



UNIVERSITE SIDI MOHAMMED BEN ABDELLAH

Projet de Fin d'Etudes LST

Biotechnologie et Valorisation des Phyto-Ressources

**L'analyse de la diversité génétique de la lentille à
l'aide des marqueurs Microsatellites (SSR)**

Présenté par: NIYA Btissam

Encadré par :

- Pr Abdelattif HAGGOUD
- Pr Sripada M. UDUPA
- Pr IRAQI Driss

Soutenu le: 08/06/2017

Devant le jury composé de :

- Pr HAGGOUD Abdelattif
- Pr SQALLI Hakima
- Pr IRAQI Driss
- Pr Sripada M UDUPA

Année universitaire 2016/2017

Les résultats présentés dans ce mémoire sont le fruit d'un travail de recherche de deux mois, qui a été mené au sein de l'unité de biotechnologie de l'Institut National de la Recherche Agronomique de Rabat.

Présentation de l'INRA

L'INRA est un établissement public créé en 1914 et opère à travers 10 centres régionaux. L'unité est équipée de plusieurs laboratoires dotés de matériel de pointe (Séquenceur automatique, PCR non quantitative et quantitative...) pour la réalisation des travaux sur le marquage moléculaire, l'étude d'expression de gènes, la culture in vitro et la transformation génétique. Elle a pour but le développement, l'application et l'intégration de la biotechnologie afin d'améliorer l'agriculture Marocaine.

Le programme de recherche établi par l'Unité de Biotechnologie est fondé principalement sur l'utilisation de techniques associant la culture in vitro, la transformation génétique et **la biologie moléculaire** pour l'amélioration de plusieurs espèces (**légumineuses**, céréales, arbres fruitiers).

L'INRA de Rabat travaille également en étroite coopération avec **l'ICARDA**

ICARDA existe depuis 1977. C'est un centre de recherche et d'essais scientifique, autonome, à but non lucratif, qui est sous la coupe du Groupe Consultatif pour la Recherche Agricole Internationale (**GCRAI**)

Remerciement

La première pensée qui me vient à l'esprit quand je pense aux remerciements est évidemment tournée vers **Dieu** tout puissant de m'avoir donné le courage, la force et la patience d'achever ce travail.

J'adresse tous mes remerciements au **Dr. Sripada M.UDUPA** généticien/biotechnologiste et responsable de l'équipe biotechnologie son encadrement, soutien et dévouement ce qui m'a permis de mener ce travail dans les meilleurs conditions possibles, ainsi que pour ses conseils précieux. *Thank You Doctor for your listening and your help during this period. Thank you also for the quality of coaching and your availability throughout the project. Thank you for all days, you had waited us in the lab, even if the night.*

Au terme de ce travail, j'ai l'honneur et le plaisir de présenter ma profonde gratitude et mes sincères remerciements à Monsieur **IRAQI Driss**, le directeur de l'Unité de Biotechnologie de l'INRA de Rabat, qui m'a permis de passer ma période de stage au sein du laboratoire et qui m'a donné les moyens nécessaires pour travailler dans des bonnes conditions.

Je tiens à remercier **Mr HAGGOU Abdellatif** mon encadrant au sein de la faculté des sciences et techniques à Fès, de m'avoir soutenu par son aide, ses orientations et sa disponibilité ainsi que ses encouragements. Merci pour l'encadrement.

Mes remerciements vont également à **Mme Sqalli Hakima**, professeur à la Faculté des sciences et techniques à Fès, qui m'a fait l'honneur par sa présence à la soutenance de mon projet de fin d'étude et par le temps qu'elle a consacré pour examiner et juger ce travail.

Mlle HENKRAR Fatima, je vous remercie pour votre patience, votre gentillesse, votre disponibilité, vos conseils et votre accueil très chaleureux. Et même de m'avoir guidée au laboratoire, je voudrais remercier l'ensemble des personnes Zahra, Solange qui m'ont aidé de près et de loin à réaliser ce travail.

Je remercie également INRA-Maroc, ICARDA, FAO/ITPGRFA, l'Union européenne, la CRP-Blé et du Programme de subventions de collaboration ICARDA-Maroc pour le soutien et leurs support financière.

Veillez agréer l'expression de ma reconnaissance et remerciements les plus sincères.

LISTE DES ABREVIATIONS

- **ADN:** Acide désoxyribonucléique
- **AFLP:** Amplified Fragment Length Polymorphism
- **APS:** Amonium PurSulfate
- **BET:** Bromure d'Ethidium
- **CRRAR:** Centre Régional de la Recherche Agronomique Rabat
- **CTAB:** Cetyl Trimethyl Ammonium Bromide
- **dNTP :** 2'-désoxyribonucléoside 5'-triphosphate
- **EDTA :** Acide éthylène diamine tétra-acétique
- **FAO:** Food and agriculture organization
- **Frq :** Fréquence allèlique
- **ICARDA :** Centre international de recherche agronomique dans les zones arides
- **INRA :** Institut National de la Recherche Agronomique
- **ISSR:** Inter Simple Sequence Repeat
- **kb:** kilo base

- **MgCl₂ :** chlorure e Magnésium
- **Na Cl :** Chlorure de sodium
- **Na⁺ :** Ion sodium
- **Pb :** Paires de bases
- **PH :** Potentiel hydrogène
- **PCR :** Polymerase chain Reaction (Réaction de polymérisation en chaîne)
- **PIC:** Polymorphism Information Content
- **RAPD:** Random Amplidied Polymorphic DNA
- **RFLP:** Restriction Fragment Lenth Poymorphism

- **Rpm :** Rotation par minute
- **SNP:** Single Nucleotide Polymorphism
- **SSR:** Simple Sequence Repeat
- **Taq :** Thermus aquaticus (bactérie des sources chaudes)
- **TBE :** Tris-Borate-EDTA
- **TEMED:** Tétraméthyléthylènediam

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1: Classification de lentille.....	2
Tableau 2: Liste de différentes accessions étudiées de lentille.....	14
Tableau 3: Composition du mélange réactionnel de l'amplification selon la technique SSR. (Mix PCR).....	17
Tableau 4: Liste des amorces de la lentille utilisées dans la réaction PCR.....	18
Tableau 5: Diversité génétique calculé chez les variétés étudiées de lentille.....	24
Tableau 6: Distance génétique.....	25

LISTE DES FIGURES

Figure 1: Production mondiale de la lentille par contient pendant les années	4
Figure 2: Répartition de la production de lentille au Maroc.....	5
Figure 3: Dégâts de la Rouille de la lentille sur les feuilles.....	8
Figure 4: Technique d'amplification de l'ADN par PCR-SSR.....	13
Figure 5: Profil électrophorétique de test qualité d'ADN total extrait de la lentille sur gel d'agarose.....	21
Figure 6: Profil électrophorétique de l'amorce spécifique PBA-LC 0250 de la lentille après l'amplification par PCR-SRR sur gel de polyacrylamide.....	22
Figure 7: Profil électrophorétique de l'amorce spécifique PBA-LC 0278 de la lentille après l'amplification par PCR-SRR sur gel de polyacrylamide.....	22
Figure 8: Profil électrophorétique de l'amorce spécifique PBA-LC 373 de la lentille après l'amplification par PCR-SRR sur gel de polyacrylamide.....	23
Figure 9: Profil électrophorétique de l'amorce spécifique SSR 46-2-1 de la lentille.. après l'amplification par PCR-SRR sur gel de polyacrylamide.....	23
Figure 11: Arbre phylogénique.....	27

SOMMAIRE

Introduction générale.....	1
Chapitre I : Revue Bibliographique	
I- Historique et origine	2
II-Classification	3
III-Description botanique de la lentille.....	3
IV-Production et répartition géographique.....	3
IV-1- Importance mondiale de la lentille.....	3
IV-2- Production et répartition de la lentille au Maroc.....	4
V- Exigences édapho-climatiques.....	5
VI- Techniques culturales.....	6
VI-1- Préparation du sol.....	6
VI-2- Fertilisation.....	6
VI-3- Semis.....	7
VI-4- Entretien.....	7
VI-5- Récolte de lentille.....	8
VII- Importance de la diversité génétique.....	9
VIII- Les marqueurs génétiques.....	9
VIII-1- Caractéristiques d'un marqueur génétique.....	10
VIII-2- Les principaux types de marqueurs génétiques utilisés.....	10
a. RFLP.....	11
b. RADP.....	11
c. AFLP.....	12
d. SSR.....	12
Chapitre II : Matériel et méthodes	
I- Matériel végétal et lieu de récolte.....	14
II-1-Méthode d'extraction d'ADN.....	15
II-2- Test de qualité par électrophorèse en gel d'agarose.....	16
II-3-PCR.....	16
II-4-Electrophorèse sur gel d'acrylamide.....	19
II-4-2- Préparation du gel.....	19
II-4-3- Révélation du gel.....	19
II-4-4- Dépôt des échantillons et migration.....	19
II-4-5- Distance génétique	19

II-4-6- Dendrogramme.....20

Chapitre III : Résultats et discussion

I- Extraction de l'ADN génomique et le test qualité.....21
II- Amplification d'ADN par PCR.....22
III- Distance génétique.....25
IV- Arbre phylogénique.....26
Conclusion.....

INTRODUCTION

La famille des Légumineuses est l'une des plus importantes parmi les dicotylédones. C'est la famille végétale qui fournit le plus grand nombre d'espèces utiles à l'homme, qu'elles soient alimentaires, industrielles ou médicinales et qui prends la deuxième classe mondiale après les céréales (Rizk, 1966).

La lentille (*Lens culinaris*), une des principales cultures légumineuses alimentaires cultivées au Maroc, joue plusieurs rôles nutritionnels, agronomiques et économiques importants. Sur le plan nutritionnel, la lentille constitue une composante importante de la ration alimentaire de nombreuses familles marocaines pour lesquelles elle fournit des protéines essentielles et des calories.

Par ailleurs, compte tenu de leurs capacités fixatrices de l'azote atmosphérique (46 à 192 kg d'azote par hectare), les lentilles sont souvent cultivées en rotation avec les céréales comme le blé (Rennie et Dubetz, 1986 ; Smith et al, 1987 ; McNeil et al, 1996 ; Rochester et al, 1998 ; Shah et al, 2003). Ces rotations permettent le contrôle des mauvaises herbes et la rupture des cycles biologiques de plusieurs maladies et insectes. La paille de la lentille est aussi très importante comme aliment du bétail.

L'amélioration des plantes et particulièrement des légumineuses est basée sur l'utilisation de la variabilité génétique naturelle et sur des méthodes d'exploitation rapides et fiables de cette diversité dans les programmes de sélection.

Des techniques nouvelles, en particulier les marqueurs moléculaires sont utilisés lors de l'étude de la diversité génétique. L'une des techniques les plus importantes consiste en l'utilisation des marqueurs microsatellites. La présente étude a donc pour but d'évaluer la diversité génétique de quelques accessions de la lentille (*Lens culinaris*) en utilisant ces marqueurs.

Nous avons jugé utile de commencer notre démarche par une étude bibliographique dans le but d'apporter des informations sur la lentille en général et aussi de démontrer les différentes techniques moléculaires utilisées pour l'étude de la diversité génétique avec des exemples d'études sur la lentille. Cette revue bibliographique, présente d'une manière générale une synthèse des connaissances actuelles sur le sujet. En suite, les techniques utilisées pour l'étude de la diversité génétique de la lentille à l'aide des marqueurs microsatellites (SSR) sont décrites, suivies par la présentation des principaux résultats obtenus ainsi que leur discussion à la lumière des données bibliographiques actualisées.

REVUE BIBLIOGRAPHIQUE

I. HISTORIQUE ET ORIGINE

La lentille (*Lens culinaris*) est originaire des régions tempérées chaudes de l'ancien monde :

- Sud-est de l'Europe : Chypre, Grèce ;
- Asie Mineure et Proche-Orient : Turquie, Syrie, Liban, Israël, Jordanie, Irak, Iran ;
- Caucase et Asie centrale : Azerbaïdjan, Géorgie, Arménie, Kazakhstan, Tadjikistan, Turkménistan, Ouzbékistan, Afghanistan et Pakistan. (AAC, 2008)

La lentille tient son nom de sa forme caractéristique, qui s'apparente à celle d'une lentille. La lentille a d'abord été cultivée en Asie 7000 ans av J.C. Elle est maintenant largement cultivée au Canada, principalement dans la Province de la Saskatchewan où les températures fraîches des prairies et les bonnes conditions des sols favorisent sa croissance. Canada est le principal pays producteur et exportateur de lentilles. (AAC, 2008)

La production y a augmenté considérablement depuis ses débuts vers la fin des années 1960

La production a atteint un niveau record (1.947 Mt) en 2010, en raison de l'accroissement de la superficie récoltée. La superficie de terre utilisée pour la production de lentille est d'environ un million d'hectares. (Weiss *et* Zohary, 2011)

II. CLASSIFICATION

La lentille (*Lens culinaris*.) est une espèce diploïde ($2n=14$) avec une taille de génome haploïde de 4063 Mb (Arumuganathan *et* Earle, 1991). C'est une espèce de plante dicotylédone annuelle appartenant à la famille des Fabacées ou légumineuses, largement cultivée pour ses graines comestibles riches en protéines. Sous famille des papilionacées, tribu des *Viciées*, groupe d'*Euvicia* et au genre *Lens*.

Elle est classée comme suit (Cokkizgin *et* Shtaya, 2013):

Tableau 1 : Classification de la lentille

Règne	Plantae
Sous règne	Tracheobionta
Division	Magnoliophyta
Classe	Magnoliopsida
Sous classe	Rosidae
Ordre	Fabales
Famille	Fabaceae
Genre	<i>Lens</i>
Espèce	<i>Culinaris</i>

III. DESCRIPTION BOTANIQUE DE LA LENTILLE

Il s'agit d'une plante annuelle autogame, dont la hauteur de la plante est comprise entre 15 à 75cm, généralement varie selon les génotypes et les conditions de culture, (Toklu *et al*, 2009; Bacchi *et al*, 2010; Erskine *et al*, 2009). Ses feuilles, alternes, composées pennées, comptent de 10 à 14 folioles opposées, oblongues, et sont terminées par une vrille généralement simple ou bifide. À la base elles sont munies de stipules dentées. Les fleurs, à corolle papilionacée typique de la sous-famille des Faboideae, sont de couleur blanche ou bleu pâle et groupées par petites grappes de deux à quatre. Le calice est régulier, à cinq dents étroites et relativement longues. La floraison estivale intervient entre mai et juillet.

Les fruits sont des gousses aplaties, courtes, contenant deux graines aplaties en forme caractéristique de disque faiblement bombé. La couleur des graines varie selon les variétés des plus pâles (vert pâle, blond, rose) au plus foncé (vert foncé, brun, violacé...) (Bésème-Pia. *et al*, 2010).

IV. PRODUCTION ET REPARTITION GEOGRAPHIQUE

IV.1. Répartition mondiale de lentille

Les grands pays producteurs de la lentille sont le Canada, l'Inde et l'Australie. La production de lentilles dans ces principaux pays est à la hausse entre 2002-2009; elle est passée de 2,1 millions de tonnes (Mt) en 2002-2003 à 2,9 Mt en 2009-2010. Elle est à la hausse au Canada, aux Etats-Unis et en Australie, mais a été très variable et à la baisse en Inde, au Bangladesh, en Syrie et en Turquie. Aux États-Unis la production a nettement augmenté depuis 2002, où les lentilles ont été ajoutées au programme américain de prêts. (FAOSTAT, 2014)

La Production mondiale moyenne de la lentille pendant ces deux dernières années a atteint 4 829 035 tonnes, dont 45,8 % reviennent à L'Asie qui représente la première place, suivie par l'Amérique avec (40,6%). Le reste est réparti sur l'Afrique avec (3,9 %) à cette production, l'Océanie (8,2%) et l'Europe (1,6%) (Figure 1). (FAOSTAT, 2014)

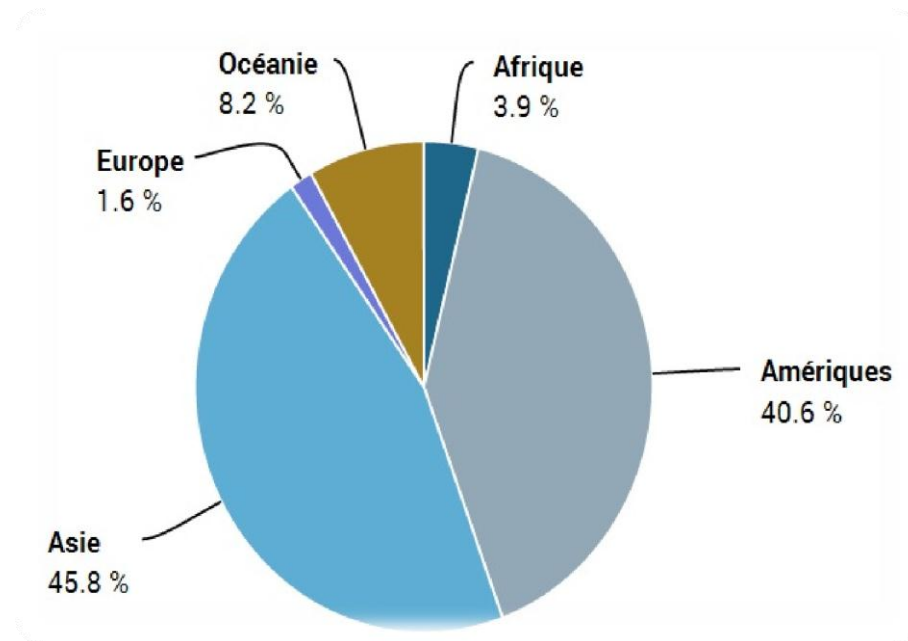


Figure 1: Production mondiale moyenne de la lentille par continent pendant les années 2012 et 2013 (FAOSTAT, 2014)

Le Maroc occupait le 15^{ème} rang mondial des pays producteurs de la lentille, et le deuxième pays Africain, après l’Ethiopie (FAOSTAT, 2014).

IV. 2. Production et Répartition géographique au Maroc

Au Maroc la lentille constitue la troisième espèce parmi les quatre principales cultures des légumineuses (fève, pois chiche, lentille et petit pois), avec une superficie moyenne de l’ordre de 50 mille hectares, soit 15% des surfaces cultivées par les légumineuses. La lentille est cultivée principalement dans la région des Settat (37% de la superficie moyenne nationale de la lentille) et la région de Khémisset avec 33% (Figure 4). Le reste est réparti sur différentes régions du pays : Azilal - Fes (5%), Ben Slimane -El Hajeb (4%), Boulmane (3%), Taza-Taounate - Al Houceima - El-Gharb (2%) et Safi (1%). (Ministère d’Agriculture du Maroc, 2012).

Les niveaux de rendements sont quant eux très faibles et ont stagné autour de 5qx/ha Cette situation est due, en plus de l’aléa climatique (la faiblesse des précipitations), à plusieurs contraintes d’ordre technique (faible maîtrise des techniques d’installation de la culture, d’entretien, de récolte et de stockage) et à l’utilisation des variétés non productives et sensibles aux maladies (Ministère d’Agriculture au Maroc, 2012).

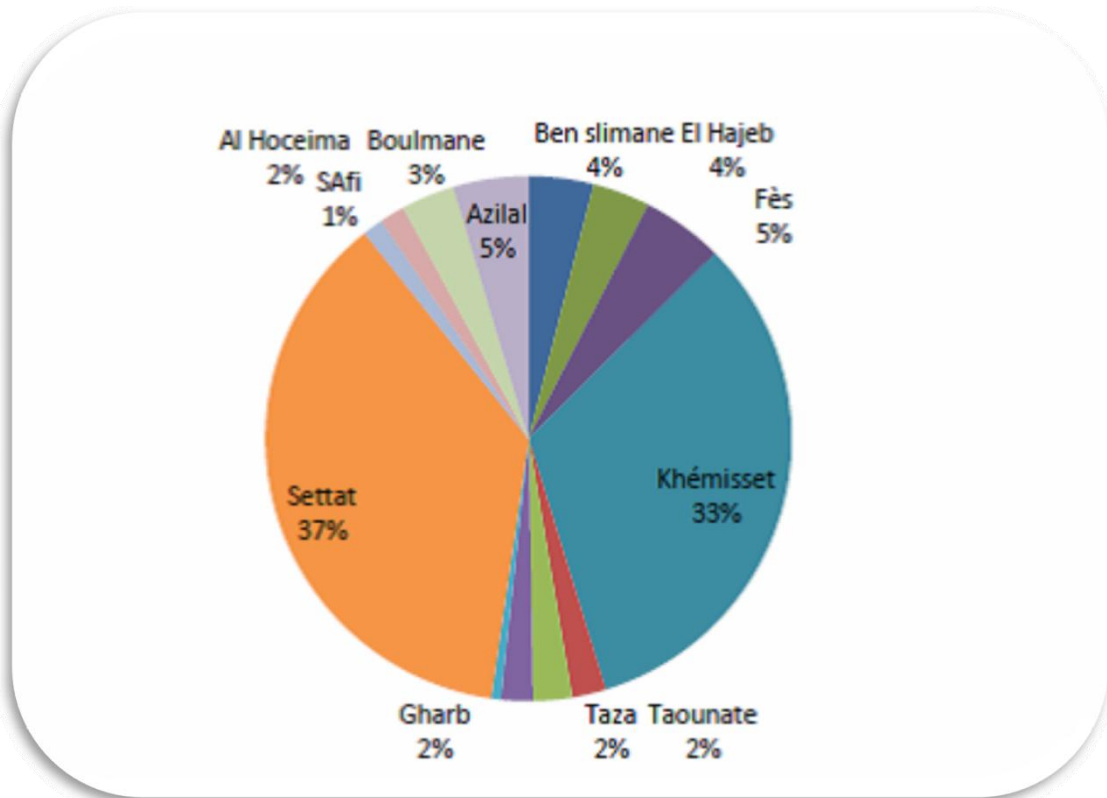


Figure 2: Répartition de la production de lentille au Maroc.

(Ministère d'Agriculture du Maroc, 2012).

V. EXIGENCES EDAPHO-CLIMATIQUES

V.1-Les types de sol

La lentille s'adapte à une large gamme de types de sol, mais préfère généralement des sols ayant une meilleure capacité de drainage d'un éventuel excès d'eau et un pH légèrement acide (5,5 à 6,5) ou à alcalinité modérée (7,5 à 9). Les sols à salinité élevée sont à déconseiller.

Dans les zones recevant des précipitations variant entre 250 et 400mm, il est recommandé de cultiver la lentille dans des sols lourds pour atténuer l'effet d'un éventuel déficit hydrique (Bamouh, 1999)

V.2-Le climat

Compte tenu de ses faibles exigences en eau, la culture de lentille s'adapte à plusieurs aires de production, (Bour favorable, zones semi-arides et zones de montagnes). Toutefois, l'intervention d'un déficit hydrique en plein floraison risque de provoquer la chute des fleurs, d'où la nécessité de semer précocement la culture et d'utiliser les variétés à cycle court en vue de permettre à la plante d'échapper aux fortes chaleurs de la fin du cycle (Bamouh, 1999)

VI. Techniques culturales

VI.1-Préparation du sol

La taille réduite des graines de la lentille nécessite un lit de semences fin, friable, compact et bien nivelé permettant de favoriser une bonne germination et une levée homogène des plantules. A cet effet, Il est préconisé de procéder à un labour moyen (charrue à disque en Bour favorable et outils à dents en zones semi arides). La profondeur de labour devra être comprise entre 20 et 25 cm en vue de permettre un bon développement racinaire (Bamouh, 1999).

VI.2-Fertilisation

a) - Inoculation

Lorsque la lentille est à installer pour la première fois ou à cultiver après une rupture de plusieurs années sur la même parcelle, il est préférable de procéder à l'inoculation du sol avec une souche de *Rhizobium*. L'inoculum doit être souvent apporté comme enrobage de la semence (Bamouh, 1999).

b) - Eléments minéraux

En général, l'apport des fertilisants doit être raisonné en fonction des exportations en éléments minéraux prélevés par la culture. Pour une production d'environ 20 q/ha (grains plus matière sèche), les quantités exportées à l'hectare sont de l'ordre de 100 Kg d' N, 28 Kg de Pet 78 Kg de potassium.

La fertilisation azotée recommandée est de l'ordre de 10 à 20 kg d'N/ha au semis (apport «Starter»), notamment pour les sols sableux à faible teneur en matière organique. Cette fertilisation pourra être absente ou réduite dans les sols présentant de bonnes conditions de fixation symbiotique de l'azote. En effet, 85% des besoins en azote sont fournis par les nodosités. La fertilisation phospho-potassique doit être apportée au moment de la préparation du sol en fonction de la rotation et de la richesse du sol.

Il est recommandé d'appliquer 40 à 60 kg/ha de P et 20 à 40 kg/ha de K. Dans tous les cas, le recours aux analyses du sol est vivement conseillé en vue de mieux raisonner la fertilisation de la culture (Bamouh, 1999).

VI.3-Semis

a) - Date de semis

Les semis sont effectués entre novembre et décembre et peuvent être étalés jusqu'au mois de janvier ou début février dans les zones où les gels et les brouillards sont fréquents.

b) - Profondeur de semis

Les semis doivent être effectués à des profondeurs faibles entre 2 et 4 cm en raison de la taille petite des semences de la lentille. Ainsi, dans les sols légers, il est recommandé de semer à une profondeur de 2 à 3 cm par contre dans les sols lourds ou pour les zones à faibles précipitations, une profondeur de semis de 3 à 4 cm est recommandée (Bamouh, 1999).

c) - Dose de semis

La densité de semis recommandée en zone favorable (pluviométrie supérieure à 400 mm ou irrigation) est de 250 plantes/m². En zones semi-arides, il est conseillé d'utiliser une densité de semis variant de 150 à 200 plantes/m².

La dose de semis doit être calculée sur la base du poids des graines, du taux de germination de la semence utilisée et de la dose de peuplement escomptée. A titre d'exemple, pour un poids d'une graine de lentille de 0.03g et une densité de peuplement de 200 plantes/m², la dose de semis est de 60 kg/ha. La dose de semis doit varier entre 40 et 90 kg/ha compte tenu de la faculté germinative, de la pureté de la semence utilisée, du mode et de la date du semis (Bamouh, 1999).

VI.4-Entretien

a) - Désherbage

Le désherbage de la lentille constitue une opération importante du fait de sa faible compétitivité vis à vis des mauvaises herbes. Pour le désherbage manuel ou mécanique, il est recommandé d'effectuer deux passages respectivement à 30 et 50 jours après la levée. Pour le désherbage chimique seul ou combiné à un désherbage manuel, son application est recommandée à 60 jours après la levée.

b)-Maladies

Les principaux ravageurs qui attaquent la lentille sont les sitones, les bruches, les pucerons et La rouille

La rouille constitue la maladie la plus redoutable de cette culture. Elle attaque la partie foliaire de la plante sous forme de tâches noires allongées. Les conditions d'humidité et de température de l'ordre de 20°C à 22°C favorisent le développement de cette maladie, dans un intervalle de 10 à 12 jours à partir de l'apparition des premiers symptômes. Par ailleurs, il est recommandé de faire un traitement des semences de la lentille.



Figure 3: Dégâts de la Rouille de la lentille sur les feuilles

VI.5-Récolte des lentilles

Les variétés de lentille cultivées et appréciées au Maroc et dans la plupart des pays du bassin méditerranéen, sont caractérisées par des plantes courtes, une tendance à la verse, déhiscence et rupture des gousses à la maturité. Le stade idéal de récolte avec un minimum de pertes ne dure pas plus de 3 à 7 jours

Pour ces raisons il est conseillé de procéder à la récolte mécanique de cette espèce. L'objectif étant de minimiser les pertes en procédant à la moisson précocement avec un outil qui peut couper les tiges très bas. Ensuite on laisse sécher la récolte au champ pendant quelques jours avant le battage.

VII. IMPORTANCE DE LA DIVERSITE GENETIQUE

La diversité génétique c'est la variation qui existe au niveau des gènes. Il était défini par le niveau de similarité ou de différence dans cette composition génétique et représente le fondement de la biodiversité. C'est la variation de la qualité d'information génétique des individus, des espèces, des populations, ou des communautés (Parizeau, 1997). Pour trouver les mécanismes fondamentaux qui sont à l'origine des diversifications du vivant il faut chercher dans le patrimoine génétique des organismes (Lévêque *et monoulou*, 2001). Le degré de subdivision génétique d'une espèce dépend de l'action des quatre forces évolutives: mutation, sélection, dérive et migration.

Les mutations, migration, sélection ainsi que dérivé génétique constituent la diversité génétique et l'influence sans oublier son effet sur l'ampleur et l'organisation du polymorphisme. On distingue un effet opposé de ses éléments: la diversité augmente avec le taux de mutation et de migration et ce même paramètre est influencé négativement par le taux de sélection et dérivés. Les marqueurs génétiques sont des caractéristiques héréditaires qui renseignent sur le génotype de l'individu qui les porte (de Vienne 1998). L'utilisation de la diversité génétique dans un programme de sélection passe inévitablement par son estimation et par le choix du type de marqueur susceptible de la traduire le plus fidèlement possible. Trois types sont largement utilisés pour l'évaluation de la variabilité génétique, à savoir les marqueurs morphologiques, les marqueurs biochimiques et les marqueurs moléculaires (Mebarek, 2010).

Nous envisageons, dans le cadre de cette étude, à étudier la diversité génétique chez la lentille à l'aide des marqueurs moléculaires de type SSR, pour permettre de documenter avec précision les liens qui existent entre les divers groupes de lignées de lentilles cultivées au Monde. Cette information peut s'avérer très utile pour la gestion des ressources génétiques et leur utilisation raisonnée dans les programmes de sélection.

VIII. LES MARQUEURS GENETIQUES

Il existe plusieurs types de marqueurs à savoir les marqueurs morphologiques, les marqueurs biochimiques et les marqueurs moléculaires. Ces derniers ont le potentiel d'exister en nombre illimité, couvrant le génome entier et ils ne sont pas influencés par l'environnement (Samouelian *et al*, 2009). Ils sont indépendants de l'organe analysé et du stade de développement de la plante ce qui les rend plus fiables ainsi qu'ils sont adoptés pour toutes les études de génétique des populations et d'écologie (Haig, 1998), contrairement aux marqueurs biochimiques qui sont faiblement polymorphes et aux marqueurs morphologiques qui sont très limités et peuvent être influencés par l'environnement.

1. Caractéristiques d'un marqueur génétique

Un bon marqueur doit être :

Neutre : ses différents allèles n'ont pas d'effet sur le phénotype de l'individu ; Polymorphe : possédant de nombreux allèles permettant de caractériser les différents individus; Co dominant : l'individu hétérozygote peut être distingué car il présente simultanément les caractères de ses parents homozygotes ; Insensible au milieu; Non épistatique ; Multiallélique; De faible coût; Requérir une faible quantité d'ADN; Indépendant de l'environnement; Reproductif et facile à utiliser.

2. Les principaux types de marqueurs utilisés

❖ Les marqueurs morphologiques :

En sélection classique, les sélectionneurs recherchent des marqueurs simples du génome des plantes pour suivre les variations de différents caractères d'intérêt agronomique. Les marqueurs morphologiques ont été retenus dans un premier temps parce qu'ils présentaient l'avantage d'être immédiatement disponibles et nécessitent seulement un équipement simple. Ils représentent des variations de type qualitatif (couleur..), morphologiques (forme), des résistances à des maladies ou des ravageurs. Ces critères sont utilisés pour décrire et identifier les lignées et les variétés chez les végétaux. Cependant, ces marqueurs sont peu polymorphes et en général dominants, ils ont fréquemment une base génétique complexe, sont limités en nombre et leur expression est souvent fortement influencée par l'environnement. (Bretting, 1995)

❖ Les marqueurs biochimiques (isozyme, protéine) :

Les protéines d'une cellule végétale peuvent facilement être extraites et analysées. Les marqueurs biochimiques les plus utilisés sont les isozymes. Ils correspondent aux différentes formes d'une même enzyme et permettent de déterminer la présence de l'allèle correspondant à chacune de ces formes. Dans ce sens, ce sont des révélateurs du polymorphisme entre individus pour les séquences codantes du génome (Bretting, 1995)

❖ Les marqueurs moléculaires

Un marqueur moléculaire est un locus polymorphe qui renseigne sur le génotype de l'individu qui le porte (Bretting *et* Widrechner, 1995 ; De Vienne, 1998)

Ces marqueurs sont les plus étudiés, ils représentent des séquences codantes ou non, présentant un polymorphisme selon les individus. Par les techniques de biologie moléculaire, plusieurs

outils ont été développés, permettant d'obtenir directement à partir des marqueurs polymorphes de l'ADN des plantes. Les plus utilisés sont les marqueurs RFLP, RAPD, AFLP et les microsatellites.

Grâce aux marqueurs génétiques, il devient possible :

- ✓ d'établir l'empreinte génétique d'un individu, c'est-à-dire de décrire et définir des individus et des variétés en vue de leur inscription, de leur protection et de leur classification
- ✓ de mettre en évidence et suivre les gènes impliqués dans l'expression de caractères d'intérêt agronomique ou technologique

Caractéristiques des principaux types de marqueurs moléculaires employés :

De nombreux marqueurs moléculaires ont été mis à la disposition des chercheurs, et de nouveaux sont régulièrement décrits. Vu l'impossibilité de dresser une liste exhaustive de la totalité de ces marqueurs, nous décrirons, un certain nombre de marqueurs: RFLP «Restriction Fragment Length Polymorphism», SSR «Simple Sequence Repeats», RAPD «Random Amplified Polymorphic DNA» et AFLP «Amplified Fragment Length Polymorphism».

Les marqueurs RFLP

La technique RFLP a été développée par Botstein *et al.* (Saghai-Marooft *et al.*, 1984). Elle repose sur la mise en évidence de la variabilité de la séquence nucléotidique de l'ADN génomique après digestion par des enzymes de restriction. Les fragments générés par digestion enzymatique de l'ADN de deux individus (identifiés A et B dans la figure) sont séparés selon leur taille sur gel d'agarose, dénaturés et transférés par capillarité sur une membrane de nylon. La position relative des fragments d'ADN est conservée durant le transfert. La dernière étape consiste en l'hybridation moléculaire avec une sonde d'ADN marquée préalablement

Les marqueurs RAPD

La technique RAPD développée par Williams *et al.*, 1990; consiste en l'amplification par PCR de fragments de l'ADN génomique en utilisant des amorces arbitraires de taille courte (10 Pb). Une amorce RAPD permet généralement l'amplification d'une dizaine de fragments. Les fragments produits par cette amplification sont séparés par électrophorèse sur un gel d'agarose. Cette technique est rapide et d'une faible technicité, elle génère un grand nombre de fragments à partir d'une faible quantité d'ADN et ne nécessite pas des informations génétiques ou génomiques préalables. Les marqueurs RAPD sont des marqueurs multi locus, bi-alléliques, dominants.

Bien que cette technique soit simple, l'inconvénient est que les marqueurs sont dominants et ne sont pas reproductibles (Williams *et al.*, 1990; Welsh *et McClelland* 1990).

Les marqueurs AFLP

Développée par (Vos *et al*, 1995), cette technique utilise à la fois les enzymes de restriction et l'amplification PCR. Après la digestion de l'ADN génomique par deux enzymes de restriction, des adaptateurs de séquence connue et spécifiques des deux sites de restriction sont ajoutés aux extrémités des fragments de restriction. Une fois que les fragments de restriction sont ainsi bordés de séquences connues, il devient possible de les amplifier par PCR. Grâce à l'emploi d'amorces sélectives qui ne peuvent amplifier qu'une petite portion des milliers de fragments de restriction obtenus, seule une centaine de fragments sont amplifiés. Ces fragments sont séparés par électrophorèse sur gel de polyacrylamide dénaturant. Le polymorphisme révélé (de type présence ou absence de bandes) est provoqué par des changements dans les sites de restriction ou les régions bordantes.

Les marqueurs AFLP sont des marqueurs bi-alléliques dominants (Vos *et al*, 1995) et génèrent un grand nombre de bandes polymorphes. Ils sont aussi extrêmement reproductibles et aucune information préalable de séquence ou génération de sonde ne sont nécessaires ce qui les rend très utiles pour créer rapidement des cartes génétiques.

Toutefois, la dominance et les difficultés techniques liées au marquage par AFLP limitent son utilisation à grande échelle pour des applications comme la sélection assistée par marqueurs (SAM).

Les marqueurs microsatellites (SSR)

La découverte dans le génome nucléaire de nombreuses zones hypervariables a ouvert la voie au développement de nouveaux marqueurs pour la cartographie du génome humain. Ces zones sont appelées microsatellites (Litt et Luty, 1989; Tautz, 1989). Les microsatellites sont constitués de répétitions en tandem de motifs mono-, di-, tri-, ou tétra-nucléotidiques sur une longueur inférieure à 100 paires de bases (Tautz, 1989). De tels motifs sont très nombreux dans le génome des organismes eucaryotes. Les SSR présentent un taux de polymorphisme extrêmement élevé qui repose sur la variation du nombre d'unités de répétition (n) constituant le microsatellite. Chaque locus microsatellite est encadré par des séquences qui lui sont spécifiques (en bleu) et qui permettent son amplification par PCR («Polymerase Chain Reaction»). L'analyse des produits amplifiés s'effectue sur gel de polyacrylamide et le polymorphisme entre les individus se traduit par une différence de taille des allèles.

Les microsatellites sont des marqueurs codominants, extrêmement polymorphes, faciles à manipuler et permettant le multiplexage. Ils requièrent très peu d'ADN (quelques nanogrammes) et sont bien répartis dans le génome. Ces marqueurs sont très reproductibles et moins lourds d'utilisation que les RFLP ou AFLP avec une bonne résolution analytique. Un

inconvenient reste cependant que leur développement nécessite un travail considérable dont les principales étapes sont:

1- Le criblage d'une banque d'ADN génomique avec une sonde correspondant au motif répété recherché

2- Le séquençage des clones positifs pour caractériser la séquence des régions bordant chaque microsatellite

3- Le développement d'amorces spécifiques pour chaque microsatellite et la vérification que ce microsatellite est polymorphe chez un groupe d'individus de l'espèce en question.

Ces marqueurs ont été très utiles pour des études de diversité génétique, phylogénétiques, ainsi que pour l'évaluation des ressources génétiques et la construction de cartes génétiques. , Leur grand nombre, leur polymorphisme et la facilité du génotypage font des SSR d'excellents marqueurs pour l'analyse de la diversité génétique (Saghai-Maroo *et al*, 1994; Struss et Plieske 1998; Matus et Hayes 2002), le génotypage (Russell *et al*, 1997; Pillen *et al*, 2000) et la cartographie génétique (Liu *et al*, 1996; Ramsay *et al*, 2000).

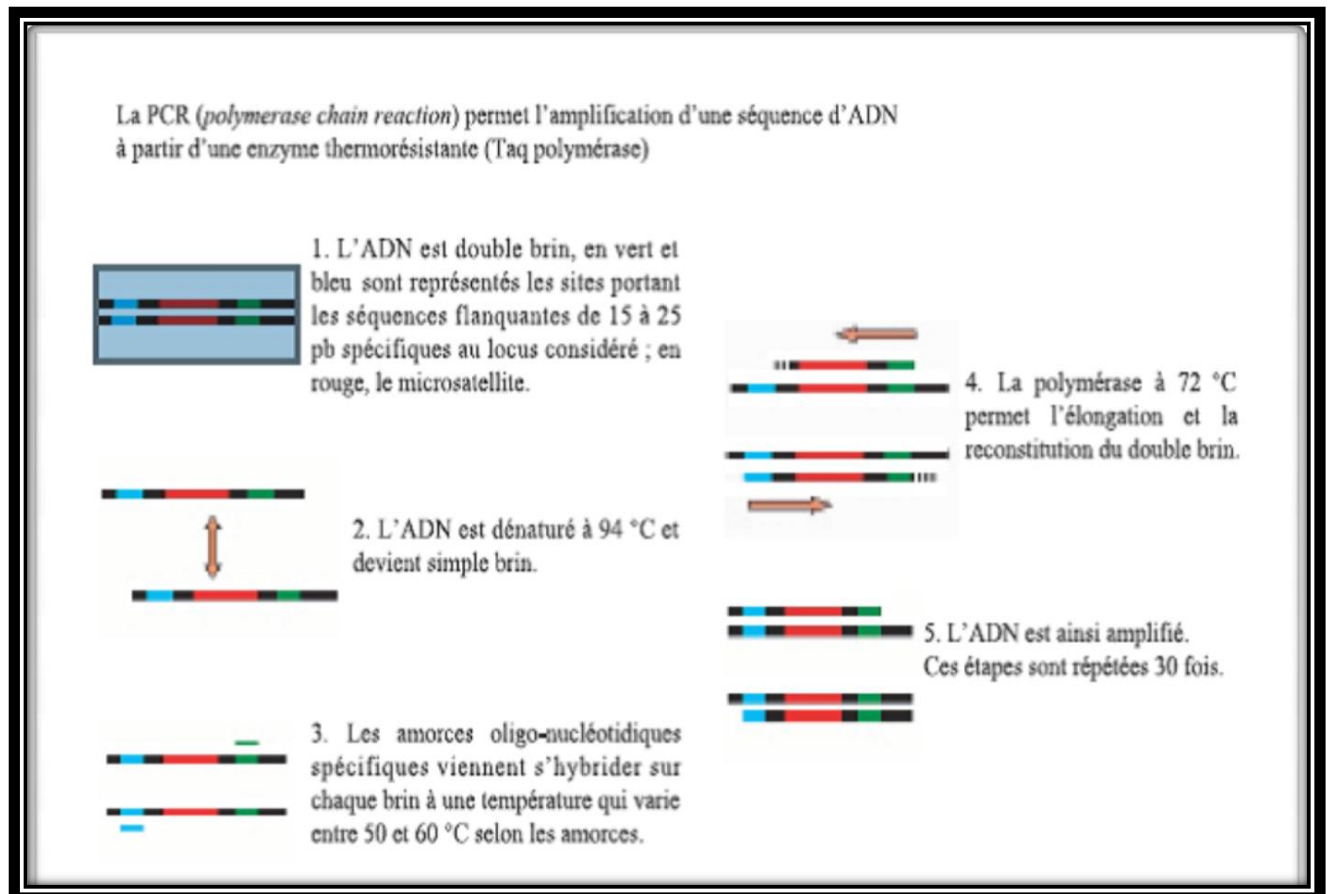


Figure 4: Technique d'amplification de l'ADN par PCR.
(Garcia *et al.*,
2001)

MATERIEL ET METHODES

I. Matériel végétal et lieu de récolte

Le but de notre travail est d'examiner la diversité génétique de la lentille (*Lens culinaris*) cultivée dans la région de Merchouch (province de Rabat) qui représente une zone assez importante de production de cette espèce au Maroc. La collecte des échantillons du matériel biologique a eu lieu en avril 2017.

Le matériel végétal qui a fait l'objet de cette étude est constitué de 48 accessions de la lentille, dont 7 sont des populations d'origine marocaine inscrites au catalogue officiel et les 41 accessions restantes sont d'origine du Canada.

Tableau 1: Noms des différentes accessions étudiées

Num	NOM	Num	NOM	Num	NOM
1	HAMRIA	100	ILL 624	151	PL128765LSP
2	ABDA	117	ILL 8595	56	PL430761LSP
3	BAKRIYA	314	PL 33688 LSP	169	ILL1267
4	ZAARIYA	289	PL451763 LSP	24	PL543677LSP
5	BICHETTE	229	PL 374120LSP	9	PL432039LSP
6	L24	142	PL 193546	173	PL432030LSP
7	L56	272	PL 432005LSP	279	PL432147LSP
201	PI 312175 LSP	34	CN 105862	137	PL179324LSP
8	CDC Imax	16	CDC Redwing	62	ILL 1762
69	ILL 28	289	ILL1278	182	PL299116LSP
296	PI 472213LSP	304	PL 472588LSP	48	IG1959
124	ILL 9997	281	PL 432188LSP	87	ILL5058
164	PL 290716 LSP	215	PL 339283LSP	186	PI299163LSP
130	PL 163589	143	PL 193547LSP	129	PL374128LSP
249	PL 431663 LSP	273	PL432147LSP	233	PL374120LSP
134	PL 178939	98	ILL9845	153	PL238758LSP

Les feuilles récoltées au champ du domaine expérimental de «MARCHOUCH » provenant des différentes accessions sont conservées à (-80°).

II.1.Extraction d'ADN

L'extraction d'ADN est une technique expérimentale permettant d'isoler l'ADN des cellules ou des tissus. L'ADN ainsi extrait peut être utilisé pour des expériences de biologie moléculaire, telles que la PCR, le séquençage ou le clonage.

Le protocole suivi pour extraire l'ADN de 48 accessions de la lentille, est nommé protocole Céthyl Bromure de Trimethyl Ammonium (CTAB 2X) (Saghai-Marroof *et al*, 1984), modifié par Udupa *et al*, 1999).

Un broyage de la feuille de lentille a été effectué à l'aide d'un broyeur à bille qui permet l'écrasement totale de la feuille. Un volume de 750 µL du tampon d'extraction CTAB 2X est ajouté avec le broyat ce qui permet la lyse membranaire et la séparation des protéines des acides nucléiques et minimise l'activité de l'ADNase en augmentant le pH à 8

Le mélange est distribué dans des tubes de 2mL puis incubé à 65°C pendant 60 min avec agitation toutes les 15 min. Ensuite, 500 µL du chloroforme/isoamyl alcool sont ajoutés au mélange CTAB/ broyat puis l'ensemble est agité vigoureusement pendant 15 min à une vitesse de 13000 rpm et une température ambiante.

Après le surnageant (1ml) est récupéré, dans des tubes Eppendorf de 2mL, puis 750 µL de l'isopropanol sont ajoutés afin de permettre la précipitation d'ADN. Le mélange est incubé au moins 30 min à température ambiante puis centrifugé à 13000 rpm pendant 10 min à 4°C afin de récupérer le culot d'ADN. Pour laver le culot d'ADN, 1mL d'éthanol est ajouté dans chaque tube Le culot obtenu est lavé dans de l'éthanol 70 % pour éliminer toute trace d'isopropanol et de NaCl.

Enfin, le surnageant est éliminé et le culot est séché sous vide à température ambiante puis dissout dans 100µL d'eau distillée. L'ADN est conservé à 4°C pendant une nuit avant d'être utilisé puis une centrifugation est appliquée le lendemain à 13000 rpm pendant 5 min. Le surnageant est récupéré dans des nouveaux tubes de 1,5mL. Ces derniers sont marqués comme « ADN stock ».

II.2. Test de qualité par électrophorèse en gel d'agarose

Avant de passer à l'amplification, il faut d'abord révéler la présence et vérifier la concentration et la qualité de l'ADN de tous les 48 échantillons. L'évaluation de la qualité d'ADN a été réalisée sur un gel d'agarose 1% en comparaison avec un marqueur connu « **Lambda marker** ».

II.2.1. Préparation du gel

Pour préparer un gel d'agarose sur lequel vont migrer nos extraits d'ADN, une solution d'agarose est préparée selon la capacité de la cuve (50, 90, 130, 300 ml). Le mélange sera fondu, refroidi puis coulé sur un porte gel.

Lorsque la solution atteint une température avoisinante 65°C, elle est coulée dans la cuve à électrophorèse. Un peigne est placé à l'extrémité de la cuve pour permettre la formation des puits dans lesquels sera déposée la solution d'ADN. Un temps de 30 minutes est nécessaire pour la polymérisation du gel.

Lorsque la solution atteint une température avoisinante 65°C, elle est coulée dans la cuve à électrophorèse. Un peigne est placé à l'extrémité de la cuve pour permettre la formation des puits dans lesquels sera déposée la solution d'ADN. Un temps de 30 minutes est nécessaire pour la polymérisation du gel.

Après la migration qui se fait à 80 volts, le gel sera coloré dans une solution de bromure d'éthidium (BET à 1 µg/ml) pendant 30 minutes. C'est un agent intercalant de l'ADN qui devient fluorescent lorsqu'il est exposé à des rayonnements ultraviolets (UV). Il permet de révéler les bandes d'ADN qui ont migré dans le gel d'agarose.

La comparaison visuelle de la fluorescence d'un échantillon avec celle d'une quantité d'ADN connue (le marqueur de taille) permet d'en déduire la quantité d'acides nucléiques déposée et d'estimer un facteur de dilution afin d'obtenir une concentration finale d'ADN de 20 ng/µL. En effet, à la suite de l'électrophorèse en gel d'agarose, une dilution est réalisée à partir de la solution « ADN stock ». La solution « ADN dilué » obtenue va servir pour réaliser une amplification en chaîne par polymérase (PCR).

II.3. Réaction de Polymérisation en Chaîne ou PCR

La réaction d'amplification est possible grâce à un mélange réactionnel de 10µl, contenant en plus de l'extrait d'ADN, des amorces complémentaires spécifiques, la Taq polymérase, les quatre désoxyribonucléotides triphosphates, une solution tampon (Tris-Cl, KCl, (NH₄)₂S₀₄, MgCl₂ (15mM), pH8.7) et l'eau pure. La réaction se réalise dans un

thermocycleur muni d'un écran tactile qui permet d'entrer le programme approprié à chaque amorce.

Tableau 2: Composition du mélange réactionnel de l'amplification selon la technique SSR.

Composantes	Volumes pour une seule réaction	Volumes pour 50,4 réactions
Eau distillé stérile	3.975µl	200,34 µl
Buffer X5	2 µl	100,8 µl
dNTP mixés (2mM)	1 µl	50,4 µl
Amorce (10pmol/µl)	1 µl	50,4 µl
Taq polymérase (5U/µl)	0.025 µl	1,26 µl
ADN	1 µl	50,4 µl
Total	9 µl	453,6 µl

Il faut noter qu'un risque d'erreur de 5% $((48 \times 5)/100) = 2,4$ est pris en compte lors du pipetage des volumes des différents composants. On aura alors $48 + 2,4 = 50,4$ au lieu de 48 réactions.

Le programme PCR consiste à la répétition de trois étapes successives, au temps et à température différents. Ces trois étapes qui constituent un cycle qui se répète trente fois sont la dénaturation, l'hybridation et l'élongation.

- La dénaturation de l'ADN nécessite une haute température de 95°C pour permettre aux deux brins de se séparer.

- L'hybridation spécifique des deux amorces sur leurs séquences complémentaires se fait à une température qui dépend du GC % de des amorces.

- L'élongation à une température de 72°C pendant 1 minute s'effectue par la Taq polymérase qui synthétise les brins d'ADN complémentaires en ajoutant des desoxynucléotides triphosphates aux extrémités 3'OH des amorces.

Pour l'amplification, deux programmes sont utilisés :

- Programme PCR réalisé dans le cas d'amorce « PBA- LC » :

- 94°C pour 5 minutes : dénaturation initiale
 - 94°C pour 30 secondes : dénaturation
 - 50°C pour 30 secondes : hybridation
 - 72°C pour 30 secondes : élongation
 - 72°C pour 5 secondes : élongation finale
- } pour 30 cycles

- Programme PCR réalisé dans le cas d'amorce « SSR » :

- 94°C pour 3 minutes : dénaturation initiale
 - 94°C pour 30 secondes : dénaturation
 - 52°C ,53°C, 55°C, ou 55°C pour 30 secondes : hybridation
 - 72°C pour 1 minute : élongation
 - 72°C pour 5 minutes : élongation finale
- } pour 30 cycles

A la fin de la réaction, le produit amplifié peut être conservé pendant un certain temps dans le thermocycleur à 4°C avant de l'analyser par électrophorèse sur gel d'acrylamide.

Tableau 3 : Caractéristiques des amorces étudiées et des microsatellites à amplifier.
Aladdin Hamwiah *et al*, (2009)

Amorce	Séquence	Taille en(Pb)	Tm en (°C)	Motif Répété
PBA-LC0250	F:TGCATTTACCATCATCTCTAAC R :TGATTGATTCCGGTACTTTTTG	149	50	(AAC) ₃
PBA-LC0278	F: GACGCAGAAGATTAAGGAGAC R : ATTCTGACCATAACCATTCCT	152	50	(TTCA) ₄
PBA-LC373	F : ATTTGGGCAACATATTCAAG R : ACTATACTTTCTCCCGTCGTT	170	52	(TAT) ₄
SSR46	F : CACTAAACATGGAAAATAGG R : CTTATCTTTGTTTGAAGCAA	157	50	(CA) ₈

II.4. Electrophorèse sur gel d'acrylamide

II.4.2. Préparation du gel

Pour préparer un gel d'acrylamide sur lequel vont migrer nos extraits d'ADN, Il faut préparer une solution d'acrylamide 40 %. Ce gel possède un pouvoir résolutif de 10 paires de bases. L'ADN peut être aussi séparé en utilisant l'électrophorèse sur gel d'agarose, mais cette dernière n'est pas adaptée à la séparation de petits fragments.

La solution mère d'acrylamide est utilisée pour préparer une solution finale concentrée à 8% pour les plaques des 100 puits.

Deux plaques en verre sont superposées et maintenues par des pinces puis séparées par deux séparateurs placés sur les bordures verticales. La solution de gel est versée entre ces deux plaques à un rythme lent et uniforme pour éviter la formation de bulles d'air. Ces dernières constituent un frein lors de la migration de l'ADN et leur présence en grand nombre rend le gel inutilisable. Pour éliminer les bulles une seringue peut être utilisée, l'idée est d'attirer les bulles vers l'extrémité des plaques de verre. Un peigne est introduit à l'extrémité des plaques et permet la formation des puits. La polymérisation du gel dure environ une heure. Une fois qu'il est solidifié, les plaques sont déposées sur un portoir.

II.4.3. Révélation du gel

Après la migration qui se fait à 300 volts, le gel sera coloré dans une solution de BET pendant 5 minutes, après il est rincé et visualisé sous rayonnement UV. La taille des fragments d'ADN sera estimée à l'aide du marqueur moléculaire 100 bp.

II.4.4. Dépôt des échantillons et migration

Un volume de 10 µl du produit d'amplification est mélangé avec 5 µl de bleu d'acrylamide. Un volume de 7 µl du mélange est ensuite déposé dans les puits du gel. Le premier puits est réservé au marqueur de taille de 100 bp est le voltage de migration de 300V. Après la migration, le gel est récupéré et exposé aux UV afin de visualiser les bandes d'ADN.

II.4.5. Distance génétique

La distance génétique entre les différentes accessions de lentille a été déterminée par le logiciel Power Marker. Il s'agit d'un ensemble complet de méthodes statistiques pour l'analyse de différentes données génétiques de marquage, spécialement conçu pour les SSR/SNP (Liu, 2004), pour le calcul de la distance génétique ainsi que pour la réalisation du dendrogramme. Ce programme utilise la méthode de Nei (Nei *et al.*, 1987).

II.4.6. Dendrogramme

Le programme Power Marker (Version 3.0; Liu et Muse, 2005) a été utilisé pour construire un arbre «dendrogramme » phylogénétique à partir des distances génétiques calculées à partir des données initiales. Ce logiciel permet de classer les accessions selon la méthode UPGMA (Unweighted Pair Group Using Method Average) (Benzecri., 1973), à partir de la matrice de distances génétiques. Cette classification hiérarchique commence par la fusion de deux unités les plus proches puis on recalcule la distance du nouveau groupe au reste des unités en créant une nouvelle matrice de distance. La nouvelle distance correspond à la moyenne arithmétique des distances entre les éléments regroupés.

Cette méthode a été choisie sur la base des travaux antérieurs ayant montré que la classification UPGMA est mieux adaptée que la classification NJ (neighbor joining) avec une meilleure structuration des groupes avec des embranchements plus robustes (Divaret, 1998).

RESULTATS ET DISCUSSIONS

I. Extraction de l'ADN génomique et test de qualité

L'extraction de l'ADN génomique des feuilles de la lentille *Lens culinaris*, montre la présence de bandes alignées au même niveau, avec une taille supérieure à la taille de la bande 21000 Pb du marqueur moléculaire « **Lambda Marker** ». Cela signifie que l'ADN génomique est en général intact et peut être considéré de bonne qualité.

Par ailleurs, les bandes obtenues ne présentent pas en général la même intensité de fluorescence, ce qui signifie que la quantité d'ADN n'est pas toujours la même pour tous les échantillons analysés.

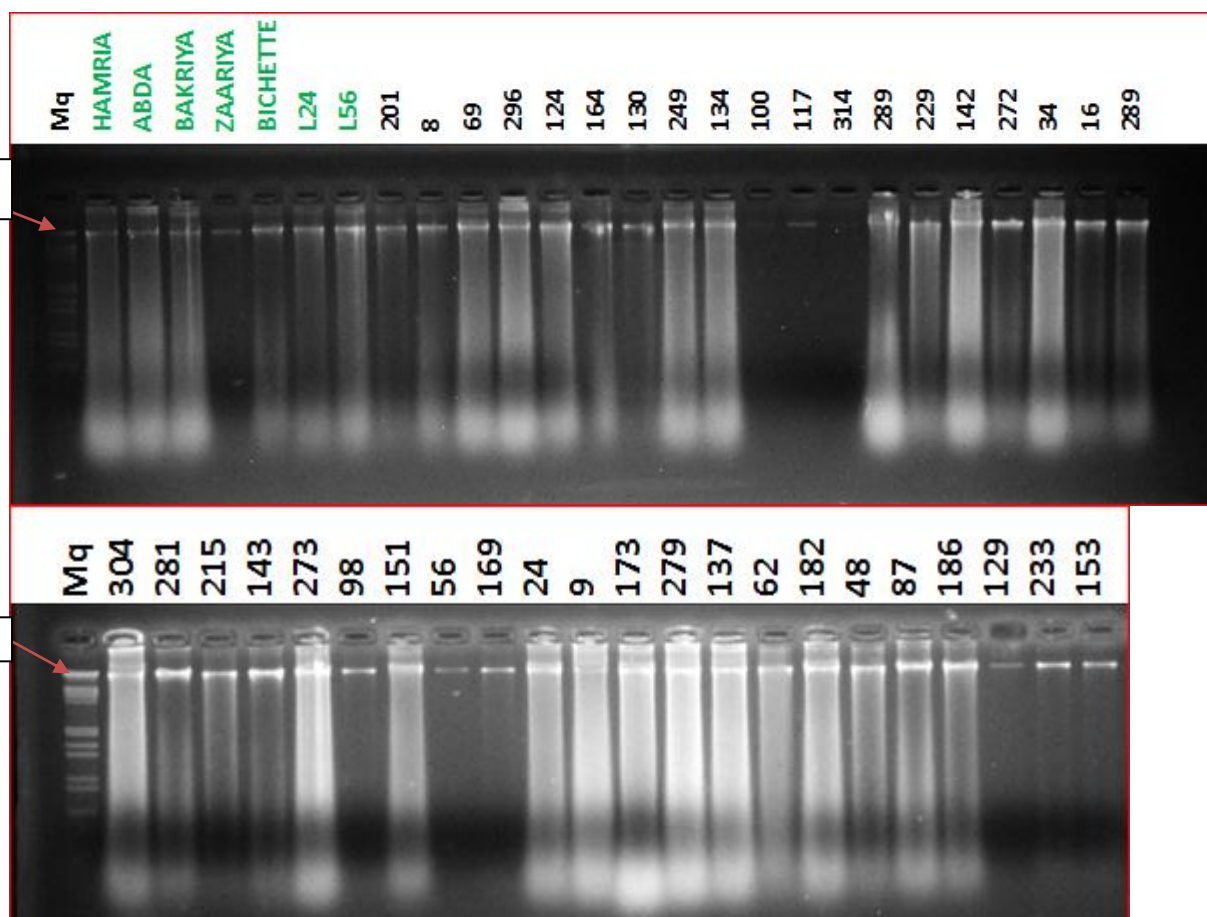


Figure5: Profil électrophorétique d'ADN total extrait à partir de 48 accessions de la lentille de MERCHOUCH sur gel d'agarose.

II. Amplification d'ADN par PCR

L'analyse des produits d'amplification par les quatre amorces étudiées a donné les profils électrophorétiques suivants :

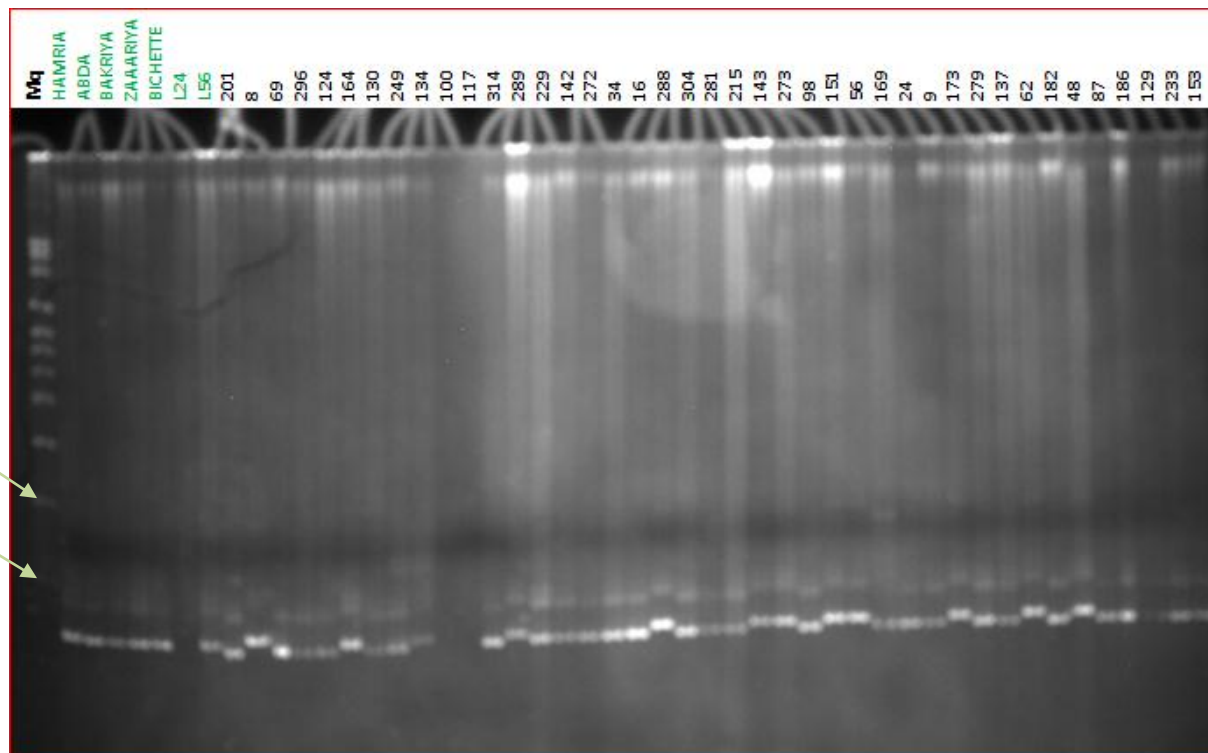


Figure 6: Profil électrophorétique de l'amorce spécifique PBA-LC0250 sur gel de polyacrylamide chez 48 accessions de la lentille après l'amplification par PCR-SRR.

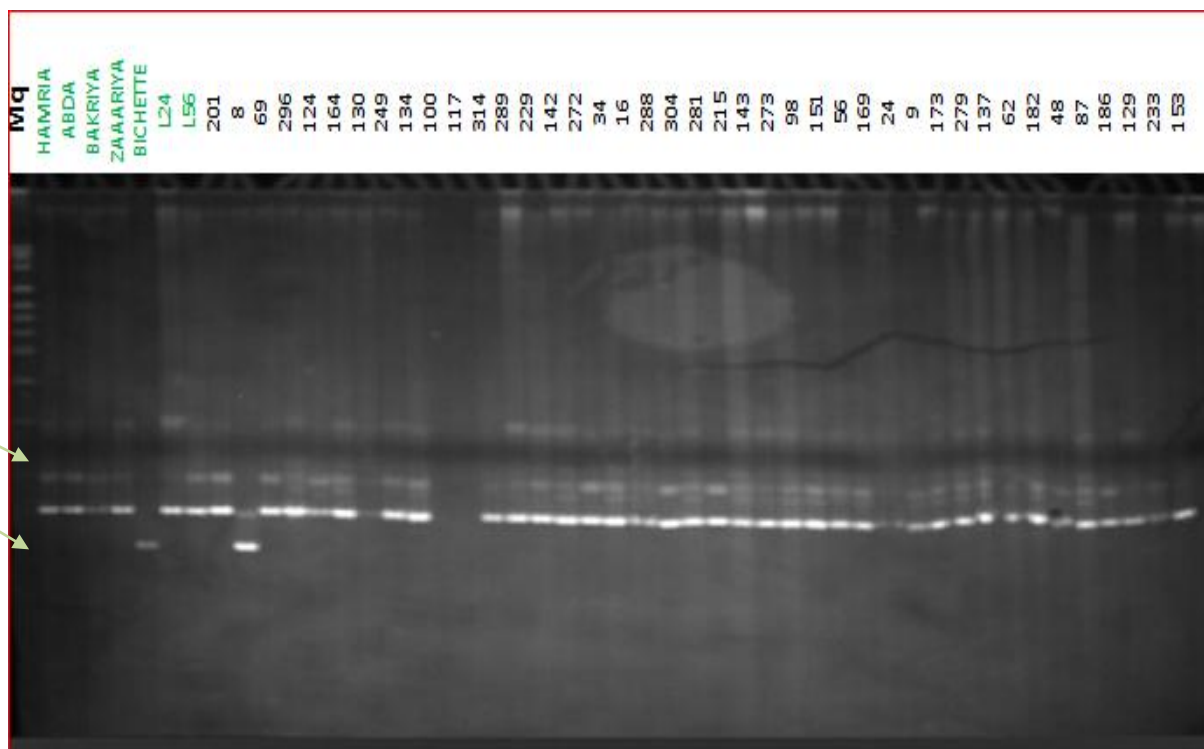


Figure 7: Profil électrophorétique de l'amorce spécifique PBA-LC 0278 sur gel de polyacrylamide chez 48 accessions de la lentille après l'amplification par PCR-SRR.

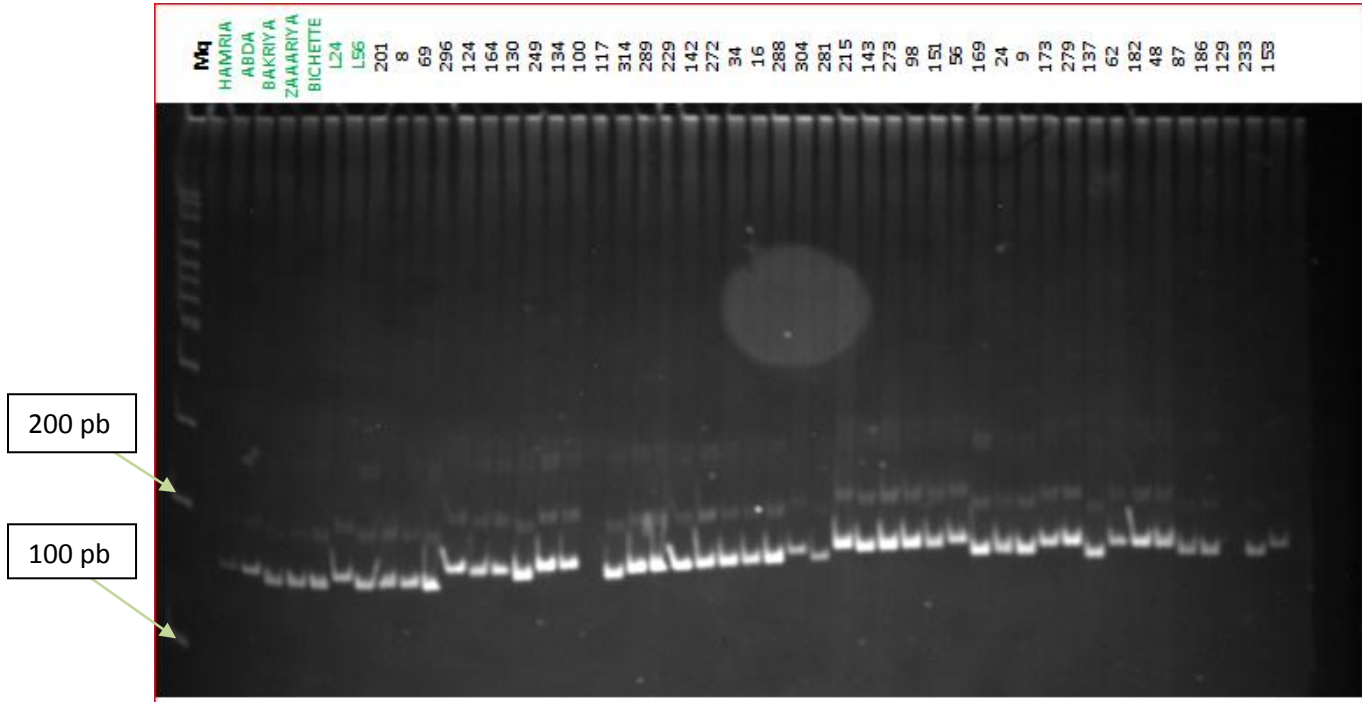


Figure 8: Profil électrophorétique de l'amorce spécifique PBA-LC 373 sur gel de polyacrylamide chez 48 accessions de la lentille après l'amplification par PCR-SRR.

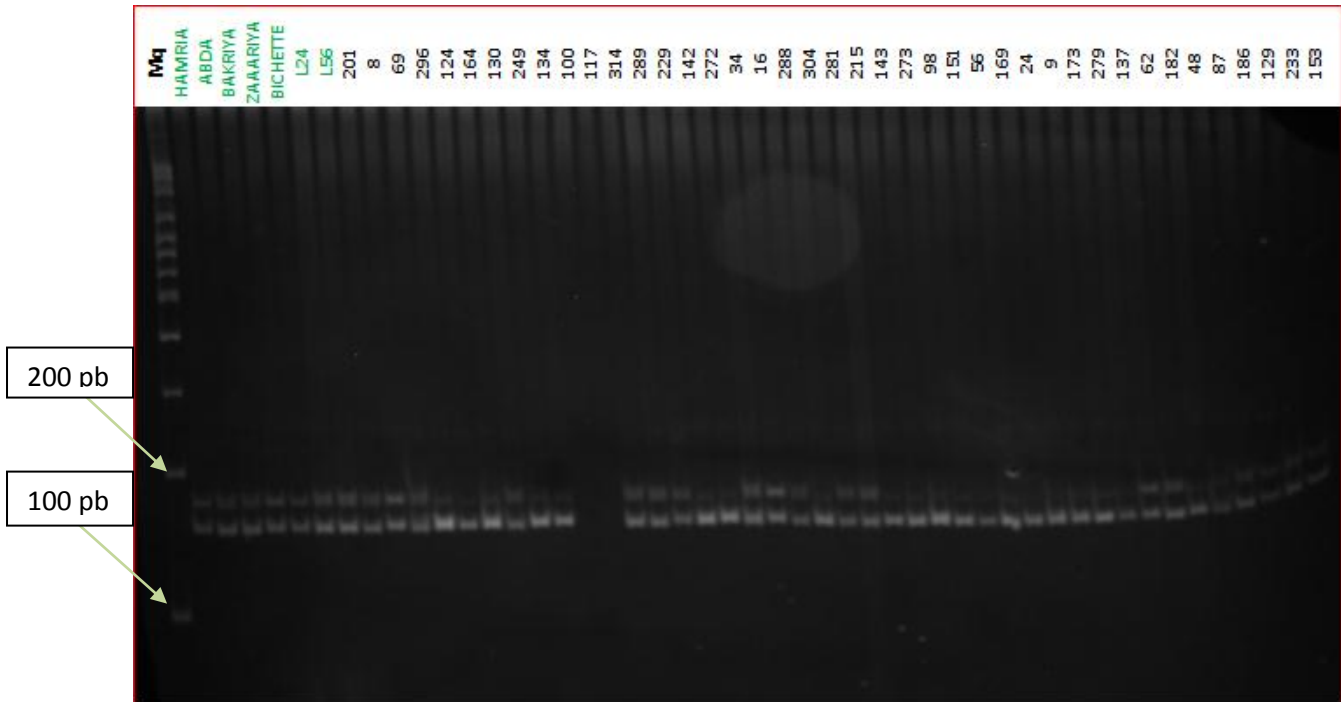


Figure 9: Profil électrophorétique de l'amorce spécifique SSR46 sur gel de polyacrylamide chez 48 accessions de la lentille après l'amplification par PCR-SRR.

En général, l'amplification nous a permis de mettre en évidence la diversité génétique existante entre les accessions de la lentille. D'après les profils interprétés on a observé la présence du polymorphisme, mais ce polymorphisme n'est pas toujours

présent, il est en fonction de l'amorce étudiée.

Dans le cas de la présence de plusieurs bandes d'ADN chez la même accession, on va prendre en considération la bande qui répond au critère de taille de l'amorce microsatellite renseigné dans plusieurs bibliographies.

Les différents profils électrophorétiques montrent un polymorphisme sauf le 4^{ème} profil (amorce SSR 46). Les bandes de différentes tailles dues à la différence de tailles en paire de bases des microsatellites amplifiés. Chaque bande claire dans le gel représente un allèle. Donc, chaque amorce a donné un nombre de bandes qui correspond au nombre d'allèles. Le tableau ci-dessous résume le nombre d'allèles, l'indice de la diversité génétique et le PIC, calculés pour les 4 amorces SSR testés sur 48 accessions de lentille à l'aide du logiciel Power Marker.

Tableau 5: Diversité génétique calculé chez les variétés étudiées de lentille

Marqueur	Nb d'échantillons	Nb d'allèles	Fréquence de l'allèle majoritaire	Indice de diversité génétique	PIC
PBA-LC0250	48	5	0,466	0,701	0,661
PBA-LC0278	48	4	0,934	0,124	0,122
PBA-LC373	48	11	0,239	0,874	0,862
SSR46	48	1	1	0.000	0.000
Moyenne	48	5,25		0,425	0,411

Le nombre d'allèles varie entre 1 (**SSR46**) et 11 (**PBALC373**) avec une moyenne de 5,25 et une moyenne de pic de 0,411.

L'allèle majeur qui représente la fréquence la plus élevée de (0,934) est retrouvé chez les accessions amplifiées par l'amorce PBA-LC0250. Par contre l'allèle majeur qui génère la fréquence la plus faible (0.0001) est retrouvé chez l'amorce SSR46.

Chez les accessions amplifiées par l'amorce PBA-LC373, on remarque qu'elles présentent un nombre d'allèle plus élevé (11 allèles), par contre l'amorce SSR46 génère qu'un seul allèle.

Les indices moyens de la diversité génétique les plus élevés (0,874 et 0,701) ont été obtenus respectivement chez les accessions dont l'ADN est amplifié par les deux amorces suivantes: PBA-LC373 et PBALC0250. Quant à l'amorce SSR46, elle a généré l'indice le plus faible (0.0001). L'amorce suivante **PBALC373** est qualifiée de hautement informative, étant donné que la valeur de l'indice PIC (*Polymorphism Information Content*) est supérieure à 0,75. En outre l'amorce PBA-LC0278 génère un faible taux de

OTU	249	272	273	279	281	288	289	296	3	304	314	34	4	48	5	56	6	62	69	7	8	87	9	98
1	0,5	0,3	0,5	0,5	0,3	0,5	0,3	0,5	0,5	0,3	0,5	0,3	0,5	0,3	0,8	0,5	0,3	0,3	0,5	0,5	0,8	0,5	0,3	0,5
117	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
124	0,3	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,0	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,8	0,5	0,3	0,5	0,3	0,5	0,8	0,5	0,5	0,5
129	0,3	0,0	0,3	0,3	0,0	0,3	0,0	0,3	0,3	0,0	0,3	0,0	0,3	0,0	0,7	0,3	0,0	0,0	0,3	0,3	0,7	0,3	0,0	0,3
130	0,3	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,3	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,8	0,5	0,3	0,5	0,3	0,5	0,8	0,5	0,5	0,5
134	0,3	0,8	0,8	0,8	0,8	0,8	0,5	0,5	0,8	0,8	0,5	0,8	0,8	0,8	0,8	0,8	0,7	0,8	0,5	0,8	0,8	0,8	0,8	0,8
137	0,5	0,3	0,5	0,5	0,0	0,5	0,3	0,5	0,5	0,0	0,5	0,3	0,5	0,3	0,8	0,5	0,3	0,3	0,5	0,5	0,8	0,5	0,3	0,5
142	0,5	0,0	0,5	0,5	0,3	0,5	0,3	0,5	0,5	0,3	0,5	0,0	0,5	0,3	0,8	0,5	0,3	0,3	0,5	0,5	0,8	0,5	0,3	0,5
143	0,5	0,3	0,5	0,5	0,3	0,5	0,3	0,5	0,5	0,3	0,5	0,3	0,5	0,3	0,8	0,5	0,3	0,3	0,5	0,5	0,8	0,3	0,0	0,5
151	0,5	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3	0,5	0,5	0,3	0,5	0,3	0,5	0,0	0,8	0,3	0,3	0,0	0,5	0,5	0,8	0,5	0,3	0,3
153	0,5	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3	0,5	0,5	0,3	0,5	0,3	0,5	0,0	0,8	0,3	0,3	0,0	0,5	0,5	0,8	0,5	0,3	0,3
16	0,5	0,0	0,5	0,5	0,3	0,5	0,3	0,5	0,5	0,3	0,5	0,0	0,5	0,3	0,8	0,5	0,3	0,3	0,5	0,5	0,8	0,5	0,3	0,5
164	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,3	0,3	0,5	0,3	0,5	0,3	0,5	0,5	0,5	0,3	0,5	0,5	0,3	0,5	0,5	0,5	0,5
169	0,5	0,5	0,5	0,3	0,3	0,5	0,5	0,5	0,5	0,3	0,5	0,5	0,5	0,5	0,8	0,3	0,3	0,5	0,5	0,5	0,8	0,3	0,5	0,5
173	0,5	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3	0,5	0,5	0,3	0,5	0,3	0,5	0,0	0,8	0,3	0,3	0,0	0,5	0,5	0,8	0,5	0,3	0,3
182	0,5	0,5	0,3	0,0	0,5	0,3	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,3	0,8	0,0	0,3	0,3	0,5	0,5	0,8	0,3	0,5	0,3
186	0,5	0,3	0,5	0,5	0,3	0,5	0,3	0,5	0,5	0,3	0,5	0,3	0,5	0,3	0,8	0,5	0,3	0,3	0,5	0,5	0,8	0,3	0,0	0,5
2	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,3	0,5	0,3	0,5	0,3	0,5	0,5	0,5	0,0	0,5	0,5	0,3	0,5	0,5	0,5	0,5
201	0,3	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,3	0,3	0,5	0,5	0,5	0,3	0,5	0,5	0,5	0,3	0,5	0,3	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
215	0,5	0,3	0,5	0,5	0,3	0,5	0,3	0,5	0,5	0,3	0,5	0,3	0,5	0,3	0,8	0,5	0,3	0,3	0,5	0,5	0,8	0,5	0,3	0,5
229	0,3	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,3	0,5	0,3	0,5	0,0	0,5	0,3	0,5	0,5	0,5	0,3	0,5	0,5	0,3	0,5	0,5	0,5	0,5
233	0,5	0,3	0,5	0,5	0,3	0,5	0,3	0,5	0,5	0,3	0,5	0,3	0,5	0,3	0,8	0,5	0,3	0,3	0,5	0,5	0,8	0,3	0,0	0,5
24	0,5	0,3	0,5	0,5	0,3	0,5	0,3	0,5	0,5	0,3	0,5	0,3	0,5	0,3	0,8	0,5	0,3	0,3	0,5	0,5	0,8	0,3	0,0	0,5
249	0,0	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,3	0,3	0,5	0,5	0,3	0,5	0,5	0,5	0,8	0,5	0,3	0,5	0,3	0,5	0,8	0,5	0,5	0,5
272	0,5	0,0	0,5	0,5	0,3	0,5	0,3	0,5	0,5	0,3	0,5	0,0	0,5	0,3	0,8	0,5	0,3	0,3	0,5	0,5	0,8	0,5	0,3	0,5
273	0,5	0,5	0,0	0,3	0,5	0,0	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,3	0,8	0,3	0,3	0,3	0,5	0,5	0,8	0,5	0,5	0,0
279	0,5	0,5	0,3	0,0	0,5	0,3	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,3	0,8	0,0	0,3	0,3	0,5	0,5	0,8	0,3	0,5	0,3
281	0,5	0,3	0,5	0,5	0,0	0,5	0,3	0,5	0,5	0,0	0,5	0,3	0,5	0,3	0,8	0,5	0,3	0,3	0,5	0,5	0,8	0,5	0,3	0,5
288	0,5	0,5	0,0	0,3	0,5	0,0	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,3	0,8	0,3	0,3	0,3	0,5	0,5	0,8	0,5	0,5	0,0
289	0,3	0,3	0,5	0,5	0,3	0,5	0,0	0,5	0,5	0,3	0,3	0,3	0,5	0,3	0,8	0,5	0,3	0,3	0,5	0,5	0,8	0,5	0,3	0,5
296	0,3	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,0	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,8	0,5	0,3	0,5	0,3	0,5	0,8	0,5	0,5	0,5
3	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,0	0,5	0,3	0,5	0,0	0,5	0,3	0,5	0,3	0,5	0,5	0,3	0,3	0,5	0,5	0,5
304	0,5	0,3	0,5	0,5	0,0	0,5	0,3	0,5	0,5	0,0	0,5	0,3	0,5	0,3	0,8	0,5	0,3	0,3	0,5	0,5	0,8	0,5	0,3	0,5
314	0,3	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,3	0,5	0,3	0,5	0,0	0,5	0,3	0,5	0,5	0,5	0,3	0,5	0,5	0,3	0,5	0,5	0,5	0,5
34	0,5	0,0	0,5	0,5	0,3	0,5	0,3	0,5	0,5	0,3	0,5	0,0	0,5	0,3	0,8	0,5	0,3	0,3	0,5	0,5	0,8	0,5	0,3	0,5
4	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,0	0,5	0,3	0,5	0,0	0,5	0,3	0,5	0,3	0,5	0,5	0,3	0,3	0,5	0,5	0,5
48	0,5	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3	0,5	0,5	0,3	0,5	0,3	0,5	0,0	0,8	0,3	0,3	0,0	0,5	0,5	0,8	0,5	0,3	0,3
5	0,8	0,8	0,8	0,8	0,8	0,8	0,8	0,8	0,3	0,8	0,5	0,8	0,3	0,8	0,0	0,8	0,7	0,8	0,8	0,5	0,3	0,8	0,8	0,8
56	0,5	0,5	0,3	0,0	0,5	0,3	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,3	0,8	0,0	0,3	0,3	0,5	0,5	0,8	0,3	0,5	0,3
6	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3	0,7	0,3	0,0	0,3	0,3	0,3	0,7	0,3	0,3	0,3
62	0,5	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3	0,5	0,5	0,3	0,5	0,3	0,5	0,0	0,8	0,3	0,3	0,0	0,5	0,5	0,8	0,5	0,3	0,3
69	0,3	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,3	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,8	0,5	0,3	0,5	0,0	0,3	0,8	0,5	0,5	0,5
7	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,3	0,5	0,3	0,5	0,3	0,5	0,5	0,5	0,3	0,5	0,3	0,0	0,5	0,5	0,5	0,5
8	0,8	0,8	0,8	0,8	0,8	0,8	0,8	0,8	0,3	0,8	0,5	0,8	0,3	0,8	0,3	0,8	0,7	0,8	0,8	0,5	0,0	0,8	0,8	0,8
87	0,5	0,5	0,5	0,3	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,8	0,3	0,3	0,5	0,5	0,5	0,8	0,0	0,3	0,5
9	0,5	0,3	0,5	0,5	0,3	0,5	0,3	0,5	0,5	0,3	0,5	0,3	0,5	0,3	0,8	0,5	0,3	0,3	0,5	0,5	0,8	0,3	0,0	0,5
98	0,5	0,5	0,0	0,3	0,5	0,0	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,3	0,8	0,3	0,3	0,3	0,5	0,5	0,8	0,5	0,5	0,0

Les valeurs de la distance génétique varient entre 0,00 et 0,8.

La plus petite distance a été observée entre plusieurs accessions comme exemple (98 et 273); (6 et 2); (16 et 272); (48, 251 et 253); (272 et 129); (36 et 16); (98 et 130); (98 et 288).

Alors que la plus grande valeur de 0,8 a été révélée entre plusieurs accessions comme exemple (98 et 8); (5 et 173); (134 et 272); (48 et 134), ce qui exprime la présence d'une diversité génétique assez importante entre les différentes accessions étudiées.

IV. Arbre Phylogénique

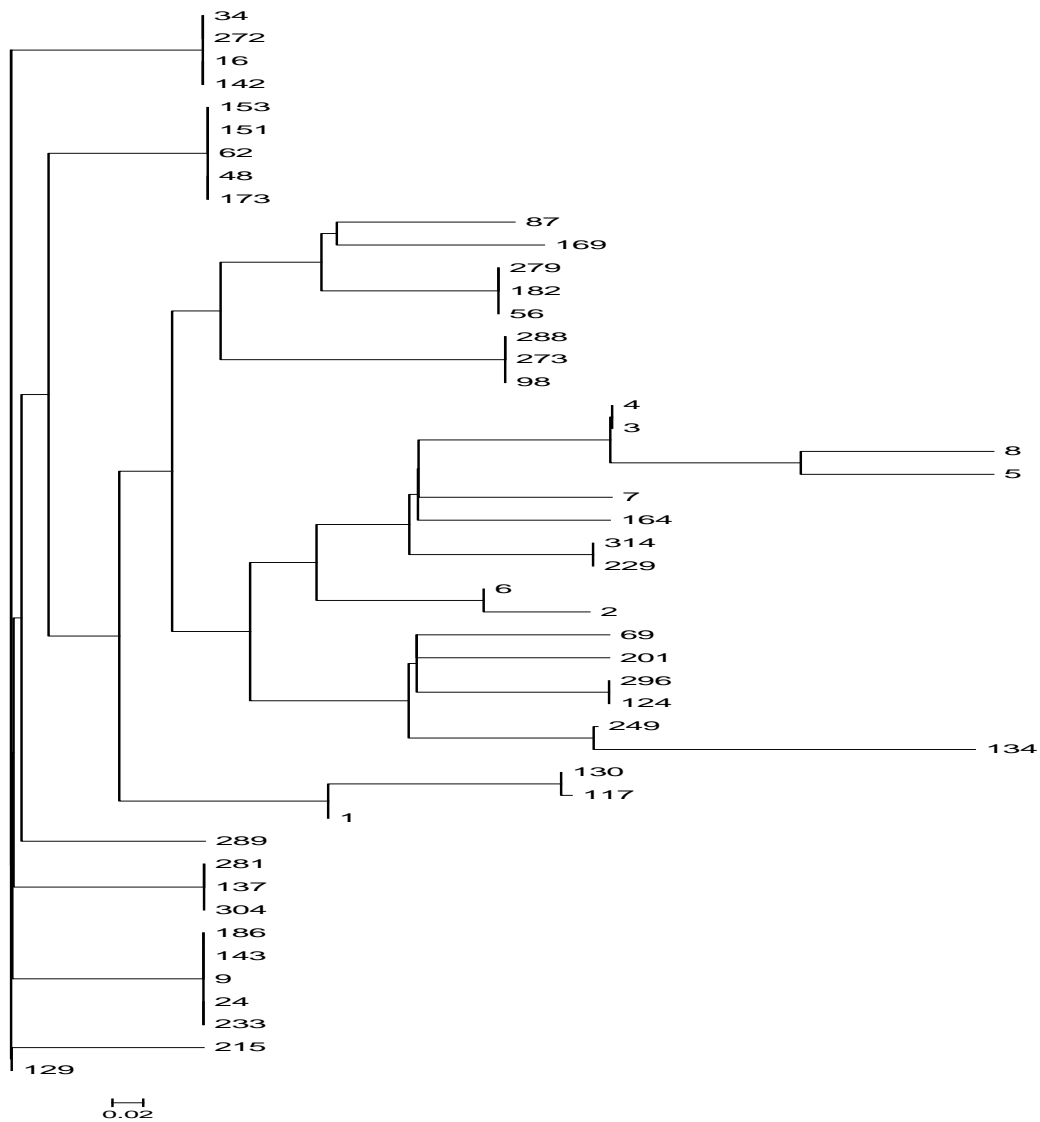


Figure 10: Dendrogramme généré sur la base des données SSR des 48 accessions de la lentille.

Les résultats ont révélé la présence d'une diversité génétique élevée au sein des accessions. La totalité des 48 accessions sont distingués les uns des autres. On remarque que le dendrogramme divise nos accessions en 7 groupes

Les accessions d'origine marocains on étés regroupés dans un seule groupe ce qui montre une variabilité génétique correcte.

Conclusion

De part sa situation géographique, le Maroc constitue un cadre naturel tout à fait original offrant une gamme de facteurs écologiques, favorisant une flore riche et diversifiée. Les légumineuses constituent une partie de cette flore. En effet le Maroc est un producteur naturel de plusieurs espèces de légumineuse telle que **la lentille**.

Le travail effectué dans le cadre de ce mémoire avait pour perspective de mettre en valeur la production naturelle de cette plante légumineuse **la lentille** « *L. culinaris* », ce qui nous a permis d'évaluer sa diversité génétique qui constitue une étape fondamentale dans les programmes d'amélioration et de conservation des produits alimentaires. De ce fait l'exploration de la diversité génétique de quelques accessions marocaines de la lentille (*L. culinaris*.) grâce à des outils moléculaires modernes tels que SSR a été un travail nécessaire.

A ce titre, l'analyse moléculaire du génome de la lentille par la technique de SSR offre un bon résultat, puisque les amorces spécifiques étudiées ont été fortement informatives.

La validation des marqueurs SSR et leur utilité sur nos accessions ont été confirmées par des analyses visant à déterminer les relations génétiques qui existent entre les populations chez l'espèce *L. culinaris*.

A l'issue de cette étude, le marquage moléculaire par la technique SSR, mis au point sur les 48 accessions de la lentille n'est pas suffisant pour analyser la diversité génétique globale de la lentille au Maroc, en effet, des études morphologiques et /ou biochimiques sont indispensables pour atteindre cet objectif.

Références Bibliographiques

AAC. (2008). Programme de réduction des risques liés aux pesticides Centre pour la lutte antiparasitaire, Profil de la culture de la lentille au Canada.

Aladdin Hamwiah (2009) Development of new microsatellite markers and their application in the analysis of genetic diversity in lentils

Bamouh,Ahmed 1999 ,fiche technique,la lentille amelioration de la culture des legumineuses alimentaires(ACLA),direction de la production végétale

Benzecri J.P. (1973).L'analyse des données. Tome 2: L'analyse des correspondances.

Bretting, P.K., et M.P. Widrechner, 1995. Genetic markers and plant genetic resource management. In : Janick J. ed. Plant Breeding Reviews. New York: John Wiley & Sons Inc.13: 11-86.

Cokkizgin A, et Shtaya MJY (2013) Lentil: Origin, Cultivation Techniques, Utilization an Advances in Transformation. Agricultural Sciences 1 (1):55-62.

Garcia F., G. Moynot, E. Forni et M.H. Chevallier (2001). Gestion in situ des ressources génétiques du sapelli, *Entandrophragma cylindricum*(Sprague) Sprague, au sud-est du Cameroun. Bois et forets des trophiques, 269, pp 77-79.

Haig, S. M. (1998). Molecular contributions to conservation. Ecology, 79(2): 413-425.

Lévêque, C et Mounoulou, J.C., (2001). Biodiversité, dynamique biologique conservation. Edition dunod, Paris. p55-60.

Mebarek L., (2010). Analyse comparative de la diversité génétique et de la structure des populations chez l'orge (*Hordeumvulgare* L.) à l'aide de marqueurs SSR, DArT et du pedigree.Université Laval.

Nei M.et Saitou N (1987). The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. 4(4):406-25.

Rizk S.G. (1966). Atmospheric nitrogen fixation by legumes under Egyptian conditions. II. Graine Legumes. Journal of Microbiology, U.A.R. 1:33-45.

Parizeau M.; (1997). La biodiversité. Tout conserver ou tout exploiter. Sciences. éthiques. Sociologie. DeBoeck et larcier s. a. paris, Bruxelles. P 209.

Saghai-Marroof, M. A., Soliman, K. M., Jorgensen, R. A., et Allard, R. W. (1984). Ribosomal DNA spacer-length polymorphism Mendelian inheritance, chromosomal location, and population dynamics. *PNAS*, 8

Samouelian F., Gaudin V., et Boccara M., (2009). Génétique moléculaire des plantes. Éd Quae.203p.

Toklu F, Tuba BB et Karaköy T (2009) Agro-morphological characterization of the Turkish lentil landraces. African Journal of Biotechnology 8(17):4121-4127

Tautz D. (1989). Hypervariability of simple sequences as a general source for polymorphic DNA markers. *Nucl. Ac. Res.*16:64636471.

Udupa S.M., Robertson L.D., Weigand F., Baum M., et Kahl G. (1999). DNA extraction and microsatellite analyses Molecular Genetics and Genomics, 261:354363.

Vos, P., R Hogers, M. Bleeker et M. Reijans, T. V. D. Lee, (1995). AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. *Nucl. Acids Res.* **23**: 4407-4414.

Williams,J.G.K., A.R.Kubelik., K.J.Livak., J.A.Rafalski, et S.V.Tingey (1990). DNA polyporphism amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nuclei acid research* **18**: 6531-6535.

Webographie

<http://alexandre.alapetite.fr/iup-gmi/cbgp/annexes.html>

<http://www.cdfd.in>

<http://www.inra.ma:120/agris/>

<http://www.faostat.fao/>

[http://onlinelibrary.wiley.com/journal/10.1111\(ISSN\)1439-0523](http://onlinelibrary.wiley.com/journal/10.1111(ISSN)1439-0523)

<http://dl.sciencesocieties.org/publications/cs/abo>

ANNEXES

ANNEXE 1 : Préparation des solutions essentiels pour l'extraction.

❖ **Solution Stock de CTAB x2 : (100ml)**

Une solution Cetyl Trimethyl Ammonium Bromide (CTAB) est préparée avec les composants ci-dessous :

- ✚ 0,2 ml de β -mercaptoéthanol qui dénature les protéines.
- ✚ 10 ml de Tampon Tris HCl (1 M) inactivant les désoxyribonucléases (ADNase).
- ✚ 25 ml de NaCl (5 M) permet une stabilisation d'ADN, où les ions Na^+ se lient avec les ions négatifs.
- ✚ 4 ml de EDTA (0,5 M) qui est un chélateur d'ions bivalents surtout les cations Mg^{2+} et qui permet également une inactivation des désoxyribonucléases.
- ✚ 2 g de CTAB poudre qui favorise la destruction de la membrane cellulaire et nucléaire et libération du contenu cellulaire.
- ✚ compléter par l'eau distillée jusqu'à 100 ml

❖ **Solution stock de 1 M Tris-HCl**

- ✚ 12,114g de Tris base
- ✚ Compléter par l'eau distillée jusqu'à 100ml

Ajuster le pH à 8 avec la solution HCl concentrée.

❖ **Solution stock de Na Cl**

- ✚ 73,05g
- ✚ Compléter par l'eau distillée jusqu'à 250 ml

❖ **Solution stock d'EDTA**

- ✚ 18,6g d'EDTA
- ✚ Compléter par l'eau distillée jusqu'à 100ml

Ajuster le pH8 avec les pelletes de NaOH.

❖ **Solution de Chloroforme / Isoamyl alcool:**

Chloroforme / isoamyl alcool (24 : 1)	Pour 25 mL	100 mL
Chloroforme (Scharlau)	24 mL	96 mL
Isoamyl alcool ou 3- Methylbutanol (Sigma)	1 mL	4 mL

❖ **Solution de 70% Ethanol:**

70% Ethanol	Pour 100 mL
Ethanol absolu ou Ethanol Anhydrous denatured (Amresco)	70 mL
Eau distillée	30 mL

❖ **Gel de 1% agarose:**

Solution d'agarose	Pour 90 mL	Pour 300 mL
Agarose (Promega)	1.08 g	3.6 g
5 X TBE	18 mL	60 mL
Eau distillée	Compléter jusqu'à 90 mL	Compléter jusqu'à 300 mL

❖ **Solution de 40% acrylamide:**

40% Acrylamide	Pour 50 mL	Pour 250 mL
Acrylamide (Promega)	19.33 g	96.65 g
Bis acrylamide ou N, N'-Methylenebisacrylamide (Sigma)	0.67 g	3.35 g
Eau distillée	50 mL	250 mL

❖ **Solution de bromure d'éthidium (BET):**

Solution diluée de Bromure d'éthidium	Pour 1 L
Bromure d'éthidium (10 mg/mL)	100 µL
Eau distillée	1 L

❖ **Préparation de gel d'acrylamide 8 %, pour les plaques de 150 ml :**

🚰 22,5 ml d'acrylamide 40%

🚰 15 ml de TBE × 5

🚰 On complète par l'eau distillé

jusqu'à 150 ml

❖ Après la préparation des plaques, On ajout les deux agents gélifiants suivants

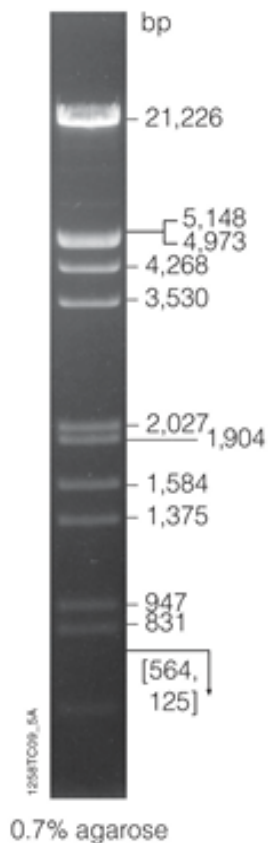
❖ 400 µL d'APS (25%)

❖ 111 µL de TEMED

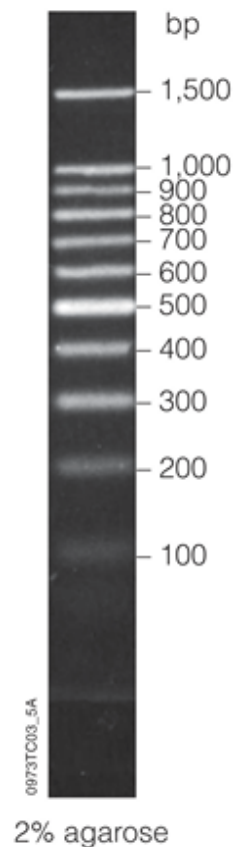
❖ **Préparation de solution NAOH :**

Le rinçage des plaques avec NAOH permet d'éviter la fixation du gel sur la plaque. (40g de poudre NAOH+ 1L d'eau ultra pure)

ANNEXE 2 : Les marqueurs de taille utilisés



Marqueur de taille lambda
DN A/ECori+HINDIII Cat.



Marqueur de taille Bench TOP
100bp DNA LadderGAT.