



UNIVERSITE SIDI MOHAMED BEN ABDELLAH
FACULTE DES SCIENCES ET TECHNIQUES DE FES

Projet de Fin d'Études

Licence Sciences & Techniques

Biotechnologie et Valorisation des Phyto-Ressources

Titre

**Analyse de la ségrégation d'une population haploïde
double chez l'orge en utilisant les microsatellites**

Présenté par : JANATI IDRISSEI Walid

Encadré par :

- Encadrant interne : Pr HAGGOUD Abdellatif
- Encadrant externe : Pr SRIPADA Udupa
Pr IRAQI Driss

Soutenu le : 08/06/2017

Devant le jury composé de :

- Pr HAGGOUD Abdellatif
- Pr SQALLI Hakima
- Pr SRIPADA Udupa
- Pr IRAQI Driss

Année universitaire
2016/2017

Remerciement

Je remercie tout d'abord dieu tout puissant de m'avoir donné la force et la connaissance pour accomplir une action qui lui plaise.

Dans le cadre de ce mémoire, je tiens à remercier, profondément, mes encadrants de stage « **M^r HAGGOUD. A** » et « **M^r IRAQI. D** » pour la qualité d'encadrement, la rigueur scientifique et le soutien affectif dont j'ai bénéficié tout au long de la période d'élaboration de ce mémoire.

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

Je tiens à exprimer toute ma gratitude aux membres de jury :

Mr S. Udupa qui a eu la gentillesse d'accepter mon invitation à juger ce travail ;

Mr A. HAGGOUD pour son aide précieux et les encouragements appréciés ;

Mme H. SQALLI pour ses efforts en début d'année qui mon beaucoup aidé lors de mon stage de PFE.

Mes sincères remerciements s'adressent aussi à l'ensemble des enseignants de département de biologie pour la qualité de formation et d'encadrement dont nous avons bénéficiés tout au long de nos études.

À tous ceux et à toutes celles dont les acronymes n'apparaissent pas sur cette page, ils sont nombreux, qu'ils demeurent convaincus, que nous ne les avons point oubliés et qu'ils soient assurés de notre profonde gratitude.

Merci.

Dédicace

À Allah la miséricorde divine, le tout puissant de m'avoir donné la volonté et la capacité de présenter ce travail et à son prophète Mohamed (PSL) ;

Pour l'âme pure de mon père que son âme repose en paix ;

À ma très chère mère, dont aucun mot n'est assez fort et suffisant pour exprimer l'amour que je lui voue, c'est à elle que je dois tout et qui sera toujours pour moi, un exemple de réussite et de courage, je lui témoigne mon affection profonde en reconnaissance de tout ce qu'elle a fait pour moi ;

À mon cher frère Amine, pour le soutien et l'estime qu'il porte à ma modeste personne.

À toute la famille JANATI IDRISSE ;

À ma chère et adorable Zineb FASSI FIGHRI ;

À mes chers amis : Si-Mohammed, Yassine, Hatim, Ismail, Youssef....

À mes camarades de promotion avec qui j'ai partagé les moments joyeux de la réussite et à qui je souhaite un avenir radieux ;

À tous ceux qui m'ont aidé tout au long de cette période ;

À tous ceux que j'aime.

Merci beaucoup

PRESENTATION DE L'INSTITUT NATIONAL DE LA RECHERCHE AGRONOMIQUE (INRA)

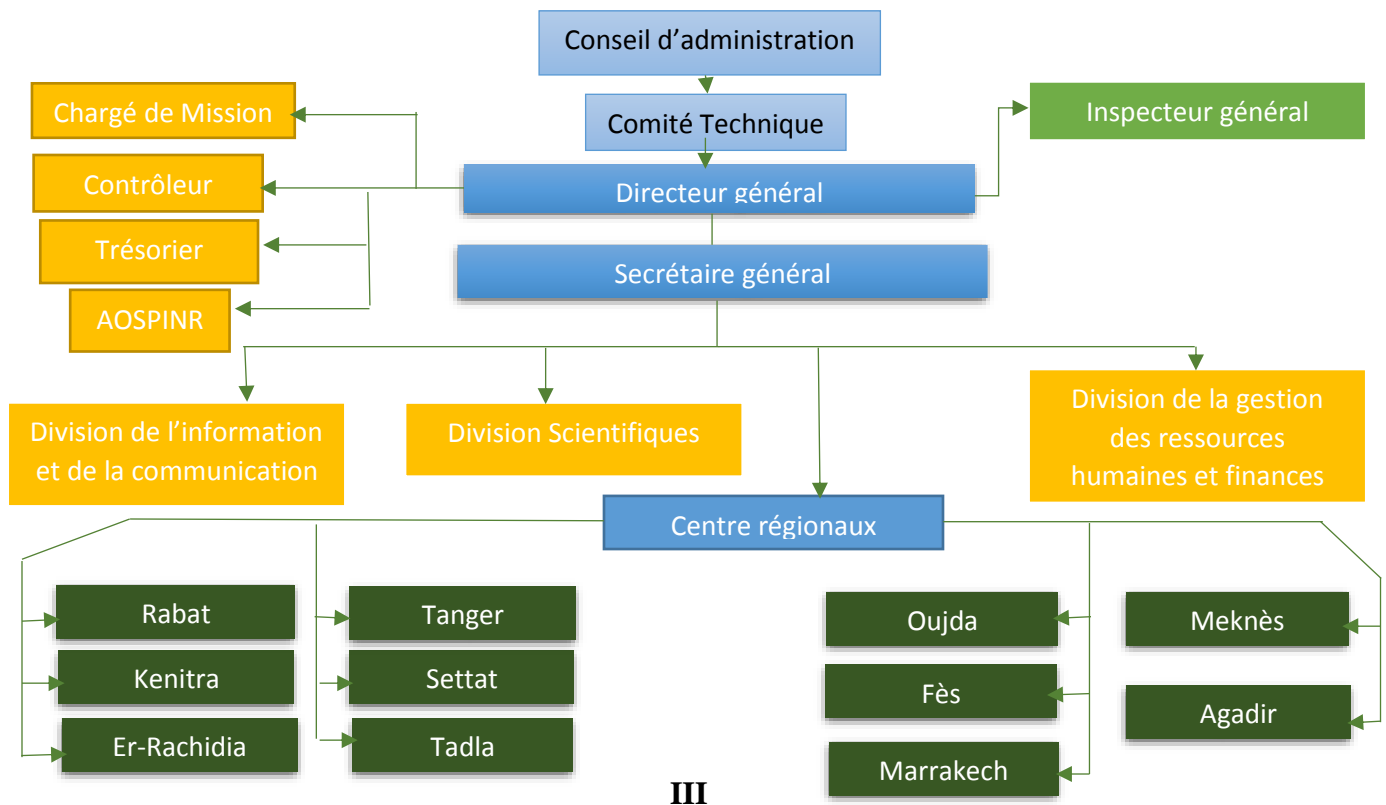
Introduction :

L'Institut National de la Recherche Agronomique (INRA) est un organisme public dont les origines remontent à 1914 avec la création de deux stations à Rabat et à Marrakech. La création officielle de l'INRA a eu lieu en 1980 dont la mission principale est d'entreprendre les recherches pour le développement agricole au Maroc. Les objectifs globaux sont :

- Améliorer la productivité, la compétitivité et la durabilité de la production agricole,
- Caractériser, préserver et valoriser les ressources naturelles,
- Améliorer la qualité, valoriser et diversifier les productions végétales et animales,
- Analyser la demande sociale et les systèmes de production.

L'INRA est constitué de trois divisions (Division de la Gestion des Ressources Humaines et Financières (DGRHF), Division Scientifique (DS) et la Division de l'Information et de Communication (DIC)), huit départements scientifiques et dix Centres Régionaux de Recherche Agronomique (CRRA) dont le Centre de Rabat où j'ai passé mon stage.

Organigramme de l'INRA :



Nouvelle organisation

La finalité de la nouvelle organisation est de doter l'institution d'une :

- Planification stratégique adéquate pour renforcer les capacités prospectives d'adaptation, de réaction et d'anticipation de la demande sociale et recherche agronomique ;
- Politique de proximité en se basant sur la régionalisation et la déconcentration de la recherche ;
- Système intégré de suivi, d'évaluation et de contrôle ;
- Gestion intégrée et rationnelle des ressources ;
- Politique de valorisation de ses produits ;
- Politique cohérente d'information et de coopération.

Unité de la biotechnologie

Généralement focalisée sur :

- Sélection assistée et recherche de gènes d'intérêts pour l'amélioration des céréales pour la tolérance à la sécheresse, maladies et insectes ;
- Étude et valorisation des ressources génétiques chez les céréales et autres ;
- Recensement génétique et moléculaire des pathogènes, insectes et bactérie – levure chez les céréales, arbres fruits et autres.

RESUME

Ce stage, s'inscrit dans le cadre de la réalisation d'un projet de fin d'études pour l'obtention du diplôme de licence « biotechnologie et valorisation des phyto-ressources » est réalisé au sein du laboratoire de biotechnologie à l'Institut National de la Recherche Agronomique de Rabat (INRA), sous le thème « *Analyse de la ségrégation d'une population haploïde double chez l'orge en utilisant les microsatellites* ».

Le projet se base sur l'analyse des profils génétiques reposant sur l'identification de segments d'ADN « marqueurs génétiques ». Ces derniers sont des microsatellites représentés par un motif d'ADN court, le plus souvent de 1 à 4 nucléotides et se répétant un certain nombre de fois au sein du génome.

Pour réaliser ce travail, plusieurs techniques sont réalisées : La *lyophilisation* et le *broyage* des échantillons, l'*extraction* de l'ADN, *amplification par la technique PCR* (polymérase chaîne réaction) en utilisant plusieurs types d'amorces pour chaque échantillon, le *marquage moléculaire*, l'*électrophorèse* sur gel d'agarose et sur gel d'acrylamide.

Les résultats obtenus ont montré la présence d'une ségrégation normale ainsi qu'une distorsion génétique des allèles.

Mots clés : Orge, haploïde double, marqueurs moléculaires, SSR, distorsion génétique.

I. Table des matières

LISTES DE TABLEAUX.....	VII
LISTES DE FIGURES	VII
LISTES DES ABREVIATIONS.....	VIII
I. Introduction :	1
II. Revue Bibliographique :	2
1) Systématique de l'orge :.....	2
2) Historique :.....	2
3) Variétés de l'orge :.....	2
4) Description générale de l'orge :.....	3
5) Intérêt économique de l'orge : mondial et national :.....	6
6) Interaction biotypes des maladies cryptogamiques attaquant l'orge :.....	7
7) Orge et santé :.....	7
8) Obtention des haploïdes doubles et la distorsion génétique :.....	7
III. Analyses de la ségrégation d'une population en utilisant les marqueurs moléculaires :	9
1) Définition d'un marqueur moléculaire :.....	9
2) Caractéristique des marqueurs moléculaires :.....	9
3) Marqueur utilisé pour l'analyse de la ségrégation de l'orge :.....	9
IV. Matériel et méthodes :	12
1) Matériel végétal : (récolte, lyophilisateur,).....	12
2) Extraction d'ADN à partir des feuilles lyophilisées :.....	12
3) Test de qualité d'ADN :.....	13
4) Technique de la PCR :.....	13
5) Électrophorèse sur gel d'acrylamide :.....	15
6) Test khi deux	14
V. Résultats et discussion :	16
1) Test qualité :.....	16
2) Amplification d'ADN par PCR :.....	17
CONCLUSION :.....	23
REFERENCE BIBLIOGRAPHIQUE : :.....	23
ANNEXES :	24

LISTES DE TABLEAUX

Tableau 1 : Classification de l'orge.....	2
Tableau 2 : Liste des variétés d'orge nouvellement commercialisées au Maroc.	3
Tableau 3 : Classement des 48 échantillons dans une plaque avec leur numéraux et nom de variétés.	11
Tableau 4 : Différents composants du Master mix ainsi que leurs volumes nécessaires.	14
Tableau 5: Les amorces utilisées et leurs séquences.	13
Tableau 6 : Nombre de génotype observé et théorique.	19

LISTES DE FIGURES

Figure 1 : description botanique de l'orge.....	4
Figure 2 : les étapes de la croissance d'une plante d'orge.....	5
Figure 1 : Evolution de la production mondiale d'orge.....	6
Figure 2 : Maladies de L'helminthosporiose et La ramulariose sur feuille d'orge.....	7
Figure 3: Electrophorèse sur gel d'agarose des échantillons 1 à 19.....	14
Figure 4 : Electrophorèse sur gel d'agarose des échantillons 20 à 39.....	15
Figure 5 : Electrophorèse sur gel d'agarose des échantillons 40 à 48.....	15

LISTES DES ABREVIATIONS

ADN : Acide **D**esoxyribo**N**ucleique

AFLP: Amplified **F**ragment **L**ength**P**olymorphism

APS: Ammonium **P**er**S**ulfate

BET: Bromure d'**E**thidium

CTAB: Cetyl Trimethyl Ammonium **B**romide

dNTP: 2'-**D**esoxyribo**N**ucleoside 5'-**T**riphosphate

EDTA: Ethylene **D**iamine **T**etraacetic **A**cid

ICARDA: International **C**enter for **A**gricultural **R**esearch in the **D**ry **A**reas

INRA : Institut National de la **R**echerche **A**gronomique

Pb : Paires de **B**ases

PCR : Polymerisation **C**hain **R**eaction

RAPD: Random **A**mplified **P**olymorphic**D**N

RFLP: Restriction **F**ragment **L**ength **P**olymorphism

SSR: Simple **S**equences **R**epeat

TBE: tampon **T**ris-**B**orate-**E**DTA

TEMED: Tetra**M**ethyl-**E**thylene-**D**iamine

TRIS : Trishydroxymethylaminomethane

µl : Micro **L**itre

UV : Ultraviolet



I. Introduction :

L'Orge est le nom commun des plantes du genre *Hordeum*, de la famille des GRAMINÉES. Il existe plusieurs espèces d'orge sauvages et cultivées. Étant donné que toutes les variétés cultivées des espèces sauvages sont capables de pollinisation croisée, on suppose qu'elles appartiennent à l'espèce *Hordeum vulgare*.

L'orge, qui s'accommode sur une grande variété de sols et de climats, est cultivée dans plusieurs régions du monde. Elle est, d'ailleurs, l'une des premières céréales à l'être. Quoique l'on ne connaisse pas son lieu d'origine, l'orge est récoltée depuis des milliers d'années au Proche-Orient, en Extrême-Orient et dans le Nord et le Centre-Est de l'Afrique. Il constitue l'une des céréales les plus cultivées au monde car il occupe le quatrième rang en matière de production céréalières après le riz, le maïs et le blé avec une production de 137 Millions selon FAO STAT (2014). L'orge est une espèce autogame, diploïde ($2n = 14$). La fécondation a lieu lorsque les anthères émettent du pollen en grande quantité dans leurs fleurs d'origine, tout cela quand l'épi est encore fermé. Il y a deux types de morphologies de l'orge ; lorsque les épillets latéraux (3+3) sont bien développés on a l'orge à 6 rangs et quand les épillets latéraux sont réduits en vestiges on a l'orge à 2 rangs.

L'objectif de cette étude était de déterminer si la méthode doubles haploïdes basées sur la culture in vitro des anthères, peut causer une perte de génotypes d'allèle désirable ou ce qu'on appelle distorsion génétique. Les plantes haploïdes doublées dérivées de cette méthode ont été analysées avec les marqueurs microsatellites afin d'étudier leur ségrégation génétique.



II. Revue Bibliographique :

1) Systématique de l'orge :

Tableau 1 : classification de l'orge. (1)

REGNE	<u>Plantea</u>
DIVISION	<u>Magnoliophyta</u>
CLASSE	<u>Liliopsida</u>
ORDRE	<u>Cyperales</u>
FAMILLE	<u>Poaceae</u>
SOUS-FAMILLE	<u>Pooideae</u>
GENRE	<u>Hordeum</u>

2) Historique :

<L'orge cultivée actuellement a probablement résulté de la domestication de l'espèce sauvage à deux-rangs, *Hordeum vulgare spontaneum*, en Mésopotamie, il y a 35.000-40.000 années. L'une des caractéristiques des espèces sauvages est la fragilité du rachis qui est un critère important pour préserver l'espèce. Les premières domestications ont probablement concerné la recherche des types à rachis plus solide pour une meilleure adaptation à la récolte. La culture de l'orge a apparemment été pratiquée en Égypte il y a 18.000 ans. L'orge à six-rangs a été cultivée aux environs de 6000 AC. Durant l'Age de la pierre, l'orge s'est répandu en Inde, Europe et Afrique du Nord. (1)

3) Variétés de l'orge :

Les variétés d'orge ont chacune leurs caractéristiques propres les prédisposant plus spécialement à être cultivées dans telle ou telle région et d'être sensibles ou résistantes aux différentes maladies.

Tableau 2 : Liste des variétés d'orge nouvellement commercialisées au Maroc. (3)

VARIÉTÉ	ZONE D'ADAPTATION	POIDS DE 1000 GRAINS (G)	PRÉCOCITÉ	PRODUCTION DE PAILLE	TOLÉRANCE AUX MALADIES & À LA CÉCIDOMYIE
TAMELLALT (2RANGS)	Bour	35-37	Précoce	Moyenne	Tolérante à la rouille brune, à l'oïdium, et tolérante à l'helminthosporiose.
AZILAL (2RANGS)	Bour	35-37	Très précoce	Moyenne	Tolérante à la rouille et à l'oïdium
MASSINE (6RANGS)	Bour favorable et irrigué	38-40	Semi précoce	Importante	Moyennement résistante à la rouille



OUSSAMA (6RANGS)	Bour	35-37	Semi précoce	Importante	et tolérante à la cécidomyie. Moyennement résistante à la rouille jaune et à l'oïdium
AMIRA (6RANGS)	Bour	37-39	Semi précoce	Importante	Moyennement résistante à la rouille brune et à l'oïdium, et résistante à la cécidomyie.
HISPANIC	Bour	37-39	Semi précoce	Faible Moyenne	à Moyennement sensible à la rouille et à l'oïdium.

Selon les variétés, l'orge peut être semée en hiver ou au printemps :

Les orges de printemps sont sensibles au gel et ont un cycle végétatif plus court. Elles se sèment en février-mars. La récolte s'effectue en été.

Les orges d'hiver se sèment fin septembre - début octobre. Après avoir passées l'hiver sous terre, elles sont récoltées juste avant les orges de printemps. Elles peuvent supporter des températures allant jusqu'à -15°C. Il existe deux types d'orges d'hiver :

- *Hordeum vulgare distichum* celles à épis plats à 2 rangs de graines.
- *Hordeum vulgare hexastichum* celles à épis cylindriques à 6 rangs de graines. (2)

4) Description générale de l'orge :

a) **DESCRIPTION BOTANIQUE :**

➤ **Partie végétative :**

La partie végétative comme celle des autres céréales est composée des tiges cylindriques, creuses entre les nœuds, contenant 5 à 7 nœuds, et de feuilles attachées à chaque nœud. La feuille est souvent couverte de cire qui donne l'aspect blanchâtre. Certaines variétés ne produisent pas de cire, leurs feuilles sont donc brillantes. La feuille est composée d'une gaine qui entoure la tige, d'un limbe qui flotte librement, et d'un collet qui relie les deux. Aux extrémités du collet se trouvent deux oreillettes qui embrassent la tige. Entre les deux oreillettes, une petite membrane, ligule est attachée au collet. **(3)**

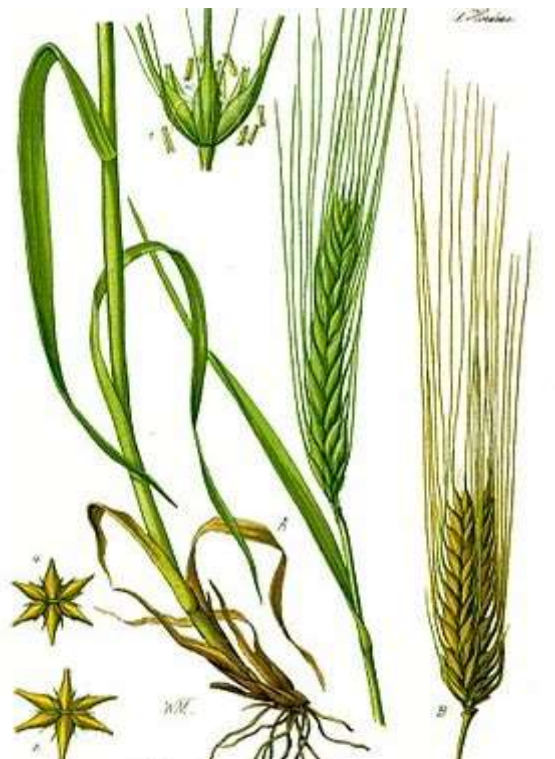
➤ **Partie reproductive :**

L'inflorescence est un épi qui contient trois épillets à chaque nœud du rachis. Le rachis est l'axe qui contient les épillets. Chaque épillet contient une seule flore. L'orge à six rangs aux trois

flores fertiles, l'orge à deux rangs n'a que la flore centrale qui est fertile. Chaque flore est soutenue par une paire de glumes minces lancéolées portant une barbe fine. La graine est un caryopse entouré de deux enveloppes, l'Emma et palea. La partie externe, l'Emma a généralement à son extrémité une barbe, un capuchon, ou une pointe arrondie ou pointue. Les deux enveloppes, l'Emma et palea, adhèrent à la graine. Au battage elles se détachent de la graine dans le cas des orges nus. Les barbes peuvent être rugueuses ou lisses selon les variétés. Les barbes lisses le sont généralement à la base et deviennent rugueuses à l'extrémité. Les capuchons ressemblent à une fourchette à trois dents. **(3)**

➤ **Graine :**

La graine peut être de couleur blanche, noire, rouge, violette, ou bleue, selon la concentration en pigments anthocyanine. La coloration bleue résulte de la présence d'anthocyanine dans les grains d'Aleurone. La présence d'anthocyanine dans le péricarpe donne la coloration rouge. La présence du pigment dans les deux tissus produit la coloration violette, visible dans les orges nues. La coloration noire est due à une substance semblable à la mélanine. **(3)**



[Figure 1 : description botanique de l'orge](#)

b) CROISSANCE ET DEVELOPPEMENT :

➤ Germination :

La graine contient un embryon qui n'est autre qu'une plantule miniaturisée avec sa petite racine (radicule), tige (plumule) et feuilles. La germination se produit à la suite d'une imbibition suivie d'une activité enzymatique et de division cellulaire. Sur le plan pratique il y a germination quand les différentes structures de l'embryon se développent en produisant une plantule normale. Une plantule a au moins deux racines séminales, une plumule et une feuille sortante de la coléoptile. Au champ on considère qu'il y a germination lorsque la plantule émerge à la surface du sol. La racine principale et les deux racines séminales s'allongent et émergent du coléorrhize. La plumule s'allonge ensuite suivie de nouvelles racines. **(3)**

➤ Croissance de la plantule :

L'apparition de la première feuille annonce le début du stade végétatif. Durant ce stade des structures latérales de l'apex sont régulièrement initiées et se développent en organes, le nœud, le bourgeon latéral, l'entre-nœud, et la feuille attachée autour du nœud. Le bourgeon latéral forme un autre apex qui va à son tour émettre des bourgeons, des feuilles, des nœuds et des entre-nœuds. L'ensemble de ces organes forme une talle. Les protéines de structure sont d'abord synthétisées par la plantule à partir des réserves dans l'endosperme de la graine durant la première semaine puis à partir de l'azote prélevé du milieu par les racines. **(3)**

➤ Plante adulte/Inflorescence :

L'induction de la floraison est dépendante de la température et de photopériode à des degrés variés selon le génotype. La formation des parties florales, glumes et l'Emma de chaque épillet est similaire à la formation des organes foliaires. La fleur provient des bourgeons latéraux situés à la base des lemmas. **(3)**

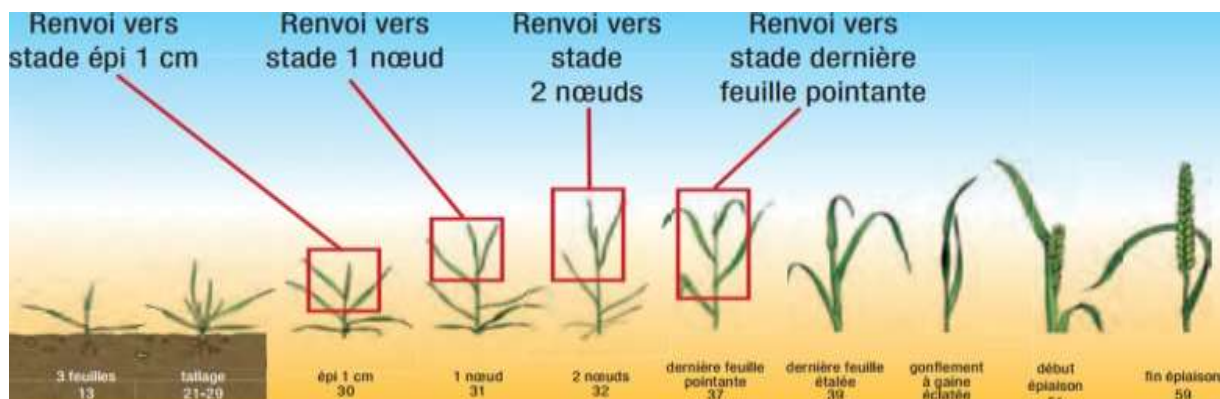


Figure 2 : les étapes de la croissance d'une plante d'orge

5) Intérêt économique de l'orge : mondial et national :

a) **IMPORTANCE MONDIALE :**

L'orge est cultivée principalement dans deux régions du globe : l'une dans l'hémisphère Nord comprenant l'Europe (France, Allemagne, Ukraine...), les Etats-Unis, le Canada et l'autre dans l'hémisphère Sud avec l'Australie, la Nouvelle-Zélande, l'Argentine et l'Afrique du Sud. 140 millions de tonnes d'orge ont été produits par an en moyenne dans le monde au cours de la période 2003-2007(4). Contrairement au blé et surtout au maïs dont les productions ont constamment progressé au cours des 50 dernières années, l'orge a connu un développement contrarié. Les volumes de production ont constamment augmenté dans les années 1960 et 1970, grâce à la progression des surfaces (+2%/an en moyenne) et des rendements (+1.8%/an), doublant durant cette période pour avoisiner les 160 millions de tonnes. (4)

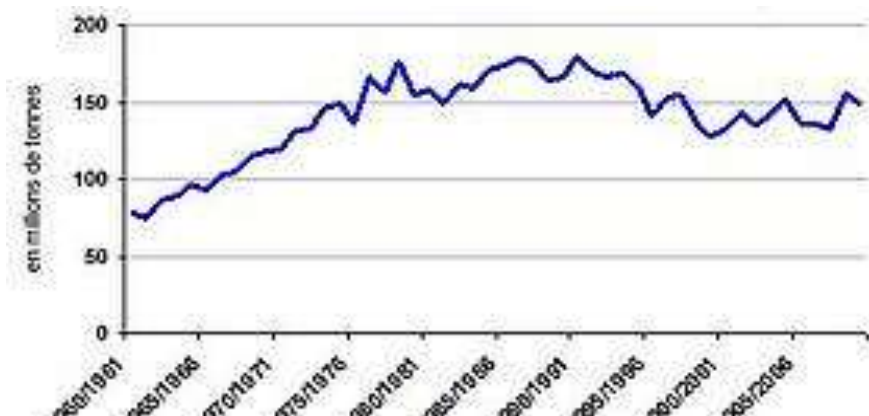


Figure 3 : Evolution de la production mondiale d'orge (4)

b) **IMPORTANCE AU MAROC :**

L'orge est cultivée au Maroc depuis l'antiquité. Elle joue un rôle capital aussi bien en alimentation humaine qu'animale. Les superficies cultivées en orge en 2003-2004 s'élevaient à 2,3 millions ha environ. (4)

L'orge est la principale céréale cultivée dans la région de Khouribga. Avec une superficie emblavée de l'ordre de 103,000 ha, elle représente 60% de la superficie de l'ensemble des céréales cultivées dans la région (4). L'orge est principalement destinée à l'alimentation du bétail sous différentes formes (en vert, grains, pailles et chaumes) et à degré moindre à l'alimentation humaine essentiellement en milieu rural. Les rendements réalisés par les agriculteurs demeurent en dessous des potentialités de cette espèce. Les causes de cette faiblesse peuvent être aussi bien techniques que socio-économiques. À l'opposé, les progrès

réalisés en matière de recherche agronomique ont permis d'améliorer la production des orges en zones semi-arides en se basant sur l'introduction de nouvelles variétés adaptées et l'amélioration des pratiques culturales. Pour faire parvenir ces résultats chez les agriculteurs, des programmes de transfert de technologies ont été élaborés en adoptant l'approche de recherche/développement participative et multidisciplinaire. (4)

6) Interaction biotypes des maladies cryptogamiques attaquant l'orge :

Les maladies entraînent des pertes de rendement et une dépréciation qualitative de la récolte, les principales maladies des orges sont :

La rhynchosporiose : *Rhynchosporiumsecalis* :

La maladie affecte l'orge, le seigle, le triticale et un certain nombre de graminées, notamment les ivraies. Il existe des formes spécialisées de l'agent pathogène, qui se cantonnent généralement aux hôtes qui leur sont propres.

L'helminthosporiose : *Pyrenophoragraminea* :

La maladie est spécifique à l'orge, elle est transmise par les semences, se manifeste par la présence de longues stries brunes sur les feuilles.

La ramulariose : *Ramulariacollo-cygni* :

La maladie affecte uniquement l'orge d'hiver et l'orge de printemps. (5)



[Figure 4 : Maladies de L'helminthosporiose et La ramulariose sur feuille d'orge](#)

7) Orge et santé :

Un grain d'orge entier est constitué de 78 % à 83 % de glucides, dont 60 % à 64 % d'amidon et un peu de sucres simples comme le glucose ou le fructose (0,4 % à 2,9 %). Il contient de 8 % à 15 % de protéines, avec un contenu toutefois limité en lysine (un acide aminé essentiel), ce qui en fait une protéine incomplète. L'orge renferme de 2 % à 3 % de lipides, dont le tiers environ est situé dans le germe. En plus de ça elle contient des antioxydants.

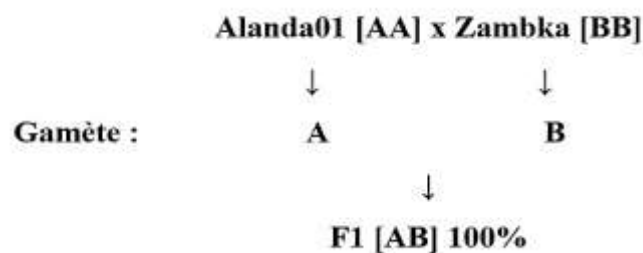


L'orge est riche en bêta-glucanes, des fibres aux propriétés santé, Cette céréale contient des tocotriénols, une forme de vitamine E particulièrement bénéfique. Ce qui fait un ragoût d'orge et de légumineuses constitue un excellent plat végétarien. **(1)**

8) Obtention des haploïdes doubles et la distorsion génétique

Dans notre étude, nous avons travaillé sur une population issue d'un croisement entre Alanda01 et Zambaka, les deux sont d'origine syrienne. Selon le schéma, décrit ci- dessous, Alanda01 a le génotype AA et Zambaka a le génotype BB.

Soit l'allèle A code pour Alanda01 et l'allèle B code pour Zambaka



La génération F1 aura comme génotype AB (50% l'allèle A et 50% l'allèle B). Les anthères des plantes F1 ont été mises en culture in vitro afin de produire des plantes haploïdes ayant soit l'allèle A soit l'allèle B. Ensuite, elles ont été traitées par la colchicine pour arrêter la division cellulaire et obtenir des plantes homozygotes AA ou BB, dite haploïdes doublées.

Dans le cas normal, on doit obtenir 50% des haploïdes doublées ayant le génotype AA, et 50% ayant le génotype BB.

La distorsion de ségrégation des allèles est décrite comme une grande force de l'évolution ; elle est causée par divers facteurs génétiques ou physiologiques qui ont des effets considérables sur l'amélioration des cultures et la cartographie des génomes. **(10)**

Une DS peut être due soit à :

- une sélection gamétique : la distorsion est la conséquence d'un déroulement anormal de la méiose. Les gamétophytes sont alors moins viables ou moins fertiles ;
- une sélection zygotique : les individus d'un groupe qui se révèlent être moins viables. La distorsion est dans ce cas généralement due à un remaniement structural chromosomique comme la translocation. **(10)**



III. Analyses de la ségrégation d'une population en utilisant les marqueurs

moléculaires :

1) Définition d'un marqueur moléculaire :

Un marqueur moléculaire est un marqueur polymorphe qui renseigne sur le génotype de l'individu qui le porte et sur les génotypes des locus voisins. Il est composé de fragments d'ADN qui servent de repères pour suivre la transmission d'un segment de chromosome d'une génération à l'autre. Ce sont donc des indicateurs neutres de variabilité génétique qui permettent d'identifier le polymorphisme entre famille, genres, espèces, variétés, populations et même entre individus. Ils sont utilisés aussi dans l'établissement d'une carte génétique ainsi la liaison avec un gène intéressant « sélection assistée par marqueur ». (7)

2) Caractéristique des marqueurs moléculaires :

Un bon marqueur doit être :

- Neutre : ses différents allèles n'ont pas d'effet sur le phénotype de l'individu ;
- Polymorphe : c'est-à-dire variable entre individus en possédant de nombreux allèles permettant de caractériser les différents individus ;
- Codominant : l'individu hétérozygote peut être distingué car il présente simultanément les caractères de ses parents homozygotes ;
- Insensible au milieu et non épistatique ;
- Multi allélique : en possédant plusieurs allèles au même locus ;
- Reproductible, économique et manipulé à grande échelle. (7)

3) Marqueur utilisé pour l'analyse de la ségrégation de l'orge :

a) RFLP : POLYMORPHISME DE LONGUEUR DE FRAGMENTS DE RESTRICTION : (restriction fragment length polymorphism)

Cette technique de marquage moléculaire est très utilisée, car elle fournit des profils peu complexes permettant de caractériser l'empreinte génétique d'une plante ou de construire une carte génétique. Marqueur utiliser couple enzyme amorce.

➤ Les étapes de la technique :

- i. Extraction de l'ADN ;
- ii. Digestion de l'ADN par une ou plusieurs enzymes de restriction, la taille des fragments obtenus est dépendante des enzymes utilisées ;
- iii. Les fragments sont ensuite séparés selon leur taille par électrophorèse ;



- iv. L'ADN est transféré par capillarité sous forme dénaturée (simple brin) sur une membrane de nylon. Cette technique de transfert permet de conserver la position relative des fragments d'ADN ;
- v. La membrane est mise en contact avec une solution contenant une sonde marquée soit par la radioactivité, soit chimiquement. Cette sonde s'hybride avec le ou les fragments d'ADN avec lesquels elle présente une homologie ;
- vi. La position de l'hybridation est révélée en plaçant la membrane au contact d'un film sensible, ou en réalisant une réaction enzymatique colorée (selon le type de sonde utilisé). (6) (7)

b) RAPD : ADN POLYMORPHE AMPLIFIÉ AU HASARD :(Random Amplified Polymorphic DNA)

Cette technique consiste à réaliser une PCR en utilisant une amorce courte d'une dizaine de nucléotides, de séquence arbitraire. Cette amorce va s'hybrider au hasard dans le génome. Si deux sites d'hybridation sont proches et sur deux brins d'ADN, il y aura amplification (A). En revanche, si ces deux sites sont trop éloignés, il ne peut y avoir amplification (B). Ainsi, on observe la présence d'une bande sur le gel pour A et l'absence pour B de cette même bande. Le polymorphisme révélé est un polymorphisme de sites d'hybridation d'amorce. Les amorces constituent donc les marqueurs. Pour l'ensemble du génome, une dizaine de fragments sont en moyenne amplifiés puis séparés par électrophorèse. **(6) (7)**

c) AFLP : POLYMORPHISME DE LONGUEUR DES FRAGMENTS D'AMPLIFICATION :(Amplification Fragment Length Polymorphism)

Cette technique est fondée sur la mise en évidence de polymorphisme de site de restriction et de polymorphisme d'hybridation d'une amorce de séquence arbitraire.

Les étapes de la technique :

- Les étapes de la technique :

L'ADN de la plante est soumis à une digestion par des enzymes de restriction. Les tailles des fragments obtenus sont dépendantes des enzymes utilisées.

Ensuite, il y a addition aux extrémités des fragments de restriction d'adaptateurs nucléotidiques spécifiques des enzymes de restriction utilisées. Ils sont de séquences connues. Les fragments sont ensuite amplifiés par PCR. On utilise comme amorce un oligonucléotide



complémentaire de la séquence de l'adaptateur, prolongé de quelques nucléotides arbitraires (de 1 à 3) appelés bases débordantes. Seuls sont amplifiés les fragments possédant les bases complémentaires de ces bases arbitraires. Il s'agit donc d'amorces sélectives permettant de réduire le nombre de fragments amplifiés à une centaine : sans ces séquences débordantes, il y aurait amplification de milliers de fragments. Les bandes sont visualisées par électrophorèse.

(6) (7)

d) SSR : LES MARQUEURS MICROSATELLITES :(Simple Sequence Repeats) :

C'est une technique qui nécessite une préparation préalable assez lourde. Il faut connaître, synthétiser et tester les amorces bordant le microsatellite. En revanche, elle est simple d'utilisation car reposant simplement sur une PCR. Elle permet de développer de nombreux marqueurs. Les **SSR** sont des séquences de di, tri, ou tétranucléotides répétées en tandem. Les plus courants sont (A)_n, (TC)_n, (TAT)_n, (GATA)_n, les valeurs de n pouvant aller de quelques unités à plusieurs dizaines. L'intérêt de ces microsatellites réside dans leur polymorphisme. Celui-ci repose sur la variation du nombre d'unités de répétition, constituant le microsatellite. C'est la paire d'amorces spécifiques des bordures droite et gauche du microsatellite qui constitue le marqueur.

➤ **Les étapes de la technique :**

C'est la technique de PCR qui est utilisée pour révéler le polymorphisme des microsatellites. Une paire d'amorces spécifiques des bordures droite et gauche d'un microsatellite est utilisée pour amplifier le même microsatellite chez différents individus.

En effet, chaque microsatellite est bordé par des séquences uniques qui lui sont propres. Les fragments d'amplification sont ensuite relevés par électrophorèse.

Un individu (B), possédant plus d'unités de répétition que (A), a un produit d'amplification qui migre plus lentement que A. **(6) (7)**



IV. Matériel et méthodes :

1) Matériel végétal : (récolte, lyophilisation)

Dans ce travail on s'est intéressé à la descendance d'orge, qui résulte du croisement entre les deux variétés *zambaka* BB et *alanda01* AA.

Après récolte des feuilles d'orge à partir de 48 plantes en plus les deux parents, les échantillons sont placés sur une plaque numérotée puis soumis à la lyophilisation pendant 48h à une pression de 0,04mBar et une température de -50° afin de faciliter le broyage.

Tableau 3 : classement des 48 échantillons dans une plaque avec leur numéros et noms de variétés.

H	G	F	E	D	C	B	A
IC1 188	IC1 160	IC1 162	IC1 164	IC1 145	IC1 147	IC1 149	IC1 151
IC1 153	IC1 155	IC1 157	IC1 159	IC1 161	IC1 163	IC1 165	IC1 166
IC1 167	IC1 168	IC1 169	IC1 170	IC1 171	IC1 219	IC1 220	IC1 221
IC1 222	IC1 223	IC1 224	IC1 225	IC1 226	IC1 227	IC1 228	IC1 229
IC1 230	IC1 231	IC1 232	IC1 233	IC1 234	IC1 235	IC1 236	IC1 237
IC1 238	IC1 239	IC1 240	IC1 241	IC1 242	IC1 244	IC1 245	IC1 246
<i>Alanda01</i>	<i>Zambaka</i>						

2) Extraction d'ADN à partir des feuilles lyophilisées :

Après broyage pendant 5min, 750µl du CTAB préalablement chauffé au bain marie à une température de 65° est ajouté, puis mélangé très bien avant de rajouter le même volume de CTAB pour une bonne lyse cellulaire. Après incubation à 65°C, 500µL de chloroforme est ajouté pour capter les molécules organiques et précipiter les pigments chlorophylliens, les protéines dénaturés, les lipides et les différents débris. Il ne reste que les acides nucléiques qui flottent. Après, les tubes sont placés en centrifugeuse pendant 15min à 13000rpm et à température ambiante. Ensuite, 1ml du surnageant est récupéré et mis dans des nouveaux tubes stériles de 2ml.

Ensuite 666µl de l'isopropanol a été ajouté afin de précipiter l'ADN, puis les tubes sont incubés pendant 45min à la température ambiante. Après centrifugation pendant 10min à 4°C le culot est récupéré. à ce moment l'addition de l'éthanol 70% est obligatoire pour lavée le culot de l'ADN et éliminer l'isopropanol qui reste, suivit d'une centrifugation de 5min à 13000rpm et 4°C pour récupérer l'ADN propre.



En fin les tubes doivent être sécher à une température ambiante pour dissoudre l'ADN dans 100µl de l'eau ultrapure. Par la suite l'ADN est conservé à 4°C pour ne pas se dénaturer.

3) Test de qualité d'ADN :

L'électrophorèse sur gel d'agarose a pour but de vérifier la présence d'ADN, d'estimer sa qualité et sa quantité.

Préparation du Gel d'agarose et dépôt des échantillons :

3,6g d'agarose est ajouté à un volume de 300ml du tampon TBE5x gel à 1,2 % (la proportion d'agarose dépend de la taille des molécules d'ADN à séparer). Le mélange est porté à ébullition dans un micro-ondes en surveillant pour éviter les projections et en agitant de temps à autre pour homogénéiser le mélange. Puis refroidi jusqu'à une température de 65°C et versé dans un moule, après solidification du gel, le moule est déposé dans l'appareil remplie de TBE1x. puis le peigne et les joints sont enlevés, le gel est prêt pour le dépôt des échantillons.

Ensuite, les puits sont remplis de solution composée de 3µl d'ADN plus 3µl de bleu d'agarose et 4µl d'eau distillée, en faisant attention de ne pas déchirer le fond du gel avec la pointe de la pipette (le 1^{er} puits est réservé au marqueur de taille lambda). Le support avec le gel chargé étant placé dans la cuve d'électrophorèse en veillant que les puits soient du côté de la cathode.

Après migration, le gel est immergé pendant 20 min dans du BET puis rincé avec l'eau distillée pendant 10min, les résultats sont visualisés par rayonnement UV.

4) Technique de la PCR :

La PCR (polymérase chaine réaction) est une technique d'amplification d'ADN in vitro. Elle permet d'obtenir un très grand nombre de copie d'une séquence d'ADN choisie par une succession de réaction de réplification d'une matrice double brin d'ADN.

Chaque cycle de PCR est constitué de trois étapes : une **dénaturation** de l'ADN par chauffage pour séparer les deux brins qui le composent, une **hybridation** des amorces aux extrémités de la séquence recherche, puis une **élongation** grâce à une **ADN polymérase**. Ce cycle est répété un grand nombre de fois pour obtenir une amplification exceptionnelle de séquence de l'ADN cible.

➤ Les étapes de la technique :

Afin de réaliser une PCR il faut commencer tout d'abord de déposer 2µl d'ADN dans une plaque de PCR, puis la préparation d'une solution appelée Master Mix dans un tube de 1,5ml qui contient de l'eau ultra pure, bufferx5 (tampon PCR), dNTP, amorce et taqpolymérase. Après une centrifugation de 10s, 8µl de la solution Master mix est ajoutée à l'ADN mise en plaque pour avoir un volume total de 10µl (il faut bien mixer le mélange).

Après avoir réglé la machine de PCR sur le système convenable il est temps de mettre la plaque PCR.

Tableau 4 : différent composant du Master mix ainsi leurs volumes nécessaires.

COMPOSANT DU MASTER MIX DE PCR	VOLUME POUR UNE REACTION (µL)	VOLUME POUR 51 REACTIONS (µL)
EAU ULTRA PURE	3,975	206,7
BUFFER X5	2	104
DNTP (2Mm)	1	52
AMORCE (10pmol/µL)	1	52
TAQ POLYMERASE (5U/µL)	0,025	1,3

Le système de PCR choisie est nommé Barly SSR, qui comprend une dénaturation initiale à 94°, puis 30 cycles composé chacun par une dénaturation à 94°, une hybridation à 59° et une élongation à 72°, ensuite pour terminer une élongation finale à 72°.

➤ Les amorces testées :

Tableau 5: les amorces utilisées et leurs séquences. (8)

NOM D'AMORCE	SEQUENCE	SSR TAILLE	ESPECE SOURCE	CHROMOSOME
BMAC0156	AACCGAATGTATTCCTCTGTA GCCAAACA ACTATCGTGTAC	139	<i>Hordeumvulgare</i>	7H
BMAG0120	ATTCATCCCAAAGGAGAC GTCACATAGACAGTTGTCTTCC	230	<i>Hordeumvulgare</i>	7H
BMAC0209	CTAGCAACTTCCCAACCGAC ATGCCTGTGTGTGGACCAT	176	<i>Hordeumvulgare</i>	3H
BMAC0134	CCAAGTGGAGTCGATCTCG CTTCGTTGCTTCTCTACCTT	148	<i>Hordeumvulgare</i>	2H



5) Électrophorèse sur gel d'acrylamide :

L'électrophorèse nous aide à révéler les bandes d'ADN et de savoir si la PCR a eu lieu ou non. Le gel est composé de poudre d'acrylamide et de bis acrylamide en plus de TEMED et d'APS 20%.

➤ Préparation de gel d'acrylamide 8% et dépôt des échantillons :

Dans une burette de 100ml, un volume de 20ml d'acrylamide 40% est mélangé avec 20ml de TBE 5x et complété avec de l'eau distillée jusqu'à 100ml. Chaque volume de 30ml est mélangé avec 15 μ l de TEMED et 75 μ l d'APS 20% afin de polymériser et solidifier le gel.

Avant de commencer à déposer, 5 μ l du bleu d'acrylamide est ajouté au produit amplifié par PCR, puis déposé 7 μ l dans chaque puits de gel sauf les trois premiers qui sont réservés au marqueur de taille de 100pb et les deux parents Alanda01 AA, Zambaka BB. Ensuite le voltage est réglé sur 260V, pendant 1h30 environ. Après migration, le gel est récupéré et mis en contact avec le BET pour avoir une coloration dans le but de visualiser les bandes d'ADN après exposition aux UV.

6) Test khi deux :

Le test du X² (prononcez khi deux ou khi carré) est un test d'hypothèse qui compare la loi de distribution observée de vos données à une loi attendue.

C'est le calcul de $Q = \sum \frac{(oi - ei)^2}{ei}$

La statistique Q donne une mesure de l'écart existant entre les effectifs théoriques attendus et ceux observés dans l'échantillon. En effet, plus Q sera grand, plus le désaccord sera important. La coïncidence sera parfaite si Q=0.

V. Résultats et discussion :

A- Résultats :

1) Test qualité :

Le résultat du test montre des bandes d'ADN de 48 échantillons bien claires pour les échantillons analysés. On peut estimer que l'ADN extrait a une qualité très satisfaisante et peut être utilisé pour l'analyse par PCR.

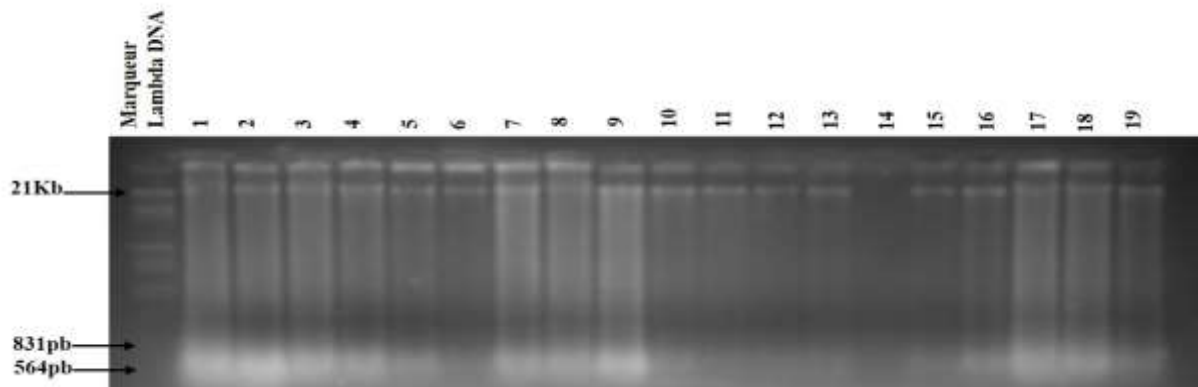


Figure 5: Electrophorèse sur gel d'agarose des échantillons 1 à 19

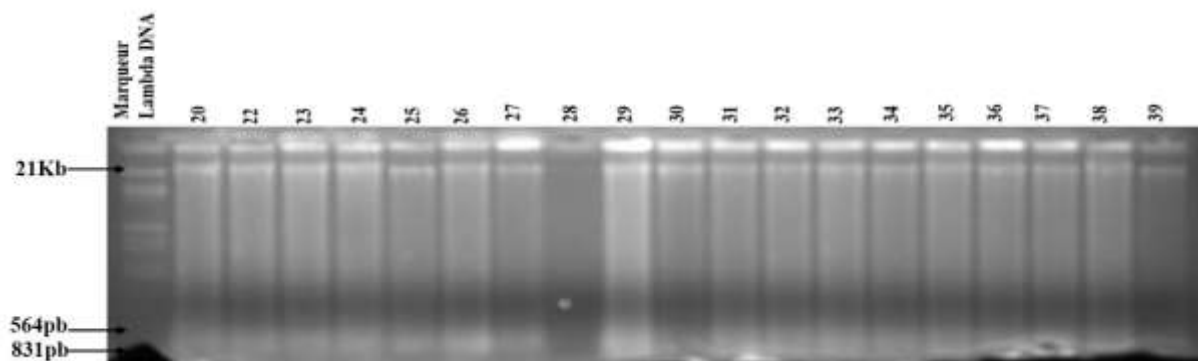


Figure 6 : Electrophorèse sur gel d'agarose des échantillons 20 à 39.

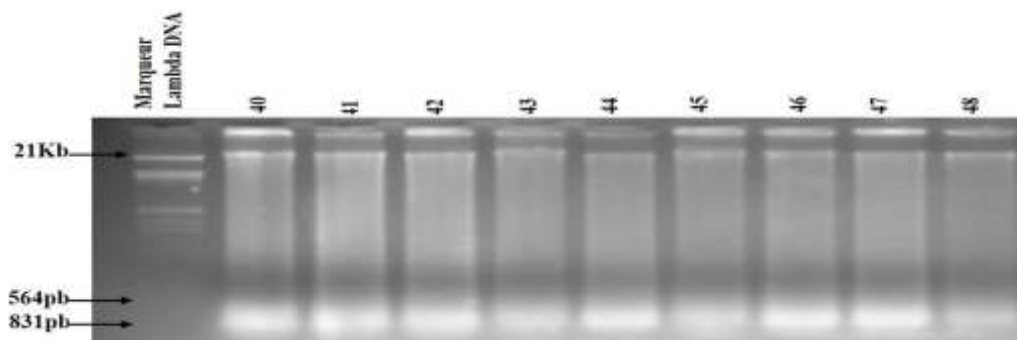


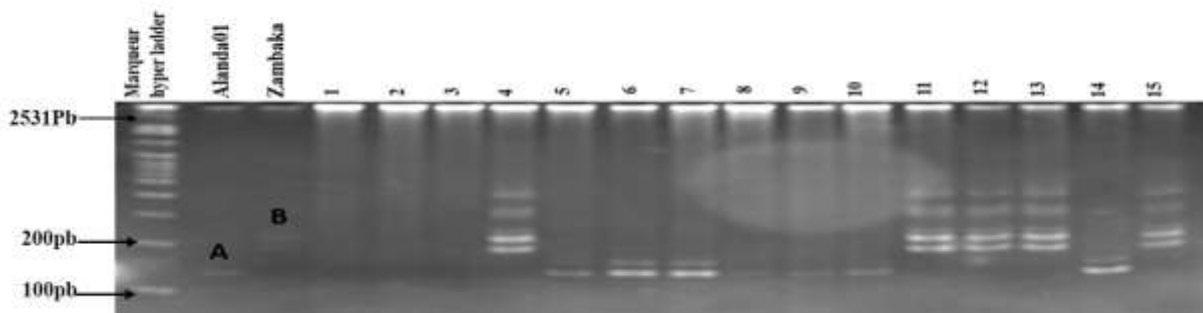
Figure 7 : Electrophorèse sur gel d'agarose des échantillons 40 à 48

2) Amplification d'ADN par PCR :

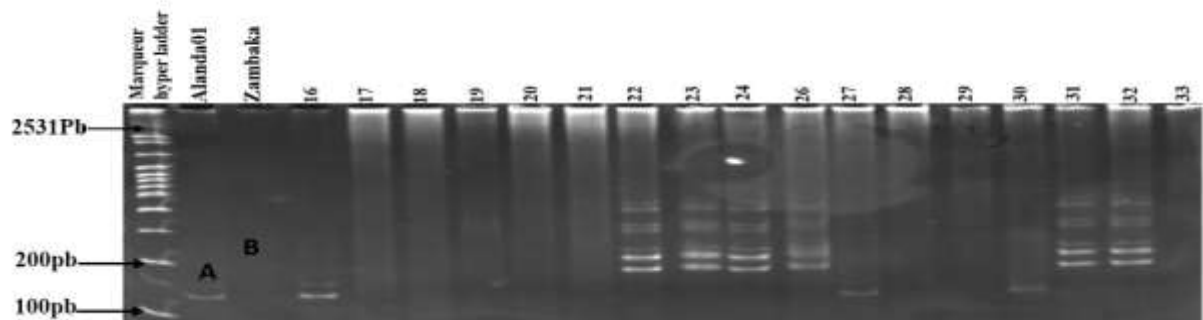
Pendant nos études, on s'est intéressé à l'utilisation des marqueurs moléculaires afin d'analyser la ségrégation d'une population d'orge bien définie, pour cela on a utilisé 4 amorces SSR. Les résultats obtenus sont représentés ci- dessous :

Chaque résultat est représenté par deux allèles : l'allèle A code pour Alanda01 et l'allèle B code pour Zambaka

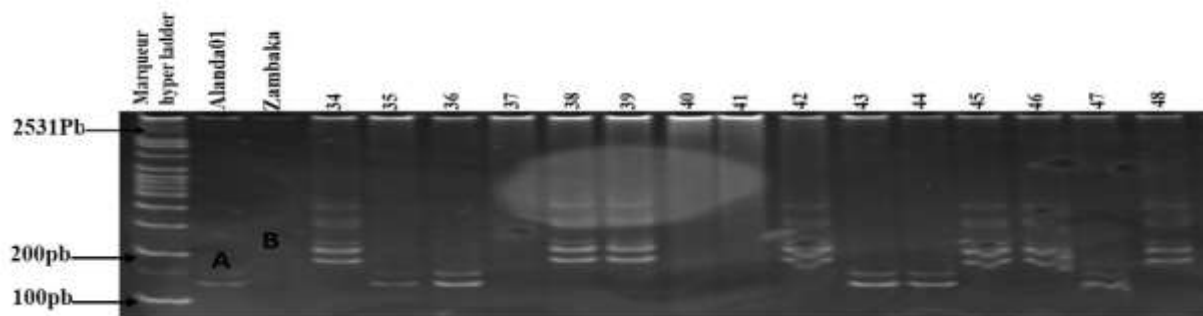
Amorce Bmac0156:



(a)



(b)

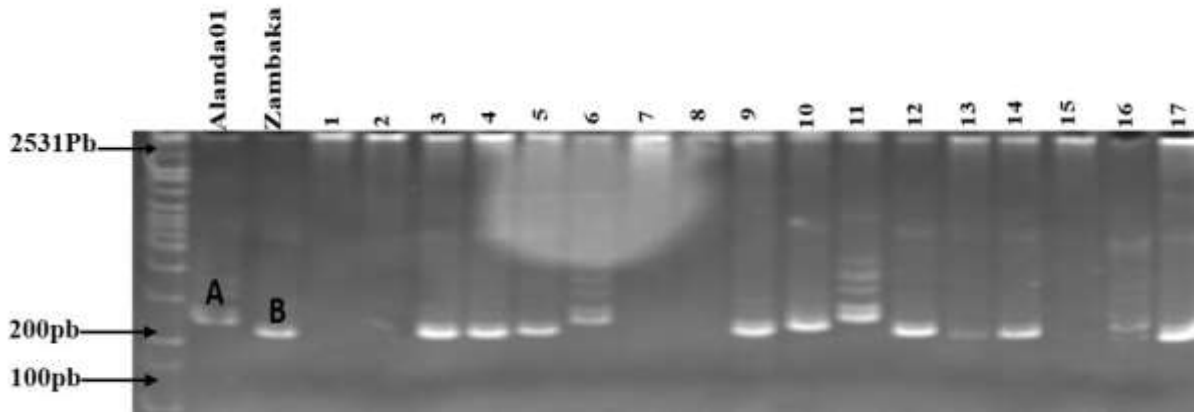


(c)

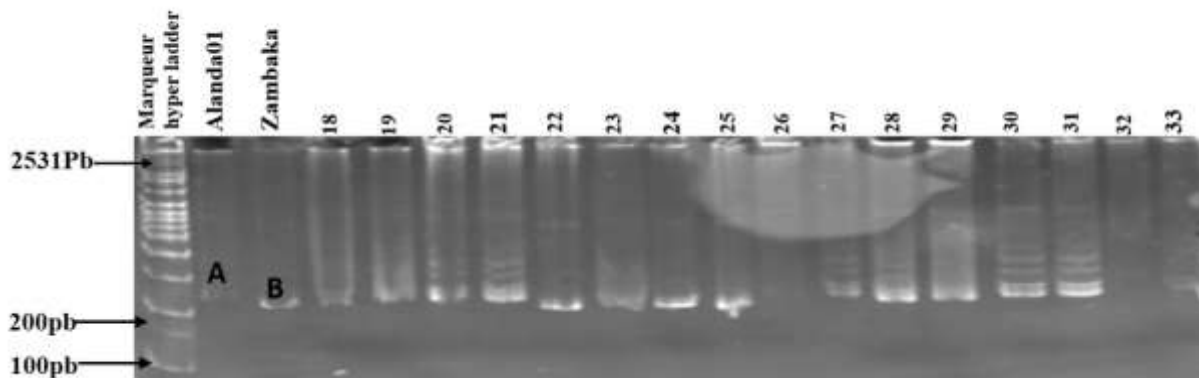
Fig.8. Analyse par électrophorèse sur gel d'acrylamide des produits d'amplification par l'amorce Bmac0156. (a) échantillons 1 à 15 ; (b) échantillons 16 à 33 ; (c) échantillons 34 à 48.

Pour l'amorce Bmac0156, on trouve qu'il y a 17 échantillons possèdent l'allèle A, et 18 échantillons possèdent l'allèle B. En revanche pour 13 échantillons aucune bande visible n'a été obtenue.

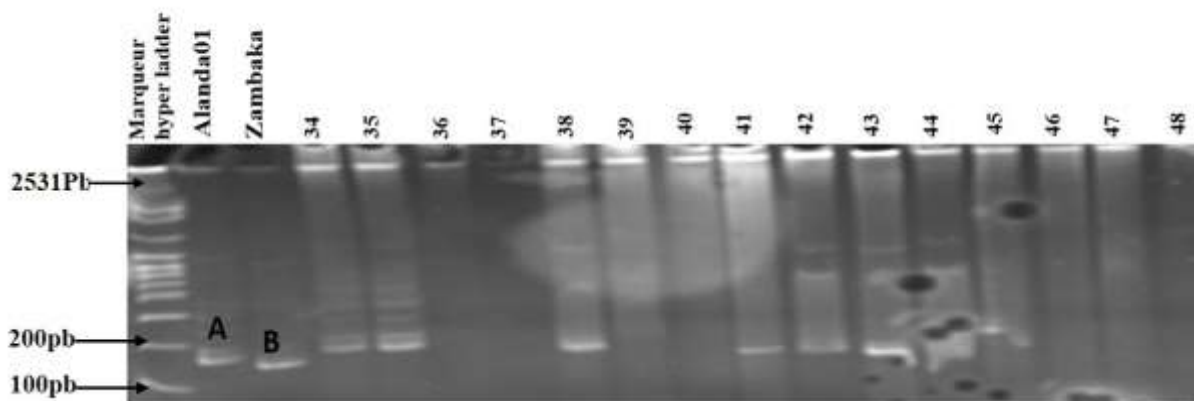
Amorce Bmag0120 :



(a)



(b)

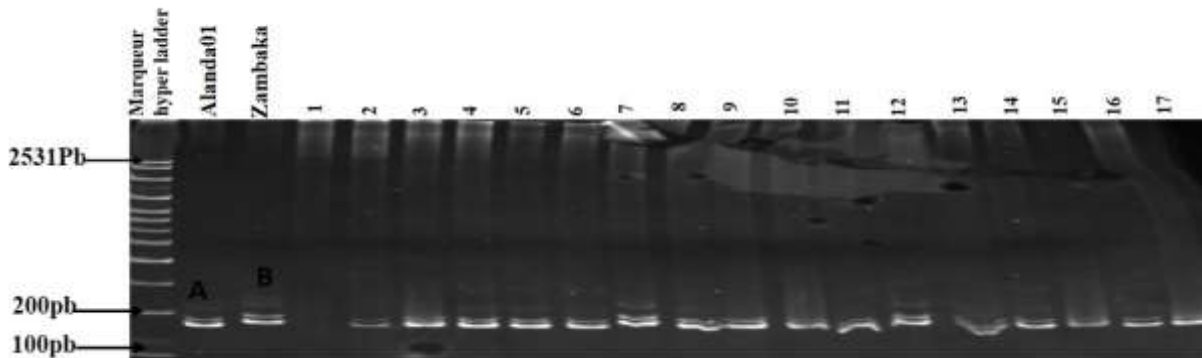


(c)

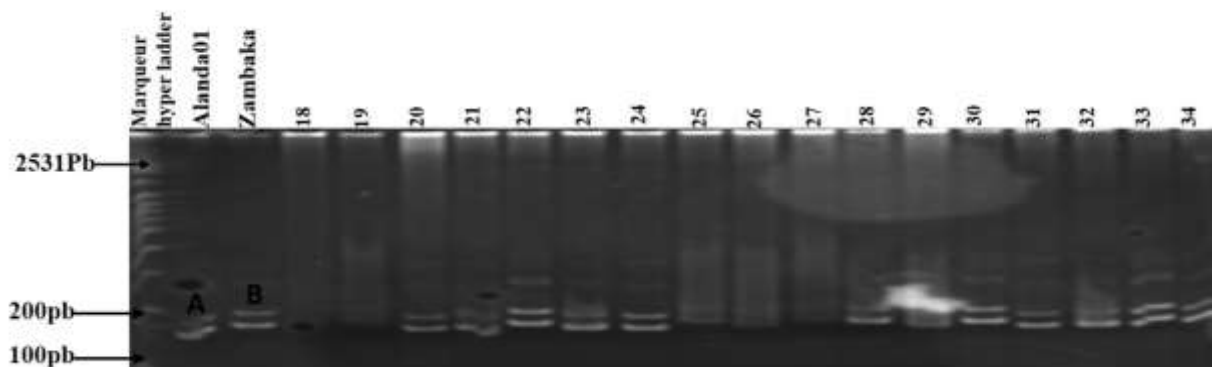
Fig.9. Analyse par électrophorèse sur gel d'acrylamide des produits d'amplification par l'amorce Bmac0120. (a) échantillons 1 à 17 ; (b) échantillons 18 à 33 ; (c) échantillons 34 à 48.

Pour l'amorce Bmac0120, on trouve qu'il y a 16 échantillons possèdent l'allèle A, et 19 échantillons possèdent l'allèle B. En revanche pour 13 échantillons aucune bande visible n'a été obtenue.

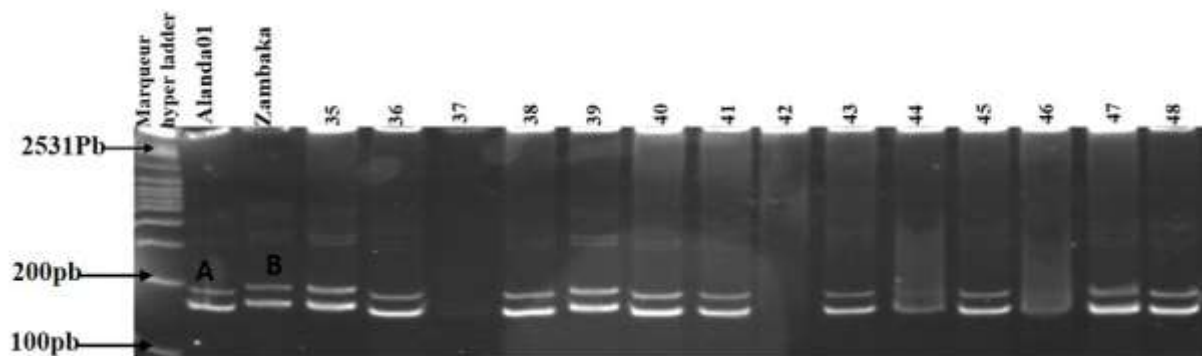
Amorce Bmac209:



(a)



(b)



(c)

Fig.10. Analyse par électrophorèse sur gel d'acrylamide des produits d'amplification par l'amorce Bmac0209. (a) échantillons 1 à 17 ; (b) échantillons 18 à 34 ; (c) échantillons 35 à 48.

Pour l'amorce Bmac0209, on trouve qu'il y a 31 échantillons possèdent l'allèle A, et 14 échantillons possèdent l'allèle B. En revanche pour 3 échantillons aucune bande visible n'a été obtenue.

Amorce Bmac0134 :

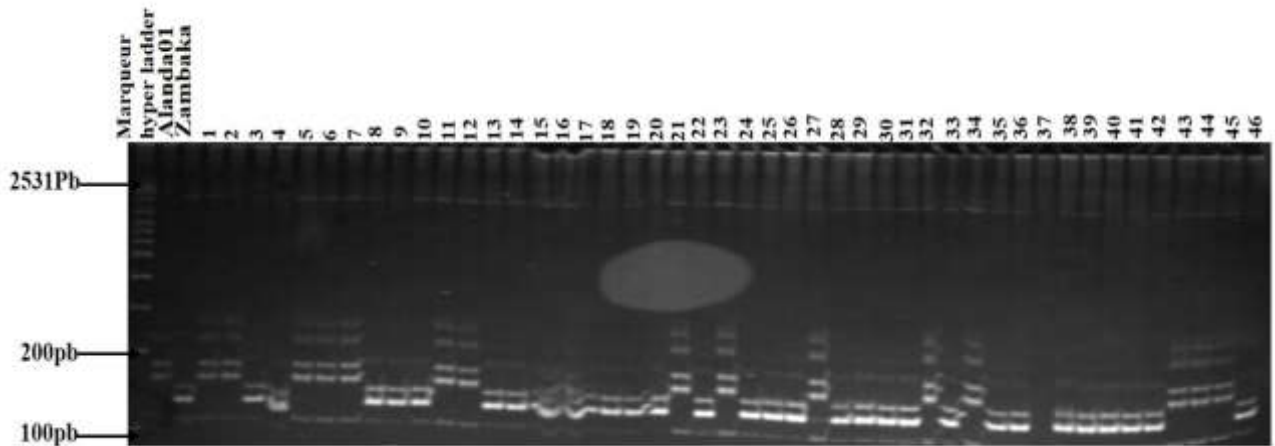


Fig.11. Analyse par électrophorèse sur gel d'acrylamide des produits d'amplification par l'amorce Bmac0134. Échantillons 1 à 48

Pour l'amorce Bmac0134, on trouve qu'il y a 15 échantillons possèdent l'allèle A, et 30 échantillons possèdent l'allèle B. En revanche pour 3 échantillons aucune bande visible n'a été obtenue.

Alors, d'après nos résultats, nous avons obtenu une ségrégation anormale car on doit avoir 24 échantillons possèdent l'allèle A et 24 échantillons possèdent l'allèle B puisque on a 48 échantillons au totale. C'est ce qu'on appelle **distorsion génétique (9)** :

Pour démontrer que c'est une distorsion génétique, nous avons effectué le test khi Deux :

$$X^2 = \sum \frac{(\text{effectifs observés} - \text{effectifs théoriques})^2}{\text{effectifs théoriques}}$$

Test de khi deux :

On calcul d'abord les génotypes observés et les génotypes théoriques :



Tableau 6 : nombre de génotype observe et théorique.

	GENOTYPES		TOTAL	GENOTYPES		TOTAL
	OBSERVES			THEORIQUES		
AMORCE	AA	BB		AA	BB	
BMAC0134	15	30	45	24	24	48
BMAC0209	31	14	45	24	24	48
BMAC0120	16	19	35	24	24	48
BMAC0156	17	18	35	24	24	48

Calcul de Khi deux :

$$X^2_{Bmac0134} = \frac{(15-24)^2}{24} + \frac{(30-24)^2}{24} = 3,375 + 1,5 = 4,875$$

$$X^2_{Bmac0209} = \frac{(31-24)^2}{24} + \frac{(14-24)^2}{24} = 2,042 + 4,17 = 6,212$$

$$X^2_{Bmac0120} = \frac{(16-24)^2}{24} + \frac{(19-24)^2}{24} = 2,67 + 1,042 = 3,712$$

$$X^2_{Bmac0156} = \frac{(17-18)^2}{24} + \frac{(18-24)^2}{24} = 0,042 + 1,5 = 1,542$$

$$\Rightarrow df=2-1=1$$

→ Pour p = 0,05 le résultat de la table est de 3,8415

Pour Bmac0134 : $X^2 > 3,8415$ alors l'hypothèse est refusée alors il y a une présence d'une distorsion génétique

Pour Bmac0209 : $X^2 > 3,8415$ alors l'hypothèse est refusée alors il y a une présence d'une distorsion génétique

Pour Bmac0120 : $X^2 < 3,8415$ alors l'hypothèse est acceptée, la ségrégation est normale

Pour Bmac0156 : $X^2 < 3,8415$ alors l'hypothèse est acceptée, la ségrégation est normale



A- Discussion :

D'après les résultats obtenus, les deux amorces Bmac0134 et Bmac0209 montrent une distorsion génétique par contre les autres amorces Bmac0120 et Bmac0156 montrent une ségrégation normale. Cela montre que l'importance de la distorsion génétique dépend du type du marqueur moléculaire utilisé et de la nature des populations étudiées ainsi que des amorces choisies.

Donc, pour déterminer si la méthode des haploïdes doublées basées sur la culture in vitro des anthères, peut causer une perte de génotypes d'allèle ou non, il faut travailler sur plusieurs amorces ainsi que sur une population totale.

Dans une autre étude de **(10)** pour construire une carte de RFLP d'orge, **deux populations** ont été analysées en utilisant 251 marqueurs génomiques et ADNc :

Une partie significative **44 % contre 10 %** de la progéniture interspécifique a montré la **ségrégation déformée**, causée principalement par **la fréquence de variantes** provenant du **parent qui a mieux répondu à la culture in vitro (IGRI)**. Par contraste avec la carte interspécifique, les sondes montrant la ségrégation biaisée étaient groupées sur la carte de DH sur des segments discrets.



CONCLUSION :

Ce présent mémoire représente le fruit d'un travail effectué au sein de l'unité de Biotechnologie à l'INRA RABAT pour une durée de deux mois.

Le travail que nous avons effectué nous a permis d'approfondir nos connaissances dans le domaine de génétique et la Biotechnologie moléculaire.

Nous avons compris que l'orge n'est pas uniquement une céréale d'importance économique mais aussi un modèle pour des études génétique et physiologique.

L'intensification et l'industrialisation tant de la production que de l'amélioration variétales ont engendré un changement au niveau des gènes par des mutations ou d'un déroulement anormal de la méiose. Les gamétophytes sont alors moins viables ou moins fertiles, dans ce sens on a constaté que la culture in vitro des anthères peut causer une distorsion génétique.

Toutefois, la période de notre stage ne nous permet pas de constater un progrès significatif qui peut répondre aux besoins mentionnés, pour cela il est important de maintenir le suivi des résultats afin que l'amélioration continue.



REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES :

(1) https://fr.wikipedia.org/wiki/Orge_commune (a été consulté le 15/05/2017)

(2) **H. Boulal et E. El Mzourn.** 2004. Institut National de la Recherche Agronomique (INRA), Département d'Agronomie,

(3) **S. B. Alaoui.** 2005. Référentiel pour la Conduite Technique de la Culture d'orge (*Hordeum vulgare*).

(4) <http://www.mesmarches.chambagri.fr/menu-horizontal/apprendre-les-marches/marches-physiques/marche-de-lorge.html> (a été consulté le 22/05/2017)

(5) **Institut Agronomique et Vétérinaire Hassan II.** Département d'agronomie Rabat-instituts, Maroc. Centre Régional de Abda Doukkala et Chaouia, B.P. 589, 26000 Settat, Maroc.

(6) **El khishin D.** 2014. agricultural genetic engineering research institute (AGERI) Utilisation of molecular markers. Marker assisted selection

(7) **D.de Vienne, éd.**1998. **Inra CNED-Aupelf-Uref.** Les marqueurs moléculaires en génétique et biotechnologie végétales,

(8) <http://wheat.pw.usda.gov> (a été consulté le 27/05/2017)

(9) Segregation distortion in homozygous lines obtained via anther culture and maize doubled haploid methods in comparison to single seed descent in wheat (*Triticum aestivum* L.) **Electronic Journal of Biotechnology Volume 17, Issue 1.** 2014 Pages 6–13.

(10) **F. B. H. Diouf.** et **G. Mergeai.** Distorsions de ségrégation et amélioration génétique des plantes (synthèse bibliographique) Volume 16 (2012),



ANNEXES :

Solution nécessaire pour l'extraction

Solution stock du tampon d'extraction 2x CTAB :

2X CTAB	POUR 50ML	POUR 250ML
1M TRIS-HCL (PH8)	5ml	25ml
5M NACL	14ml	70ml
0,5M EDTA (PH8)	2ml	10ml
CTAB	1g	5g
EAU DISTILLE	Complete jusqu'à 50ml	Complete jusqu'à 250ml

Solution stock d'EDTA :

0,5M EDTA (PH8)	POUR 100ML	POUR 250ML
EDTA	18,6g	46,5g
L'EAU DISTILLE	Complete jusqu'à 100ml	Complete jusqu'à 250ml

Solution stock de NaCl :

5M NACL	POUR 100ML	POUR 250ML
NACL	29,22g	73,05g
L'EAU DISTILLE	Complete jusqu'à 100ml	Complete jusqu'à 250ml

Solution stock de Tris-Hcl :

1M TRIS-HCL (PH8)	POUR 100ML	POUR 250ML
TRIS BASE	12,114g	30,285g
L'EAU DISTILLE	Complete jusqu'à 100ml	Complete jusqu'à 250ml

Solution de chloroforme iso-amyle alcool :

CHLOROFORME	POUR 25ML	POUR 100ML
ISOAMYLE ALCOOL		
CHLOROFORME	24ml	96ml
ISOAMYLE ALCOOL	1ml	4ml



Solution de 70% éthanol :

70% ETHANOL	POUR 100ML	POUR 250ML
ETHANOL ABSOLU	70ml	175ml
L'EAU DISTILLE	30ml	75ml

Solution stock pour les gels

Gel d'agarose 1,2% :

SOLUTION D'AGAROSE	POUR 90ML	POUR 300ML
AGAROSE	1,08g	3,6g
5X TBE	18ml	60ml
L'EAU DISTILLE	Complete jusqu'à 90ml	Complete jusqu'à 300ml

Solution d'acrylamide 40% :

40% D'ACRYLAMIDE	POUR 100ML	POUR 250ML
ACRYLAMIDE	38,66g	96,65g
BIS ACRYLAMIDE	1,34g	3,35g
L'EAU DISTILLE	100ml	250ml

Solution d'acrylamide 8% :

ACRYLAMIDE 8%	POUR 100ML	POUR 250ML
ACRYLAMIDE 40%	20ml	50ml
5X TBE	20ml	50ml
L'EAU DISTILLE	60ml	150ml

Préparation de bleu d'agarose :

BLEU D'AGAROSE	POUR 10ML	POUR 50ML
1M TRIS-HCL (PH8)	0,5ml	0,25ml
0,5M EDTA (PH8)	0,1ml	0,5ml
50% GLYCEROL	5ml	25ml
BLEU DE BROMOPHENOL	20g	100g

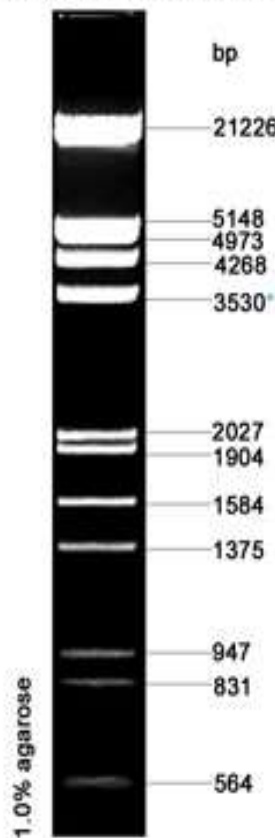
Préparation de bleu d'acrylamide :

BLEU D'ACRYLAMIDE	POUR 25ML	POUR 100ML
FORMAMIDE	24,75ml	99ml
BLEU DE BROMOPHENOL	12,5mg	50mg
XYLENE CYANOLE	12,5mg	50mg
L'EAU DISTILLE	1,25ml	5ml

Solution de bromure d'éthidium BET :

BROMURE D'ETHIDIUM DILUE	POUR 1L
BROMURE D'ETHIDIUM (10MG /ML)	100µl
L'EAU DISTILLE	1L

Lambda DNA / EcoRI + HindIII Marker



Hyper ladder 100plus

