



UNIVERSITE SIDI MOHAMMED BEN ABDELLAH

Projet de Fin d'Etudes LST

Biotechnologie et Valorisation des Phyto-Ressources

Caractérisation Phénotypique (Grain Scan) et Génotypique (SSR) du blé

Présenté par: SAIDI Ranya

Encadré par :

- Pr Manni laila
- Pr SRIPAD Udupa
- Pr IRAQI Driss
- Pr Fatima HENKRAR

Soutenu le: 11/06/2019

Devant le jury composé de :

- Pr MANNI Laila
- Pr SQALLI Hakima
- Pr IRAQI Driss
- Pr SRIPADA Udupa
- Pr HENKRAR Fatima

Dédicaces

Je dédie ce travail à:

*A mes chers parents **Abdelhak** et **Nazha** qui ont éclairé le chemin de ma vie par leur dévouement exemplaire et les énormes sacrifices ainsi que leurs encouragements tout le long de mon parcours scolaire et universitaire.*

*A mes très chères sœurs **Rym** et **Aya**, et mon frère **Mamoune** pour leur encouragement, leur aides et leur soutien moral permanent.*

A mes amis fidèles pour leur soutien et leur disponibilité et les instants agréables passés ensemble.

*A tous mes camarades du Licence «**Biotechnologie et valorisation des phyto-ressources** »*

A tous mes enseignants.

Remerciements

Je remercie avant tout ALLAH tout puissant, de m'avoir guidé toutes les années d'études et m'avoir donnée la volonté, la patience et le courage pour bien mener ce travail.

Je tiens tout d'abord à manifester toute ma gratitude à mes encadrant de l'INRA : Dr Driss IRAQI coordinateur de l'unité de biotechnologie et maître de recherche en biotechnologie végétale ainsi que Dr SRIPADA Udupa, biotechnologiste et généticien de l'ICARDA « International Center for Agricultural Research in the Dry Areas », pour m'avoir accordé la permission d'effectuer ce stage au sein du laboratoire de biologie moléculaire, pour leur encadrement, leur grande sympathie à mon égard et leurs efforts accomplis pour veiller sur la bonne réalisation de ce travail.

Mes remerciements à Mme Laila MANNI 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.

Je présente aussi mes remerciements à Mme SQALLI Hakima, professeur à la Faculté des Sciences et Techniques de 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.

Tous mes sincères remerciements vont également à Mme Fatima HENKRAR, Docteur au sein de laboratoire de biotechnologie, Pour sa patience, sa gentillesse, sa disponibilité, ses conseils et son accueil très chaleureux. Et même de m'avoir guidée au laboratoire.

Je tiens également à remercier l'ensemble des personnes Solange, Zahra et Saida qui m'ont aidé de près et de loin dans la réalisation de ce travail.

Enfin, ce travail n'aurait pas été mené à terme sans les concessions et les encouragements de mes parents auxquels je dis tout simplement merci.

Un grand merci à toute ma famille.

“Finalement, je remercie ICARDA, INRA-Maroc, FAO/ITPGRFA, l'Union Européenne, CRP-Blé et le Programme de subventions en collaboration avec ICARDA-Maroc pour leur soutien et leur support financière”.

LISTE DES ABREVIATIONS

ADN: Acide désoxyribonucléique

AFLP: Amplified Fragment Length Polymorphism

APS: Amonium PurSulfate

BET: Bromure d'Ethidium

CTAB: Cetyl Trimethyl Ammonium Bromide

dNTP : 2'-désoxyribonucléoside 5'-triphosphate

EDTA : Acide éthylène diamine tétra-acétique

FAO: Food and agriculture organization

Qx/ha : Quintaux par hectare

ICARDA : Centre international de recherche agronomique dans les zones arides

INRA : Institut National de la Recherche Agronomique

ISSR: Inter Simple Sequence Repeat

Pb : Paires de bases

PH : Potentiel hydrogène

PCR : Polymerase chain Reaction (Réaction de polymérisation en chaîne)

PIC: Polymorphism Information Content

RAPD: Random Amplified Polymorphic DNA

RFLP: Restriction Fragment Length Polymorphism

Rpm : Rotation par minute

SSR: Simple Sequence Repeat

Taq polymerase : Thermus Aquaticus polymerase

TBE : Tris-Borate-EDTA

TEMED: Tétraméthyléthylènediam

Liste des tableaux

Tableau 1 : Classification botanique du blé.....	06
Tableau 2 : Présentation des marqueurs moléculaires RFLP, AFLP et SSR.....	10
Tableau 3 : Noms des différentes accessions étudiées.....	12
Tableau 4 : Composant du mixte de la réaction PCR.....	17
Tableau 5 : Programme utilisé pour l'amplification d'ADN du blé.....	17
Tableau 6 : Marqueurs microsatellites utilisés pour l'analyse de la diversité des populations locales de blé dur et de blé tendre utilisé dans l'expérience.....	18
Tableau 7 : Mesure statistiques de l'aspect de la plante établi par « Grain scan ».....	20
Tableau 8 : Diversité génétique calculé chez les variétés du blé.....	22
Tableau 9 : Distance génétique entre les 14 accessions étudiées.....	23

Liste des figures

Figure 1 : les deux espèces de blé.....	02
Figure 2 : Origine génétique du blé dur et du blé tendre.....	04
Figure 3 : Production mondiale de blé en 2017.....	05
Figure 4 : Caractéristique morphologique du blé.....	07
Figure 5 : Différents stades de la croissance des céréales.....	08
Figure 6 : Programme d'Amplification PCR.....	11
Figure 7 : Appareil de Grain Scan.....	13
Figure 8 : Etapes de l'extraction d'ADN.....	14
Figure 9 : Electrophorèse sur gel d'agarose.....	16
Figure 10 : Electrophorèse sur gel d'acrylamide.....	19
Figure 11 : Profile de migration des échantillons d'ADN extraits des variétés de blé sur gel d'agarose 1,2%.....	21
Figure 12 : Profiles d'amplification par différentes amorces sur gel d'acrylamide 6%.....	22
Figure 13 : Dendrogramme en utilisant le logiciel power marker.....	24

Sommaire

Introduction.....	01
Chapitre I : Etude bibliographique	
I. Origine et historique.....	02
1. Historique du blé.....	02
2. Origine de blé.....	03
a. Origine géographique.....	03
b. Origine génétique.....	03
II. Importance du blé.....	04
1. Importance du blé à l'échelle mondiale.....	04
2. Importance du blé au Maroc.....	05
III. La biologie du blé.....	06
1. Taxonomie.....	06
2. Description botanique.....	06
3. Cycle biologique.....	07
IV. Problématique du blé.....	08
1. Stress abiotiques.....	08
2. Stress biotiques.....	08
V. Etude du polymorphisme phénotypique et génotypique du blé.....	09
1. Etude du polymorphisme phénotypique.....	09
2. Etude du polymorphisme génotypique.....	09
a. Etude de la diversité génétique via les marqueurs.....	09
b. Principaux types de marqueurs moléculaires.....	09
c. Amplification d'ADN par la PCR.....	11
Chapitre II : Matériels et méthodes	
I. Matériel végétal étudié.....	12
II. Etude du polymorphisme phénotypique du blé.....	12
III. Etude du polymorphisme génotypique du blé.....	13
1. Extraction d'ADN.....	13
2. Electrophorèse en gel d'agarose 1,2%.....	15
3. Amplification d'ADN par PCR.....	16
4. Electrophorèse en gel d'acrylamide 6%.....	18

IV.	Analyse des données.....	19
-----	--------------------------	----

Chapitre III : Résultat et discussions

I.	Analyse phénotypique des populations de blé.....	20
II.	Analyse génotypique des populations de blé.....	21
1.	Test qualité d'ADN extrait.....	21
2.	Résultat d'amplifications d'ADN par les amorces microsatellites.....	22
3.	Nombre d'allèle et indice de diversité génétique.....	22
4.	Distance génétique.....	23
5.	Arbre phylogénique	24

Conclusion et perspectives.....	26
---------------------------------	----

Références bibliographiques.

Les annexes

Présentation du lieu de stage

Le travail de laboratoire de ce projet de fin d'étude a été mené dans L'unité de biotechnologie du Centre Régional de la Recherche Agronomique de Rabat.

L'Institut National de la Recherche Agronomique "INRA" a pour mission d'entreprendre les recherches pour le développement agricole. C'est un établissement public dont les origines remontent à 1914 avec la création des premiers services de recherche agricole officiel.

L'INRA opère à travers dix centres régionaux de la recherche agronomique et 23 domaines expérimentaux répartis sur le territoire national et couvrant les divers agro-systèmes du pays.

L'unité de biotechnologie a été créée au Centre de la Recherche Agronomique de Rabat. Elle est constituée plusieurs laboratoire équipés par du matériel à la fine pointe de la technologie (Séquence automatique, PCR normal et quantitative, AFLP express...) pour la réalisation des travaux sur le marquage moléculaire, l'étude d'expression des gènes, la culture in vitro et la transformation génétique. L'Unité est appelée à se positionner comme centre de compétition dans ce domaine. Elle a pour mission le développement, l'application et l'intégration des biotechnologies pour améliorer l'agriculture au Maroc, le transfert de technologie aux laboratoires régionaux et la formation des chercheurs de l'INRA et des établissements nationaux. Ces orientations sont caractérisées par les investissements importants déjà réalisés au niveau des recrutements, de constructions et d'équipements.

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 (céréales, arbres fruitiers, légumineuses, etc...). Elles permettent la production d'un matériel stable, homogène qui peut être indemne de maladies et tolérant aux stress biotiques et abiotiques. De même, la transformation génétique offre une stratégie puissante et rapide là où l'amélioration classique est limitée du fait des barrières génétiques et de la complexité des caractéristiques, la caractérisation des gènes et le développement de marqueurs moléculaires de sélection associés aux stress biotiques et abiotiques pour assister la création de nouvelles variétés.

L'INRA travaille en étroite collaboration avec l'**ICARDA International Center for Agricultural Research in the Dry Areas**, sur l'application d'outils biotechnologiques dans l'amélioration des cultures.

INTRODUCTION GENERALE

La filière céréalière occupe une place importante dans la structure de la production agricole au Maroc, représente l'une des plus importantes ressources alimentaires de l'Homme (Boutigny, 2007). Outre son importance économique et sociale, elle est aussi la principale source nutritive des pays sous-développés.

Cependant, la culture du blé souffre des fluctuations pluviométriques interannuelles et des sécheresses de plus en plus fréquentes qui affectent sa production. En effet, au cours des 50 dernières années, le Maroc a connu 11 années de sécheresse qui sont devenues de plus en plus fréquentes depuis les années 80. Cette fréquence est passée d'une année sur 5 avant les années 90 à 1 année sur 2 au cours de la dernière décennie (MADARPM, 1999). La sécheresse est donc le stress environnemental le plus important affectant la culture du blé et cause une réduction alarmante de son rendement.

Le blé est une céréale aux enjeux économiques importants. Il occupe le troisième rang mondial des céréales et le premier rang au Maroc. Cependant la production peine à satisfaire la demande qui ne cesse de s'accroître avec l'augmentation de la population. En effet, selon ses dernières prévisions, il apparaît que la production mondiale en 2018 devrait s'établir à 7,72 milliards de tonnes, (FAO, 2017).

Ces ressources génétiques représentent, en effet, un patrimoine qu'il est nécessaire de préserver et de mieux explorer afin de mieux l'exploiter. Dans cet ordre d'idées, et pour assurer une agriculture durable, l'étude de la diversité et la caractérisation de ces ressources génétiques sont indispensables pour créer de nouvelles variétés adaptées aux variations climatiques et résistantes aux maladies, dotées d'un rendement élevé, mais aussi, combiné à une bonne qualité (Aguiriano, 2006).

Ceci présente l'un des principaux objectifs tracés par les chercheurs de l'Unité de Biotechnologie du Centre Régional de la Recherche Agronomique qui vise l'amélioration génétique et diversité génétique du blé. Ainsi, la présente étude a pour objectif d'une part, l'étude de l'amélioration génétique du blé et d'autre part, l'analyse de la diversité génétique (paramètre de qualité) Pour ce faire, une stratégie globale est suivie, associant d'une diversité morphologique (Grain Scan) qui est une nouvelles méthode utilisé à ICARDA et génotypiques en intégrant différents marqueurs moléculaires précisément les SSR.

Chapitre I : Etude bibliographique

I. ORIGINE ET HISTORIQUE

1. Historique du blé

Le blé est une plante annuelle herbacée, monocotylédone de la famille des *Poaceae* appartenant au genre *Triticum*. Elle produit un fruit sec indéhiscent : le caryopse (Boutigny, 2007; Ait Kaki, 2008).

La domestication et la culture des différentes espèces de blé ont été un élément fondateur des premières civilisations humaines dans le croissant fertile, zone couvrant la Palestine, la Syrie, l'Irak et une grande partie de l'Iran (Croston et Williams, 1981). Ces différentes espèces de blé ont subi des transformations au fil du temps, les faisant passer de l'état de graminées sauvages aux espèces cultivées.

Il existe plus de vingt mille variétés de blé, mais les plus cultivées sont le blé tendre (*Triticum aestivum*) et le blé dur (*Triticum durum*) (Figure 1) (Debiton, 2010). Il existe aussi des blés d'hiver et des blés de printemps, dont les périodes de plantation et de récoltes sont différentes dans l'année (Boutigny, 2007).



Figure 1: Espèces de blé (Botarela, 2012)

(A : Blé tendre, B : Blé dur)

2. Origine du blé

a. Origine géographique du blé

Le blé, est un composant central de l'alimentation humaine qui a été domestiqué au Proche-Orient à partir d'une graminée sauvage il y a environ 10000 ans. Sa consommation remonte à la plus haute antiquité. Les premières cultures apparaissent au VIII^e siècle av. J.-C., en Mésopotamie (Actuellement nord-est de la Syrie et nord de l'Irak) dans les vallées du Tigre et de l'Euphrate (actuel l'Irak) et dans la région du "croissant fertile" (Liban, Syrie et Sud de la Turquie) où subsistent à ce jour des blés sauvages (Boutigny, 2007)

b. Origine génétique du blé

L'origine du blé dur remonte au croisement entre deux espèces ancestrales : *Triticum monococcum* (génomme A) et *Aegilops speltoides* (génomme B). Ce croisement conduit à l'apparition d'un blé dur sauvage de type AABB (*Triticum turgidum ssp. dicocoides*) (génomme AB) qui a ensuite progressivement évolué vers *Triticum turgidum ssp. dicocum* puis vers *Triticum durum* (blé dur cultivé) selon Mackey (1968). Le blé dur appelé ainsi en raison de la dureté de son grain, possède $2n = 4x = 28$ chromosomes (Feillet, 2000) (Figure 2).

Le blé tendre possède les trois génomes AA, BB et DD constitués chacun de sept paires de chromosomes homologues numérotés de 1 à 7 (A1...A7, B1...B7, D1...D7), (Feldman, 1994), soit au total 42 chromosomes quand au blé dur ne contient que les deux génomes AA et BB et 28 chromosomes. *Triticum aestivum*, résultent de l'hybridation entre des blés tétraploïdes cultivés, en particulier *Triticum turgidum L. ssp. dicocum* et la graminée sauvage *Aegilops squarrosa* (*Triticum tauschii*) $2n = 14$, DD (Van slageren, 1994) (Figure 2).

Triticum aestivum serait apparus entre 7 000 et 8 000 avant J.C dans les zones de culture des blés tétraploïdes communes avec l'aire de distribution d'*Aegilops squarrosa* qui comprendrait le croissant fertile de la Turquie, à l'ouest, jusqu'aux confins de la Chine, à l'est (Bonjean, 2001).

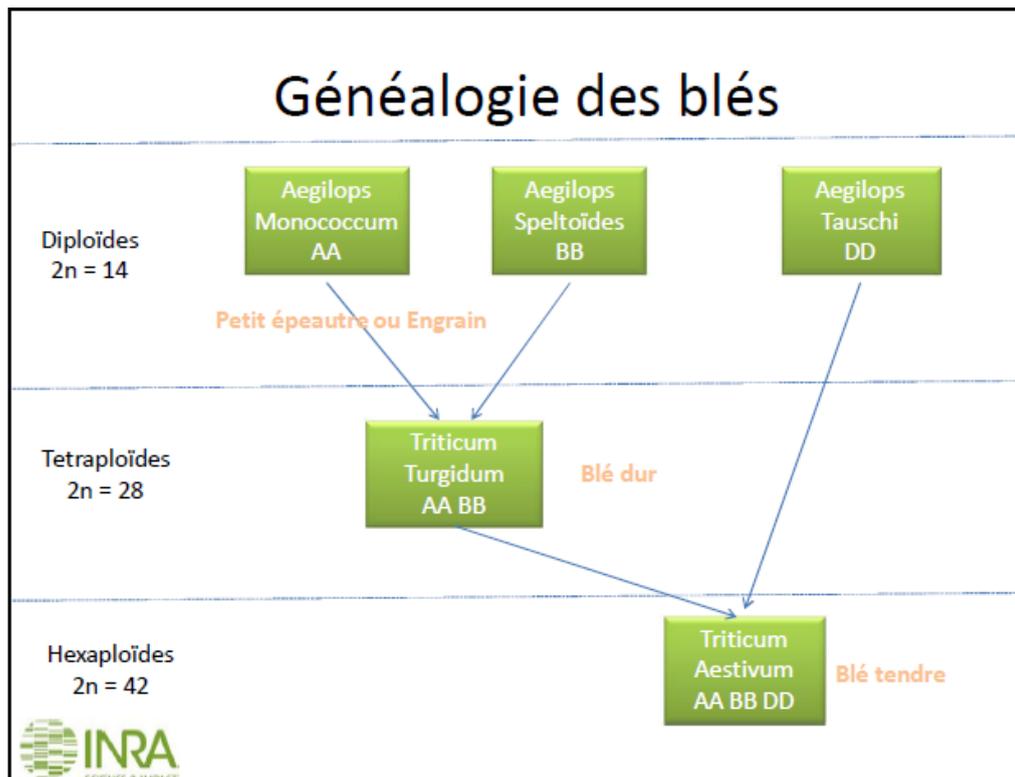


Figure 2 : *Origine génétique du blé dur et du blé tendre (Sears, 1954)*

II. IMPORTANCE DE LA PRODUCTION DU BLE

1. Importance du blé à l'échelle mondiale

La production mondiale des céréales devrait atteindre les 2 521 millions de tonnes en 2016, juste 0,2% de moins par rapport à l'année dernière de 2015, devenant ainsi la troisième céréale la plus produite au monde, devant le riz et derrière le maïs, et le troisième meilleur rendement jusqu'à présent, selon les premières prévisions de la FAO pour la nouvelle saison.

En raison des conditions météorologiques, la légère baisse de la production mondiale de céréales en 2016/17 annoncée par la FAO s'explique en grande partie par la chute de la production de blé dans le monde, qui devrait s'élever à 712,7 tonnes, soit 20 millions de tonnes de moins qu'en 2015. Cette chute reflète principalement une baisse du nombre de plantations en Russie et en Ukraine, deux pays affectés par un climat sec.

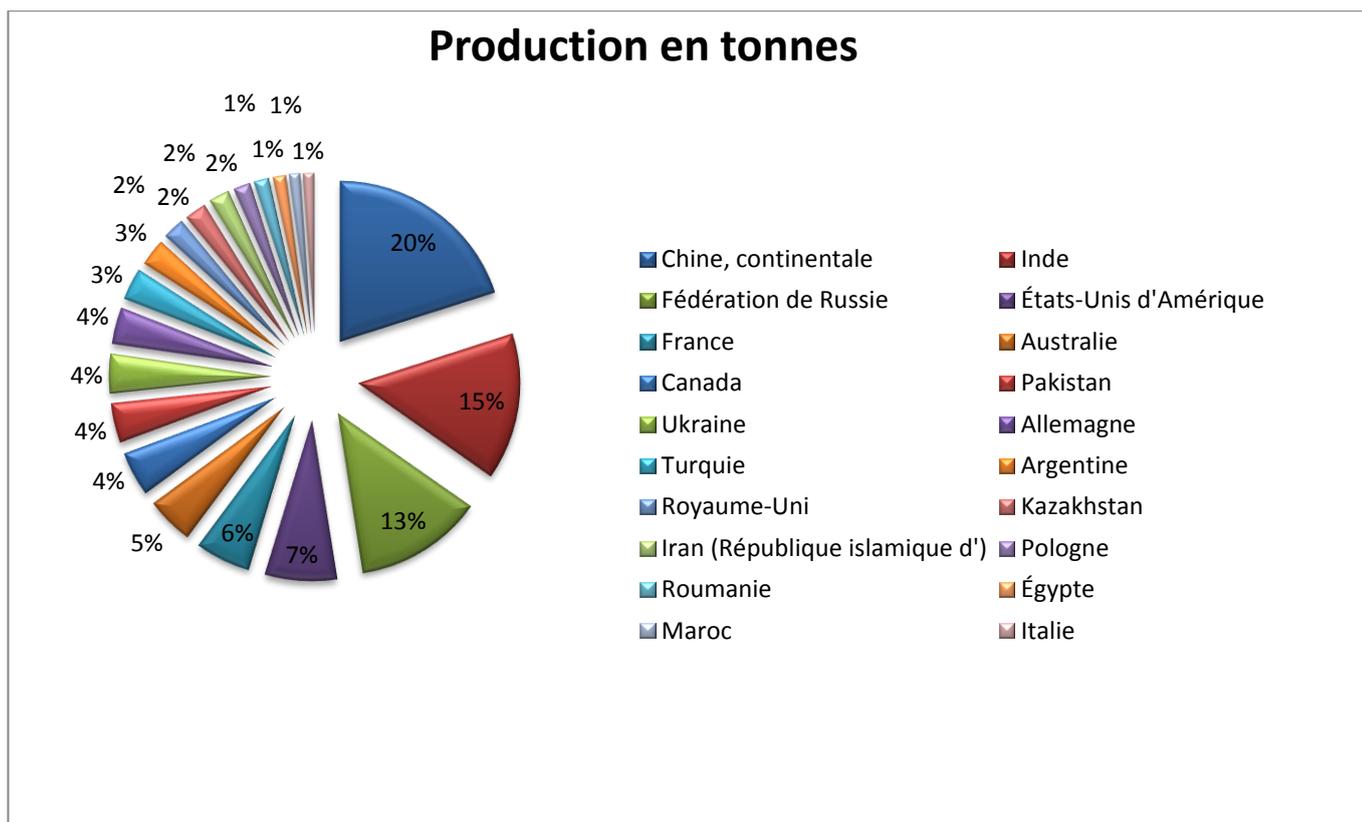


Figure 3 : Production mondiale de blé en 2017 (FAO STAT, 2019).

2. La production du blé au Maroc

Au Maroc, la saison agricole 2017-2018 a été sauvée par les récentes précipitations. Les cultures d'automne ont connu une importante dynamique. La production céréalière au titre de la campagne agricole 2017-2018 devrait atteindre un niveau exceptionnel de 98,2 millions de quintaux, selon les premières prévisions du ministère de l'Agriculture.

Une production de 48,1 millions de quintaux de blé tendre, de 22,8 millions de quintaux de blé dur et de 27,3 millions de quintaux d'orge est attendue. Cette production est réalisée sur une superficie emblavée en céréales principales de 4,5 millions d'hectares contre 5,4 millions d'hectares en 2016-2017, soit moins de 16% par rapport à la campagne précédente. Cette performance a pu être réalisée grâce à un rendement moyen record de 21,8 Qx/Ha, en augmentation de 23% par rapport à la campagne précédente. Selon les chiffres officiels, 96 millions de quintaux, c'est la production définitive des trois principales céréales (blé dur, le blé tendre et l'orge) au titre de la campagne agricole 2016-2017.

III. BIOLOGIE DU BLE

1. Taxonomie

Le blé est une plante herbacée, appartenant au groupe des céréales à paille et à la classe des monocotylédones (Tableau 1), (Naville, 2005).

Tableau 1 : Classification botanique du blé (Naville, 2005).

Règne	Plantae
Embranchement	Spermaphytes
Sous-embranchement	Angiospermes
Classe	Monocotylédones
Ordre	Poales
Famille	Graminae ou Poaceae
Genre	Triticum
Espèce	→ <i>Triticum aestivum</i> (Blé Tendre) → <i>Triticum durum</i> (Blé dur). (Bonneuil et al., 2009)

2. Description botanique

Le blé est une plante herbacée annuelle monocotylédone, à feuille alternes, formée d'un chaume portant un épi constitué de deux rangées d'épillets sessiles et aplatis. Les fleurs sont nombreuses, petites et peu visible. Elles sont groupées en épis situés à l'extrémité des chaumes.

L'épi de blé est formé de deux rangées d'épillets situés de part et d'autres de l'axe. Un épillet regroupe trois fleurs à l'intérieur et deux glumes. Chaque fleur est dépourvue de pétales, et est entourée de deux glumelles (pièces écailleuses non colorées). Elle contient trois étamines (pièces mâles), un ovaire surmonté de deux styles plumeux (les pièces femelles). La fleur du blé est dite cléistogame, c'est-à-dire que, le plus souvent, le pollen est relâché par déhiscence des étamines. Il s'attache alors au stigma, ou peut se produire la fécondation. A cause du caractère cléistogame de la fleur, l'autofécondation est le mode de reproduction le plus fréquent chez les blés : ce sont les anthérozoides (ou spermatozoides) issus du pollen d'une fleur qui fécondent l'oosphère et la cellule centrale du sac embryonnaire de l'ovaire de cette même fleur (les cellules sexuelles femelles sont

protégées dans un sac embryonnaire fermé au sein d'un ovule). A la différence de l'orge ou du seigle, le blé peut, un certain temps au moins se passer d'insectes pollinisateurs (Figure 4).

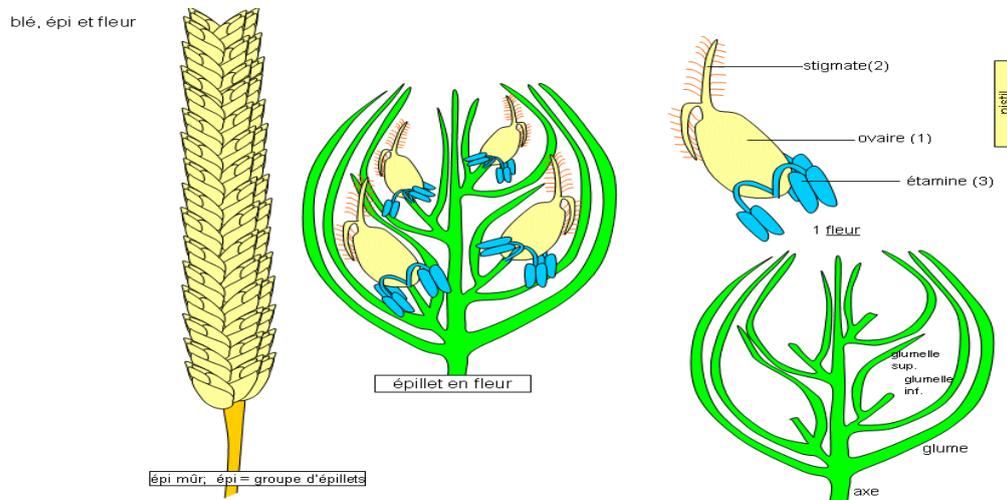


Figure 4 : Caractéristique morphologique du blé. (Clarke et al., 2006).

Après fécondation, l'ovaire donnera le grain de blé. Dans le cas du blé, le grain est à la fois le fruit et la graine. En effet, les enveloppes du fruit sont soudées à celles de la graine. On appelle ce type de fruit un caryopse (Garnsey, 1983).

3. Cycle de développement

De graine à graine, le cycle biologique du blé se divise en trois périodes successives : la période végétative, reproductrice et de maturation de grain (Hamadache, 2013). Ces périodes sont marquées par des stades repères, basées sur l'évolution de l'aspect externe ou sur les modifications internes des organes producteurs (Soltner, 2005). Différentes échelles de notation ont été développées, celle de Lepage (2012) et Zadoks et al, (1974).

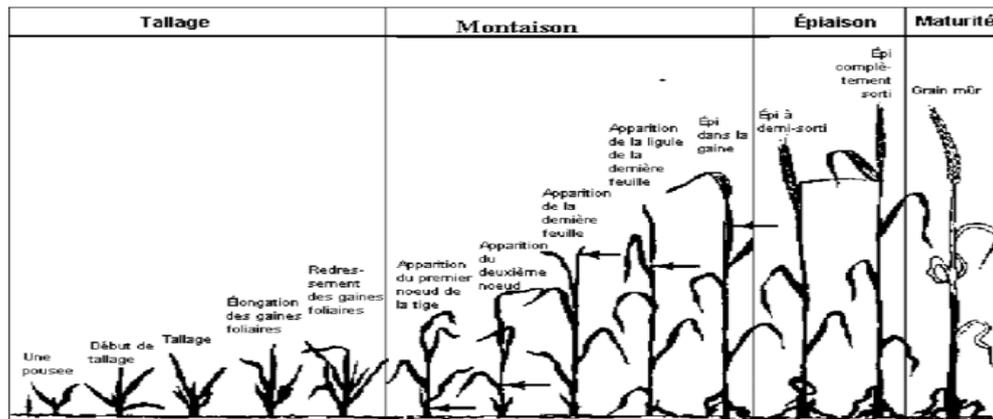


Figure 5 : Différents stades de la croissance des céréales (Ministère de l'Agriculture, de l'Alimentation et des affaires Rurales de l'Ontario, 2009).

IV. PROBLEMATIQUE DU BLE AU MAROC

La production du blé au Maroc est réalisée dans un contexte d'écosystèmes variés, un changement climatique défavorable, des stress biotiques et abiotiques et des exigences en qualité de plus en plus sophistiquées :

1. Stress abiotiques

Le déficit hydrique, thermique et minéralogique constitue les facteurs qui influencent le rendement et contribue au développement des maladies du blé au Maroc. En effet les régions arides et semi-arides souffrent d'un déficit hydrique (Jlibene, 2009) et des problèmes associés au régime de pluviométrie comme la pourriture racinaire et la cécidomyie, Les régions humides souffrent de l'excès d'eau et des problèmes de maladies foliaires qui sont favorisées par l'humidité, (Jlibene et Chafai, 2003), et les régions subhumides connaissent des problèmes de sécheresses, de cécidomyie et des maladies foliaires (Jlibene, 2005). Quand aux intrants indispensables pour la plante comme l'azote, le phosphore et la potasse, leurs réserves sont sujettes à l'épuisement, et leurs prix vont en augmentation.

2. Stress biotiques

Les stress biotiques sont ceux causés par des facteurs vivants tels que les insectes ravageurs, les champignons, les bactéries et les virus. D'après le rapport d'activité de l'INRA concernant la protection des céréales et légumineuses en 2008, les maladies cryptogamiques les plus dominantes dans les champs de blé, sont la rouille brune (*Puccinia triticina*), la septoriose (*Mycosphaerella graminicola*) et la rouille jaune (*Puccinia striitiformis*).

V. ETUDE DU POLYMORPHISME PHENOTYPIQUE ET GENOTYPIQUE DU BLE

1. Etude du polymorphisme phénotypique

En génétique, le phénotype est l'ensemble des traits observables d'un organisme. Très souvent, l'usage de ce terme est plus restrictif : le phénotype est alors considéré au niveau d'un seul caractère, à l'échelle cellulaire ou encore moléculaire (Soumarey, 2014).

Les caractéristiques phénotypiques constituent un outil incontournable dans la classification et la taxonomie des micros et macro organismes et continue, à nos jours, d'être utilisée, l'évaluation de la diversité génétique des cultures est essentielle pour comprendre la variabilité génétique disponible et l'utilisation potentielle pour l'amélioration variétale. Les méthodes classiques d'estimation de la diversité génétique ou de la parenté de groupes de plantes se basent sur des caractéristiques morphologiques.

2. Etude du polymorphisme génotypique

a. Etude de la diversité génétique via les marqueurs

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). On s'est intéressé par les marqueurs moléculaires.

Les marqueurs moléculaires ou les marqueurs d'ADN sont un petit segment ou une section de la séquence d'ADN qui reflète le polymorphisme ou la variation (délétion de base, insertion et substitution) entre différents individus. Ils peuvent être considérés comme un signe ou un indicateur associé ou lié à un trait dans une plante au niveau des molécules d'ADN (Jiang, 2018).

b. Les principaux types de marqueurs moléculaires

Il existe différents types de marqueurs moléculaires correspondant à différentes techniques, Leur utilisation permet de visualiser l'une, voire plusieurs de ces différences. (Samouelian et al., 2009)

Le choix du système de marquage dépend de l'objectif précis fixé, des moyens et des compétences disponibles au laboratoire. Les marqueurs les plus largement utilisés chez le blé sont (Tableau 2) :

Tableau 2 : Présentation des marqueurs moléculaires RFLP, AFLP et SSR

Marqueurs	Avantages	Inconvénients
RFLP	<ul style="list-style-type: none"> • Est une méthode fiable et facilement transférable entre laboratoires • Il s'agit d'un marqueur Co-dominant • Aucune information sur la séquence n'est requise • Basée sur des homologies de séquences, elle peut être utilisée pour des analyses phylogénétique entre espèces. • Utilisée pour faire des cartes génétiques de liaisons. • Il s'agit d'un marqueur locus spécifique qui peut également permettre l'étude de synthésies. • Est une technique simple ne nécessitant pas de sondes particulières. 	<ul style="list-style-type: none"> • Elle nécessite une grande quantité d'ADN. • Elle n'est pas automatisable vu les étapes de transfert et d'hybridation • Certaines espèces possèdent un taux peu élevé de polymorphisme • Un faible nombre de locus sont détectés par expérience. • Elle nécessite d'avoir recours à une banque des sondes • La méthode est peu rapide • Son coût est élevé • Il est possible de transmettre les sondes entre laboratoires
AFLP	<ul style="list-style-type: none"> • Permet un survol rapide de l'ensemble du polymorphisme du génome. • Elle est hautement reproductible • Il n'ya pas besoin de connaître une séquence et de créer des sondes spécifiques. • Elle permet la création facile et rapide de cartes génétique. • Permet la création d'un profil de transcrits qui reflète l'expression et la répression de gènes (AFLP- cDNA) • Cette technique peut être appliquée à de nombreuses espèces (animaux, plantes et bactéries). • Elle ne nécessite aucune connaissance préalable de séquences du génome de la plante étudiée, ni la construction des banques génomiques ou cDNA, à l'encontre des SSR ou des RFLP. 	<ul style="list-style-type: none"> • La génération d'une grande quantité d'information nécessite une analyse automatisée et la technologie informatique • Ce sont des marqueurs dominants • Ils sont souvent localisés aux centromères et aux télomères • Etant couverte par un brevet de la société néerlandaise Key gène qui a mis au point cette technique, est une méthode couteuse. • Ces différences limitent l'utilisation de l'AFLP à grande échelle pour des applications comme la sélection assistée par marqueurs.
SSR	<ul style="list-style-type: none"> • Les microsatellites sont des marqueurs Co-dominants. • Ils sont très largement utilisés • Il ya une grande fréquence de SSR dans le génome. • Les microsatellites sont bien répartis à travers tout le génome • Ils sont reproductibles • Les microsatellites sont faciles à manipuler • On observe un polymorphisme élevé de SSR dans la population humaine. 	<ul style="list-style-type: none"> • La préparation des microsatellites est très lourde car il faut cribler une banque génomique enrichie avec une sonde du microsatellite, séquencer les clones positifs, synthétiser les amorces oligonucléotidiques et tester les paires d'amorces dans un échantillon d'individus.

Les microsatellites ou SSR ont été signalés comme des marqueurs très polymorphiques abondants et omniprésents (Tautz, 1989, Weber et May, 1989). Il s'agit en fait des séquences très courtes, constituées de di-, tri- ou tétra-nucléotides répétés en tandem. Ces éléments sont uniformément répartis en plusieurs exemplaires sur l'ensemble du génome d'une espèce. Le polymorphisme de ces

séquences répétées repose sur la variation du nombre d'unités de répétition constituant le microsatellite. L'analyse des séquences SSR amplifiés par PCR s'effectue sur gel d'acrylamide.

Si les SSR constituent de bons marqueurs moléculaires (reproductibles, Co-dominants et aisés d'utilisation), leur caractérisation initiale est toutefois assez lourde. En effet, leur production doit passer d'abord par le clonage et le séquençage de ces éléments répétés, (Prat et al., 2006).

c. Amplification d'ADN par la technique PCR

La PCR est une technique d'amplification représente une évolution puisqu'elle permet d'obtenir quelques microgrammes d'une séquence à partir de quantités infimes d'ADN. Cette technique est basée sur les répétitions de réplication d'ADN à partir d'amorces spécifiques (Figure 6).

Les étapes nécessaires pour doubler la quantité de l'ADN cible constituant un cycle sont :

- **Etape de dénaturation** : cette étape se déroule entre 90°C et 95°C, pendant une minute à chaque cycle (Mullis et Falonna, 1987)
- **Etape d'hybridation de l'ADN** : cette étape importante et relativement critique s'effectue pendant 2 minutes à une température approximativement égale au T_m d'oligonucléotide (Mullis et Falonna, 1987)
- **Etape de la synthèse d'ADN** : elle s'effectue à 72°C, température optimale de la synthèse de l'ADN par la taq polymérase (Mullis et Falona, 1987).

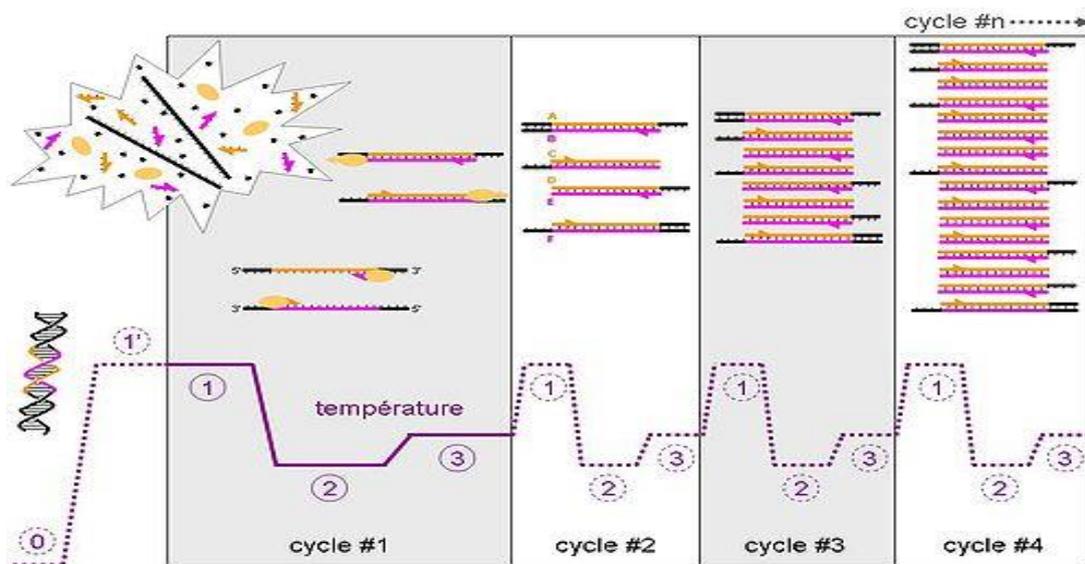


Figure 6 : Programme d'amplification PCR (Mullis et Falona, 1987).

Chapitre II : Matériel et Méthodes

I. MATERIEL VEGETAL ETUDIE

Le matériel végétal utilisé dans l'étude de la variabilité génétique est les feuilles lyophilisées du blé pour l'étude génotypique, et les graines de blé pour l'étude phénotypique. L'objectif de cette étude est de détecter le polymorphisme existant entre les 14 accessions (tableau 3), dix de blé dur et quatre de blé tendre cultivées au champ du Centre Régionale de la Recherche Agronomique de Rabat.

Tableau 3 : Différentes accessions étudiées.

Nombre d'Echantillon	N° d'Echantillon	Nom d'accession	Origine	Taxon
1	19BW0429	PI542668	Algérie	<i>T. aestivum</i>
2	19BW0428	PI542667		<i>T. aestivum</i>
3	19BW0426	PI542663		<i>T. aestivum</i>
4	19BW0422	PI542658		<i>T. aestivum</i>
5	19DW0292	Razzek	Tunisie	<i>T. durum</i>
6	19DW0290	19		<i>T. durum</i>
7	19DW0175	DW4578	CIMMYT/ Mexique	<i>T. durum</i>
8	19DW0174	DW4574		<i>T. durum</i>
9	19DW0171	DW4448		<i>T. durum</i>
10	19DW0166	DW3944		<i>T. durum</i>
11	19DW0164	DW2176		<i>T. durum</i>
12	19DW0144	GUEMGOUM RKHEM	Algérie	<i>T. durum</i>
13	19DW0129	BIDI 17 / WAHA // BIDI 17		<i>T. durum</i>
14	19DW0103	19	Maroc	<i>T. durum</i>

II. ETUDE DU POLYMORPHISME PHENOTYPIQUE DU BLE

Les caractéristiques phénotypiques ont été et continuent d'être utilisées comme étant des éléments indispensables dans la classification définitive des organismes vivants. Jusqu'à nos jours, elles ont constitué le principal outil descriptif utilisé pour caractériser une collection ou germoplasme donné et pour identifier et différencier les types sauvages des cultivars.

Cette étude est menée pour évaluer les caractéristiques morphologiques des 14 accessions du blé. Ces dernières vont être scannées, puis analysées à l'aide du logiciel GRAIN SCAN.

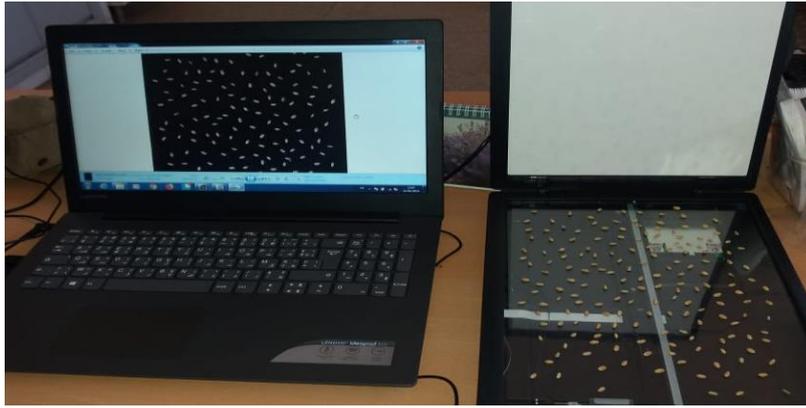


Figure 7 : Appareil de Grain Scan

Grain Scan (Scanneur Lise 220), est un logiciel permettant de mesurer le rendement (surface, périmètre, longueur, largeur et le poids), La qualité et la dormance du grain de blé à partir d'images capturées à l'aide de scanners à plat grand public, et ce de manière robuste et normalisée.

La mesure des caractéristiques des grains fait partie intégrante de la sélection des céréales notamment le blé et de la recherche sur le contrôle génétique du développement des semences. Les mesures telles que le poids en milliers de grains sont rapides, mais ne donnent pas d'indication de variation au sein d'un échantillon. La taille des grains représente l'un des composants principaux du rendement, elle contribue à la vigueur des semis et les grains plus gros peuvent entraîner une augmentation du rendement en mouture. La dormance de la graine est également importante pour la sélection des variétés de céréales car elle affecte la qualité et l'attrait du grain transformé, et est également associée à la dormance chez plusieurs espèces.

III. ETUDE DU POLYMORPHISME GENOTYPIQUE DU BLE

1. Extraction de l'ADN végétal

Les feuilles récoltées au champ du domaine expérimental de INRA Rabat provenant des différents accessions mondiales sont conservées à (-80°C) puis sont lyophilisées pendant 2 jours.

L'ADN a été extrait en utilisant la technique décrite par Saghai-Marooof et al. (1984) et modifiée par Udupa et al. (1998). La composition de chaque solution du protocole est détaillé dans l'annexe 1.

20-30 mg de feuilles de blé lyophilisées sont broyées mécaniquement par des billes jusqu'à l'obtention d'une poudre homogène. Puis ajouter 1,5 mL d'un mélange composé du détergent ionique CTAB (2x) préalablement chauffé à 65°C et du β -mércaptoéthanol 0.2%. Ensuite les tubes sont placés dans un bain marie à 65°C pendant 1 heure, avec une agitation chaque 15 minutes.

Ajouter dans chaque tube 500 μ L du mélange chloroforme / alcool isoamylique (24 :1), suivie d'une centrifugation de 15 min à 13000 tours/min. Puis transférer la phase supérieure (le surnageant), tout en évitant la phase blanche constituée des protéines dans de nouveaux tubes de 2 mL, et ajouter 666 μ L d'isopropanol en remuant doucement jusqu'à l'homogénéisation de la solution et formation des filaments d'ADN. Les tubes sont incubés à une température ambiante pendant 30 min puis centrifugés à 4°C pendant 10 min à 13000 rpm. Après élimination des surnageants l'ADN sous forme de culot est lavé avec 1 mL d'éthanol 70%, et centrifugé de nouveau à 13000 rpm à 4°C pendant 5 min (Figure 8). Après séchage du culot sous la hotte, les tubes sont additionnés de 100 μ L d'eau purifiée et sont stockés à 4°C.

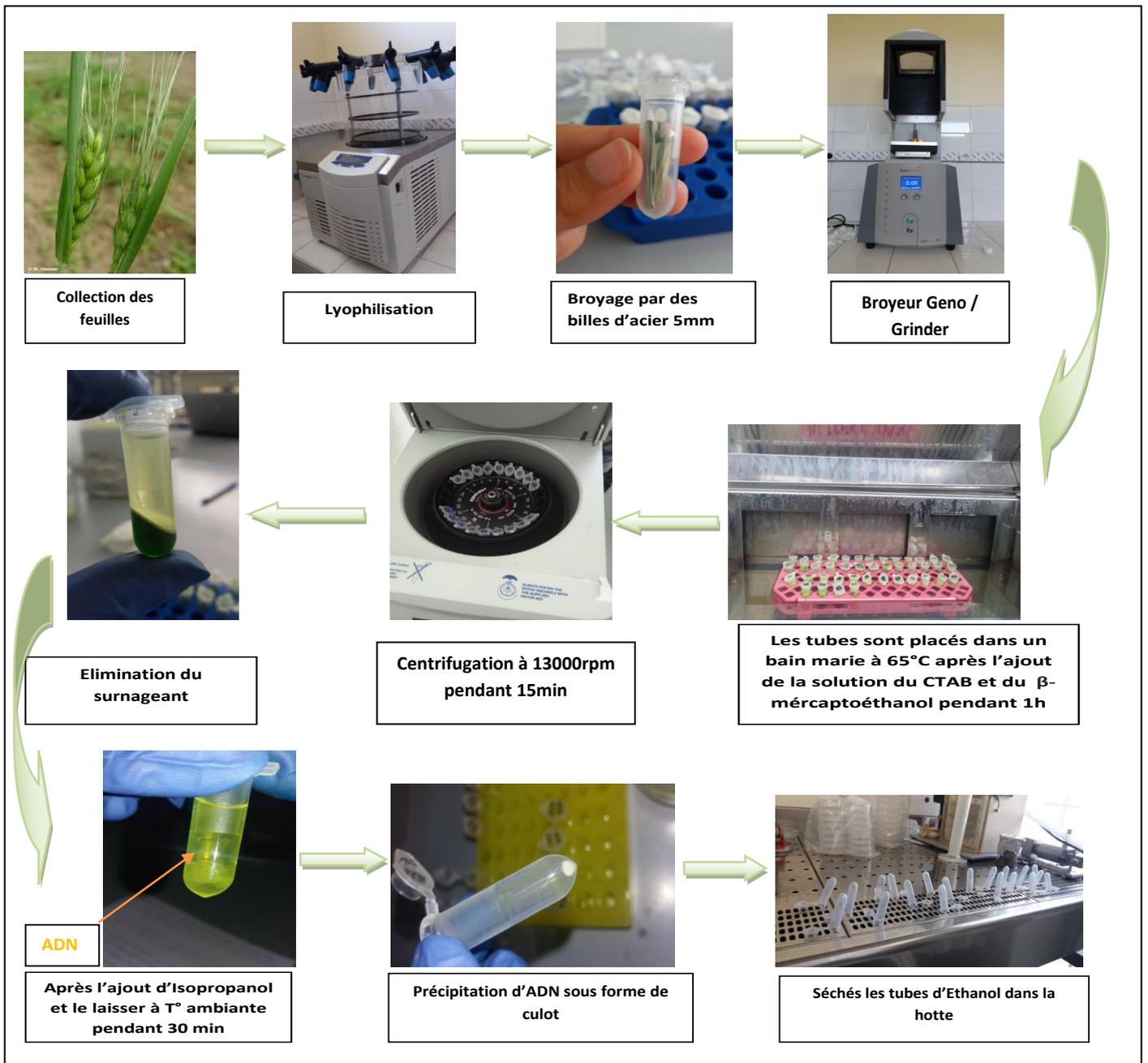


Figure 8 : *Etapes principales de l'extraction d'ADN (Saghai-Marooof et al., 1984 ; Udupa et al., 1999)*

La qualité et la quantité d'ADN isolé ont été évaluées sur gel d'agarose en comparant l'intensité de la bande de l'ADN avec la première bande du marqueur de taille à concentration connue (Marqueur Lambda DNA/EcoRI + HindIII - Promega).

2. Electrophorèse en gel d'agarose 1,2%

La technique de l'électrophorèse en gel d'agarose utilisée en laboratoire est basée sur la séparation des acides nucléique chargés négativement sous l'effet d'un champ électrique.

Le gel d'agarose 1,2% a été préparé après avoir dissous la poudre d'agarose dans un tampon de TBE 0,5% (annexe 2). Cette solution est portée à ébullition dans un four à microonde puis après un refroidissement dans un bain marie, le gel est coulé dans une plaque d'électrophorèse. La plaque recouverte du gel complètement solidifié a été placée dans la cuve à électrophorèse remplie de tampon de migration TBE 0,5%. Ensuite à partir du contenu des tubes à PCR préalablement composé de :

- ✚ 4 μ l d'eau bi-distillé
- ✚ 3 μ l de bleu de charge
- ✚ 3 μ l d'ADN

10 μ L des échantillons ont été introduits dans les puits du gel, puis déposer 5 μ L de marqueur de taille Lambda DNA qui permet de vérifier la taille des fragments amplifiés. Après migration, la coloration des bandes d'ADN se fait en incubant le gel dans une solution de bromure d'éthidium (BET) sous agitation pendant 20 min. C'est un intercalent qui se lie entre les bases de l'ADN double brin et émet une fluorescence rouge-orange sous lumière UV.

Après élimination du BET, le gel est rincé sous agitation avec de l'eau pendant 10 min, il a été ensuite placé dans un appareil à UV muni d'une camera connectée à un ordinateur. Les fragments d'ADN amplifiés sont visualisés sous lumière Ultra violette, ainsi le poids moléculaire de ces derniers est déterminé par rapport au marqueur de taille. En effet pour faciliter l'analyse et l'archivage des gels, des prises de vue ont été effectuées. Les photos ont été alors prises à l'aide d'un logiciel appelé EASY Win (Figure 9).

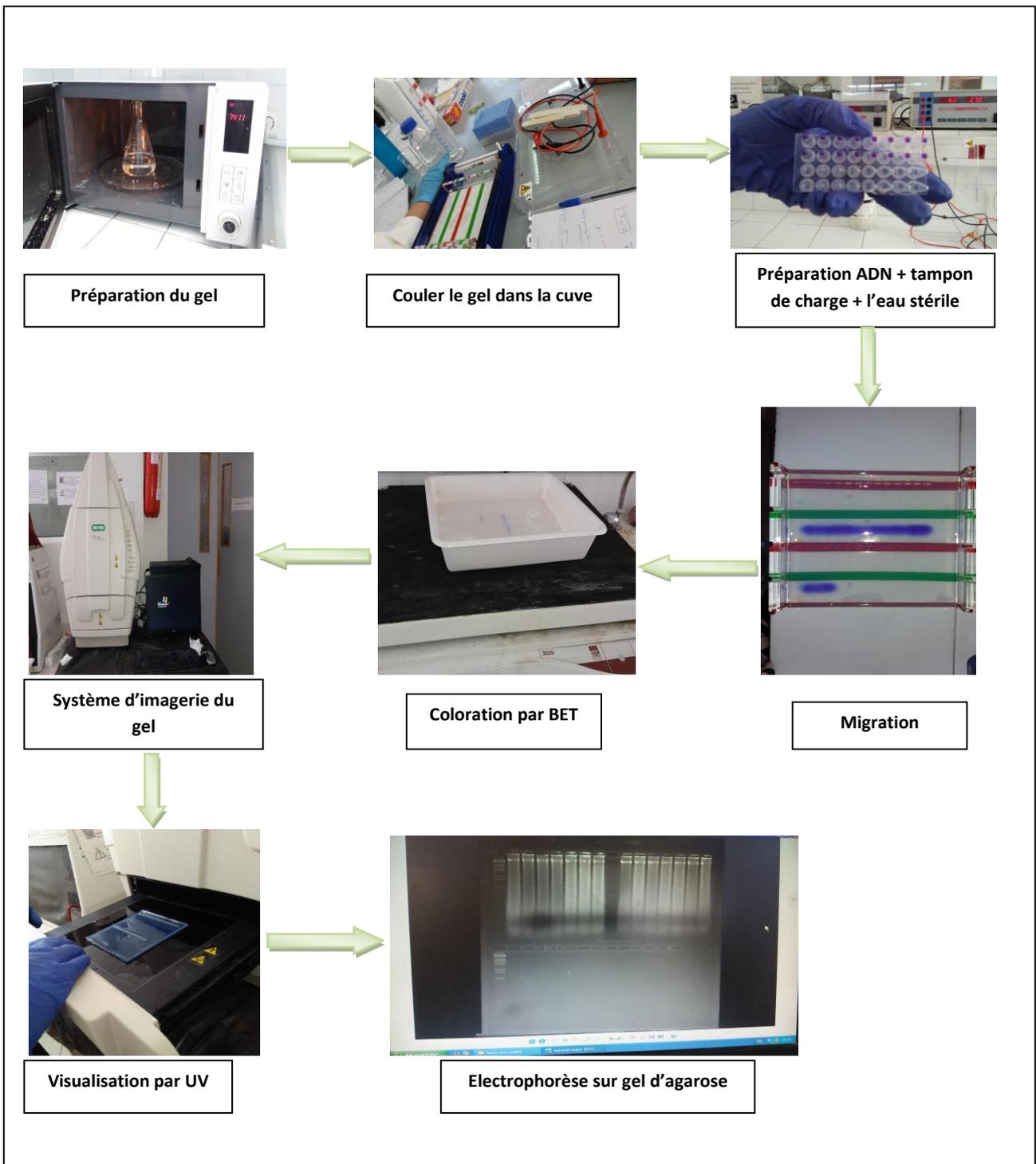


Figure 9 : *Electrophorèse sur gel d'Agarose*

3. Amplification de l'ADN extrait dans la PCR par les microsatellites

Après estimation des concentrations des bandes d'ADN, une dilution des échantillons d'ADN est effectuée à partir de « ADN stock ». Pour la réalisation de la PCR, le volume réactionnel utilisé de 10 μ l, 8 μ l du mixte est préparé comme suit :

Tableau 4 : Composant du mixte de la réaction PCR

Master Mix	Pour une réaction	Pour 15 réactions
Eau bi distillé stérile	3.95 μ L	59.25 μ L
Tampon (5x)	2 μ L	30 μ L
dNTPs (2mM)	1 μ L	15 μ L
Amorce (10 μ M)	1 μ L	15 μ L
Taq polymérase (5U)	0.05 μ L	0.75 μ L

2 μ l d'ADN a été ajouté à chaque accession sur le mixte.

Les trois étapes du cycle PCR ont été effectuées dans un Thermocycleur (de marque Eppendorf) permettant d'exposer les tubes contenant le mélange réactionnel à des températures différentes. Un programme PCR optimisé a été utilisé pour l'amplification de l'ensemble des fragments d'ADN de blé. Les conditions de ce programme sont :

Tableau 5 : Programme utilisé pour l'amplification d'ADN du blé

Etape	Temps	Température
Dénaturation initiale	3 min	94°C
Dénaturation	30 secs	94°C
Hybridation	35 secs	X°C
Elongation	60 secs	72°C
Polymérisation finale	5 min	72°C
Refroidissement à 4°C		

Les réactions d'amplification PCR de l'ADN ont été faites par six amorces microsatellites, Les marqueurs sont de trois types Xgwm, Xwmc et Xbarc (Tableau 6).

L'ensemble de ces marqueurs SSR ont été sélectionnés dans la base de données.

Tableau 6 : Marqueurs microsatellites utilisés pour l'analyse de la diversité des populations locales de blé dur et de blé tendre utilisé dans l'expérience. (Grain gènes)

Locus	Séquence	Chromosome	Tm en °C
Xgwm397	5'-TGTCATGGATTATTTGGTCGG-3' 3'-CTGCACTCTCGGTATACCAGC-5'	4A	55°C
Xwmc273	5'-AGTTATGTATTCTCTCGAGCCTG-3' 3'-GGTAACCACTAGAGTATGTCCTT-5'	7B	51°C
Xgwm165	5'-TGCAGTGGTCAGATGTTTCC-3' 3'-CTTTCTTTTCAGATTGCGCC-5'	4A	60°C
Xbarc98	5'-CCGTCCTATTCGCAAACAGATT-3' 3'-GCGGATATGTTCTCTAACTCAAGCAATG-5'	2B	55°C
Xwmc147	5'-AGAACGAAAGAAGCGCGCTGAG-3' 3'-ATGTGTTTCTTATCTGCGGGC-5'	1D	61°C
Xgwm3	5' GCAGCGGCACTGGTACATTT 3' 3' AATATCGCATCACTATCCCA 5'	3D	55°C

4. Electrophorèse en gel d'acrylamide à 6%

Le gel d'acrylamide a pour avantage de permettre la migration de petits fragments d'ADN. Contrairement à celle effectuée avec un gel d'agarose, elle se réalise verticalement (figure 10).

Prélever 22,5 mL de la solution d'acrylamide qui a été préalablement préparé (Annexe 3). Dans un bûcher, ajouter à cette solution 15 mL de TBE 5x et compléter avec l'eau distillé jusqu'à 150 mL. Puis pour ce volume de 150 mL de la solution, nous avons ajouté deux agents polymérisant : 400 µL de persulfate d'ammonium (APS) 25% (initiateur de la polymérisation), et 111 µL de TEMED (accélérateur de polymérisation). Ce mélange préparé est coulé entre les plaques d'électrophorèse. La migration est réalisée avec le tampon TBE 0,5x.

Ensuite à partir du contenu des tubes à PCR préalablement mélangé avec 5 µL de bleu de charge (Annexe 3), faire migrer 7 µL de chaque échantillon à 300 V pendant 90 min. Incuber le gel dans une solution de BET, puis rincer avec de l'eau. Estimer la taille des fragments d'ADN à l'aide du marqueur de taille 100pb.

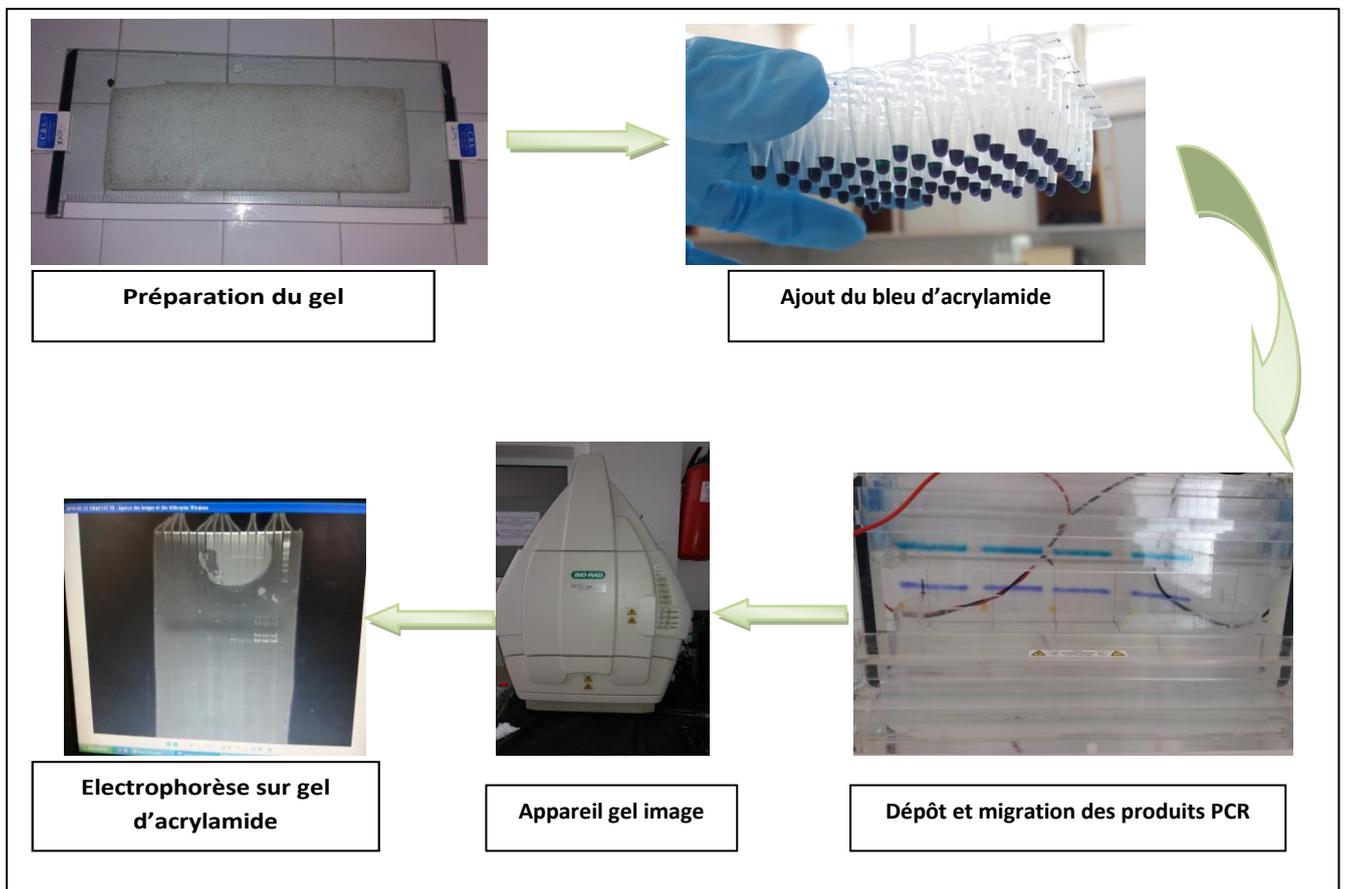


Figure 10 : *Electrophorèse sur gel d'acrylamide 6%*

IV. ANALYSE DES DONNEES

Les allèles amplifiés par amorces SSR ont été notés par présence (1) et absence (0) et la diversité génétique a été calculé utilisant l'indice de diversité de Nei, (1987):

$$H = n / (n-1) (1-\Sigma p^2)$$

Dont:

- n est le nombre des échantillons et p est la fréquence de l'allèle

La distance génétique entre les différentes accessions du blé 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 (liu, 2004), pour calculer le nombre d'allèles, l'indice de la diversité génétique et la valeur informative sur le polymorphisme du marqueur PIC (Botstein, 1980), et cela a été fait pour chaque locus. La distance génétique entre chaque paire de variété a été mesurée en calculant la fréquence d'allèle partagé (Jin et Chakraborty, 1993). Le dendrogramme Neighbor-joining a été généré par la méthode (Saitou et Nei, 1987) utilisant PowerMarker et visualisé employant le logiciel MEGA5 (Tamura et al., 2011).

Chapitre III : Résultats et Discussion

I. ANALYSE PHENOTYPIQUE DES POPULATIONS DE BLE

Les traits agro-morphologiques liés à la forme des graines étudiés à l'aide du logiciel «Grain scan». Ainsi que le poids des graines qui sont utilisées a été mesuré par une balance. L'étude de l'aspect des graines a révélé une différence de la surface, périmètre, longueur, largeur et la couleur entre les 14 accessions du blé, elle est important pour expliquer le rendement de la récolte, et influencée par la nutrition de la plante et la durée de la période de remplacement des graines, (Tableau 7).

Tableau 7 : Mesure statistiques de l'aspect de la plante établi par « Grain scan »

Accession	Origine	Nombre de graines	Surface (mm ²)	Périmètre (mm)	Longueur (mm)	Largeur (mm)	Poids en (g)	Poids de milles graines en (g)
BW 422	Algérie	208	12.92	18.66	6.27	2.61	5.32	25.58
BW 426		132	14.91	19.39	6.26	6.26	4.95	37.50
BW 428		109	20.83	23.99	8.11	3.25	5.57	51.10
BW 429		111	10.9	17.49	5.8	2.4	2.45	22.07
DW 103	Maroc	208	19.47	21.5	6.97	3.53	11.1	53.37
DW129	Algérie	157	20	22.16	7.28	3.49	9.04	57.58
DW 144		132	24.45	24.95	8.29	3.73	9.71	73.56
WD 164	CIMMYT/Mexique	160	21.17	22.64	7.37	3.64	9.98	62.38
DW 166		200	20.36	22.99	7.5	3.45	10.7	53.50
DW 171		146	21.84	23.19	7.57	3.64	9.5	65.07
DW 174		168	21.69	23.03	7.515	3.66	10.27	61.13
DW 175		157	17.7	21.08	6.92	3.24	7.47	47.58
DW 290	Tunisie	214	19.6	22.124	7.211	3.433	11.32	52.90
DW 292		181	21.99	23.43	7.67	3.64	11.308	62.48

Nous avons constaté que blé dur ont une grande surface comparée aux 4 accessions de blé tendre : DW 144 d'Algérie donne une grande surface de 24,4 mm² et BW 429 d'Algérie donne une faible surface de 10.9 mm². Le poids de milles graine montre que l'accession DW 144 provenant de l'Algérie à la plus grande valeur de poids de milles graines de l'ordre de 73,56 g. La plus faible valeur correspond à BW 429 qui est d'origine Algérienne avec 22,07 g par 1000 graines.

II. ANALYSE MOLECULAIRE DES POPULATIONS DE BLE

1. Test qualité d'ADN extrait

L'extraction de l'ADN génomique des plantes de blé dur et de blé tendre par la technique de CTAB (Saghai-Marouf et al., 1984), suivie par l'analyse qualitatif des ADN extraits ont été réalisés (Figure 12). L'analyse des résultats a permis de mettre en évidence la présence de l'ADN génomique de bonne qualité et a montré des bandes fluorescentes d'intensités variables. Après comparaison avec le marqueur de taille « Lambda EcoR I + Hind III » (Figure 11), les bandes d'ADN de nos échantillons se situent soit au même niveau ou à un niveau supérieur de la première bande du marqueur dont la taille est de 21 226 pb. Les bandes de forte intensité traduisent des concentrations élevées d'ADN extrait.

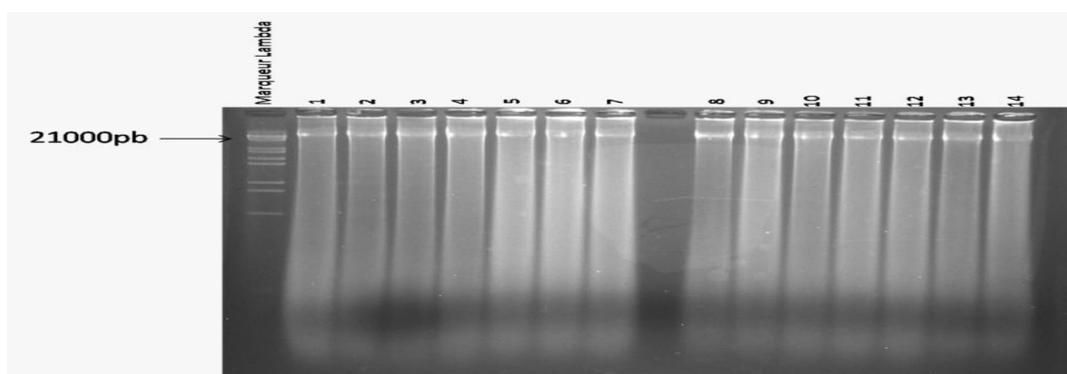


Figure 11 : Profil de migration des échantillons d'ADN extraits des variétés de blé sur gel d'agarose 1,2%

Après dilution des échantillons pour avoir des concentrations finales de 20 ng, la séquence recherchée au sein des génomes analysés a été amplifiée par la technique des microsatellites. Le choix de ces derniers est basé sur le fait qu'ils détectent un polymorphisme élevé (Gupta et al., 1996).

2. Résultats d'amplifications d'ADN par les amorces microsatellites

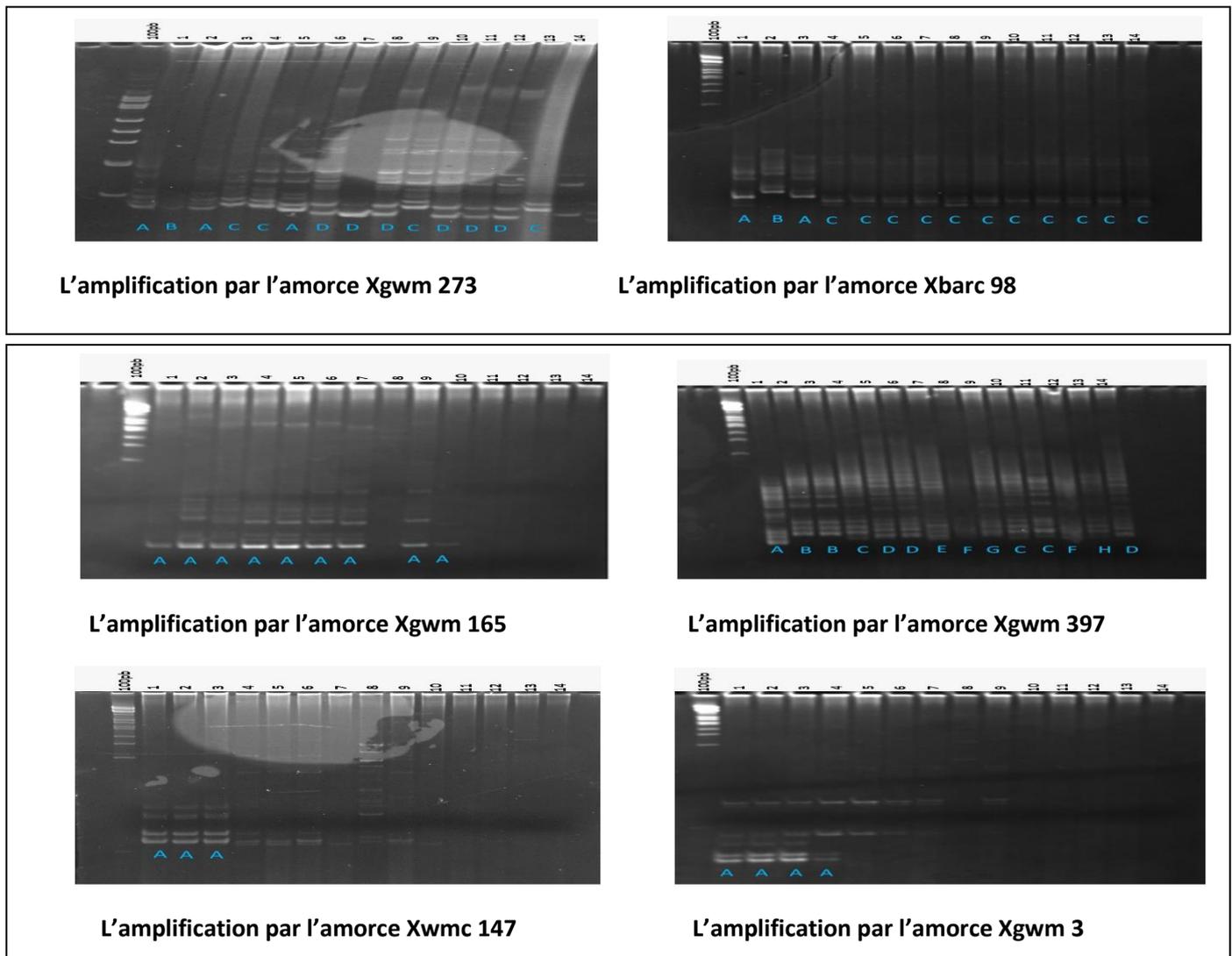


Figure 12 : Profils d'amplification par différentes amorces sur gel d'acrylamide 6%

Le nombre d'allèles varie d'une amorce à une autre. En effet, les accessions qui contiennent le plus grand nombre d'allèles, présentent un polymorphisme et celles qui contiennent un seul allèle présente un monomorphisme, (Figure 12).

3. Nombre d'allèles et indice de diversité génétique

Les bandes de différentes tailles sont dues à la différence de tailles en paire de bases des microsatellites amplifiés. Chaque bande claire dans le gel représente un allèle. Alors, chaque amorce a donné un nombre de bandes qui correspond au nombre d'allèles.

Le nombre d'allèles détectés ainsi que l'indice de la diversité génétique (H) et le PIC obtenu à chacun des loci SSR utilisés dans cette présente étude sont présentés au tableau 8.

Tableau 8 : Diversité génétique calculé chez les variétés du blé

Marqueur	Nombre d'allèles	Indice de diversité génétique	PIC
Xgwm 273	4	0.684	0.626
Xbarc 98	3	0.357	0.325
Xgwm 165	1	0.000	0.000
Xgwm 397	8	0.847	0.829
Xwmc 147	1	0.000	0.000
Xgwm 3	1	0.000	0.000
Total	18	-	-
Moyenne	3	0.315	0.297

L'amorce Xgwm 397 a généré le nombre d'allèles le plus élevé. Elle a donné huit allèles chez les populations du blé. Concernant la diversité génétique, l'indice le plus élevé (0,847) a été obtenu chez les accessions de blé dont l'ADN a été amplifié par l'amorce Xgwm 397, alors que l'indice le plus faible est de 0 est enregistré par les deux amorces de Xwmc 147-1D et Xgwm 3-3D (Tableau 8).

La moyenne de l'indice de diversité est de 0,315 ; ce qui veut dire que l'ensemble des accessions utilisées sont différentes génétiquement. La moyenne de PIC est de 0,297 avec la plus grande valeur est de 0,829 de PIC.

4. Distance génétique

Tableau 9 : Distance génétique entre les 14 accessions étudiées

OUT	1	10	11	12	13	14	2	3	4	5	6	7	8	9
1	0													
10	0.75	0												
11	0.0001	0.333	0											
12	0.0001	0.667	0.333	0										
13	0.0001	0.667	0.333	0.333	0									
14	0.0001	0.333	0.667	0.667	0.67	0								
2	0.5	0.75	0.0001	0.0001	0.0001	0.0001	0							
3	0.167	0.75	0.0001	0.0001	0.0001	0.0001	0.333	0						
4	0.75	0	0.333	0.667	0.67	0.333	0.75	0.75	0					
5	0.75	0.25	0.667	0.667	0.67	0	0.75	0.75	0.25	0				
6	0.5	0.5	0.667	0.667	0.67	0.333	0.75	0.5	0.5	0.25	0			
7	0.75	0.5	0.333	0.333	0.33	0.667	0.75	0.75	0.5	0.5	0.5	0		
8	0.0001	0.667	0.333	0	0.33	0.667	0.0001	0.0001	0.667	0.667	0.667	0.333	0	
9	0.75	0.5	0.333	0.333	0.33	0.667	0.75	0.75	0.5	0.5	0.5	0.25	0.333	0

1: PI542668, 2: PI542667, 3: PI542663, 4: PI542658, 5: Razzek, 6: BNGT-19, 7: DW4578, 8: DW4574, 9: DW4448, 10: DW3944, 11: DW2176, 12: GUEMGOUM RRRKHEM, 13: BIDI17/WAHA/BIDI17, 14: Ramdani-19.

Les valeurs de la distance génétique varient entre 0 et 0,75

La plus petite distance a été observée entre 4 et 10, 8 et 12, 5 et 14, Alors que la plus grande valeur a été révélée entre 1 et 10, 2 et 4, 3 et 7,... ect (Tableau 9).

Une distance génétique faible entre deux individus différents indique automatiquement une similarité génétique élevée. Alors que les grandes distances génétiques indiquent que les individus en question sont très différents génétiquement.

Les paires d'accessions qui ont eu une distance génétique nulle sont probablement les mêmes, donc elles vont être éliminées.

5. Arbre phylogénique

Le dendrogramme montrant la relation génétique entre les 14 variétés est présenté dans la Figure 16. En utilisant les six microsattellites, nous avons pu différencier toutes les variétés étudiées. La distance génétique la plus faible était entre les deux variétés PI542668 et PI542663, alors que la distance génétique la plus élevée se trouve entre la variété PI542667 et les variétés PI542668 et PI542663. En plus, en comparant les autres distances, la variété DW4578 était la plus distante des autres variétés. Ces résultats nous confirment le bon choix des variétés de blé actuellement employés dans cette étude et qui seraient adéquates pour améliorer la diversité génétique chez les futures variétés.

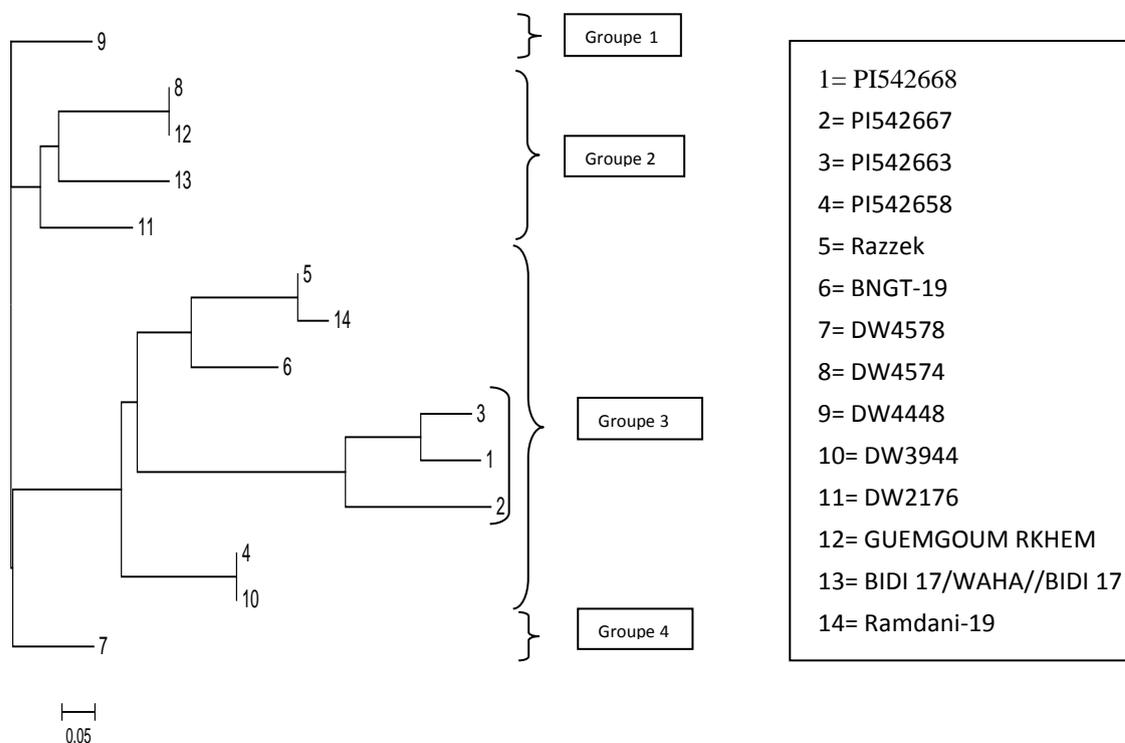


Figure 13 : Dendrogramme en utilisant le logiciel power marker

Le dendrogramme sépare les accessions en quatre groupes (Figure 13) :

- **Groupe 1** : comporte une seule variété : DW4448.
- **Groupe 2** : contenant les quatre accessions : DW4574, GUEMGOUM RKHEM, BIDI17/WAHA//BIDI17 et DW2176.
- **Groupe 3** : Contient les variétés suivantes : Razzek, Ramdani-19, BNGT-19, PI542663, PI542668, PI542667, PI542658 et DW3944.
- **Groupe 4** : constitué une seule variété : DW4574.
-

Dont le 3^{ème} groupe représente les trois accessions du blé tendre : PI542663, PI542668 et PI542667 qui sont séparé de PI542658 par une grande distance de 0,75 donc ça nous confirme les résultats des profils électrophorétiques sur gel d'acrylamide des deux amorces Xwmc 147-1D et Xgwm 3-3D, donc l'accession 4 n'appartient pas au blé tendre.

La distance génétique nous renseigne sur la relation génétique entre les différents échantillons. Dans l'amélioration génétique du croisement il est préférable de croiser celles qui ont une distance génétique élevée pour avoir de nouvelles variétés. En ce qui concerne les variétés : DW4574 et GUEMGOUM RKHEM, Razzek et Ramdani-19, PI542658 et DW 3944, elles sont très proches et ont une distance génétique très faible. Il faut donc utiliser d'autre amorces, en effet, les 6 marqueurs ne sont pas suffisants pour séparer ces quatorze accessions du blé.

Conclusion et Perspectives

Ce travail avait comme but de mesurer la diversité génétique de l'espèce *L. Triticum* à deux niveaux: Le phénotype qui représente une combinaison de caractères individuels résultant d'un génotype et son interaction avec l'environnement ainsi qu'au niveau du génotype. Les marqueurs d'ADN sont des outils utiles pour décrire les relations génétiques. Alors que les marqueurs phénotypiques peuvent fournir des informations sur les réponses adaptatives aux conditions environnementales et même sur la diversité génétique.

Cette étude traite de l'application des marqueurs moléculaires dans l'amélioration génétique du blé comme outil d'analyse de la diversité génétique. Dans un premier temps, nous avons déterminé la relation génétique entre les variétés du blé en utilisant les marqueurs microsatellites (SSR). L'analyse microsatellites nous a généré des informations sur la relation génétique entre les variétés. Ce qui est très utile dans le programme de la sélection et l'identification des variétés appropriées qui peuvent être utilisées comme parents dans les programmes de croisements.

Nous avons constaté d'après les résultats phénotypiques de Grain Scan, que les grains du blé dur ont une grande surface par rapport aux celles du blé tendre, ainsi que pour les autres caractères (périmètre, longueur, largeur et le poids).

Utilisations des six marqueurs microsatellites sur les 14 accessions de *L.Triticum* comme outil d'analyse de la diversité génétique permet d'identifié le nombre d'allèle qui varie d'une amorce à une autre, alors ce qu'on a remarquées d'après cette étude, et surtout pour les deux amorces qui sont situés sur le chromosome D : Xgwm3-3D et Wwmc147-1D, que l'accession 4 = PI542658 à était parmi l'ensemble de blé tendre mais on a découvert que cet échantillon appartient au blé dur, et ces résultats sont confirmés par le dendrogramme tant que, l'accession de PI542658 été plus distante des autres variétés de blé tendre.

Alors comme perspective on se propose d'utiliser d'autres amorces hautement polymorphes pour étudier une large gamme d'accessions provenant de plusieurs pays. Les accessions distantes, seront très intéressantes dans les programmes de croisement afin que la progéniture soit variable et aura une grande diversité.

Références bibliographiques

- Aguiriano E., Ruiz M., Fite R. et Carrillo JM., (2006).** Analysis of genetic variability in a sample of the durum wheat (*Triticum durum* Desf.) Spanish collection based on gliadin markers. *Genet. Resour. Crop Ev.* 53: 1543–1552.
- Ait Kaki S., (2008).** Contribution à l'étude de l'interaction génotype x milieu, pour la qualité technologiques chez le blé dur en Algérie. Thèse Doctorat ès Sciences. Université Badji Mokhtar Annaba, Algérie. 174p.
- Bonjean A. (2001).** Histoire de la culture des céréales et en particulier de celle du blé tendre (*Triticum aestivum* L.) In S. Le Perchec, P. Guy, A. Fraval : Agriculture et biodiversité des plantes. Dossier de l'environnement de l'INRA, 21 : 29-37.
- Bonneuil C., Roerich R et Anglade P., (2009).** Innover autrement, la recherche face à l'avènement d'un nouveau régime de production et de régulation des savoirs en génétique végétale, Dossier de l'environnement de l'INRA, 30, 2006, P : 29-51.
- Botarela. (2012).** *Triticum aestivum* (Blé tendre) *Triticum turgidum* (Blé dur), <http://botarela.fr/Poaceae/Taxons/Triticum-turgidum-subsp-durum.html>, <http://botarela.fr/Poaceae/Taxons/Triticum-aestivum.html> [Consulté le 9, mai 2016].
- Botstein D., White R.L., Skolnick M. and Davis R.1980.** Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms. *Am. J. Hum Genet.* 32 : 314-331
- Boutigny A. (2007).** Etude de l'effet de composés du grain de blé dur sur la régulation de la voie de biosynthèse des trichothécènes B : purification de composés inhibiteurs. Analyse des mécanismes impliqués. Thèse de doctorat en Biologie. Université Bordeaux, France .404p
- Croston L., Williams C. (1981),** A world survey of wheat genetic resources. *IBPGR. Bulletin/80/59* :37-38
- Clarke B., Feldman L., Adams W. (6 juillet 2006).** ‘ ‘ La biologie de *Triticum turgidum ssp. Durum* ‘ ‘. Document d'accompagnement des Critères d'évaluation du risque environnemental associé aux végétaux à caractères nouveaux : Direction des produits végétaux. Agence canadienne d'inspection des aliments : 15
- Debiton C., Bancel E., Chambon C., Rhazi L., Branlard G. (2010),** Effect of the three waxy null alleles on enzymes associated to wheat starch granules using proteomic approach. Accepted for publication in *Journal of Cereal Science* Ref.: Ms. No. JCS10-169R1.
- Feillet P. (2000),** Des blés aux farines. In : *Le grain de blé : composition et utilisation.* Pp. 17-24. Paris : INRA
- Feldman M. (1994),** Cytogenetic activity and mode of action of the pairing homologous gene of wheat. *Crop Sci* 33 : 894-897.
- Garnsey P. (1983),** Hopkins K., Whittaker C.R. (editors), *Trade in the Ancient Economy, Grain for Rome.* London.
- Hamadache, A. (2013),** *Eléments de phytotechnie générale : Grandes Culture* Tom I : Le blé. 1ère édition. Mohamed Amrani. 49-69

Jiang, G. (2018), Encyclopedia of Applied Plant Sciences, (Second Edition) Editor(s)-in-Chief: Brian Thomas, Brian G Murray and Denis J Murphy, ISBN: 978 : 0-12-394808-3.

Jin L., Chakraborty R. (1993), Estimation of genetic distance and coefficient of gene diversity from single-probe multilocus DNA fingerprinting Data. *Molecular Biology and Evolution* 11:120-127.

Jlibene M., Chafai A. (2003), variétés de blé tendre adapté au nord-ouest du Maroc. *Bulletin de transfert et technologie*. 88 : 1-4.

Jlibene M. (2005), Amélioration génétique du blé tendre, in : La création variétale à l'INRA méthodologie acquis et perspectives. Edité par : F.A. Andaloussi, A. Chahbar. Rabat : INRA.

Jlibene M. (2009), Amélioration génétique du blé tendre au Maroc à l'aube du 21^{ème} siècle. Edité par M. Jlibene. Rabat : INRA.

Lepage, M.P., Bourgeois, G., Bélanger G. (2012), Indices agrométéorologiques pour l'aide à la décision dans un contexte de climat variable et en évolution. Québec.

Liu K., Muse S.V. (2005), Power Marker : An integrated analysis environment for genetic marker analysis. *Bioinformatics* 21 :2128-2129.

Mackey J. (1968), Relationships in the Triticinae. In Third International Wheat Genetic Symposium. K. W. Findlay and K. W. Shepherd, eds. *Proc Aust Acad Sci.*, Canberra, Australia. Butterworths, London : 39-50.

MADRPM. (1999), programme de sécurisation de la production céréalière, 1999-2002 (Rapport). Ministère de l'agriculture, du développement rural et des pêches maritimes, Rabat, Maroc.

Muliss K.B et Falonna F. (1987), Specific Synthesis of DNA in vitro via a polymerase-Catalyzed Chain Reaction. *Methods. Methods in Enzymology* 155 : 350-355.

Naville M. (2005), La biodiversité des espèces cultivées : Analyse dans le cas du blé, Paris: Université Paris XI, Paris, 20p.

Nei M., Saitou N. (1987), The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular Biology and Evolution* 4(4):406-25.

Prat D., Faivre Rampant A., Prado. (2006), « Analyse du Génome et Gestion des ressources génétique forestières ». INRA Edition. P456.

Saghai-Marooif Ma, Soliman K, Jorgensen Ra, Allard Rw. (1984), Ribosomal DNA spacer length polymorphism in barley : Men-using microsatellite markers. *Theor Appl Genet* 105 : 699-707.

Saitou N., Nei M. (1987), The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular Biology and Evolution* 4:406-425.

Samouelian, F., Boccara, M., Gaudin V. (2009), Génétique moléculaire des plantes. Editions Quae. ISBN : isbn : 2759209776, 9782759209774

Sears Er. (1954), The aneuploids of common wheat. *Mo Agric Exp Stn. Res Bull.* 572 : 1-58.

Soltner D. (2005), La base de la production végétale Tom I. Le sol et son amélioration 24^{ème} Edi. Collection science et technique agricole. 472P.

Soumarey P.A. (2014), De l'origine de la vie et de l'homme, éditions du Panthéon, 2014, p.

Tamura K., Peterson D., Peterson N., Stecher G., Nei M., Kumar S. (2011), MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Molecular Biology and Evolution* 28:2731- 2739.

Tautz D. (1989), Hypervariability of simple sequences as a general source for polymorphic DNA markers. *Nucleic acids research*, 17(16) : 6463-6471.

Udupa Sm, Weigand F, Saxena Mc, Kahl G. (1998). Genotyping with RAPD and microsatellite markers resolves pathotype diversity in the ascochyta blight pathogen of chickpea. *Theor Appl Genet* 97 : 299-307.

Van Slageren, Mw (1994). Wild wheats : a monograph of Aegilops L. ICARDA/Wegeningen Agricultural University Papers. 94 : 1-512.

Zadoks J.C., Chang T.T., Konzak C. F. (1974), A decimal code for the growth stages of cereals. *Weed Research*, 14(6), 415 : 421. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3180.1974.tb01084>.

Webographie

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

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

<http://www.graingenes.org>

<http://www.omafra.gov.on.ca/french/crops/pub811/4planting.htm>

Annexes

Annexe 1

Solution nécessaire pour l'extraction

- Solution stock pour tris-HCl :

1 M Tris-HCL (PH=8)	Pour 100 mL
Tris base (Amresco)	12,114 g
Eau distillée	Compléter jusqu'à 100 mL

Ajouter le PH avec le HCl concentrée jusqu'à Ph=8.

- Solution stock de NaCl :

5 M NaCl	Pour 250 mL
NaCl (Merck)	73,05 g
Eau distillée	Compléter jusqu'à 250 mL

- Solution stock d'EDTA :

0,5 M EDTA (PH=8)	Pour 100 mL
EDTA (mresco)	186 g
Eau distillée	Compléter jusqu'à 100 mL

Ajuster le PH avec les pelètes de NaOH jusqu'à PH=8

- Solution stock du tampon d'extraction 2x CTAB :

2x CTAB	Volume final de 50 mL	Volume finale de 250 mL
1 M Tris-HCl (PH=8)	5 mL	25 mL
5 M NaCl	14 mL	70 mL
0,5 M EDTA (PH=8)	2 mL	10 mL
CTAB (Amresco)	1 g	5 g
Eau distillée	Compléter jusqu'à 50 mL	Compléter jusqu'à 250 mL

➤ Solution de Chloroforme / Alcool isoamylique:

Chloroforme / isoamyl alcool	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

➤ Rôle de chaque élément intervenant dans le protocole d'extraction.

Constituants	Rôles
NaCl	Stabilisation de l'ADN : les Na ⁺ se fixent avec les ions négatifs de l'ADN
EDTA	Inactivation de l'ADNase : c'est un agent chélateur qui se fixe avec les ions Mg ²⁺ qui sont des cofacteurs de l'ADNase ce qui l'inactive.
Tris-HCL	Inactivation de l'ADNase avec son PH basique (PH = 8,00)
CTAB	-Lyse des membranes cellulaires : rôle de détergent, il forme avec les phospholipides et les protéines membranaires des formes micellaires. -Désactive l'ADNase
Chloroforme isoamylique	Précipitation et solubilisation des imputés : il précipite les protéines, et les polysaccharides et solubilise les pigments chlorophyllien.
Iso-propanol	Précipitation de l'ADN : en se fixant aux molécules H ₂ O liées à l'ADN.
Ethanol 70%	Rinçage des Na ⁺ du CTAB lié à l'ADN
Température 65°C	Température optimale pour l'inactivation de l'ADNase.

Annexe 2

Solutions stock pour les gels

- Tampon de migration 5 X TBE:

5x TBE	Pour 1 L
Acide borique (Amresco)	27,5 g
Tris base (Sigma)	54 g
0,5 M EDTA (pH 8)	20 mL
Eau distillée	Compléter jusqu'à 1 L

Ajuster le pH avec l'acide borique jusqu'à pH 8.

- Gel d'agarose:

Solution d'agarose	Gel 1.2%	Gel 1.5%
Aarose (Promega)	3,6 g	4,5g
5x TBE	30 mL	30 mL
Eau ditillée	Compléter jusqu'à 300 mL	Compléter jusqu'à 300 mL

- Solution 40% d'acrylamide :

40% Acrylamide	Pour 50 mL	Pour 100 mL	Pour 250 mL
Acrylamide (Promega)	19,33 g	38,66 g	96,65 g
Bis acrylamide ou N, N'-Methylenebiacrylamide (Sigma)	0,67 g	1,4 g	3,35 g
Eau distillée	Jusqu'à 50 mL	Jusqu'à 100 mL	Jusqu'à 250 mL

- Solution de 6% acrylamide :

6% acrylamide natif	Pour 100 mL	Pour 150 mL
40% Acrylamide natif	15 mL	22 ,5 mL
5x TBE	10 mL	15 mL
Eau distillée	Jusqu'à 100 mL	Jusqu'à 150 mL

➤ Préparation d'ammonium persulfate (APS):

Soution d'ammonium persulfate (10 mL)	10 %	25 %
Ammonium persulfate (Pharmacia Biotech)	1 g	2,5 g
Eau distillée	10 mL	25 mL

➤ Polymérisation du gel d'acrylamide 6%:

Constituants	Pour 100 mL	Pour 150 mL
APS 25 %	250 µL	400 µL
TEMED	75 µL	111 µL

➤ Préparation du bleu d'agarose :

Bleu d'agarose	Pour 10 mL
1 M Tris-HCl (pH 8)	0,5 mL
5 M EDTA (pH 8)	0,1 mL
50 % Glycérol (Acro Organics)	5 mL
Eau de bromophénol	20 mg

➤ Préparation du bleu d'acrylamide :

Eau d'acrylamide	Pour 25 mL
Formamide (Roche)	24,75 mL
Bleu de bromophénol	12 mg
Xylene cyanole (Sigma)	12,5 mg
Eau distillée	1,25 mL

Annexe 3

Produits nécessaires pour la PCR

➤ Préparation de 2 mM dNTPs :

2 mM dNTPs	Pour 1000 µL
100 mM dATP (Promega)	20 µL
100 mM dTTP (Promega)	20 µL
100 mM dCTP (Promega)	20 µL
100 mM dGTP (Promega)	20 µL
Eau bi-distillée stérile	920 µL

➤ Préparation de l'amorce 10 pmol/µL :

Amorce F / R	Pour 500 µL
100 µM Amorce Forward (Sigma)	50 µL
100 µM Amorce Reverse (Sigma)	50 µL
Eau bi-distillée stérile	400 µL

Annexe 4

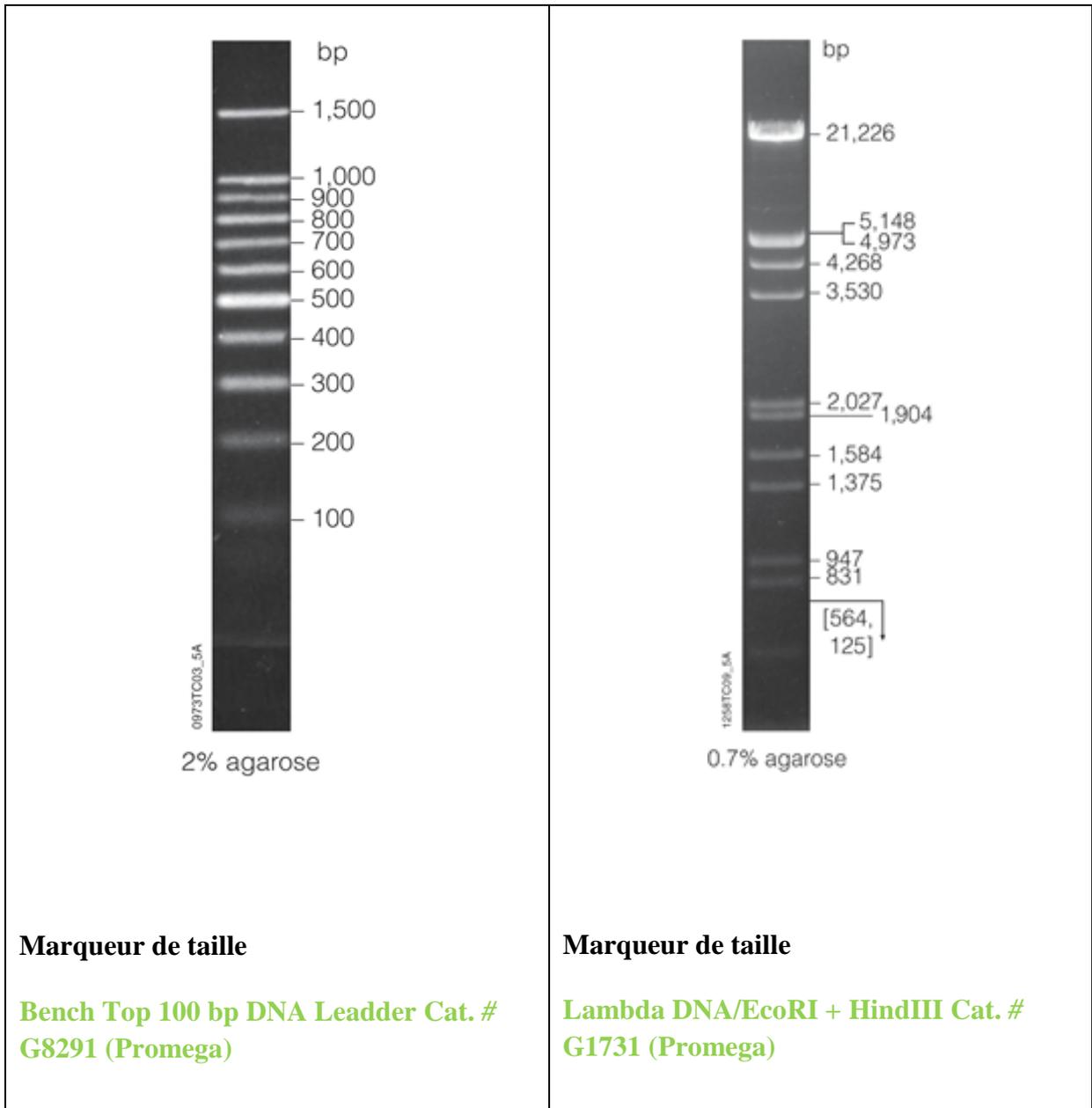
Solutions pour la coloration des gels

➤ Solution de bromure d'éthidium (BET):

Soution dilué de Bromure d'éthidium	Pour 1 L
Bromure d'éthidium (10 mg/mL)	100 µL
Eau distillée	Jusqu'à 1 L

Annexe 5

Figures des marqueurs de taille utilisés



Résumé

Le blé tendre et le blé dur sont deux grandes cultures au Maroc. Leur productivité est restreinte par le stress biotique et abiotique. Le changement climatique a aggravé de plus les problèmes. La solution la plus efficace pour gérer ces contraintes est par le développement des nouvelles variétés résistantes. L'intégration d'outils biotechnologiques comme la technique de la sélection assistée par les marqueurs moléculaires (SAM) dans la sélection conventionnelle améliore l'efficacité et l'efficience du programme de sélection du blé, et l'étude du polymorphisme entre les variétés du blé.

Dans cette étude nous avons caractérisé et estimé la diversité génétique présente dans une collection de blé, et d'étudier les changements de fréquence allélique et de la diversité génétique en réponse à la sélection des agriculteurs dans le cadre d'un programme d'amélioration génétique à la future, en utilisant les marqueurs phénotypiques et génotypiques.

Les résultats obtenus ont permis de montrer la révélation d'un polymorphisme chez quatorze accessions mondiales utilisant six amorces microsatellites. Le profil électrophorétique a été révélé sur deux gels, gel d'agarose à 1,2% et gel d'acrylamide, ce dernier s'est avéré le plus fiable.

Mots clés :

Blé tendre, blé dur, la diversité génétique, marqueurs phénotypiques, marqueurs moléculaires, amorces microsatellites.