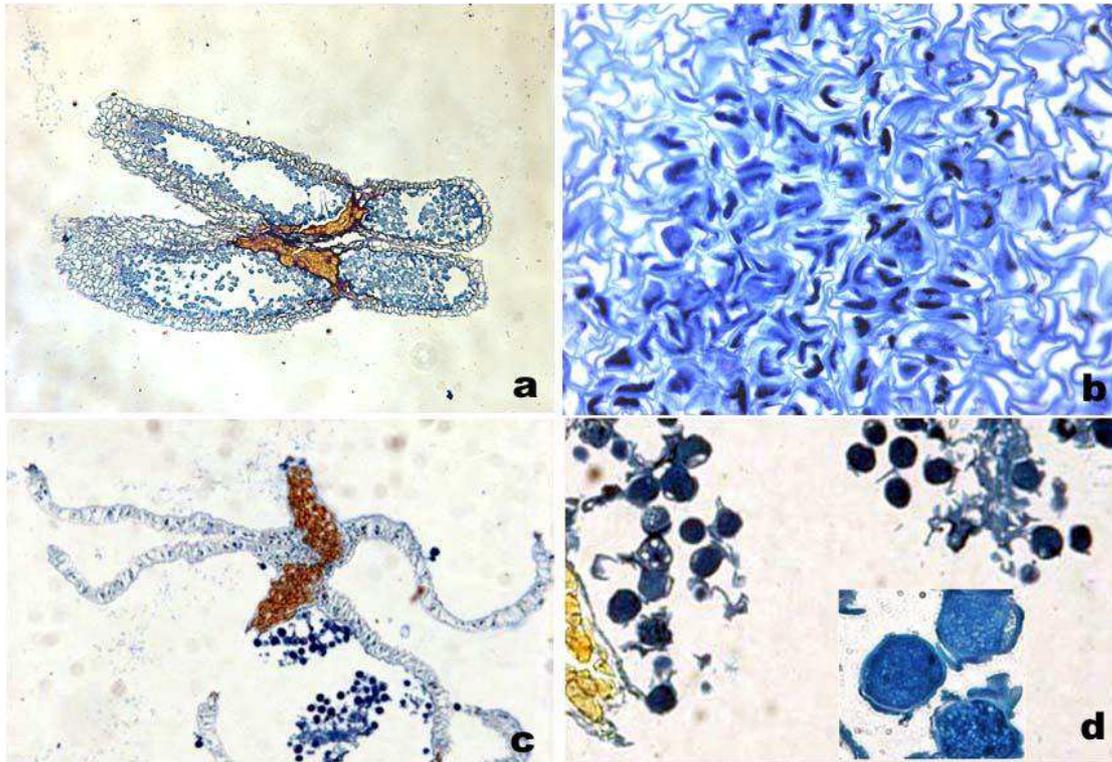
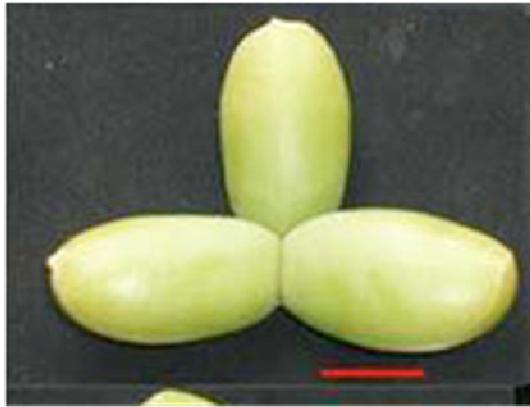
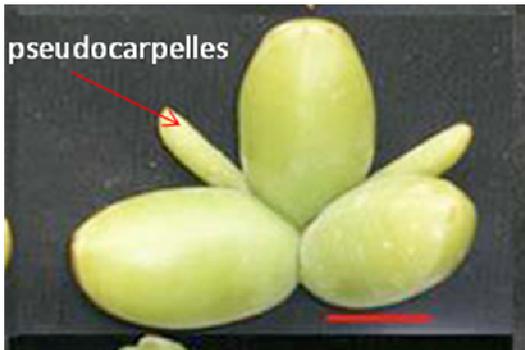


Figure 45 : Coupes histologiques des organes mâles des fleurs bisexuelles prélevées *in vitro* et *in planta* (a : anthères non déhiscentes, b : pollen anormal) et (c : anthères normales, d : pollen normal).



Fruit parthénocarpique issu du développement de 3 carpelles



Fruit parthénocarpique issu du développement de 3 carpelles et des staminodes en pseudocarpelles



Fruit parthénocarpique issu du développement de 4 carpelles (Changement d'ordre de symétrie)

Figure 46: Fruits anormales produites par des individus femelles régénérés *in vitro*. On observe la transformation des staminodes en pseudocarpelles comparables carpelles ou des pseudocarpelles en forme de languettes et la perte de symétrie 3 par le verticille 4. Barre : 1 cm

II. Variation florale *in vitro*

Afin d'étudier la régulation du développement des organes sexuels stériles, et donc de l'expression du sexe de la fleur, nous avons entrepris la mise en culture *in vitro* des boutons floraux de plusieurs variétés sur des milieux enrichis en différentes combinaisons hormonales de nature auxinique (2,4D : acide 2,4-dichlorophenoxyacétique ; ANA : acide α naphthalène acétique ; AIB : acide β indole butyrique), cytokinique (BAP : acide 6-Benzyl-aminopurine) et un agent chimique (5-azaC : 5 azacytidine) (figure 47a,b ; Annexe 1). Les différentes balances hormonales testées ont été déjà rapportées comme inducteur « d'hermaphrodisme » chez le palmier dattier (DeMason et al, 1980 ; Masmoudi et al., 2008) et chez le compagnon blanc (Janousek et al., 1996).

A travers ces expériences, nous avons recherché les conditions d'induction conduisant au développement des organes sexuels stériles (pistillodes des fleurs mâles et staminodes des fleurs femelles). De plus, nous avons étudié l'état de différenciation des organes stériles après leur développement *in vitro*.

A. Culture *in vitro* des fleurs mâles

L'évolution de la morphogénèse des fleurs mâles *in vitro* a été observée. Après 8 semaines de mise en culture dans les différentes conditions hormonale, nous avons comparé l'effet des 2,4-D, de l'ANA et de la 5-azaC sur le développement *in vitro* des pistillodes et des étamines.

L'effet de la balance hormonale

Nos résultats ont révélé que les milieux de culture enrichies en 2,4-D, en ANA et en 5-azaC sont les plus favorables au développement atypique des pistillodes (figure 48). Dans l'ensemble, 6 à 20 % des fleurs mâles testée ont manifesté un développement carpellaire dans ces conditions. Ainsi, le taux de développement carpellaire reste faible dans l'ensemble. Les autres conditions hormonales (IBA+BAP, IBA, BAP) n'ont pas induit de développement anormal des fleurs.

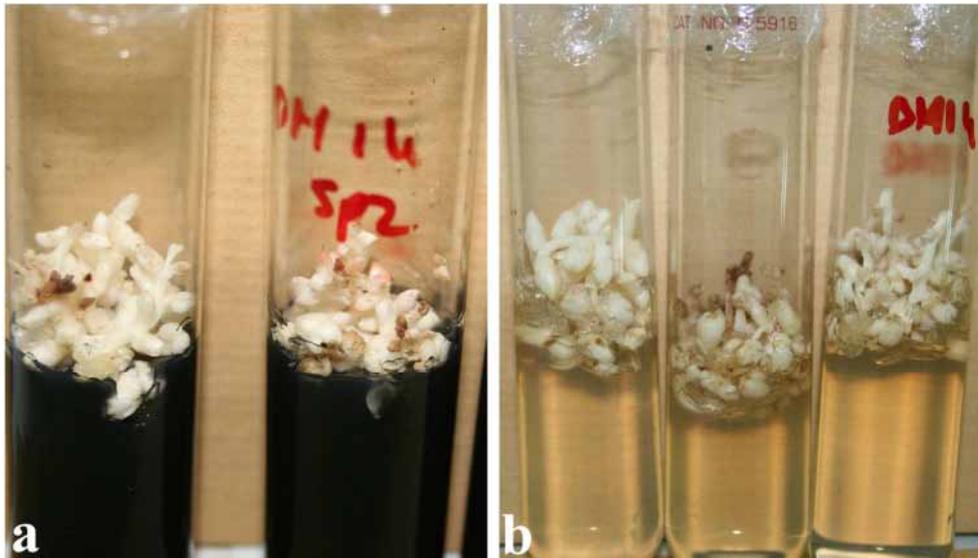


Figure 47 : Culture *in vitro* des fleurs mâle et femelle. a : jeunes boutons floraux mise en culture sur milieux enrichis en 2,4-D et en charbon actif. b : jeunes boutons floraux mis en culture sur milieux enrichi en ANA et en 5-azaC.

Incidence du stade de développement

Nous avons étudié l'effet du stade de développement sur la réactivité des fleurs mâles dans les différentes conditions.

Nos résultats ont montré que le développement des structures carpellaires est observé dans 20%, 16%, 7% et 0% pour les fleurs mâles portés des rachillae de taille 8, 9cm, 12 cm et 25cm respectivement en conditions de 2,4-D (figure 48). En condition d'ANA et de 5 azaC, respectivement 7,5% et 6 % des fleurs portées par les épillets de 9 cm montrent une croissance des pistillodes (figure 48). Ainsi la réactivité des fleurs mâles diminue avec l'augmentation de la taille des rachillae, donc de stade de développement des fleurs. Globalement, les rachillae mâles de taille comprise entre 8 et 12 cm sont compatibles avec une réversion vers des fleurs d'apparence « bisexuelle » alors qu'au-delà, les rachillae plus jeunes (taille < 7 cm) ou plus âgées (taille > 25 cm) n'ont révélés aucune aptitude morphogénétique quelque soit la nature hormonale. Ainsi, les stades appropriés pour le développement carpellaire des fleurs mâles sont les stades V et VI.

Fertilité des fleurs mâles

Le développement *in vitro* des pistillodes des fleurs mâles se traduit par une hypertrophie des structures carpellaires qui étaient initialement à l'état vestigial (figure 49a-c).

Une étude histologique réalisée sur les fleurs mâles « bisexuelles » montre que les pseudocarpelles des pistillodes sont constitués d'un tissu parenchymateux (figure 50a). L'ovaire présente un développement incomplet (figure 50b). Malgré le stade de différenciation avancé des pistillodes, l'ovule demeure immature. Les téguments et le sac embryonnaire ne se sont pas encore développés.

L'hypertrophie des pistillodes des fleurs mâles s'accompagne d'une perturbation de la maturation des étamines. Les filets et les anthères montrent un allongement anormal. Au-delà du stade de maturité, les étamines persistent sur la fleur et les anthères ne montrent aucune entre-ouverture pariétale laissant échapper le pollen (figure 50c).

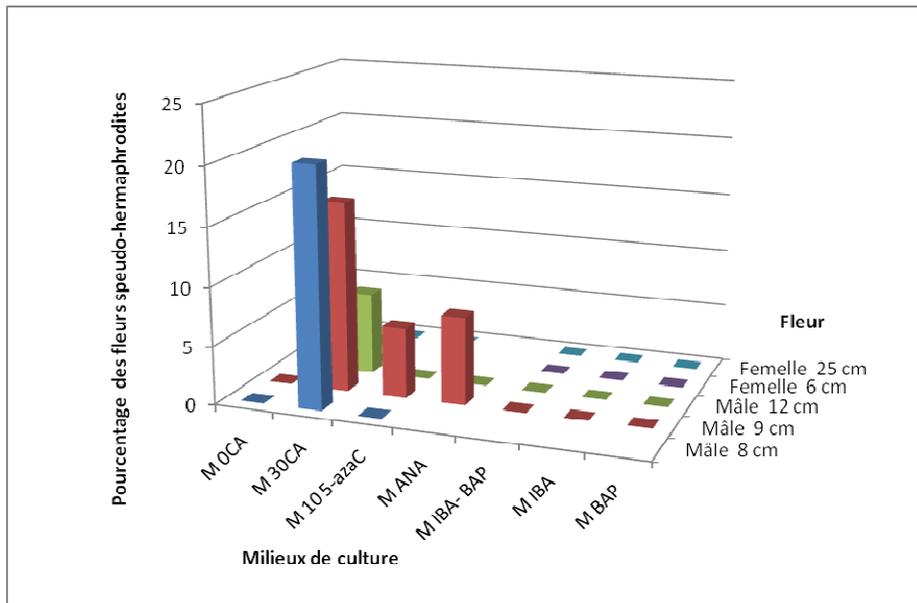


Figure 48 : Effet de la composition hormonale des milieux de culture sur l'évolution des fleurs mâles et femelles en fleurs hermaphrodites en fonction de la taille des épillets. Composition des milieux de culture (annexe 1).

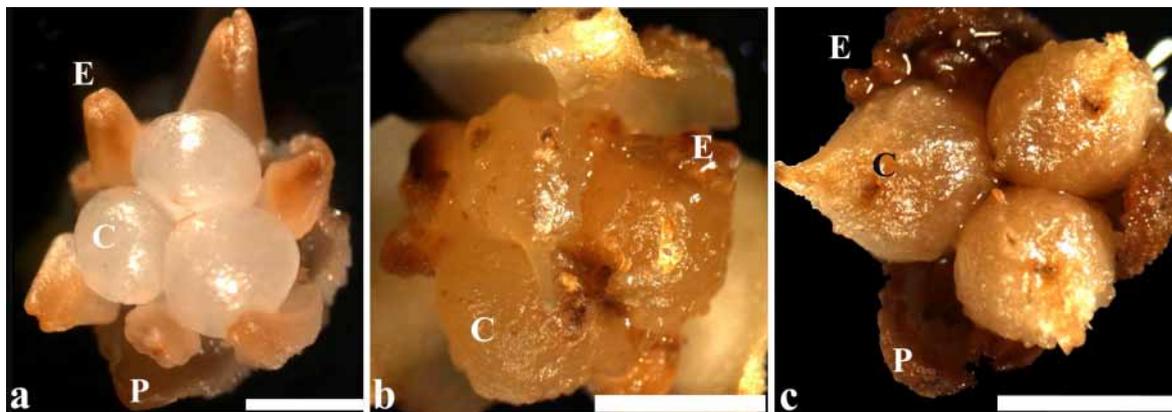


Figure 49: Fleurs mâles cultivées en présence de 2,4-D (a), d'ANA (b) et de 5-azaC (c) et présentant un développement carpellaire. Abréviations : C : carpelle, E : étamines, P : pétale. Barre : 500µm

Les observations histologiques des anthères de la fleur mâle « bisexuelle » montre que les sacs polliniques contiennent de nombreux grains de pollens malformés entourés d'une couche tégale épaisse, ce qui pourrait expliquer l'absence de déhiscence des sacs polliniques constatée chez ces fleurs mâles (figure 50c-d).

Autres types d'anomalies observées

Nous avons observé différents phénotypes annexes des fleurs mâles sur les milieux enrichis en 2,4-D, en ANA et en 5-azaC :

- Dans les milieux de culture contenant du 2,4-D, on observe une hypertrophie des bases des étamines (figure 51a), une double hypertrophie étamines-pistillodes (figure 51b) et la formation des pseudocarpelles soudés en 1, 2 ou 3 (figure 51c, d). Bien qu'elles soient compactes et de grande taille, ces modifications du développement floral s'observent à de faibles fréquences.
- Dans les milieux de culture contenant de l'ANA et du 2,4-D, on observe la formation des racines qui prennent naissance à partir de l'épillet au point d'insertion de la fleur mâle (figure 51e,d). L'aptitude à la rhizogénèse des fleurs de palmier dattier reste limitée. Verdeil (1993) a rapporté que les cals issues des cellules périvasculaires des épillets de cocotier sont observées avec une forte potentialité rhizogène.

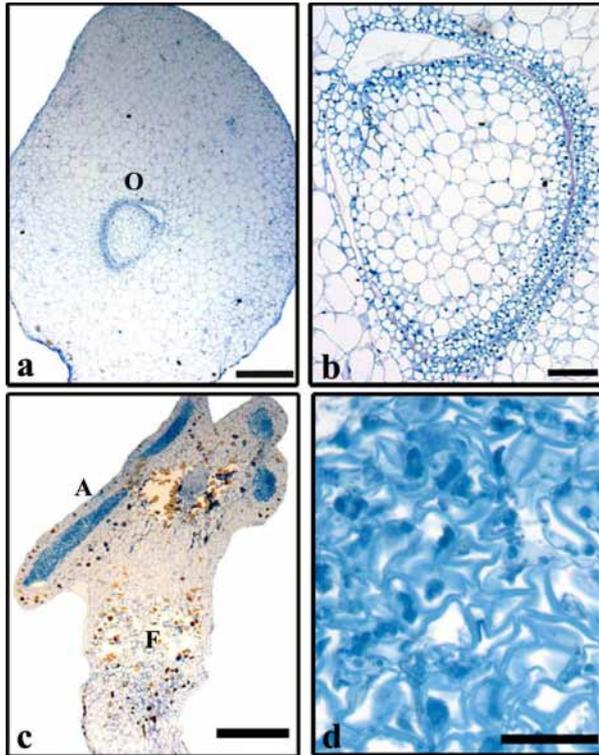


Figure 50 : Fertilité des organes mâles et femelles des fleurs mâles bisexuelles obtenues *in vitro*. a : pistillodes ; b : ovule du pistillode ; c : étamines ; d : sac pollinique avec des pollens déformés, collapés. Barres : 30 μm (d) ; 100 μm (b) et 500 μm (a, c).

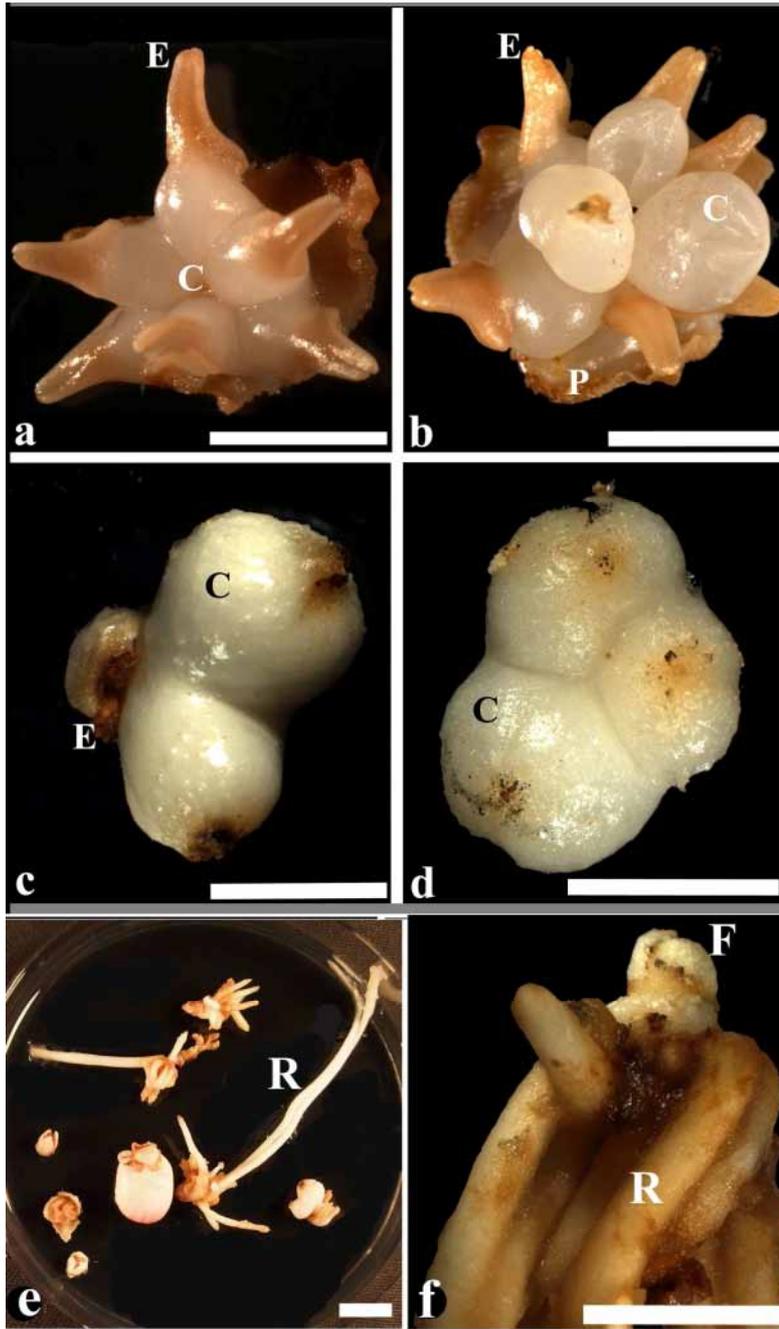


Figure 51: Diverses perturbations du développement floral obtenu en condition *in vitro*. a : épaissement de la base des étamines ; b : épaissement des bases des étamines et développement carpellaire ; c : carpelles soudés en 2 ; d : carpelles soudés en 3 ; e-d : forte activité rhizogène des boutons floraux sur milieu de culture contenant du 2,4-D.

B. Culture *in vitro* des fleurs femelles

Afin d'étudier l'effet des facteurs hormonaux sur le développement *in vitro* des staminodes des fleurs femelles, nous avons testé différentes combinaisons hormonales notamment les conditions auxine/cytokine décrites par Masmoudi et al. (2008) qui ont permis l'induction de l'hermaphrodisme à partir de fleurs femelles.

Les jeunes fleurs femelles traitées aux différentes conditions hormonales ont montré une faible réactivité. Les staminodes n'ont montré aucune modification morphologique. Elles sont restées rudimentaires. La taille et la forme générale du carpelle sont similaires pour les fleurs femelles traitées aux hormones (2,4-D, ANA et 5-azaC ; IBA, BAP) et les fleurs femelles témoins. Aucune croissance morphologique n'a été observée chez les différents organes floraux qui périclissent par brunissement au bout des 8 semaines de mise en culture.

Conclusion

Le développement carpellaire *in vitro* des pistillodes des fleurs mâles dépend de la nature et de la taille des fleurs et du type d'hormone utilisée. Les régulateurs de croissance de nature auxinique (2,4-D, ANA) ou chimique (5-azaC) ont permis le développement des pistillodes dans une « fenêtre physiologique » qui serait comprise entre le stade bisexuel (V) et le stade où le sexe de la fleur mâle est parfaitement distinguable (VII). Cependant, l'induction hormonale ne permet pas d'obtenir un développement complet et la fertilité de l'organe sexuel stérile. Il résulte une structure florale non fonctionnelle. Ainsi, les résultats obtenus montrent que les hormones de nature auxinique jouent un rôle important dans les processus de développement floral conduisant à la distinction entre organes sexuels stériles et fertiles.

III. Discussion

La diversité des phénotypes floraux variants obtenus *in planta* et *in vitro* montrent que la morphogénèse florale du palmier dattier est relativement plastique.

Variation de la morphogénèse florale in planta

Le phénotype variant «bisexuel» mâle associe un développement carpellaire, un changement de l'ordre de symétrie et une transformation homéotique de verticille 3. Cela suggère que les processus à l'origine de ces différents aspects de développement floraux soient liés.

De plus, la distribution des fleurs « hermaphrodites » et des fleurs mâles le long du rachis suggère l'existence d'un « gradient physiologique » interagissant avec des facteurs liés au sexe de la fleur. Le phénotype inflorescentiel anormal du palmier dattier rappelle le phénotype inflorescentiel normal du cocotier pour lequel les fleurs femelles sont situées à la base du rachis et les fleurs mâles sont localisées dans la région apicale (Verdeil, 1993). Chez le concombre, le sexe de la fleur varie selon l'âge de la feuille et les bourgeons axillaires de jeunes feuilles évoluent en fleurs femelles (Rael Perl-Treves, 1999). Les mécanismes contrôlant ce gradient sexuel sont peu étudiés chez les espèces dioïques. Rael et al.(1990) suggèrent que l'éthylène et les auxines constitueraient les principaux inducteurs de ce gradient de féminité des bourgeons floraux du concombre.

L'apparition du phénotype variant varie selon le sexe et que l'individu mâle présenterait une sensibilité plus importante à la variation. De plus, certains phoeniculteurs du Maghreb ont rapportés qu'en fin de vie, les individus mâles produisent de nombreux fruits parthénocarpiques, ce qui suggère un effet « âge » sur l'expression du phénotype variant.

Le développement des staminodes des fleurs femelles du palmier dattier en pseudocarpelles observés *in planta* montre des similarités avec les phénotypes des mutants du développement floral de classe B *apetala3* et *pistillata*, d'*Arabidopsis thaliana* (Jack et al., 1992) et *deficiens* et *globosa* d'*Antirrhinum majus* (Sommer et al., 1990), ainsi qu'avec le phénotype « *mantled* » du palmier à huile (Adam et al, 2005). Ce dernier est caractérisé par

une transformation homéotique de l'androcée stérile des fleurs femelles en carpelles surnuméraires. Adam et al. (2007) ont montré que cette transformation homéotique du verticille 3 de la fleur « *mantled* » du palmier à huile est associée à une dérégulation de l'expression de plusieurs gènes MADS box (*EgDEF1* et *EgGLO2*, gènes de fonction de type B ; *EgAGL2-1* de type E et *EgAG2* de type C et D). Une diminution de l'accumulation des transcrits de ces gènes est observée dans les fleurs *mantled*. De plus, cette variation somaclonale, de nature épigénétique est associée à une hypométhylation globale de l'ADN génomique (Jaligot et al., 2000). Après comparaison avec le phénotype « *mantled* », Cohen et al. (2004) suggèrent l'hypothèse d'un mécanisme de dérégulation de la méthylation du génome associé à l'apparition des variants femelles du palmier dattier.

Variation de la morphogénèse florale in vitro

Notre investigation de la plasticité florale *in vitro* a montré que les organes sexuels stériles peuvent acquérir de nouvelles capacités morphogénétiques sous l'effet des régulateurs de croissance. L'utilisation des hormones auxiniques (2,4-D, ANA) ou d'un agent chimique ayant une action hypométhylante sur l'ADN, le 5-azaC, ont induit le développement des pistillodes. Cependant, la différenciation incomplète des gamétophytes femelles des pistillodes montre que les hormones utilisées n'ont permis d'assurer la maturation de l'ovule.

En revanche, Masmoudi et al. (2008) ont rapporté l'obtention *in vitro* de fleurs hermaphrodites à partir de fleurs femelles de palmier dattier. En effet, des étamines matures ont pu être régénérées à partir des staminodes des fleurs femelles en utilisant une balance hormonale comprenant de l'IBA et de la BAP. Le développement des étamines est optimal lorsque les bourgeons floraux sont prélevés aux stades d'initiation des verticilles sexuels (staminodes et carpelles).

L'ensemble des expériences de développement floral suggère fortement que le déblocage du développement des organes sexuels stériles (staminodes des fleurs femelles ou pistillodes des fleurs mâles) reste réversible. Ces organes stériles peuvent être réactivés sous l'action de facteurs appropriés. De plus, cette réversibilité conforte l'idée que le bourgeon floral du palmier dattier est potentiellement bisexuel jusqu'à un stade tardif.

De plus, la plasticité florale du palmier dattier observé *in vitro* conforte l'hypothèse selon laquelle les auxines et les cytokines joueraient un rôle important dans la régulation du développement des organes sexuels. Les applications hormonales exogènes modifient la balance hormonale endogène, ce qui affecte la détermination du sexe. Ces observations sont en accord avec les travaux de Lebel-Hardenack et al (1997) qui concluent que les gènes associés à l'expression du sexe de la fleur chez le maïs sont impliqués dans les métabolismes des hormones. C'est en effet le cas pour de nombreuses espèces végétales (Ainsworth, 2000). Cependant, mis à part quelques exceptions comme le maïs et le melon (Acosta et al., 2009 ; Boualem et al., 2008) les mécanismes d'action de ces hormones sur le programme de détermination du sexe ne sont pas encore élucidés.

Chapitre 4 : Caractérisation des processus cellulaires associés à la base de l'unisexualité

Nous avons établis dans les chapitres précédents que le sexe du palmier dattier peut être distingué dès la mise en place du verticille femelle au stade « bisexuel » V. Les premiers signes du dimorphisme sexuel résulteraient d'une activité mitotique plus importante dans les cellules du gynécée fertile par rapport à son équivalent non fonctionnel mâle.

Cette différence d'activité mitotique dans les primordia du gynécée se manifeste sous forme d'un ralentissement de la prolifération cellulaire, ce qui conduit à l'arrêt du développement des staminodes et des pistillodes. Les événements cellulaires et moléculaires associés au blocage du développement de ces organes stériles demeurent inconnus.

Sur la base de nos résultats précédents et des données de la bibliographie et pour tenter d'expliquer les causes du blocage de développement, nous avons étudiés l'hypothèse d'une dégénérescence cellulaire ou d'un arrêt des divisions cellulaires dans les primordia des organes sexuels stériles. D'après les données disponibles chez les espèces dioïques, la dégénérescence nucléaire est rapportée comme étant le processus associé à l'unisexualisation des fleurs mâles chez le maïs (Calderon-Urrea et Dellaporta 1999). Différentes études ont montré que les cellules des bourgeons floraux ou végétatifs peuvent être bloquées en phase G1 ou G2 et que la prolifération cellulaire est contrôlée par des molécules hautement conservés incluant les histones et les cyclines (Cockcroft et al., 2000 ; Matsunaga et al., 2006). Certains gènes codant des histones sont spécifiquement exprimés au cours de la phase S. Ainsi, ils peuvent être utilisés comme marqueurs du cycle cellulaire, notamment dans la transition G1-S (Krizek, 1999). Chez le palmier dattier, nous étudié l'intégrité cellulaire ainsi que les activités de divisions par l'expression du gène histone H4 dans les primordia des organes sexuels stériles aux stades de blocage dans un premier temps.

D'autre part, il existe plusieurs processus associés à l'unisexualisation florale chez les espèces dioïques. Parmi, les processus épigénétiques sont rapportés comme impliqués dans l'arrêt des organes stériles mâles des fleurs femelles chez *S. latifolia* (Janousek et al., 2006). De plus, nos résultats précédents sur le développement carpellaire *in vitro* des pistillodes des fleurs mâles ont montré que le blocage du développement des organes stériles peut être reversé sous

induction hormonales (2,4D) ou grâce à un agent chimique hypométhylant (5-azaC). Ces résultats suggèrent que par des agents hypométhylants, la répression du blocage des organes résiduels pourrait être levée. Dans cette optique, nous avons recherché à évaluer l'état de la méthylation de l'ADN globale dans les cellules des primordia des pièces résiduelles stériles du palmier dattier par immunolocalisation.

Sur le plan expérimental, étant donné que les bourgeons floraux de palmier dattier contiennent à la fois des organes fertiles et des organes stériles, les méthodes d'analyse excluent tout dosage qui nécessiteraient un broyage de la fleur et donc le mélange des deux types d'organes. De plus, nous n'avons pas pu réaliser des dissections étant donné la petite taille des organes stériles (< à 1mm). Par conséquent, nous avons focalisé nos investigations sur les analyses histo-cytologiques rendant possible la comparaison de l'état des cellules des organes fertiles et stériles sur une même coupe histologique.

I. Absence de dégénérescence cellulaire dans les organes sexuels stériles

L'objectif de cette étude est de déterminer si l'arrêt du développement des organes stériles serait dû à une dégénérescence cellulaire et nucléaire.

Une analyse de l'intégrité cellulaire a été réalisée par l'observation de l'état des structures nucléaires et des organites, et l'étude de l'état de la chromatine au sein des noyaux des cellules des organes sexuels. Pour cela, nous avons réalisé des colorations de l'ADN au DAPI et des observations ultra-structurales des cellules des organes stériles par microscopie électronique à transmission (MET).

Les travaux ont porté sur trois stades de développement de la fleur :

- le stade bisexuel V pour lequel les primordia des organes fertiles et stériles sont initiés. C'est aussi le stade où les premiers signes de dimorphisme sont visibles entre les deux sexes
- les stades VI et VII correspondant au blocage du développement des staminodes et des pistillodes respectivement

A. *Etat des noyaux des cellules des organes fertiles et stériles*

Nous avons examiné l'intégrité nucléaire des cellules des pistillodes des fleurs mâles et celles des staminodes des fleurs femelles sur des coupes histologiques colorées au DAPI à trois stades différents de développement (V, VI et VII). Le DAPI est un intercalant fluorescent de l'ADN qui se fixe de façon covalente sur les bases A et T. Il permet ainsi d'observer la présence d'ADN dans les cellules.

Nos résultats ont montré la présence de noyaux intacts dans les cellules des staminodes (figure 52a-c) et des pistillodes (figure 52d-f) au stade V (figure 52a,d), VI (figure 52b,e) et VII (figure 52c,f). Les cellules des staminodes et des pistillodes ne montrent aucune dégradation des contenus nucléaires après coloration au DAPI aux stades de blocage VI et VII respectivement. Les noyaux sont similaires à ceux observés les cellules des organes fertiles.

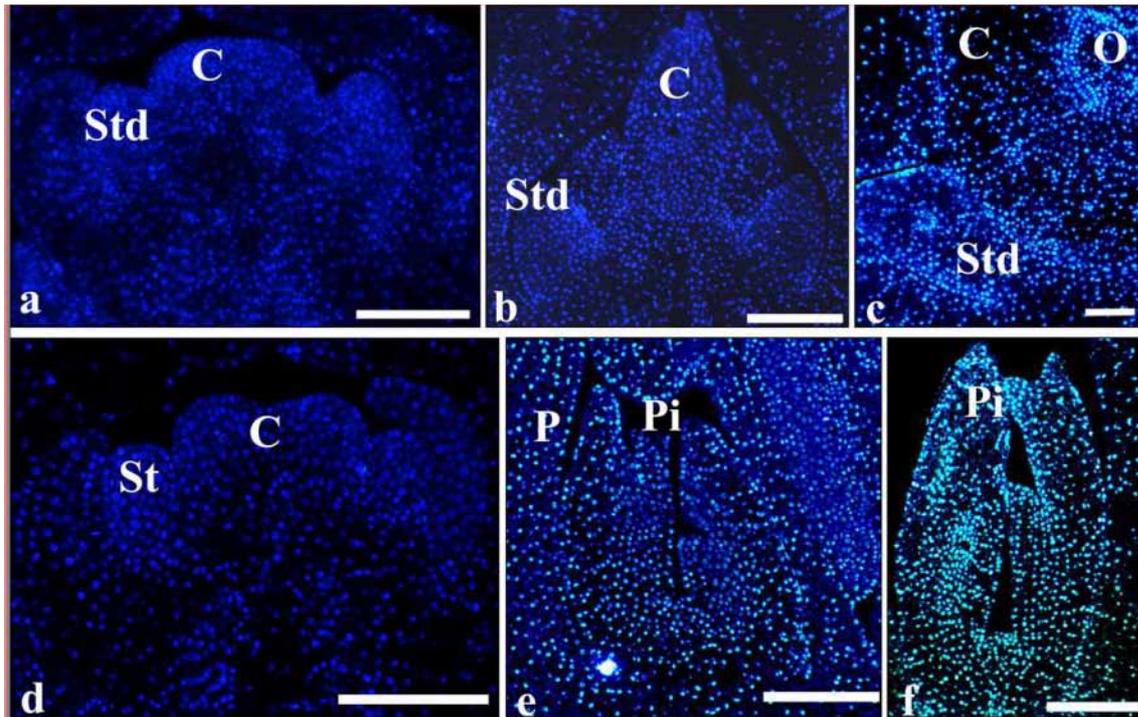


Figure 52 : Coloration de l'ADN au DAPI sur des coupes longitudinales des fleurs de palmier dattier à trois stades de développement. Le DAPI s'observe par un signal fluorescent bleu. Les noyaux des cellules des staminodes (a, b, c) et des pistillodes (d, e, f) montrent la présence d'ADN ou de noyaux entiers au stade bisexuel V (a, d), au stade VI (b, e) et au stade VII (c, f). Abréviations: C, carpelle; O, ovule; Pi, pistillode; Std, staminodes; St : étamines. Barre =100 μ m.

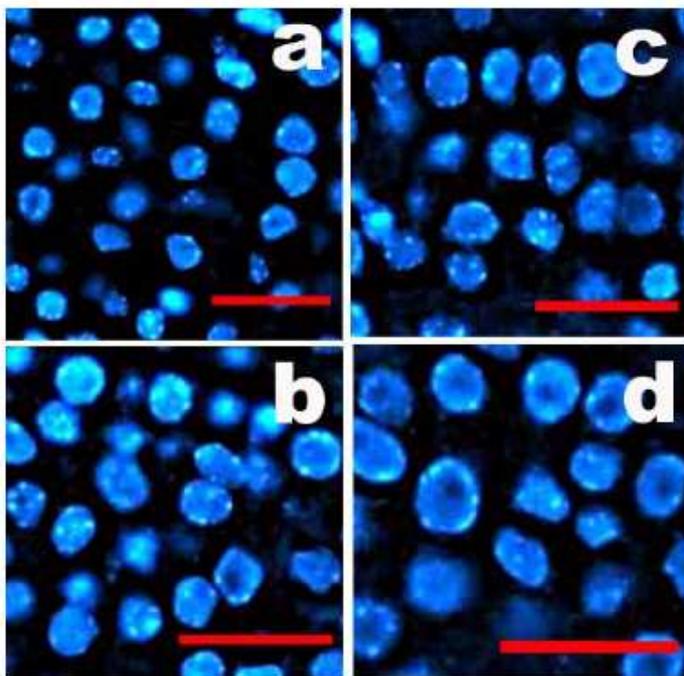


Figure 53 : Observation des noyaux colorés au DAPI sur des coupes longitudinales des organes floraux du palmier dattier au stade VII. Les noyaux apparaissant en bleu montrent la conservation de leur intégrité dans les cellules des organes fertiles, carpelle (a) et étamines (c), ou stériles, staminodes (b) et pistillodes (d). Des chromocentres sont visibles principalement en périphérie des noyaux.

De plus, nos observations à fort grossissement ont révélé que dans les organes fertiles (figure 53a, b) et stériles (figure 53c, d) de la même fleur au stade VII, les cellules se caractérisent par de gros noyaux larges et majoritairement sphériques pour la majorité. De nombreux foyers chromatinien ou chromocentres marqués au DAPI sont observables dans tous les noyaux. Ils correspondent à l'hétérochromatine condensée. Leur nombre ainsi que leur intensité de coloration ne sont pas différents entre les cellules des organes stériles et fertiles. Néanmoins, une certaine localisation plus périphérique des chromocentres des cellules des organes stériles est observable sans toutefois être significativement différente. Cette localisation périphérique des chromocentres semble correspondre à une indication de différenciation cellulaire, cela conforte la thèse de différenciation cellulaire précoce observée lors de l'arrêt des organes stériles (voir chapitre 2).

B. Intégrité des organites intracellulaires des cellules des organes fertiles et stériles

Une fois établi que les noyaux des cellules des organes bloqués présentaient une intégrité normale, nous avons poursuivi les investigations par l'étude de l'état des organites intracellulaires pour confirmer l'intégrité ses structures nucléaires. Pour ce faire, nous avons procédé à des observations au microscope électronique à transmission (MET) des fleurs mâles et femelles aux premiers stades de blocage de développement des organes sexuels stériles (VI et VII).

Les figures 54 et 55 montrent l'état ultrastructural des cellules des fleurs femelles (figure 54) et mâles (figure 55) aux stades VI et VII.

Nos observations montrent que, globalement, la forme et l'aspect des cellules sont similaires entre les organes sexuels fertiles (54a-b ; 55a-b) et stériles (54c-d ; 55c-d) quel que soit le stade de développement et le sexe. Les cellules des organes considérés sont larges et possèdent de gros noyaux sphériques en position centrale. Les organites (mitochondries, réticulum endoplasmique, appareil de Golgi, plastes, vacuoles, noyaux etc...) sont parfaitement visibles et intègres sans aucune malformation visible (figure 56). Aucune différence spécifique du sexe n'est observable entre les cellules des organes des fleurs mâles (figure 55) et femelles (figure 54).

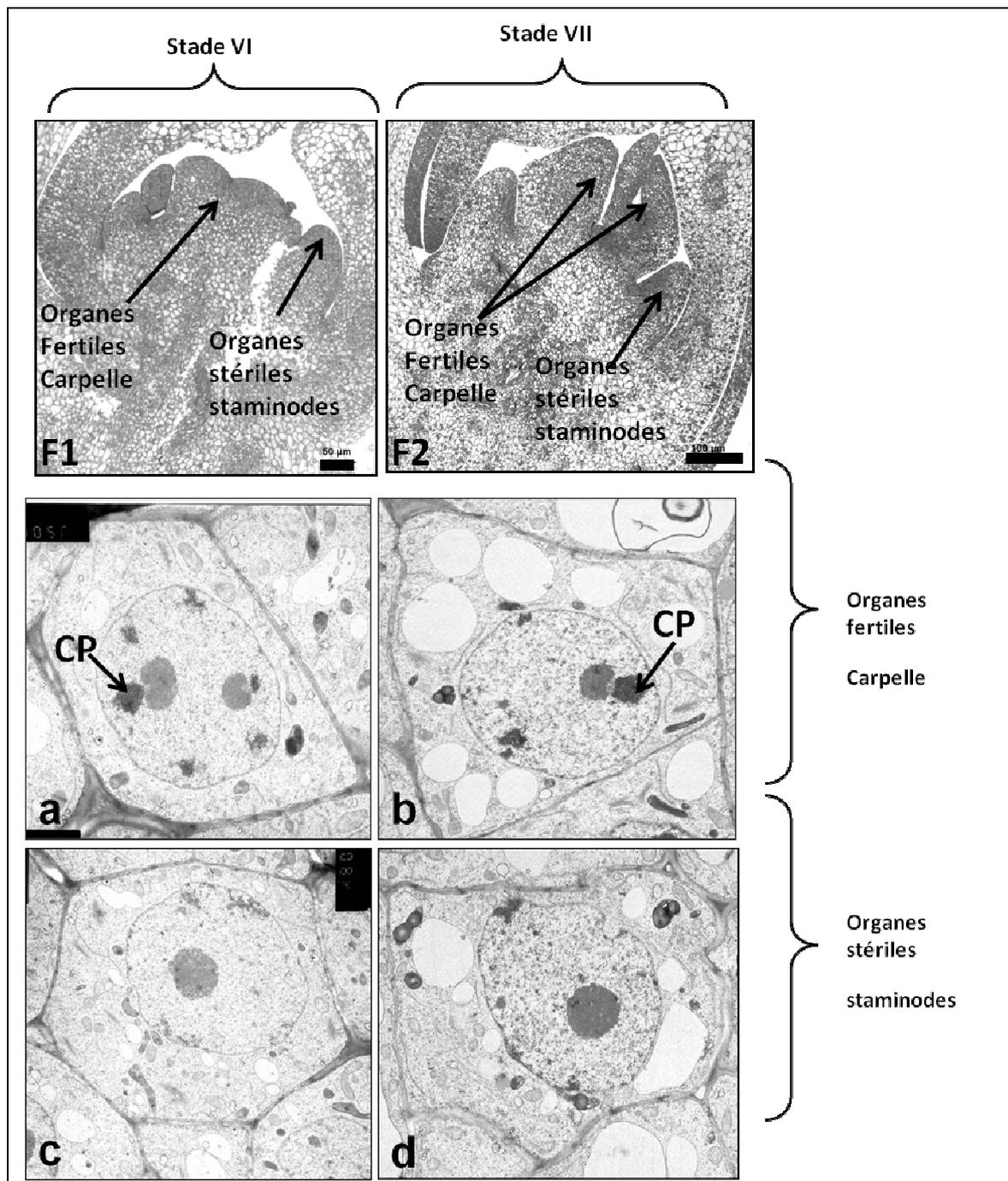


Figure 54: Ultrastructure des cellules de la fleur femelle au stade VI (F1, a, c) et au stade VII (F2,b,d). Les coupes longitudinales F1 et F2 correspondent aux coupes semi-fines. Les cellules fertiles (a,b) et stériles (c,d) montrent une parfaite intégrité de leurs organites intracellulaires. Aucune structure particulière de la chromatine des cellules stériles pouvant être relié au blocage n'est observée (c,d). Des corps protéiques (CP) très denses aux électrons associés au nucléoles sont observables principalement dans les noyaux des cellules fertiles (a,b). Échelles : 50µm (F1) ; 100µm(F2) ; X3600(d) ; X4800 (c).

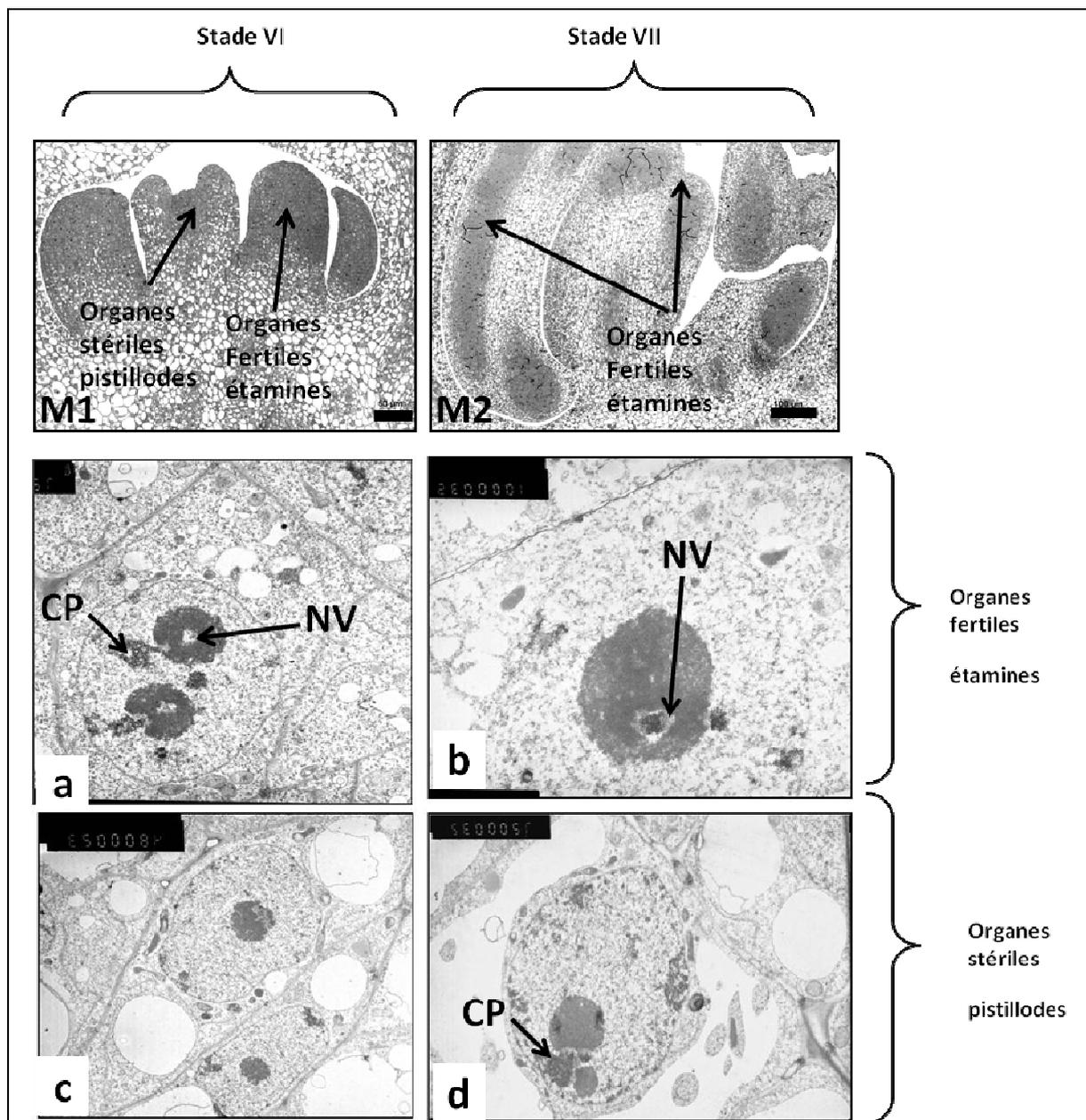


Figure 55: Ultrastructure des cellules de la fleur mâle au stade VI (M1, e,g) et au stade VII (M2,f,h). Les coupes longitudinales M1 et M2 correspondent aux coupes semi-fines. Les cellules fertiles (e,f) et stériles (g,h) montrent une parfaite intégrité de leurs organites intracellulaires. Aucune structure particulière de la chromatine des cellules stériles pouvant être relié au blocage n'est observée (g,h). Des corps protéiques (CP) très denses aux électrons associés au nucléoles et des vacuoles nucléolaires (VN) sont observables principalement dans les noyaux des cellules fertiles (e,f). échelle : 50µm (M1) ; 100µm(M2) ; X4800 (g) ; X7200(e,h) ; X10000(f).

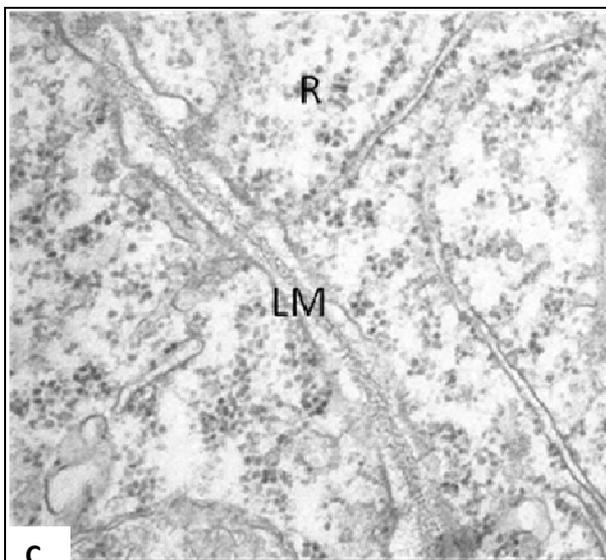
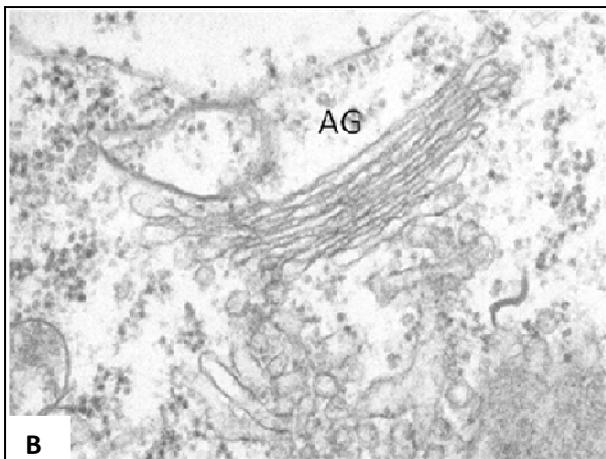
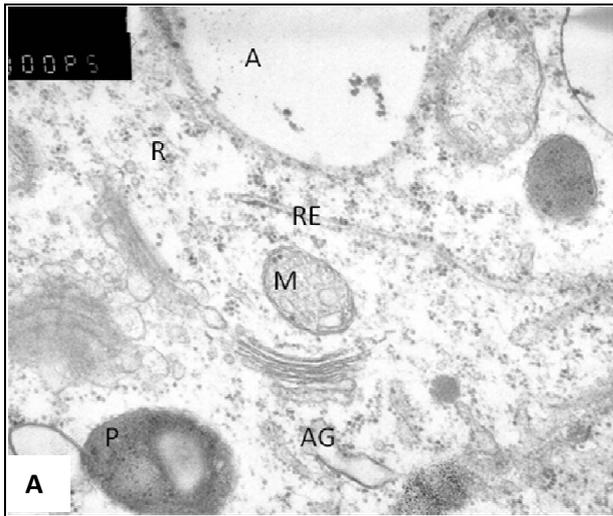


Figure 56 : Organites intracellulaires des cellules des organes sexuels stériles. A : détail ultrastructurale d'une cellule. B : Détail d'un appareil de Golgi. C : Détail des ribosomes et de la lamelle moyenne. On observe la présence des organites présentant des morphologies normales. Abréviations : V : vacuole ; R : ribosomes ; RE : réticulum endoplasmique ; M : mitochondrie ; AG : appareil de golgi ; P : amyloplast. Échelle : A (X29000) ; B(48000) ; C (X29000).

La structure de la chromatine nucléaire, peu condensée, est très similaire qu'il s'agisse des noyaux des cellules des organes sexuels stériles (figure 54c,d et 55c,d) ou fertiles (figure 54a,b et 55a,b). Il est à noter que les noyaux des cellules des organes stériles (figure 54c,d et 55c,d) ne présentent aucune condensation particulière de la chromatine pouvant être associé à un blocage du développement.

Le nucléole présente une organisation particulière dans les cellules des organes fertiles (figures 54a,b et 55a,b). Il apparaît comme une structure composée d'un centre fibrillaire surmonté d'une couche périphérique granulaire. Des structures très denses (ou corps nucléolaires) associées au nucléole sont observables. Ces structures sont également localisées à proximité immédiate de l'enveloppe nucléaire. Elles émergent à partir de la couche granulaire du nucléole. Cela suggère que ces SnRNP sont originaires du nucléole. Ces structures pourraient correspondre à des ribonucléoprotéines nucléaire (SnRNP : Small nuclear Ribonucleoproteins). La présence de SnRNP est plus importante dans les cellules des organes sexuels fertiles des fleurs mâles et femelles mais elle est également observée dans les organes stériles. De plus, les noyaux des organes sexuels fertiles des fleurs mâles présentent des vacuoles nucléolaires (figure 55 a,b). Ces vacuoles renferment ou non des composés granulaires. Ces composés granulaires semblent être des SnRNP.

La vacuolisation cellulaire augmente entre le stade VI (figure 54a,c et 55a,c) et le stade VII (figure 54b,d et 55b,d). De plus, les cellules des organes sexuels stériles, staminodes (figure 54c,d) ou pistillodes (figure 55c,d) présentent plus de vacuoles que leurs organes sexuels fertiles de la même fleur, carpelles (figure 54a,b) ou étamines (figure 55a,b). La présence de cette vacuolisation est associée à une élongation et une différenciation précoces des cellules des organes stériles.

Conclusions

Les cellules des staminodes et des pistillodes par comparaison avec les cellules fertiles ne montrent aucune **dégradation des contenus nucléaires** après coloration au DAPI et observations au MET. Ces résultats révèlent que l'intégrité nucléaire des cellules des organes sexuels stériles est conservée. Les observations suggèrent un **fonctionnement cellulaire normal**. Toutes les cellules sont transcriptionnellement actives. De plus, la présence abondante des SnRNP ainsi que des vacuoles nucléolaires suggèrent l'existence d'une intense

activité de transcription chez les organes fertiles que dans les cellules des organes stériles. De l'ensemble de ces résultats, nous déduisons que l'arrêt du développement des organes sexuels stériles aux stades VI et VII ne serait donc pas dû à un processus de dégénérescence cellulaire. L'aspect ultrastructural des cellules des organes stériles suggèrent une légère réduction de leur activité de transcription.

II. L'arrêt des divisions cellulaires dans les organes sexuels stériles

Nous avons observé qu'il n'y a pas de dégénérescence cellulaire dans les organes stériles. Un arrêt des divisions cellulaires pourrait-il être responsable du blocage de leur développement ?

Ainsi, pour étudier l'activité mitotique des cellules dans les différents tissus floraux, des travaux d'hybridation *in situ* ont été réalisés pour trois stades différents de développement floral (stades V, VI et VII) afin de détecter les transcrits d'un gène codant une histone H4.

Comme précédemment mentionné, l'intérêt de travailler sur des coupes longitudinales des fleurs de palmier dattier est que chaque coupe comporte les deux organes sexuels fertiles et stériles. La présence et l'absence du signal correspondant au marqueur de division peuvent ainsi être observées sur une même coupe.

A. Arrêt des divisions dans les primordia des staminodes de la fleur femelle

Au stade bisexuel (V), l'accumulation des transcrits du gène *H4* a été détecté dans les primordia des staminodes et des carpelles de la fleur femelle (figure 57a). Aux stades correspondant à la différenciation sexuelle (VI, VII), les transcrits du gène *H4* ne sont détectés que dans les cellules du carpelle fertile en croissance et plus tard dans les cellules des primordia de l'ovule (figure 57b,c). Cependant, aucun signal significatif correspondant aux transcrits de gène *H4* n'a été détecté dans les primordia de staminodes des fleurs femelles au stade VI et VII (figure 57b,c).

B. Arrêt des divisions dans les primordia des pistillodes de la fleur mâle

Dans la fleur mâle, les transcrits d'histone *H4* sont détectables dans tous les primordia des organes sexuels au stade « bisexuel » V (figure 57d). Ils sont également observables dans cellules sporogènes des anthères au stade VI (figure 57e) et dans le méristème ovulaire de pistillodes au stade VII (figure 57f). La présence de divisions cellulaires dans les pistillodes au stade VII est vraisemblablement limitée à l'initiation des ovules. Aucun signal correspondant aux transcrits du gène *H4* n'a été détecté dans les cellules de pistillodes au stade VI au moment où les étamines de la fleur mâle sont en cours de différenciation pour générer les anthères et le filament. De plus, les pistillodes sont dépourvues d'activité de division pour les stades de développement tardifs VIII et IX.

Conclusion

Les travaux d'hybridation *in situ* permettant de visualiser l'expression du gène codant une histone *H4* ont montré l'absence d'accumulation de ces transcrits dans les cellules des staminodes et des pistillodes aux stades correspondant au blocage VI et VII respectivement. Nos résultats suggèrent que le blocage du développement des staminodes et des pistillodes, donc l'unisexualité des organes floraux qui en découle, est dû à un arrêt des divisions cellulaires.

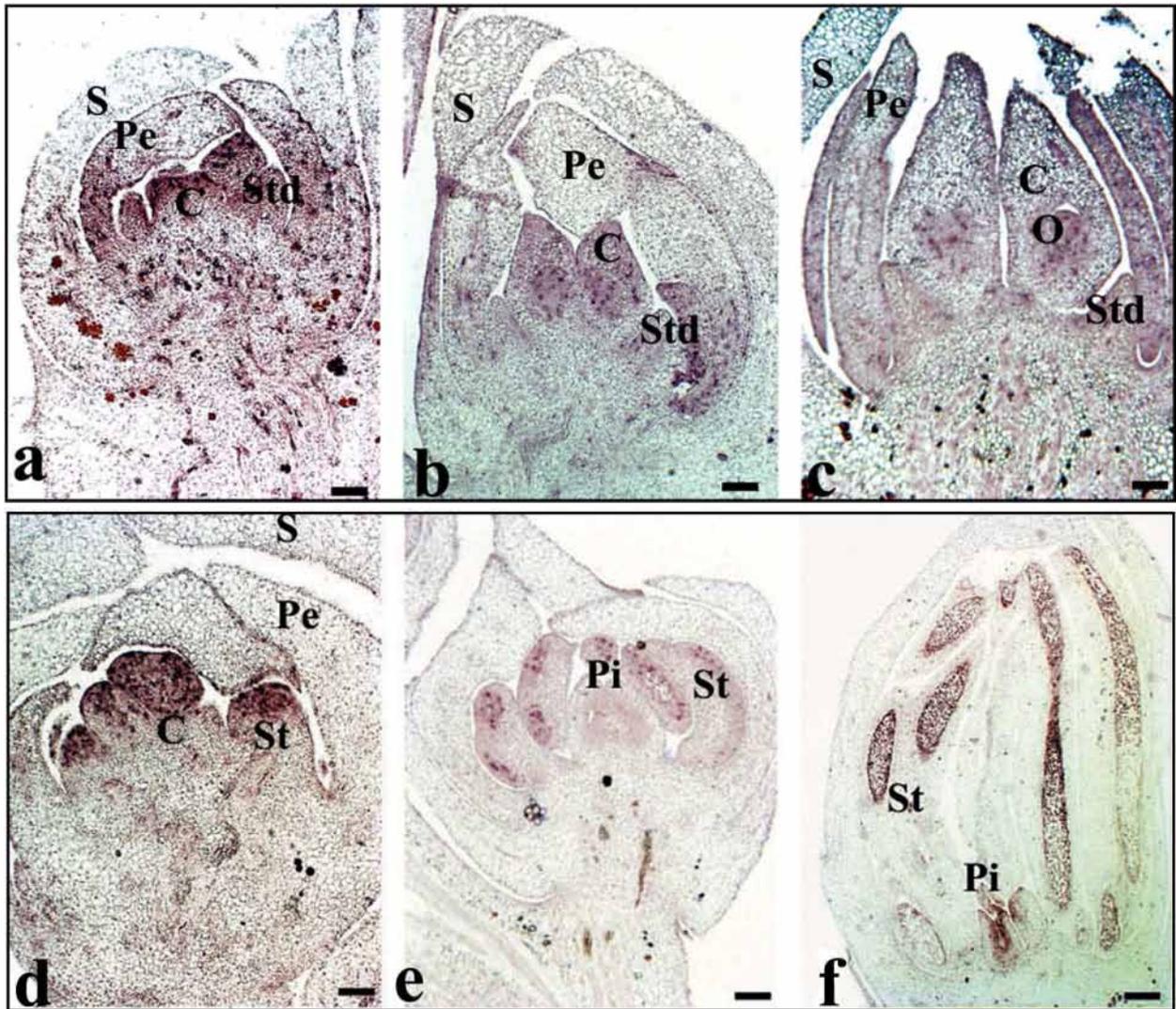


Figure 57 : Analyse par hybridation *in situ* de l'expression du gène *H4* dans des coupes longitudinales des fleurs de palmier dattier à trois stades de développement (V, VI et VII). Les cellules qui montrent une accumulation des transcrits d'histone H4 sont colorées en pourpre. Chez la fleur femelle, les transcrits d'histone H4 sont observés dans tous les primordia d'organes au stade bisexuel V (a) et dans les ovules carpellaires aux stades VI et VII (b, c) alors que aucune accumulation de transcrits d'histone H4 n'est visible dans les staminodes aux stades VI et VII (b, c). Chez la fleur mâle, l'expression du gène histone H4 est uniquement détectable dans les primordia de tous les organes (d), dans les étamines (e, f) et dans l'ovule (f). Aucun signal de H4 n'est visible dans les pistillodes au stade VI (e). Abréviations: C, carpelle; O, ovule; Pe, pétale; Pi, pistillode; Std : staminodes; St, stamens ou étamines; S, sépale. Barre : 200 μ m.

III. Rôle de la méthylation dans l'unisexualité florale

D'après les résultats précédents, nous avons établi l'absence de dégradation cellulaires et d'altération des organites intracellulaires dans les cellules des organes sexuels stériles. L'intégrité conservée des cellules semblent écarter l'hypothèse d'un processus de dégénérescence cellulaire à la base du blocage d'élongation des organes stériles des fleurs du palmier dattier. De plus, nos travaux d'hybridation *in situ* avec le marqueur de division H4 ont montré que ce blocage de développement est associé à un arrêt de divisions des cellules des organes stériles. Nous avons poursuivi la recherche des causes de blocage en nous focalisant sur la méthylation d'ADN. Pourquoi cette hypothèse ? En effet, la méthylation est un élément clé des mécanismes de répression de la transcription des gènes. De plus, il a été montré l'existence d'une corrélation entre la méthylation globale d'ADN et le blocage des organes sexuels stériles chez le *S. latifolia*.

Afin de rechercher l'implication de la méthylation globale de l'ADN dans l'arrêt du développement des organes sexuels stériles, nous avons procédé à l'analyse par immunolocalisation des cytosines méthylées de l'ADN des organes floraux à plusieurs stades de développement. Les trois stades de développement de la fleur choisis sont :

- le stade VI correspondant à l'arrêt des divisions cellulaires dans les organes stériles (staminodes et pistillodes)
- le stade V qui correspond l'apparition du premier dimorphisme sexuel
- le stade IV pour observer l'état de méthylation d'ADN des primordia avant l'émergence du dimorphisme sexuel

Pour chacun des stades, nous avons évalué l'état de la méthylation globale des organes sexuels fertiles et stériles.

Les patterns de méthylation de l'ADN des organes stériles et fertiles de fleurs de palmier ont été analysés en utilisant un anticorps monoclonal dirigé contre la 5 méthylcytidine et visualisé au moyen d'un fluorochrome, l'Alexa 488.

Nous avons réalisés des contrôles afin de nous assurer de l'absence de fixation aspécifique des anticorps utilisés. De plus, pour contrôler l'accessibilité et la fixation des anticorps à l'ADN ou de la présence de la fluorescence 5 methylcytidine dans les noyaux, une colocalisation du signal de l'Alexa 488 avec celui des marqueurs spécifiques du noyau

(DAPI) a été réalisée par analyse d'image, et déconvolution spectrale, grâce au logiciel *LSM Image Browser*. Cette analyse d'image permet de visualiser les deux fluorochromes (Alexa 488 et DAPI) sur les mêmes noyaux des coupes de fleurs.

Nos observations montrent que le signal fluorescent est présent dans la plupart des noyaux des cellules des organes fertiles ou stériles des fleurs mâles et femelles (Figure 58). Cependant, le pattern de marquage est différent entre les organes fertiles et stériles de la fleur (figure 58). En effet, les noyaux des cellules des organes fertiles présentent un signal de méthylation de l'ADN plus faible que les noyaux des cellules des organes stériles (figure 58). Pour la fleur femelle (figure 58a-c ; figure 59A-B), les primordia des staminodes sont plus méthylés que les primordia des carpelles. De même, les noyaux des pistillodes de la fleur mâle montrent un marquage fluorescent plus important que celui observé dans les étamines (figure 58d-f ; figure 59C-D). Il est important à noter que la différence de pattern de méthylation de l'ADN est observable dès le stade IV, avant l'émergence des premiers dimorphismes sexuels de la fleur (figure 58a, d ; figure 58 A, C).

Les différences de méthylation de l'ADN des noyaux des cellules des organes sexuels de la fleur de palmier dattier ont été confirmées par une analyse statistique (figure 59). D'après le Test-T au seuil de 5%, la moyenne de l'intensité de la fluorescence des noyaux est significativement plus importante dans les primordia des organes stériles par rapport aux organes fertiles pour les stades IV (figure 59 A, C) et V (figure 59B, D).

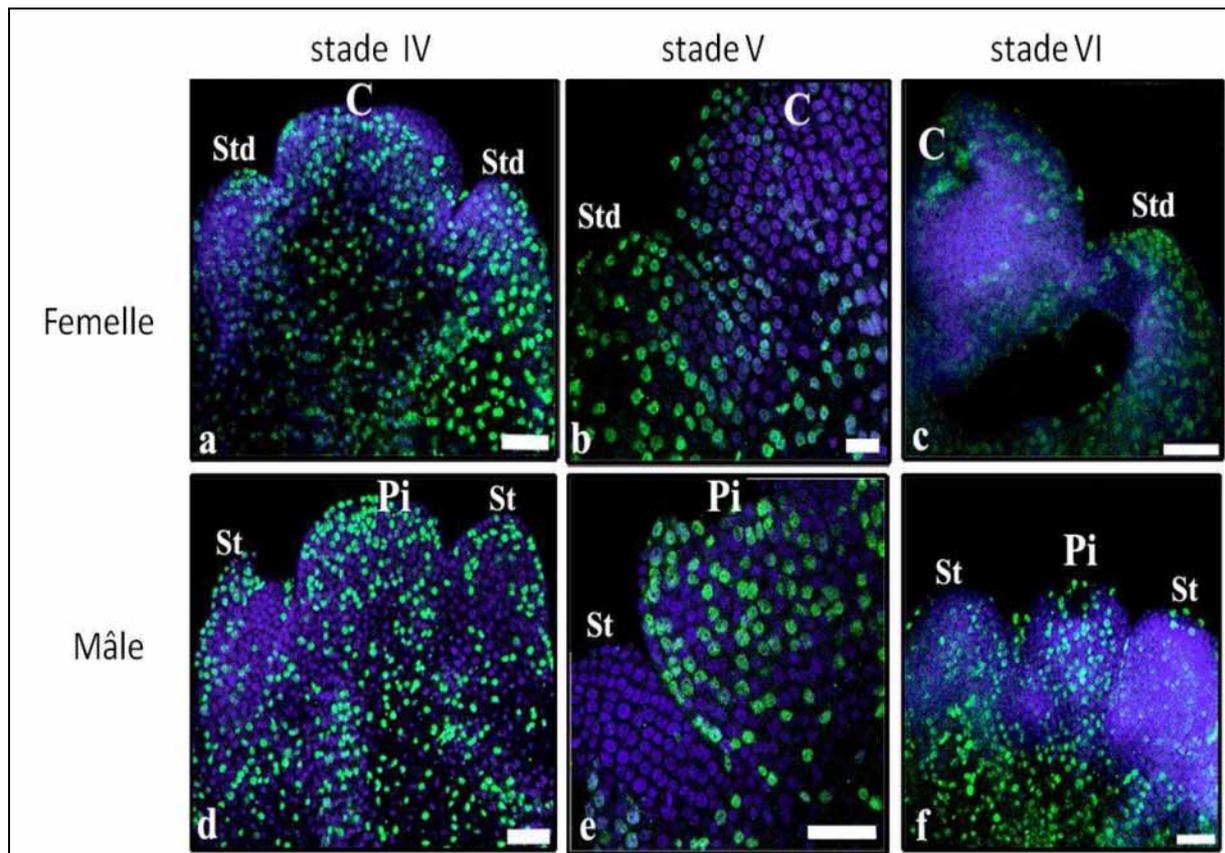


Figure 58: Pattern de méthylation de l'ADN des méristèmes floraux du palmier dattier à différents stades de développement. Le signal bleu indique la présence des noyaux et le signal vert correspond à la méthylation de l'ADN. a-c: organes floraux femelles au stade IV (a), V (b) et VI (c). d-f: bourgeons floraux mâles au stade IV (d), V (e) et VI (f). Barre: 20 μ m (b,e), 50 μ m (a,c,d,f).

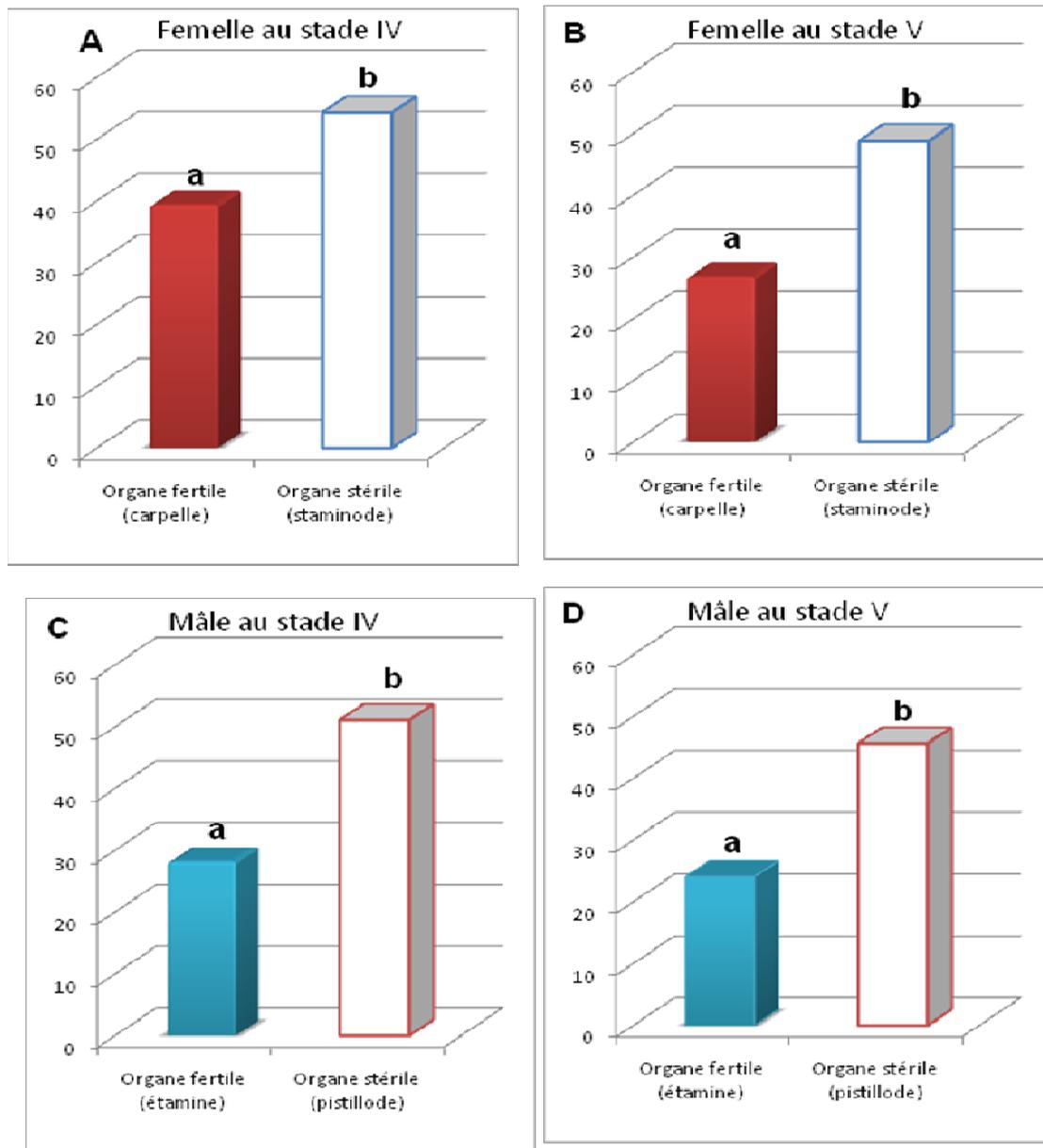


Figure 59: Quantification du marquage de méthylation des résidus de cytosine de l'ADN génomique au niveau des primordia des organes sexuels fertiles (carpelles et étamines) et stériles (staminodes et pistillodes) des fleurs femelles (A-B) et mâles (C-D) à deux stades de développement IV (A-C) et V (B-D). Pour chaque stade et pour chaque sexe, cinq fleurs différentes sont utilisées pour cette étude. Pour l'évaluation de la méthylation, une trentaine de noyaux pour chaque primordium de chaque organe et chaque stade ont été analysés. Les valeurs présentées correspondent à la moyenne de la fluorescence des noyaux des primordia des organes fertiles et stériles. D'après le **Test-T** au seuil de **5%**, les noyaux sont **significativement plus méthylés** dans les primordia des organes stériles (pistillodes ou staminodes) que fertiles (étamines ou carpelles) pour les stades IV ($p=0,033$ pour les fleurs femelles ; $p=0,046$ pour les fleurs mâles) et V ($p=0,037$ pour les fleurs femelles ; $p=0,040$ pour les fleurs mâles).

Conclusion

Nos résultats révèlent que l'arrêt du développement des organes sexuels stériles est associé à une augmentation du signal de méthylation globale de l'ADN au niveau des résidus de cytosine. Cette hyperméthylation globale constatée précocement dans les pièces résiduelles stériles pourrait expliquer la diminution de l'activité mitotique observée dans les primordia des gynécées des fleurs mâles au stade V.

IV. Synthèse

L'ensemble de ces résultats nous permet de proposer l'hypothèse d'une unisexualité florale chez le palmier dattier qui serait dépendant de la combinaison de trois processus (figure 60) : un processus d'hyperméthylation globale d'ADN qui interviendrait avant l'émergence du dimorphisme sexuel, suivi d'un arrêt de l'activité mitotique des cellules des organes sexuels stériles. Les cellules des organes sexuels stériles ne présentent aucune dégradation nucléaire durant les stades avancés de développement de la fleur. Les principaux résultats de cette étude de l'unisexualité des fleurs du palmier dattier ont été valorisés par une publication (Annexe 2).

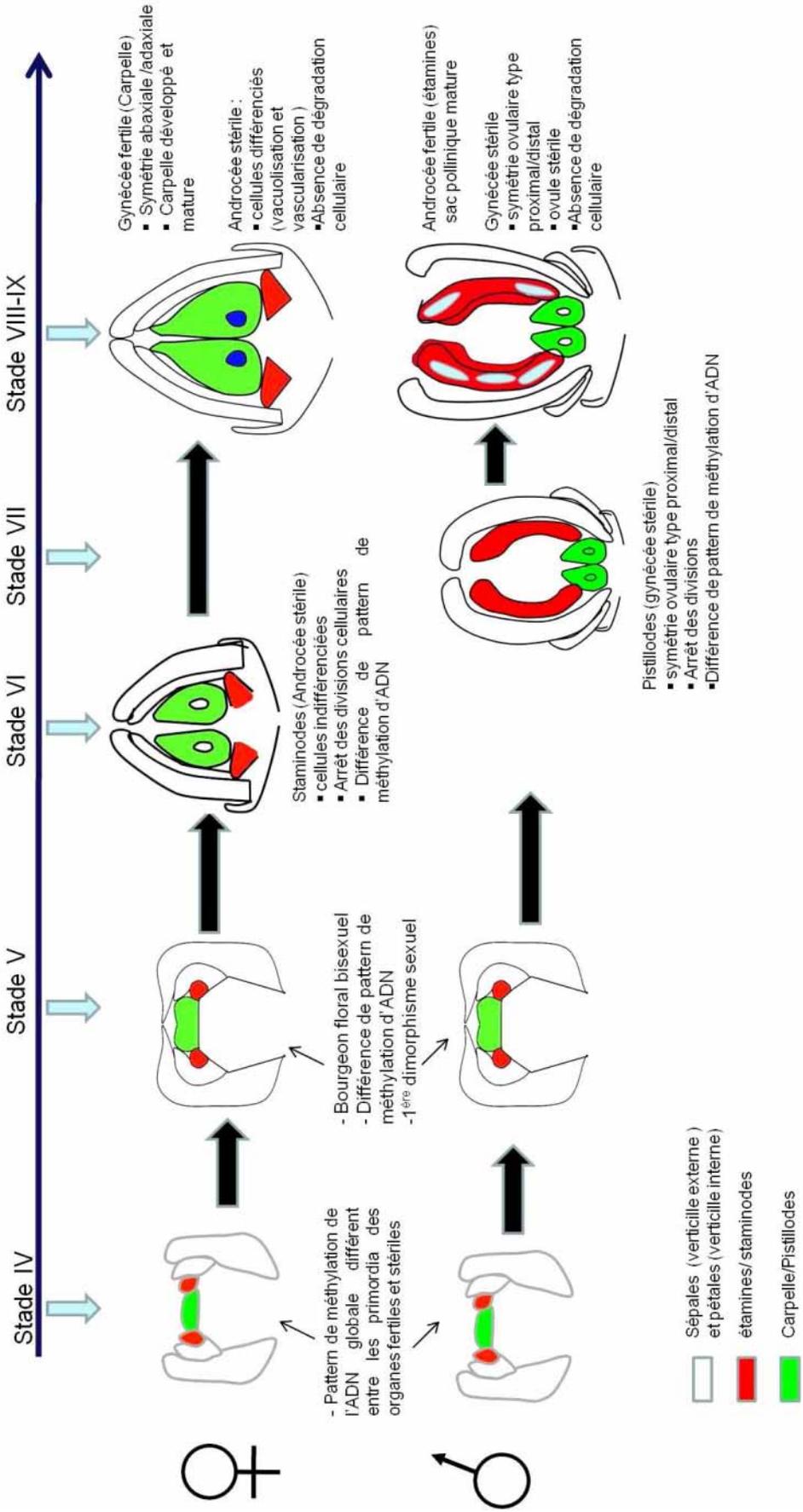


Figure 60 : Schéma de synthèse sur les processus associés à l'unisexualité des fleurs du palmier dattier

V. Discussion

Absence de dégénérescence cellulaire dans les organes stériles

Les observations ultra-structurales des organes sexuels stériles au stade post-bisexuel (VI) ont montré l'existence d'une conservation de l'intégrité cellulaire et nucléaire. L'absence de dégénérescence cellulaires dans les organes stériles des fleurs de palmier dattier est différent du mécanisme d'apoptose caractérisant l'avortement des pistillodes des fleurs mâles du maïs (Calderon –Urrrea and Dellaporta, 1999). D'autres études du développement floral conduite chez le concombre ont révélé que l'arrêt du développement des staminodes des fleurs femelles serait associé à une dégradation partielle de l'ADN observée par effet TUNEL et une condensation de la chromatine observé au MET (Hao et al., 2003). En revanche, les cellules des organes sexuels stériles des fleurs de palmier dattier se singularisent au niveau nucléaire par l'absence de condensation particulière de la chromatine. Donc, les processus régulant l'unisexualité chez le concombre, le maïs et le palmier dattier sont différents.

A l'échelle infra-structurale, des vacuoles nucléolaire et l'émission des corps protéiques associés au nucléole sont observées plus fréquentes chez les organes sexuels fertiles que ceux stériles. Deltour et De Bary (1985) avait décrit que ce type d'organisation nucléolaire contribuerait à l'activité de la transcription et pourrait permettre à l'enrichissement du cytoplasme en ribosome. L'ensemble des données ultra-structurales suggère l'existence d'une faible activité de transcription dans les organes sexuels stériles. L'état structural de ces derniers n'exprime aucune caractéristique de quiescence cellulaire, en revanche, témoigne d'un fonctionnement cellulaire normal et pourrait être considéré comme préparatoire à une différenciation.

Le blocage du développement des organes sexuels stériles est associé à un arrêt des divisions cellulaires

Les présents travaux constituent la première étude cytologique détaillée du développement reproducteur du palmier dattier avec une attention particulière accordée à l'expression des gènes du cycle cellulaire afin de déterminer leur rôle dans la transition du bourgeon floral "bisexuel" vers une fleur unisexuée. Nos résultats suggèrent que l'avortement des organes sexuels stériles résulte d'un arrêt des divisions cellulaires plutôt qu'un processus de mort cellulaire. L'arrêt du cycle cellulaire se traduit par l'arrêt de l'expression d'un gène codant l'histone H4 dans les pièces résiduelles. Cela est corrélé par un arrêt de la croissance des organes sexuels stériles. Ce même processus semble être associé au blocage de développement des organes résiduels chez d'autres espèces dioïques. Par exemple, chez le *S. latifolia*, l'avortement des pièces résiduelles inappropriées résulte d'une réduction de l'activité de divisions cellulaires comme le montrent les profils d'expression des gènes d'histone H4 (*SIH4*) et de cycline A1 (*SICycA1*) (Matsunaga et al., 2004). Chez le maïs, le blocage du développement des staminodes de la fleur femelle résulterait d'un arrêt des divisions qui est confirmé par l'absence de l'expression du gène de cycline B alors que l'unisexualité de la fleur mâle serait liée à l'avortement précoce des primordia de carpelles par apoptose, processus contrôlé par l'action des gènes *TASSELSEED 1* et *2* (Calderon-Urrea et al., 1999 ; Kim et al., 2007).

Un pattern différent de méthylation de l'ADN précède l'émergence du dimorphisme sexuel de la fleur

La méthylation de l'ADN constitue un mécanisme épigénétique qui joue un rôle important dans le développement de la plante et notamment durant la transition florale ainsi que le développement des organes floraux (Charlesworth et al, 1999). Plus précisément, la méthylation de l'ADN est admise comme un mécanisme répresseur de la transcription des gènes non requis pour le stade de développement ou différenciation donné (Kass et al, 1997). Dans nos investigations de la dynamique chromatinienne, nous avons pu constater que, à l'inverse des organes sexuels fertiles, les organes sexuels stériles mâles et femelles se distinguent par leur niveau élevé de méthylation globale de l'ADN depuis le stade pré-

bisexuel (IV) jusqu' au stade post-bisexuel (VI). La baisse d'activité mitotique dans les primordia du gynécée des fleurs mâles de palmier dattier observée au stade V pourrait résulter de leur hyperméthylation globale constatée plus précocement (stade IV). Ces observations sont à rapprocher des travaux de Janousek et al.(1996) dans lesquels il a été montré que la suppression des organes femelles (pistillodes) des fleurs mâles serait fortement corrélé à une hyperméthylation de l'ADN.

L'hypothèse d'un mécanisme de blocage associé à une méthylation étant privilégié pour expliquer l'arrêt de développement des organes sexuels stériles chez le palmier dattier, il serait intéressant de poursuivre les investigations et de rechercher les gènes qui se sont montrés sensibles aux variations de méthylation génomique globale chez *Arabidopsis*, par exemple *AGAMOUS* ou *SUPERMAN* (Jacobsen et Meyerowitz, 1997 ; Finnegan et al.,1996).

Conclusions générales et perspectives

Afin de promouvoir l'hétérosis *via* l'allogamie et obtenir une meilleure utilisation de leurs ressources, les plantes à fleurs ont développé différents mécanismes de détermination du sexe. L'étude et la compréhension des processus à la base de l'unisexualité des fleurs permet à terme de développer des marqueurs du sexe pouvant être exploités dans les programmes d'amélioration génétique des espèces d'intérêt agronomique (e.g. vigne, palmier huile et palmier dattier) afin de mieux maîtriser la gestion de la production. Dans ce contexte, les travaux présentés dans ce mémoire contribuent à la compréhension des mécanismes régulant la floraison chez le palmier dattier, avec un accent particulier sur l'initiation du développement inflorescentiel et les processus associés à la différenciation sexuelle des organes floraux.

En combinant différentes approches histo-cytologiques et immunologiques, nous avons pu caractériser les événements cellulaires associés à la mise en place du dimorphisme floral chez le palmier dattier. Nos résultats ont montré que l'unisexualité de la fleur se caractérise par trois éléments-clé à savoir l'arrêt des divisions cellulaires, l'absence de dégradation de l'ADN nucléaire et l'hyperméthylation de l'ADN des organes sexuels stériles. Nos résultats ouvrent de réelles pistes d'investigation des mécanismes gouvernant l'unisexualité florale du palmier dattier en particulier et des palmiers et plantes à fleur en général.

Induction florale chez le palmier dattier

Dans un premier temps, nos résultats ont permis de proposer l'hypothèse d'un développement reproducteur du palmier dattier en deux temps : une longue phase d'initiation du bourgeon inflorescentiel dépendante des facteurs endogènes de nature génétique, hormonale, et trophiques, et une phase de développement de l'inflorescence qui est principalement contrôlée par des facteurs exogènes (baisse de température). Les différents comportements vis-à-vis de la floraison (précoce ou tardive) observés entre les génotypes dans les mêmes conditions climatiques résulteraient d'une différence d'aptitude à répondre aux signaux exogènes par le déclenchement du développement inflorescentiel. Dans cette perspective, les connaissances acquises sur les gènes *PHYC* impliqués dans la précocité de floraison chez l'espèce modèle *Arabidopsis thaliana* (Balasubramanian et al., 2006) et chez certaines plantes tropicales comme le mil (Saïdou et al., 2009) pourrait être exploités pour la recherche des

gènes de précocité de floraison chez le palmier dattier. En effet, la date de l'induction florale est un facteur déterminant pour la production des dattes au Sahel, non seulement pour son avantage économique mais pour ne pas perdre la récolte à cause du chevauchement de la maturation des dattes et la saison des pluies. D'autre part, la caractérisation de la compétence à l'induction florale pourra être poursuivie en comparant par exemple l'identité moléculaire des bourgeons indéterminés et celle des bourgeons inflorescentiels par la recherche d'orthologues de gènes potentiellement associés au processus d'engagement dans la floraison chez d'autres espèces (e.g. *EgSQUAI* de palmier à huile) (Adam et al, 2007). Une meilleure compréhension des mécanismes génétiques responsables de l'initiation florale permettrait de disposer à terme de variétés plus adaptées aux évolutions des conditions pédoclimatiques et contribuerait à la compréhension de la phénologie globale du palmier dattier.

Rôle des hormones dans l'unisexualisation des fleurs du palmier dattier

L'unisexualité des fleurs du palmier dattier résulte d'une différence d'activité mitotique florale entre les organes fertiles et stériles depuis le stade bisexuel. Le premier dimorphisme sexuel de la fleur serait dû à une activité de division plus importante dans le gynécée femelle que son homologue de la fleur mâle. Une meilleure compréhension des mécanismes régulant la prolifération cellulaire du méristème floral permettrait d'identifier les gènes à la base de l'unisexualité florale. Une piste intéressante à investiguer sera le rôle des hormones, notamment les auxines, dans l'unisexualisation des fleurs de palmier dattier. En effet, le rôle des auxines dans les activités de division cellulaire sont bien connues (Vanneste et al., 2005). La présence d'un gradient de répartition des fleurs mâles normales et des fleurs mâles « bisexuelles » le long de l'axe d'inflorescence mâle variante *in planta* d'une part et la possibilité d'obtenir un développement *in vitro* des organes stériles sous l'effet des auxines et des cytokines d'autre part, sont compatibles avec l'hypothèse selon laquelle ces hormones seraient impliquées dans la différenciation de la fleur chez le palmier dattier. Chez les espèces modèles comme *Arabidopsis*, il a été montré que les auxines sont nécessaires à la formation de la fleur (Cheng et al., 2007). Les phénotypes des mutants des gènes *ETTIN* (qui code pour un ARF ou auxin response factor) et *YUCCA* (impliqué dans la biosynthèse des auxines) montrent une perturbation importante de la forme et du nombre d'organes par verticille, ce qui suggère que les gènes *ETTIN* et *YUCCA* joueraient un rôle important dans la prolifération cellulaire du méristème floral ainsi que dans la mise en place de la symétrie florale (Cheng et

al., 2006, Cheng et al., 2007). Lebel-Hardenack and Grant (1997) ont également rapporté que la transition du bourgeon bisexuel vers une fleur unisexuée est influencé par les hormones. De plus, l'acide jasmonique (JA) et l'éthylène ont été décrits comme des acteurs principaux de la détermination du sexe chez le maïs et le melon respectivement (Acosta et al., 2009 ; Boualem et al., 2008). Ainsi, il sera intéressant d'étudier le rôle des hormones dans la régulation de l'unisexualisation florale chez le palmier dattier. Trois pistes d'investigation pourraient être considérées : (1) le dosage global des hormones endogènes (auxines, cytokinines et gibbérellines) dans des inflorescences à différents stades clés de développement pourront être envisagés dans un premier temps ; (2) la recherche dans les fleurs mâles et femelles de l'expression des gènes impliqués dans les étapes-clé des voies de biosynthèse des auxines et des cytokines ; (3) une étude des transporteurs d'auxine (PIN) par immunodétection dans les primordia des organes sexuels mâles et femelles aux stades-clé de la différenciation florale.

Régulation génétique de l'unisexualisation des fleurs

L'arrêt du développement des organes stériles de la fleur du palmier dattier est associé à une différenciation cellulaire partielle. Les staminodes demeurent rudimentaires alors que les pistillodes présentent un développement ovulaire incomplet. Les phénotypes des pistillodes des fleurs mâles du palmier dattier sont à rapprocher de ceux des fleurs d'*Arabidopsis thaliana* lorsque certains gènes MADS box impliqués dans l'identité ovulaire sont mutés. C'est le cas des gènes *AGAMOUS* (*AG*), des gènes *SEEDSTICK* (*STK*), *SHATTERPROOF 1, 2* (*SHP1, 2*), et des gènes *INNER NO OUTER* (*INO*) et *AINTEGUMENTA* (*ANT*) qui s'expriment dans l'ovule de la fleur d'*Arabidopsis* (Colombo et al., 2008). L'absence d'un ovule mature dans les organes stériles des fleurs du palmier dattier pourrait s'expliquer par une dérégulation des gènes gouvernant l'identité ovulaire dans ce type d'organe. A ce titre, la recherche et l'identification chez le palmier dattier de gènes homologues aux gènes de l'identité ovulaire d'*Arabidopsis* serait une étape importante vers la compréhension de la régulation moléculaire de la différenciation des organes sexuels. De plus, l'étude de la détermination du sexe chez le maïs a montré l'implication de plusieurs gènes identifiés à travers un phénotype mutant *tasselseed*, tels que *TASSELSEED 1* et *TASSELSEED 2*, codant une lipoxygénase de la voie de biosynthèse de l'acide jasmonique et une alcool deshydrogénase respectivement (Acosta et al., 2009). Par ailleurs, le gène *TASSELSEED 4* code un microARN (*miR172*) impliqué dans le contrôle de la détermination du sexe du maïs et le devenir du méristème inflorescentiel par la régulation de l'expression du gène

TASSELSEED 6/INDETERMINATE SPIKELET 1, un homologue d'*APETALA 2 (AP2)* (chuck et al., 2007). Etant donné qu'un draft du génome de palmier dattier est désormais disponible, il offre la possibilité de rechercher des orthologues des gènes *TASSELSEED 1, 2* et puis d'étudier leur éventuelle implication dans la différenciation des organes sexuels du palmier dattier.

Rôle de la méthylation dans la détermination du sexe

Nous avons montré dans cette étude que l'unisexualité des fleurs du palmier dattier est associée à une hyperméthylation de l'ADN des primordia des organes stériles avant la différenciation sexuelle de la fleur. Ces résultats ont permis de mettre en lumière que des facteurs épigénétiques pourraient être impliqués dans le contrôle du développement de la fleur. L'implication de la méthylation dans la régulation du sexe a été rapportée chez très peu d'espèce à fleurs unisexuées. Chez *S. latifolia*, l'unisexualisation de la fleur mâle résulte d'une hyperméthylation des organes stériles femelles (Janousek et al., 2006). A une échelle différente, au niveau du gène, il a été montré très récemment que la formation d'une fleur femelle résulterait d'une méthylation du locus gouvernant la gynocécie chez le melon (Martin et al., 2009). Les résultats sur les différences de méthylation globale constatées chez le palmier dattier pourraient être complétés par l'analyse de la méthylation des gènes qui seront identifiés comme candidats pour la détermination du sexe chez cette espèce.

L'ensemble des résultats présentés ici, ainsi que les données disponibles dans la littérature, soulignent le fait que les processus cellulaires gouvernant l'unisexualisation des fleurs soient différents d'une espèce à une autre. L'unisexualité florale peut être mise en place à travers différents processus, tels que : l'apoptose (maïs, (Dellaporta et al., 1999) ; la dégradation partielle de l'ADN (concombre, Hao et al., 2003) ; l'arrêt des divisions cellulaires (silène (Masunaga et al. 2004), palmier dattier (présent travaux)) ; l'action d'une hormone (melon) ; ou bien d'autres. Ainsi, la détermination du sexe des plantes est un processus très complexe et chaque espèce constitue un modèle en soi pour les mécanismes d'unisexualisation florale.

Les processus cellulaires à la base de l'unisexualité des fleurs du palmier dattier sont désormais mieux connus, et donc la recherche des gènes exprimés différemment entre les fleurs mâles et femelles aux stades-clé de la différenciation sexuelle s'en trouvera facilitée. Il conviendrait de se focaliser sur les gènes impliqués dans le contrôle du cycle cellulaire et dans la biosynthèse des hormones.

La comparaison des processus cellulaires à la base de l'unisexualité des fleurs des autres palmiers de la famille des Arecaceae pourra être également envisagée, en s'appuyant sur les données déjà obtenues sur le palmier dattier comme point de référence. Une telle approche évo-devo, permettrait de comprendre si des voies communes de régulation ont été sollicitées au cours de l'évolution pour l'établissement de la monoécie ou la dioécie au sein de cette famille.

Les connaissances acquises sur le développement reproducteur du palmier dattier ouvrent de réelles perspectives pour la recherche et l'identification des marqueurs moléculaires de la différenciation et la détermination du sexe chez le palmier dattier. L'obtention des marqueurs du sexe sera un grand atout pour l'ensemble des programmes de sélection de variétés de palmier dattier résistantes aux stress abiotiques et biotiques dans un contexte de changements climatiques.

Références bibliographiques

- Abdelouahhab Zaid et Helal H Al Kaabi.** (2009). Plant-off types in tissue culture-derived date palm (*Phoenix dactylifera* L.). *the Blessed Tree*. 01:12-23
- Aberlenc-Bertossi F, Noirot M, Duval Y (1999)** : BA enhances the germination of oil palm somatic embryos derived from embryogenic suspension cultures, *Plant Cell. Tissue Organ. Cultures*, 56:53–57.
- AboEl-Nil M., Al-Ghamdi A.S., Turjoman A. (1986).** Role of tissue culture in propagation and genetic tree improvement of date palm. A prespective review. Proceedings of the second symposium on the date palm, Saudi Arabia,
- Acosta I F, Laparra H, Romero S, Schmelz E, Hamberg M, Mottinger J P, Moreno M, Dellporta S L.,** 2009: tasselseed 1 is a lipoxygenase affecting jasmonic acid signaling in sex determination of maize. *Science* vol 323:262-265
- Adam H, Jouannic S, Escoute J, Duval Y, Verdeil JL, Tregear J. 2005.** Reproductive developmental complexity in the African oil palm (*Elaeis guineensis*, *Arecaceae*). *American Journal of Botany* **92**: 1836–1852.
- Adam H, Jouannic S, Orioux Y, Morcillo F, Richaud F, Duval Y, Tregear JW. 2007.** Functional characterization of MADS box genes involved in the determination of oil palm flower structure. *Journal of Experimental Botany* 58: 1245–1259
- Ainsworth, C.** (2000). Boys and girls come out to play: The molecular biology of dioecious plants. *Ann. Bot.* 86, 211–221.
- Al-Khayri J. M. (2001).** Optimization of biotin and thiamine requirements for somatic embryogenesis of date palm (*Phoenix dactylifera* L.). *In vitro Cellular and Developmental Biology Plant*, 453-456.
- Asmussen C. B., Dransfield J., Deickmann V., Barfod A. S., Pintaud J.-C. et Baker W. J.** (2006). A new subfamily classification of the palm family (*Arecaceae*): evidence from plastid DNA phylogeny. *Botanical Journal of the Linnean Society*, 151: 15-38.
- Bahmanpour S., Talaei T., Vojdani Z., Panjehshahin M.R., Poostpasand A., Zareei S, Ghaemina M . 2006.** Effect of *Phoenix Dactylifera* Pollen on Sperm Parameters and Reproductive system of Adult Male Rats. *Iran J Med Sci* Vol 31 No 4:208-212
- Bai S-L, Peng YB, Cui JX, Gu HT, Xu LY, Li YQ, Xu ZH, Bai SN 2004.** Developmental analyses reveal early arrests of the spore-bearing parts of reproductive organs in unisexual flowers of cucumber (*Cucumis sativus* L.) *Planta* (2004) **220**: 230-240.
- Balasubramanian, S., S. Sureshkumar, M.Agrawal, T. P. Michael, C. Wessinger et al.,** 2006 The phytochrome C photoreceptor gene mediates natural variation in flowering and growth responses of *Arabidopsis thaliana*. *Nat. Genet.* 38: 711–715.
- Ben Abdallah A.** (1990). La phoeniciculture. Options méditerranéennes, Sér. A/n°11: 105-120.

- Bhargava S C, Saxena S N and Sharma R. (2003):** *In vitro* multiplication of phoenix dactylifera (L), *J Plant Biochemistry & Biotechnology* vol. 12, 43-47.
- Blasquez, M.A. et Weigel, D. 2000.** Integration of floral inductive signals in . *Nature* 404, 889-892.
- Blazquez, Miguel A., Ferrandiz Cristina, Madueno Francisco and Parcy Francois . 2006.** How floral meristems are built. *Plant Molecular Biology*. 60:855–870
- Borgel A., Gaillard R. (1998) :** Ploidy level determination on young vitroplant of Cucumis melo obtained by haplomehtod, colloque EUCARPIA cucurbitacées, Avignon, juin 1998
- Boualem A, Fergany M, Fernandez R, Troadec C, Martin A, Morin H, Sari MA, Collin F, Flowers JM, Pitrat M, Purugganan MD, Dogimont C, Bendahmane A. 2008.** A Conserved Mutation in an Ethylene Biosynthesis Enzyme Leads to Andromonoecy in Melons. *Science* **321**:836-838.
- Bouguedoura N. (1991).** Connaissance de la morphogenèse du palmier dattier (*Phoenix dactylifera* L.). Etude in situ et *in vitro* du développement morphogénétique des appareils végétatif et reproducteur. Thèse de doctorat d'Etat de l'Université des Sciences et de la Technologie Houari Boumediene (USTHB) d'Alger, 201 p.
- Calderon-Urrea A, Dellaporta SL. 1999.** Cell death and cell protection genes determine the fate of pistils in maize. *Development* **126**: 435-441.
- Caporali E, Spada A, Marziani G, Failla O, Scienza A. 2003.** The arrest of development of abortive reproductive organs in the unisexual flower of *Vitis vinifera* ssp. *Silvestris*. *Sexual Plant Reproduction* **15**:291-300.
- Charlesworth, D., and Guttman, D.S. 1999.** The evolution of dioecy and plant sex chromosome systems. *In Sex determination in plants. Edited by C.C. Ainsworth.* Bios Scientific Publishers, Oxford, U.K. pp. 25–49.
- Cheng PC, Gryson RI, Walden DB. 1983.** Organ initiation and the development of unisexual flowers in the tassel and ear of *Zea mays*. *American Journal of Botany* **70**: 450–462.
- Cheng Y, Dai X, Zhao Y (2006).** Auxin biosynthesis by the YUCCA flavin monooxygenases controls the formation of floral organs and vascular tissues in *Arabidopsis*. *Genes Dev* **20**, 1790–1799.
- Cheng Y, Dai X, Zhao Y (2007).** : A Role for Auxin in Flower Development. *Journal of Integrative Plant Biology* 2007, **49** (1): 99–104
- Chetto Abdelaziz , Harrak Hasnaâ , Elhachami Noureddine. 2005.** Le marketing des dattes au Maroc. Edition inra maroc 2005
- Chuck G, Meeley R, Irish E, Sakai H, Hake S: 2007 :** The maize tasselseed4 microRNA controls sex determination and meristem cell fate by targeting Tasselseed6/indeterminate spikelet1. *Nat Genet* 2007, 39:1517-1521.

- CHUCK G. and HAKE S. 2005.** Regulation of developmental transitions, *Current Opinion in Plant Biology*, 8 (1), 67-70.
- Chuck George. 20210 :** molecular mechanism of sex determination in monoecious and dioecious plants. *Advances in botanical research*, vol 54 p53, academic Press.
- Coen ES, Meyerowitz EM. 1991.** The war of the whorls: genetic interactions controlling flower development. *Nature* 353,31–37.
- Coen, E.S. et Meyerowitz, E.M. 1991** The war of the whorls : genetic interactions controlling flower Development. *Nature* 353: 31-37.
- Cohen Y., Korchinsky R. et Tripler E. (2004).** Flower abnormalities cause abnormal fruit setting in tissue culture propagated date palm (*Phoenix dactylifera* L.) *Journal of Hort. Sci. & Biotech.*, 79 (6): 1007-1013.
- Coimbra S, Torrao L, Abreu I. 2004.** Programmed cell death induces male sterility in *Actinidia deliciosa* female flowers. *Plant Physiology and Biochemistry*. **42**: 537- 541.
- Colombo, L., Franken, J., Koetje, E., van Went, J., Dons, H.J., Angenent, G.C. et van Tunen, A.J. (1995)** The petunia MADS box gene *FBP11* determines ovule identity. *Plant Cell* 7: 1859-1868.
- Cubas, P., Vincent, C. et Coen, E. (1999)** An epigenetic mutation responsible for natural variation in floral symmetry. *Nature* 401: 157-161.
- Daguin F., Letouze 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
- De Mason DA, Stolte KW, Tisserat B. 1982.** Floral development in *Phoenix dactylifera*. *Canadian Journal of Botany* **60**: 1439–1446.
- De Mason DA, Tisserat B.1980.** The occurrence and structure of apparently bisexual flowers in the date palm, *Phoenix dactylifera* L. (Arecaceae). *Botanical journal of the Linnean Society* **81**:283–292.
- Delichere C, Veuskens J, Hernould M, Barbacar N, Mouras A, et al. (1999).** SIY1, the first active gene cloned from a plant Y chromosome, encodes a WD-repeat protein. *EMBO J* 18: 4169–4179.
- Dellaporta SL, and Calderon-Urrea A. 1993.** Sex determination in flowering plants. *Plant Cell* **5**: 1241–1251.
- DeLong, A., Calderon-Urrea, A. and Dellaporta, S. L. (1993).** Sex determination gene *TASSELSEED2* of maize encodes a short-chain alcohol dehydrogenase required for stage-specific floral organ abortion. *Cell* **74**, 757-768.
- Deltour R. et De Barsy T. (1985).** Nucleolar activation and vacuolation in embryo radicle cells during early germination. *J. Cell Sci.* 78: 67-83

- Didier Greiner.** 1998. Le marché de la datte, produit de rente des oasis : enjeux, diversité, tensions. *Secheresse*, Volume 9, Numéro 2, Juin 1998
- Djerbi M. (2000)** : abnormal fruiting of the date palm derived from tissue culture, Proceedings of date palm international symposium, *Windhoek , Namibia, 22-25 February, 2000.*
- Dransfield J, Uhl NW, Amussen CB, Baker WJ, Harley M, Lewis CL. 2008.** *Genera Palmarum*. The evolution and classification of palm. Royal Botanic Gardens, Kew publishing, Kew, UK.
- Dransfield J. & Uhl N. W. (1998).** Palmae. In: Kubitzki K, ed. The families and genera of vascular plants, IV: Flowering plants, monocotyledons. *Berlin: Springer*, 306–389.
- 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 adultes, *J Plant Physiol* 119:227–235
- ENAIMI J.H, JAFAR A. 1980.** La physiologie et la morphologie du palmier dattier (*Phoenix dactylifera L.*). Ed. Université El Basra et université d'Agronomie (Iraq), 257 p.
- Farbos I, Veuskens J, Vyskot B, Negrutiu I, Mouras A. 1997.** Sex organ determination and differentiation in the dioecious plant *Melandrium album (Silene latifolia)*: a cytological and histological analysis. *Sexual Plant Reproduction* 10:155-167.
- Farbos I, Veuskens J, Vyskot B, Oliveira M, Hinnisdaels S, Aghmir A, Mouras A, Negrutiu I. 1999.** Sexual dimorphism in white campion: deletion on the Y chromosome results in floral asexual phenotype. *Genetics* 151:1187-1196.
- Ferrario S, Imminck RGH, Angenent GC. 2004.** Conservation and diversity in flower land. *Current Opinion in Plant Biology* 7, 84–91.
- Ferry M., Bouguedoura N., Hadrami I.** 1998. Patrimoine génétique et techniques de propagation in vitro pour le développement du palmier dattier, *Sécheresse*, 9(2):139-146.
- Ferry Michel (2001)**: Le palmier dattier et les systèmes de production en zones arides, recherché et expérimentation à Elche (Espagne), *INRA mensuel n°110.*
- Ferry Michel (2003).** **Date palm axillary productions: morphogenesis and in vitro propagation. Book**, The date palm: from tradition resource to green wealth, published by Emirate center for strategic study and research
- Finnegan, E.J., Peacock, W.J. et Dennis, E.S.** (1996) Reduced DNA methylation in *Arabidopsis thaliana* results in abnormal plant development. *PNAS* 93: 8449-8454
- Fki, L., Masmoudi, R., Drira, N., Rival, A., (2003)**: An optimised protocol for plant regeneration from embryogenic suspension cultures of date palm, *phoenix dactylifera L.*, cv. Deglet Nour, *Plant cell Rep*, 21: 517-524.
- Fransz Paul F and de Jong J Hans.** 2002. Chromatin dynamics in plants. *Current Opinion in Plant Biology*, 5:560–567

- Fraser JA, Heitman J:**2005. Chromosomal sex-determining regions in animals, plants, and fungi. *Curr Opin Genet Dev*, 15:645-651.
- Gaudin V, Lunness PA, Fobert PR, Towers M , Riou-Khamlichi C, Murray JA, Coen E, Doonan JH. 2000.** The expression of D-cyclin genes defines distinct developmental zones in snapdragon apical meristems and is locally regulated by the CYCLOIDEA gene. *Plant Physiology* **122**: 1137-1148.
- Gebler P., Wolko Ł., Knaflewski. K.** 2007 Identification of molecular markers for selection of supermale (YY) *asparagus* plants, *J Appl Genet* 48(2), , pp. 129–131
- Giddey A., Spichiger R.E., Stauffer F.W.** 2009. Comparative floral structure and systematics in Asian palm genus *Raphis* (Arecaceae, Coryphoideae). *Flora* 204 : 347-357
- Govaerts, R., Dransfield, J.,** 2005. World Checklist of Palms. Royal Botanic Gardens, Kew, London.
- Grant S, Hunkirchen B, Saedler H. 1994.** Developmental differences between male and female flowers in the dioecious plant *Silene latifolia*. *The plant journal* **6**:471-480.
- Hao YJ, Wang DH, Peng YB, Bai SL, Xu LY, Li YQ, Xu ZH, Bai SN. 2003.** DNA damage in the early primordial anther is closely correlated with stamen arrest in the female flower of cucumber (*Cucumis sativus* L.). *Planta* **217**:888-95.
- Harrak Hasnaâ, Chetto Abdelaziz. 2001.** Valorisation et commercialisation des dattes au Maroc. Edition inra maroc 2001
- Jack Thomas.** 2004. Molecular and genetic mechanisms of floral control. *Plant Cell* 16(Suppl): S1–17.
- Jack, T., Brockman, LL. et Meyerowitz, EM.** (1992) The homeotic gene *APETALA3* of *Arabidopsis thaliana* encodes a MADS box and is expressed in petals and stamens. *Cell* 68: 683-697.
- Jacobsen, S.E. et Meyerowitz E.M.** (1997) Hypermethylated SUPERMAN epigenetic alleles in *Arabidopsis*. *Science* 277: 1100-1103.
- Jahiel M.** (1996). Phénologie d'un arbre méditerranéen acclimaté en région tropicale : le dattier au sud du Niger et son appropriation par la société *Manga*. Thèse de doctorat de l'Université de Montpellier II, 268 p.
- Jaligot, E., Rival, A., Beulé, T., Dussert, S. et Verdeil, J.L.** (2000) Somaclonal variation in oil Palm (*Elaeis guineensis* Jacq.) : The DNA methylation hypothesis. *Plant Cell Reports* 19: 684-690.
- Janousek B, Siroky J, Vyskot B. 1996.** Epigenetic control of sexual phenotype in a dioecious plant, *Melandrium album*. *Mol Gen Genet.* 250:483-490.
- Jenik Pablo D, Irish Vivian F. 2000.** Regulation of cell proliferation patterns by homeotic genes during *Arabidopsis* floral development. *Development* **127**, 1267-1276.

- Juarez C, Banks JA. 1998.** Sex determination in plants. *Current Opinion in Plant Biology*. 1:68-72.
- Kaci-Aïssa Benchaba G. (1988).** Distribution et écologie du complexe d'espèces du genre *Phoenix*, D.E.s. U.S.T.H.B, Alger, 106 p.
- Kanno, A., H. Seaki, T. Kameya, H. Saedler et G. Theissen. (2003).** Heteropic expression of class B floral homeotic genes supports a modified ABC model for tulip (*Tulipa gesneriana*). *Plant Mol. Biol.* 52 : 831-841.
- Kass Stefan U, Pruss Dmitry and Wolffe Alan P. 1997.** How does DNA méthylation repress transcription? *TIG*. Volume 13 n° 11 : 444-449.
- A. **Kazama Y, Fujiwara MT, Koizumi A, Nishihara K, Nishiyama R, Kifune E, Abe T, Kawano S. 2009.** A SUPERMAN-like Gene is Exclusively Expressed in Female Flowers of the Dioecious Plant *Silene latifolia*. *Plant and Cell Physiology* 50:1127-1141.
- Kende H, Zeevaart JAD (1997)** The five “classical” plant hormones. *The Plant Cell* 9(7),1197-1210.
- Kgazal m.a, salbi m.i, alsaadawi i.s., Fattah f. A., Al-jibouri. 1990. :** Bisexuality in date palm in iraq. *Journal of Islamic Academy of Sciences* 3:2, 131-133
- Kim JC, Laparra H, Calderon-Urrea A, Mottinger JP, Moreno MA, A.A.M Dellaporta SL. 2007.** Cell Cycle Arrest of Stamen Initials in Maize Sex Determination. *Genetics* 177: 2547-2551.
- Krishnamoorthy, H.N. and Talukdar, A.R. (1976)** Chemical control of sex expression in *Zea mays L.*, *Z. Pflanzenphysiol.* 79, 91-94
- Krizek BA. 1999.** Ectopic expression of AINTEGUMENTA in Arabidopsis plants results in increased growth of floral organs. *Developmental Genetics* 25 : 224-2236.
- Ku Sujin, Yoon Hyejin, Suh Hak Soo Chung Yong-Yoon. 2003.** Male-sterility of thermosensitive genic male-sterile rice is associated with premature programmed cell death of the tapetum. *Planta* 217: 559–565
- Laprade Pierre Saumitou, Vernet Philippe, Vassiliadis Christine, Hoareau Yves, Magny Guillaume , Dommée Bertrand, Lepart Jacques . 2010.** A selfincompatibility system explains high male frequencies in an androdioecious plant, *Science*, vol.327, pp. 1648-1650
- Lebel-Hardenack S, Grant S. 1997.** Genetics of sex determination in flowering plants. *Trends in Plant Sciences* 2: 130–136.
- Leshem en Ophir 1977.**
- Lloyd DG, Webb CJ. 1977.** Secondary sex characters in seed plants. *Bot Rev* . 43:177-216.
- Irish E. E. and Nelson Timothy. 1989.** Sex Determination in Monoecious and Dioecious Plants. *The Plant Cell*, Vol. 1 : 737-744

- Marguerit E, Boury C, Manicki A, Donnart M, Butterlin G, Némorin A, Wiedemann S. 2009.** Genetic dissection of sex determinism, in Xorescence morphology and downy mildew resistance in grapevine. *Theoretical and Applied Genetics* **118**:1261–1278.
- Martin A, Troadec C, Boualem A, Rajab M, Fernandez R, Morin H, Pitrat M, Dogimont C, Bendahmane A. 2009.** A transposon-induced epigenetic change leads to sex determination in melon. *Nature*, **461**:1135-8.
- Masmoudi-Allouche F, Anissa Cha[^]ari-Rkhis A, Kriaa W, Gargouri-Bouزيد R , Jain SM, Drira N. 2008.** In vitro hermaphroditism induction in date palm female flower. *Plant Cell Reports* **28**:1–10.
- Mather, K. (1949)** Genetics of dioecy and monoecy in *Ecballium*, *Nature* 163, 926
- Matsunaga S, Uchida W, Kawano S. 2004.** Sex-Specific Cell Division during Development of Unisexual Flowers in the Dioecious Plant *Silene latifolia*. *Short Communication. Plant and Cell Physiology*. **45**: 795–802.
- Mccubin, M.J, van Staden, J. and Zaid, A. (2000):** a southern African survey conducted for off-types on date palms produced using somatic embryogenesis, Proceedings of date palm international symposium, Windhoek , Namibia, 22-25 February, 200.
- Meehan, R.R., Lewis, J.D. and Bird, A.P. (1992)** *Nucleic Acids Res.* 20, 5085-5092
- Meyerowitz EM. (1997).** Genetic control of cell division patterns in developing plants. *Cell* **88**, 299-308.
- Ming R, Yu Q, Moore PH. 2007.** Sex determination in papaya. *Seminars in Cell and Developmental Biology*. **18**:401-408.
- Ming Ray and Moore Paul H. 2007.** Genomics of sex chromosomes. *Current Opinion in Plant Biology*, 10:123–130
- Mohamed Azeqour' , Mohamed Amssa and Mohamed Baaziz :** Identification de la variabilité intracloale des vitroplants de palmier dattier issus de culture *in vitro* par organogénèse : étude morphologique, [Comptes Rendus Biologies Volume 325, Issue 9](#) , September 2002, Pages 947-956
- Monciero A., 1954.** Contribution a l'étude du pollen et de la fécondation du palmier dattier. In : Ann. de *l'Inst. Agr. d'Algérie*, **8 (4)**, pp. 3-28.
- Monéger F., 2001,** Molecular and evolutionary analysis of a plant Y chromosome, *Comptes rendus de l'Académie des sciences. Paris, Sciences de la vie*, 324 pp. 531-535
- Moore H. E. Jr. (1973).** The major groups of palms and their distribution. *Gentes Herb.*, 11(2) : 27-141.
- Morris Karl, Thornber Sarah, Codrai Lesley, Richardson Christine, Craig Adam, Sadanandom Ari, Thomas Brian and Jackson Stephen. 2010.** *DAY NEUTRAL FLOWERING* Represses *CONSTANS* to Prevent *Arabidopsis* Flowering Early in Short Days *The Plant Cell* 22:1118-1128

- Munier P.** (1973). Le palmier dattier. Techniques Agricoles et Productions Tropicales. Paris: Maisonneuve et Larose 1-222.
- Munier P.**, 1981. Origine de la culture du palmier dattier et sa propagation en Afrique. *Fruits*, vol 36, n°7-8 : 437-449.
- Nemhauser JL, Zambryski PC, Roe JL.** 1998. Auxin signaling in *Arabidopsis* flower development? *Curr Opin Plant Biol* 1, 531–535.
- Neuffer, M.G., Coe, E.H., Wessler, S.R.** 1997. Mutants of Maize. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Plainview, NY.
- Nixon RW.** 1934. Metaxenia in dates. Am Soc for hort.Sciences. vol.32.1934.p221-226.
- Ouennoughi Melica, Dubost Daniel.** 2005. Le voyage forcé des dattiers en Nouvelle-Calédonie, sécheresse ; vol. 16, n°4
- Parasnis, A.S., W. Ramakrishna, K.V. Chowdari, V.S. Gupta, P.K. Ranjekar.** 1999. Microsatellite (GATA)n reveals sex-specific differences in papaya. *Theor. Appl.Genet.* 99:1047–1052.
- Pereau-Leroy, P.** 1958. Le palmier dattier au Maroc. Paris : IFAC.
- Perl-Treves, R.** (1999). Male to female conversion along the cucumber shoot: Approaches to studying sex genes and floral development in *Cucumis sativus*. In *Sex Determination in Plants*, C. Ainsworth, ed (Oxford, UK: Bios Scientific Publishers), pp. 189–216.
- Peyron G.** (2000). Cultiver la palmier dattier. Groupe de Recherche et d'Information pour le Développement de l'Agriculture d'Oasis, 109 p.
- Pierre Estanove.** 1990 : Note technique : valorisation de la datte. *Options Méditerranéennes*, Sér. A/ n 11. *Les systèmes agricoles oasiens*
- Pintaud J.C, Zehdi S., Couvreur T., Barrow S., Henderson S., Aberlenc-Bertossi F., Tregear J., Billote N.** 2010: Species delimitation in the Genus *Phoenix* (Arecaceae) based on SSR markers, with emphasis on the identity of the date palm. Diversity, phylogeny, and evolution in the monocotyledon. Edited by seberg, Peterson, barfod and dais. Aarhus university press, dannark, 2010.
- Rhiss A, C. Poulain, G. Beauchesne, (1979)** : la culture *in vitro* appliquée à la multiplication végétative du palmier dattier (*Phoenix dactylifera L.*), *fruits-vol.34, n°9, 1979.*
- Rival A, Bertrand L, Beulé T, Combes MC, Trouslot P, Lashermes P, (1998)** : Suitability of RAPD analysis for the detection somaclonal variants in oil palm. *Plant Breeding* 117, 73-76.
- Rochat Didier , Chapin Éric, Ferry Michel, -Faghih Arman Avand, Brun Luc.**2006. Le charançon rouge du palmier dans le bassin méditerranéen, *Phyoma* : la défense des végétaux. N° 595 juillet -aout: 20-24

- Saaidi. Mohamed. (1979)** : Contribution à la lutte contre le Bayoud, Fusariose vasculaire du Palmier dattier. Thèse d'université, Université de Dijon, France 140 pp,
- Saïdou A.-A., Mariac C., Luong V., Pham J.-L., Bezançon G. and Vigouroux Y . 2009.**: Association Studies Identify Natural Variation at PHYC Linked to Flowering Time and Morphological Variation in Pearl Millet. *Genetics* : 182, p. 899-910 : , DOI: 10.1534/genetics.109.102756
- Sané D., Aberlenc-Bertossi F., Gassama-Dia Y. K., Sagna M., Trouslot M. F., Duval Y. & Borgel A. (2006).** – Histological analysis of callogenesis and somatic embryogenesis on cell suspension of date palm (*Phoenix dactylifera* L.), *Annals of Botany* 98:301-308
- Sherry RA, Eckard KJ, Lord EM. 1993.** Flower development in dioecious *Spinacia oleracea* (Chenopodiaceae). *American journal of Botany* 80: 283–291.
- Sicard A, Petit J, Mouras A, Chevalier C, Hernould M. 2008.** Meristem activity during flower and ovule development in tomato is controlled by the mini zinc finger gene *INHIBITOR OF MERISTEM ACTIVITY*. *The Plant Journal* 55: 415–427.
- Siljak-Yakovlev S, Cerbah M, Sarr A, Benmalek S, Bounaga N, Coba de la Pena T, Brown S. 1996.** Chromosomal sex determination and heterochromatin structure in date palm. *Sexual Plant Reproduction* 9:127–132.
- Sommer, H., Beltran, J.P., Huijser, P., Pape, H., Lonngig, W.E., Saedler, H. et Schwartz-Sommer, Z. (1990).** *DEFICIENS*, a homeotic gene involved in the control of flower morphogenesis in *Antirrhinum majus* : the protein shows homology to transcription factors. *EMBO J.* 9: 605-613.
- Sondur, S.N., R.M. Manshardt, J.I. Stiles. 1996.** A genetic linkage map of papaya based on randomly amplified polymorphic DNA markers. *Theor. Appl. Genet.* 93: 547–553.
- Suzaki T, Sato M, Ashikari M, Miyoshi M, Nagato Y, Hirano H Y. 2004.** The gene *FLORAL ORGAN NUMBER1* regulates floral meristem size in rice and encodes a leucine-rich repeat receptor kinase orthologous to Arabidopsis *CLAVATA1*. *Development* 131:5649–5657.
- Takano, M., N. Inagaki, X. Xie, N. Yuzurihara, F. Hihara et al., 2005** Distinct and cooperative functions of phytochromes A, B, and C in the control of deetiolation and flowering in rice. *Plant Cell* 17: 3311–3325.
- Tanurdzic M, Banks JA. 2004.** Sex determining mechanisms in land plants. *The Plant Cell* 16:61–71.
- Tcherkez Guillaume . 2002.** Les fleurs. Évolution de l'architecture florale des Angiospermes. Livres 192 pages. Collection: **UniverSciences, Dunod.**
- Terauchi R. and Kahl G., 1999.** Mapping of the *Dioscorea tokoro* genome: AFLP markers linked to sex, *Genome* 42: 752–762.
- Terefe Diro and Tatlioglu Turan. 2005** Isolation of a partial sequence of a putative nucleotide sugar epimerase, which may involve in stamen development in cucumber (*Cucumis sativus* L.) *Theor Appl Genet* (2005) 111: 1300–1307.

- Theissen, G.** (2001). Development of floral organ identity: Stories from the MADS house. *Curr. Opin. Plant Biol.* **4**, 75–85
- Tisserat B, Demason D (1980):** A histological study of development of adventive embryos organ cultures of *Phoenix dactylifera* L. , *Ann Bot* 46:465–472.
- Uhl NW, Dransfield J. 1984.** Development of the inflorescence, androecium, and gynoecium with reference to palms. *In* R. A. White and W. C. Dickison [eds.], *Contemporary problems in plant anatomy*, 397–449. Academic Press, New York, USA.
- UHL NW. 1972.** Inflorescence and flower structure in *NYPA FRUTICANS* (Palmae). *American Journal of Botany* **59**: 729-743.
- Vanneste S., Maes L., Smet I, Himanen K, Naudts M, Inze D´ and Beeckma T 2005.:** Auxin regulation of cell cycle and its role during lateral root initiation. *PHYSIOLOGIA PLANTARUM* 123: 139–146. 2005
- Verdeil, J. L. (1993).** Etude de la régénération du cocotier (*Cocos nucifera* L.) par embryogenèse somatique à partir d'explants inflorescentiels. Thèse de Doctorat de l'Université Pierre et Marie CURIE (Paris VI), 150p.
- Vyskot B, Koukalova B, Kovarik A, Sachambula L, Reynolds D, Bezdek M (1995)** Meiotic transmission of a hypomethylated repetitive DNA family in tobacco. *Theor Appl Genet* 91 : 659-664
- Vyskot Boris and Hobza Roman, 2004,** Gender in plants: sex chromosomes are emerging from the fog, *Review TRENDS in Genetics* Vol.20 No.9 September 2004
- Weiblen GD, Oyama RK, Donoghue MJ. 2000.** Phylogenetic Analysis of Dioecy in Monocotyledons. *The American Naturalist* **155**:46–58.
- Woltering Ernst J , Bent Arie van der, and. Hoeberichts Frank A. 2002.** Do Plant Caspases Exist? *Plant Physiology*, Vol. 130, pp. 1764–1769
- Wu Hen-ming,. Cheung Alice Y. 2000.** Programmed cell death in plant reproduction. *Plant Molecular Biology* 44: 267–281.
- Yanan Hou, Fenglan Li and Shumin Gao.** 2004. Sex determination and sexual organ differentiation in flowering plants . Forestry Studies in China Volume 6, Number 4 50-57
- Yang SF, Hoffman NE (1984)** Ethylene biosynthesis and its regulation in higher plants. *Annual Review of Plant Physiology* **35**, 155-189
- Zaher H, Baaziz M. (2006)** Contribution à l'identification des pieds mâles et femelles chez le palmier dattier par l'utilisation des marqueurs RAPD. *Congrès international de Biochimie*. Agadir, 9-12 Mai 2006, Maroc.
- Zluvova J, Nicolas M, Berger A, Negrutiu I, Moneger F. 2006.** Premature arrest of the male flower meristem precedes sexual dimorphism in the dioecious plant *Silene latifolia*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **103**, 8854–18859.
- Zohary D. et Hopf N. (1988).** Fruits trees and nuts in domestication of plants in the old word. Oxford Soc. *Clarendon Press Publications*, 146-149.

ANNEXE 1

Différentes conditions hormonales pour les essais de réversion in vitro de sexe de la fleur.

Type de milieu	Composition hormonale	Référence bibliographique
M 0CA	0 mg/l de 2,4-D + 3g/l charbon actif	
M 30CA	30 mg/l de 2,4-D + 3g/l charbon actif	Demasson et al., 1980
M 10AZA	10 μ M de 5- azacytidine	Siroky et al., 1998
M IBA- BAP	1 mg/l IBA + 1 mg/l BAP	Masmoudi et al, 2008
IBA	1 mg/l	
BAP	1 mg/l	
M ANA	54 μ M	Badara et al, 2007
M 0	Sans hormone	