



UNIVERSITE SIDI MOHAMMED BEN ABDELLAH

Projet de Fin d'Etudes

LST

Biotechnologie et Valorisation des Phyto-Ressources

Caractérisation phénotypiques et génotypiques (SSR) de la lentille (*Lens culinaris*)

Présenté par:

❖ SAIDI Rym

Encadré par :

- Pr MANNI Laila
- Dr. IRAQI Driss
- Dr. SRIPADA M.Udupa
- Dr. HENKRAR Fatima

Soutenu le: 11/06/2019

Devant le jury composé de :

- ✓ Pr MANNI Laila
- ✓ Pr SQALLI Hakima
- ✓ Dr. HENKRAR Fatima
- ✓ Dr. IRAQI Driss
- ✓ Dr. SRIPADA M.Udupa

Année universitaire 2018/2019

Résumé

L'étude des accessions de lentilles (*Lens culinaris*) de différents pays, au niveau morphologique et moléculaire sera utile pour comprendre leur diversité génétique, afin de gérer leur conservation et leur utilisation efficace dans les programmes d'amélioration. Dans ce contexte, Une étude phénotypique basée sur plusieurs traits morphologiques a été réalisée sur 16 accessions de lentilles, alors que l'étude moléculaire de ces 16 accessions en utilisant 4 marqueurs SSR a permis de mettre en évidence la présence de 13 allèles. L'indice de la diversité génétique était (0.402) c'est une valeur moyenne, et en utilisant les données fournis par les microsatellites, un dendrogramme a groupé les accessions de lentilles en 3 groupes. Une diversité génétique a été révélée sur un ensemble d'accessions qui vont être très utiles pour les prochains travaux d'amélioration de lentille afin de créer des nouvelles variétés.

Mots clés : lentille (*Lens culinaris*), indice de la diversité génétique, marqueur moléculaire, phénotype, SSR, allèle, dendrogramme.

Dédicace

A ma très *chère mère*

J'aimerai toujours te remercier pour tous ce que tu as fais jusqu'à maintenant, j'avoue vraiment que tu été pour moi la lumière qui me guide mes routes et qui m'emmène aux chemins de la réussite, c'est grâce à toi que je dois toute ma réussite.

A mon très *cher père*

Tu as toujours été a mes cotés pour me soutenir et m'encourager, ta présence a toujours été ma source de force pour affronter les différents obstacles
J'espère que ce travail sera le témoignage de ma gratitude et mon respect le plus profond.

A mon frère *Mamoune*

et mes sœurs *Aya* et *Ranya*

Puisse Dieu vous donne santé, bonheur, courage et surtout réussite

A toute ma famille, et à tous mes ami(e)s.

Saïdi Rym

REMERCIEMENTS

Tout d'abord, j'adresse mes remerciements à Monsieur AMRANI Khalid, Professeur et Chef département de la Filière BVPR à la Faculté des Sciences et Techniques de Fès. Un grand merci pour sa patience et ses précieux conseils.

Je tiens à remercier vivement Monsieur IRAQI Driss le Coordinateur de l'Unité de Recherche en Biotechnologie de l'INRA Rabat, pour avoir accepté de suivre ce travail tout au long de sa réalisation et d'assurer son encadrement, pour ses conseils et pour avoir pris le temps de discuter.

J'adresse tous mes remerciements au Dr. SRIPADA M.Udupa Généticien, Bio-technologiste et responsable de l'équipe biotechnologie pour son encadrement, ses interventions précieuses et les conseils et pour sa culture scientifique.

Mes remerciements vont également à Madame MANNI Laila Professeur à la Faculté des sciences et techniques de Fès, pour ses conseils dans la rédaction de mon rapport de stage, ses enseignements et son encadrement.

Je remercie également Madame SQALLI Hakima, Professeur à la Faculté des sciences et techniques de Fès. C'est avec un grand plaisir que j'ai appris que vous faites partie du Jury. Je suis très honorée.
Merci.

Je saisis également cette occasion pour adresser mes profonds remerciements à Madame HENKRAR Fatima pour sa confiance, sa patience, sa gentillesse, sa disponibilité, et ses conseils.

En fin, Je tiens à remercier toutes les personnes qui ont contribué au succès de mon stage qui m'ont conseillé, et qui m'ont aidé lors de la rédaction de ce rapport.

Un grand merci à mes parents, pour leurs conseils, leur confiance ainsi que leur soutien inestimable ainsi que leurs encouragements. Merci également à ma famille et mes amis pour leur soutien et leurs encouragements.

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.

Avant propos

Présentation de l'Institut National de la Recherche Agronomique "INRA" :

L'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. Il a connu dernièrement une réorganisation structurelle visant la modernisation de son processus de gestion.

Avec pour mission principale d'entreprendre les recherches pour le développement agricole au Maroc, l'INRA vise à :

- 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 compte 10 centres régionaux de recherche agronomique englobant 30 unités de recherche à travers le Royaume du Maroc.

Unité de Biotechnologie :

Mise en place en 2003, l'Unité de Biotechnologie se trouve au Centre Régional de la Recherche Agronomique de Rabat (CRRR Rabat).

Cette unité a été créée dans le cadre de la nouvelle stratégie et orientation de l'INRA, afin d'utiliser les nouvelles techniques de biotechnologie pour identifier des remèdes aux stress biotiques (virus, bactéries, champignons, parasites et ravageurs...) et abiotiques (sécheresse, salinité...) des plantes. Appelée à se positionner comme centre d'excellence dans le domaine de la biotechnologie, l'Unité a pour mission:

- Le développement, l'application et l'intégration des biotechnologies pour améliorer l'agriculture au Maroc;
- Le transfert de technologies aux laboratoires régionaux;
- La formation des chercheurs de l'INRA et des établissements nationaux.

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...**)

Les laboratoires équipés d'un matériel à la pointe de la technologie :

Les laboratoires qui constituent l'Unité sont munis de l'équipement indispensable à la réalisation des travaux sur le marquage moléculaire, l'étude d'expression de gènes, la culture in vitro et la transformation génétique : (séquenceur automatique, PCR quantitative et non quantitative...)

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

Présentation de l'ICARDA :

Le Centre International pour la Recherche Agricole dans les Régions Arides (ICARDA) est une organisation mondiale de recherche pour le développement. Depuis sa création en 1977 en tant qu'organisation à but non lucratif, **ICARDA** a développé des projets de recherche pour le développement dans plus de 50 pays dans le monde dans les régions arides, du Maroc en Afrique du Nord au Bangladesh en Asie du Sud.

ICARDA est l'un des quinze centres de recherche membres du groupe consultatif pour la recherche agricole internationale.

Le travail de fin d'étude a été effectué au sein de l'unité de biotechnologie de l'Institut National de la Recherche Agronomique de Rabat.

LISTE DES ABREVIATIONS :

- ADN: Acide désoxyribonucléique
- AFLP: Amplified Fragment Length Polymorphism
- APS: Amonium PerSulfate
- BET: Bromure d'Ethidium
- CRRAR: Centre Régional de la Recherche Agronomique Rabat
- CTAB: Cetyl Trimethyl Ammonium Bromide
- dNTP : 2'-désoxyribonucléoside 5'-triphosphate
- EDTA : Acide éthylène diamine tétra-acétique
- FAO: Food and agriculture organization
- Hg : Hectogramme
- Frq : Fréquence allèlique
- ICARDA : Centre international de recherche agronomique dans les zones arides
- INRA : Institut National de la Recherche Agronomique
- ISSR: Inter Simple Sequence Repeat
- kb: kilo base
- MgCl₂ : chlorure e Magnésium
- NaCl : Chlorure de sodium
- Na⁺ : Ion sodium
- Pb : Paires de bases
- PH : Potentiel hydrogène
- PCR : Polymerase chain Reaction (Réaction de polymérisation en chaîne)
- PIC: Polymorphism Information Content
- RAPD: Random Amplified Polymorphic DNA
- RFLP: Restriction Fragment Lenth Poymorphism
- Rpm : Rotation par minute
- SNP: Single Nucleotide Polymorphism
- SSR: Simple Sequence Repeat
- Taq : Thermus aquaticus (bactérie des sources chaudes)
- TBE : Tris-Borate-EDTA
- TEMED: Tétraméthyléthylènediam

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1: La classification de la lentille.....	2
Tableau 2 : Valeurs nutritionnelles de la lentille	4
Tableau 3 : Liste des variétés de lentille.....	5
Tableau 4 : Caractéristiques des marqueurs d'ADN les plus utilisés.....	9
Tableau 5 : Les différentes accessions étudiées.....	13
Tableau 6 : Composantes du mixte de la réaction PCR.....	17
Tableau 7 : Séquences d'amorce directes et inverses et températures d'hybridation utilisées pour l'amplification de 4 locus microsatellites	18
Tableau 8 : Suivi des étapes d'évolution des plantes étudiées	21
Tableau 9 : Diversité génétique calculé chez les accessions étudiées de lentille	26
Tableau 10 : Distance génétique entre les accessions étudiées	27

LISTE DES FIGURES

Figure 1: Morphologie d'une plante de lentille	3
Figure 2: Production mondiale de la lentille pendant l'année 2017 (FAOSTAT, 2019)	5
Figure 3: Grands producteurs de la lentille pour l'année 2017 (FAOSTAT, 2019)	6
Figure 4: Principales maladies et ravageurs de la lentille	7
Figure 5: Etapes de la technique du marqueur moléculaire SSR	10
Figure 6: Etapes d'amplification de l'ADN	12
Figure 7: Différentes caractéristiques phénotypiques étudiées chez la lentille	14
Figure 8: Etapes de l'extraction d'ADN suivant la technique de CTAB x 2 (Udupa et al, 1999)	16
Figure 9: Etapes de la technique d'électrophorèse sur le gel d'agarose	17
Figure 10: Etapes de la technique d'amplification d'ADN par la PCR	18
Figure 11: Etapes de la technique d'électrophorèse sur le gel d'acrylamide 6%	19
Figure 12 : Représentations graphiques de la variation du temps des différents stades de formation de vrilles jusqu'à 50% de maturité chez les accessions étudiées	23
Figure 13 : Représentations graphiques des différentes mesures de la hauteur chez les accessions étudiées	24
Figure 14 : Profil électrophorétique d'ADN total extrait à partir des accessions étudiées de la lentille sur le gel d'agarose 1,2 %	25
Figure 15 : Profils électrophorétiques des différentes amorces SSR sur gel d'acrylamide chez les accessions étudiées de la lentille après l'amplification par PCR-SRR	25
Figure 16 : Dendrogramme généré sur la base des données SSR des accessions étudiées de la lentille	28

SOMMAIRE

Introduction.....	1
Chapitre I : Etudes bibliographiques	
I. Généralités sur la lentille	2
1. Origine et historique de la lentille	2
2. Taxonomie	2
3. Données botaniques de la lentille	2
4. Valeurs nutritionnelles de la lentille	3
5. Mise au point des variétés de lentille	4
5.1. Aperçu historique	4
5.2. Les différentes variétés de lentille au Maroc	5
6. Production et répartition géographique	5
6.1. La répartition géographique et statistique mondiale de lentille	5
6.2. Production et répartition nationale de lentille	6
7. Problématique de la lentille au Maroc	6
II. Techniques d'analyses moléculaires	7
1. Définition d'un marqueur moléculaire	7
1.1. Principaux types de marqueurs moléculaires	8
1.2. Microsatellites SSR (Simple Sequence Repeat)	9
2. Amplification d'ADN par la technique de PCR	10
2.1. Définition	10
2.2. Principe	11
2.3. Les étapes de la technique	11
Chapitre II. Matériels et méthodes	
I. Analyses phénotypiques des accessions mondiales de la lentille	13
II. Analyses moléculaires des accessions mondiales de la lentille	14
1. Collecte des échantillons étudiés	14
2. Extraction d'ADN à partir des feuilles lyophilisées de la lentille	14
3. Electrophorèse sur le gel d'agarose	16
4. Amplification d'ADN extrait dans la PCR par les microsatellites	17

5. Electrophorèse sur le gel d'acrylamide 6 %	19
6. Analyses des données	20
Chapitre III. Résultats et discussion	
I. Résultats des analyses phénotypiques des accessions mondiales de la lentille ...	21
1. Jours de formation des vrilles	22
2. Jours de la floraison	22
3. Jours de formation des gousses	23
4. Jours de remplissage 50% de la gousse	23
5. Jours 50% de maturité	23
6. Mesures de la hauteur	24
6.1. Hauteur de la plante	24
6.2. Hauteur de 1 ^{ère} gousse	24
II. Résultats des analyses moléculaires des accessions mondiales de la lentille	24
1. Extraction d'ADN génomique et test de qualité sur le gel d'agarose	24
2. Amplification d'ADN extrait dans la PCR par les microsatellites sur le gel d'acrylamide	25
3. Distance génétique	27
4. Dendrogramme	27
Conclusion	29
Références bibliographiques	31
Annexe 1	35
Annexe 2	37
Annexe 3	38
Annexe 4	40
Annexe 5	41

Introduction :

La lentille (*Lens culinaris*), une des principales cultures légumineuses alimentaires cultivées au Maroc, joue plusieurs rôles nutritionnels, agronomiques et économiques importants. Sur le plan nutritionnel, la lentille constitue une composante importante de la ration alimentaire de nombreuses familles marocaines pour lesquelles elle fournit des protéines essentielles et des calories. Au niveau agronomique, la lentille entre en rotation avec les céréales dans la plupart des zones de production céréalières. De telles rotations permettent le contrôle des mauvaises herbes et la rupture des cycles biologiques de plusieurs maladies et insectes. La paille de la lentille est aussi très importante comme aliment du bétail.

La diversité génétique est la base de l'amélioration des plantes. La connaissance de cette diversité a un impact significatif sur le progrès de la sélection des plantes cultivées. Donc chaque diminution ou dérèglement de cette diversité aura des répercussions sur les programmes d'amélioration pour l'adaptation aux stress biotiques, comme les maladies, et aux stress abiotiques, tels que la sécheresse ou la tolérance à la salinité. Les légumineuses alimentaires sont considérées comme les plantes les plus cultivées par l'homme depuis longtemps. Vu leurs adaptations faciles aux différents milieux, nous pouvons les rencontrer dans la plupart des régions du monde. La lentille, comme les autres espèces légumineuses, présente un effet bénéfique sur l'équilibre des nutriments du sol et ceci à travers son pouvoir fixateur de grandes quantités d'azote atmosphérique (Rizk, 1966). Raison pour laquelle l'amélioration de la productivité de cette culture est un sujet d'actualité par la création de variétés plus productives et plus adaptées, parallèlement à l'amélioration des techniques de culture et de protection contre les maladies et ravageurs.

L'utilisation des marqueurs moléculaires pour l'évaluation de la diversité génétique constitue une alternative probante et donne majoritairement de meilleurs résultats.

Il a été démontré que les marqueurs microsatellites ou SSRs, sont les mieux adaptés pour l'évaluation de la diversité génétique du fait qu'ils sont multi alléliques et uniformément répartis le long des chromosomes (Roder et al, 1998a, b).

L'objectif de ce présent travail est l'analyse de la diversité génétique de 16 accessions mondiales à partir d'une collection internationale de la lentille par des outils phénotypiques en basant sur l'observation d'évolution des plantes étudiées, et moléculaires par l'utilisation des marqueurs moléculaires plus particulièrement les SSRs.

CHAPITRE I : ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE

I. Généralités sur la lentille

1. Origine et Historique de la lentille

La lentille (*Lens culinaris*) est une légumineuse alimentaire annuelle, autogame, diploïde avec $2n=14$ chromosomes, et son cycle est très court. C'est une espèce végétale appartenant à l'une des plus importantes familles des légumineuses, en raison de ses hautes qualités nutritionnelles (Costa et al., 2006). Ses origines sont le proche Orient et l'Asie de l'Ouest, et elle s'est propagé rapidement vers d'autres parties du monde (Yadav et al., 2007).

La lentille (*Lens culinaris*), est une petite graine appartenant aux légumes secs. Elle est présente dans l'alimentation humaine depuis la Préhistoire. Elle a acquis son nom scientifique (*Lens culinaris*) en 1787 par le botaniste Allemand Medikus (Cubero, 1981 ; Sehirali, 1988 ; Henelt, 2001).

2. Taxonomie

D'un point de vue taxonomique, la classification classique des lentilles se présente comme suit (Cokkizgina, 2013 ; Anonyme 1, 2012) (Tableau 1) :

Tableau 1 : Classification de la lentille :

Règne	<i>Plantae</i> ;
Sous Règne	<i>Tracheobionta</i> ;
Embranchement	<i>Spermatophyta</i> ;
Sous Embranchement	<i>Magnoliophyta</i> ;
Classe	<i>Magnoliopsida</i> ;
Sous Classe	<i>Rosidae</i> ;
Ordre	<i>Fabales</i> ;
Famille	<i>Fabaceae</i> ;
Genre	<i>Lens</i> ;
Espèce	<i>Lens culinaris</i>

3. Données botaniques de la lentille

D'un point de vue morphologique (Figure 1), la plante de la lentille est une plante annuelle herbacée, de 20 à 70 cm de haut. Les tiges sont dressées et rameuses. Ses feuilles, alternes, composées pennées, comptent 10 à 14 paires de folioles, opposées et sont terminées par une vrille généralement simple ou bifide.

Les fleurs de la lentille sont petites, de couleur blanche ou bleu pâle, et groupées de petites grappes de deux à quatre. Le calice est régulier, à cinq pétales. La fleur de lentille à 10

étamines, dont 9 soudées et 1 libre. Le pistil est constitué d'un stigmate, d'un style et d'un ovaire supère, et ce dernier renferme habituellement deux ovules.

Les fruits sont des gousses, aplaties, courtes, contenant deux graines aplaties en forme caractéristique de disque faiblement bombé. Les gousses sont isolées ou disposées en paires (Slinkard, 1990, Street et al., 2008).



Figure 1 : Morphologie d'une plante de lentille : (1) Plante, (2) Feuilles, (3) Gousse, (4) Graine

4. Valeurs nutritionnelles de la lentille

La lentille joue un rôle important dans l'amélioration de la santé des hommes, des animaux et des sols. Sur le plan nutritionnel (Tableau 2), la lentille est très riche en composants nutritionnels et complémentaire de toute culture céréalière.

Tableau 2 : Valeurs nutritionnelles de la lentille.

(Pour 100 g de lentilles)

Valeur énergétique	132 Kcal	
QUALITÉS NUTRITIONNELLES		
Eau	60 g	-
Glucides	19 g	7,3 %
dont sucres	0,3 g	0,3 %
Matières grasses	1 g	1,4%
dont acides gras saturés	0 g	-
Protéines	9,7 g	20 %
Fibres	5,4 g	-
Sel	0 g	-
VITAMINES		
Vitamine B1	0,13 mg	-
Vitamine B2	0,13 mg	-
Vitamine B3	0,5mg	-
Vitamine B5	0,68 mg	-
Vitamine B6	0,14 mg	-
Vitamine B9	0,019 mg	-
MINÉRAUX		
Magnésium	39,5 mg	-
Fer	3,15 mg	22%

5. Mise au point des variétés de lentille

5.1. Aperçu historique

Les premiers travaux d'amélioration sur la lentille au Maroc ont commencé à l'INRA durant les années 1960 par Bryssine. Actuellement, les efforts de recherche ont été concentrés sur la collecte du germoplasme national et sur son évaluation en vue d'identifier des lignées locales performantes. En effet, ces efforts ont permis le développement des deux premières variétés améliorées de lentille au Maroc (L24 et L56). Durant les années 80, le programme marocain d'amélioration des légumineuses alimentaires, y compris la lentille, a connu un saut typique suite à la création en fin des années 1970 de la Station Centrale des Légumineuses Alimentaires à l'INRA et du Centre International des Recherches Agricoles en Zones Arides (ICARDA) en Syrie, avec qui l'INRA avait établi une collaboration étroite, notamment, en matière d'amélioration des céréales et des légumineuses alimentaires. Durant cette même période, plusieurs jeunes chercheurs et techniciens ont été recrutés au programme, ce qui a permis la formation d'une équipe multidisciplinaire de travail sur les légumineuses à l'échelle nationale. Les efforts de recherche de ce groupe ont permis l'obtention de la variété Bakria en

1989 puis de deux autres (Bichette, Hamria) en 2000, de la variété Zaria en 2003 et des variétés Chaouia et Abda en 2004.

5.2. Différentes variétés de lentille au Maroc

Le tableau ci-dessous (Tableau 3) représente la liste des variétés de lentilles disponibles à l'INRA.

Tableau 3 : *Liste des variétés de lentille au Maroc*

Variétés	Obtenteur / Demandeur ou Mainteneur	Année d'inscription
L 24	INRA-MAROC	1989
L 56	INRA-MAROC	1989
BAKRIA	INRA-MAROC	1989
BICHETTE	INRA-MAROC	2000
HAMRIA	INRA-MAROC	2000
ZARIA	INRA-MAROC	2003
CHAOUIA	INRA-MAROC	2004
ABDA	INRA-MAROC	2004
CHAKKOUF	INRA-MAROC	2009

6. Production et répartition géographique

6.1. La répartition géographique et statistique mondiale de la lentille

La production de la lentille varie d'un pays à un autre selon plusieurs facteurs (Température, taux de précipitation, superficies cultivées...). Selon les statistiques de la FAO, la production mondiale de la lentille pendant l'année 2017 est de 54% à l'Amérique qui représente la première place, suivie par l'Asie avec 36%. Le reste est réparti entre l'Europe avec 4% et l'Afrique et l'Océanie avec un pourcentage de 3% (Figure 2). (FAOSTAT, 2019).

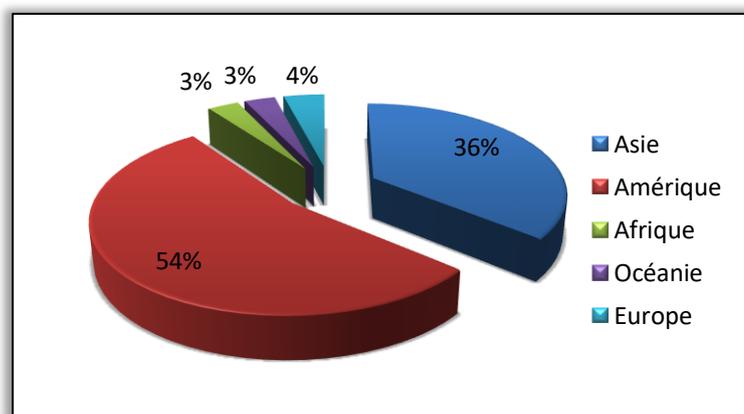


Figure 2 : *Production mondiale de la lentille pendant l'année 2017 (FAOSTAT, 2019)*

En 2017, les dix grands pays producteurs de la lentille étaient : le Canada, l'Inde, la Turquie, l'États-Unis d'Amérique, la Kazakhstan, le Népal, l'Australie, Russie, Chine et le Bangladesh (Figure 3). Or, la production du Maroc reste très faible par rapport à ces pays. Au moment où le rendement de Canada a atteint 15127 hg/ha, le Maroc n'a pu atteindre que 6574 hg/ha. (FAOSTAT, 2019).

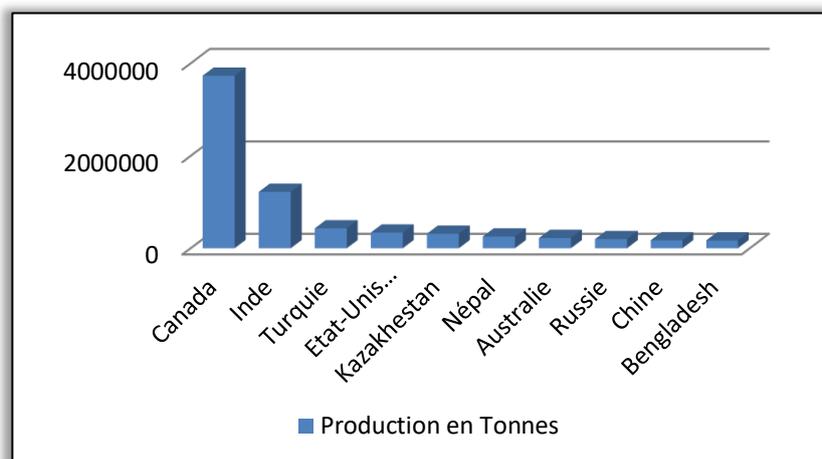


Figure 3 : Grands producteurs de la lentille pour l'année 2017 (FAOSTAT, 2019)

6.2. Production de la lentille au Maroc

En 2017, le Maroc a été classé au 14^{ème} rang mondial des pays producteurs de la lentille, et le deuxième pays Africain (28 163 Tonnes) avant l'Algérie (19 139 Tonnes) et après l'Ethiopie (168 548 Tonnes) (FAOSTAT, 2019).

7. Problématique de la lentille

Plusieurs contraintes biotiques menacent la culture de la lentille, telles que les maladies (Ascochytose, la rouille et la pourriture racinaire) (Figure 4) (Muehlbauer et Tullu 1997), les infestations par des insectes et la présence des mauvaises herbes. La culture de la lentille peut être limitée aussi par certains stress abiotiques tels que la salinité, la haute température, la basse température, la sécheresse et la carence en nutriments dans le sol (Muehlbauer et Tullu 1997). Le stress thermique et la sécheresse sont les deux contraintes abiotiques les plus néfastes dans la région méditerranéenne. Autrement dit, ils affectent généralement tous les stades de développement de la lentille. La période de la floraison reste le stade le plus sensible à ces deux stress puisqu'ils peuvent provoquer des avortements floraux et une accélération de sénescence (Idrissi et al., 2013).

Les Orobanches (*Orobanche spp.*) sont des plantes herbacées parasites non chlorophylliennes qui se développent sur les racines de plantes hôtes. L'orobanche crénelée (*Orobanche*

crenata) s'attaque principalement aux légumineuses (lentille, pois, féverole, pois chiche...). L'orobanche vit au dépend de sa plante hôte.



Figure 4 : Les principales maladies et ravageurs de la lentille.

II. Techniques d'analyses moléculaires

En biologie végétale, le terme marqueur s'applique à plusieurs concepts, parfois très différents. Un marqueur morphologique par exemple est un caractère physique (couleur, forme, longueur...), généralement dominant, souvent influencé par le milieu, et pouvant interférer avec d'autres caractères (Plomion, 2003). Par contre, un marqueur génétique, moléculaire ou biochimique est toujours synonyme de locus marqueur; le locus marqueur est un locus (séquence d'acides nucléiques, ou expression de cette séquence) polymorphe qui renseigne sur le génotype de l'individu qui le porte et/ou sur les génotypes voisins (De Vienne et al., 1998; Santoni et al., 2000).

1. Marqueurs moléculaires

Par définition, un marqueur génétique est un caractère mesurable à hérédité mendélienne (Swynghedauw 2000). On distingue les marqueurs biochimiques, issus de l'expression des gènes (y compris les produits de métabolisme secondaire : isozymes, protéines, terpènes...), et les marqueurs moléculaires, qui désignent directement des séquences d'acides nucléiques. Les marqueurs moléculaires représentent la dernière génération de marqueurs utilisés dans les études de diversité génétique. Ils reposent sur la mise en évidence du polymorphisme de la taille de fragments d'ADN. Les qualités attendues pour un marqueur moléculaire sont principalement un niveau de polymorphisme adéquat et une abondance élevée (Harti 1988, Vekemans et Jacquemart 1997).

Un marqueur génétique « idéal » doit être :

- ✓ Polymorphe : la « matière première » du généticien est la variabilité.
- ✓ Multi-allélique.
- ✓ Co-dominant : l'hétérozygote présente simultanément les caractères des deux parents homozygotes ; il peut donc être distingué de chacun des homozygotes parentaux.
- ✓ Non épistasique : son génotype peut être « lu » à partir de son phénotype quel que soit le génotype aux autres locus. La codominance et le non épistasie peuvent être respectivement définis comme l'absence d'interactions intra et inter locus.
- ✓ Neutre : une substitution des allèles au locus marqueur n'a pas d'autres effets phénotypiques que ceux qui permettent de déterminer son génotype; un marqueur neutre révèle, directement, les modifications génétiques qu'elles se traduisent ou non par une modification phénotypique.
- ✓ Insensible au milieu : Le génotype peut être déduit du phénotype indépendamment du milieu. (De Vienne et al. 1998) (Ferreira et Grattapaglia 1998),
- ✓ Facilement observable et sans ambiguïté,
- ✓ Reproductible d'une expérience à une autre (Ferreira et Grattapaglia 1998).

Les marqueurs morphologiques répondent mal à ces critères. Peu polymorphes, en général dominants, ils interfèrent souvent avec d'autres caractères, et peuvent être influencés par le milieu (De Vienne et al., 1998).

1.1. Principaux types de marqueurs moléculaires

Il existe de nombreuses techniques de marquage moléculaire (Tableau 4), parmi lesquelles on trouve celles basées sur l'hybridation moléculaire (RFLP : Restriction Fragment Length Polymorphism : Polymorphisme de longueur des fragments de restriction), et des techniques basées sur la PCR ((les microsatellites ou SSR : Simple Sequence Repeat), (RAPD : Random-Amplified Polymorphic : ADN polymorphes amplifiés aléatoirement), (AFLP : Amplification Fragment Length Polymorphism : Polymorphisme de longueur des fragments amplifiés)).

Tableau 4 : *Caractéristiques des marqueurs d'ADN les plus utilisés.*

Type	Caractéristique de la méthode	Procédure	Fiabilité	Coût	Référence
RFLP	Digestion de l'ADN par des enzymes de restriction, et détection par l'ADNc ou Les sondes d'ADN (via Southern Blot)	Complexe et laborieuse	Elevée	Elevé	Beckmann & Soller (1986); Kochert (1994); Tanksley et al. (1989)
RAPD	Amplification aléatoire via des amorces arbitraires de 10pb	Simple	Faible	Faible	Welsh & McClelland (1990); Williams et al. (1990)
ISSR	Amorces conçues pour des séquences simples répétées avec des 'ancres'	Simple	Moyenne	Faible	Blair et al. (1998)
SSR	Amorces conçues pour des séquences bordant les séquences simples répétées	Simple	Elevée	Faible	McCouch et al. (1997); Powell et al. (1996)
AFLP	Digestion d'ADN génomique suivie d'une ligation par des adaptateurs et PCR	Complexe et laborieuse	Elevée	Elevé	Vos et al. (1995)

1.2. Microsatellites ou SSR (Simple Sequence Repeat)

Les microsatellites sont de courts segments d'ADN composés de séquences de di-, tri- ou tétra-nucléotides répétées en tandem d'un motif de 2 à 6 paires de bases (suivant les définitions) que l'on peut amplifier par PCR. Sur le génome, il existe des séquences constituées d'unités répétées de 1 à 4 nucléotides. Ce sont les microsatellites (Morgante et Olivieri, 1993).

Les plus courants sont (A)_n, (TC)_n, (TAT)_n et (GATA)_n, les valeurs de n pouvant aller de quelques unités à plusieurs dizaines. On parle de séquences répétées ou SSR (Simple Sequence Repeats). L'intérêt de ces microsatellites réside dans leur polymorphisme. Celui-ci repose sur la variation du nombre d'unités de répétition, constituant le microsatellite.

L'analyse des produits amplifiés s'effectue sur gel d'acrylamide. Si les SSRs constituent de bons marqueurs moléculaires (reproductibles, Co-dominants et facilement utilisables), 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.

Ces répétitions sont très polymorphes, même parmi les cultivars étroitement liées, en raison de mutations qui provoquent des variations dans le nombre d'unités répétitives. Contrairement aux autres techniques de marqueurs basés sur la PCR, les microsatellites sont hérités de façon co-dominante. Cela permet de discriminer entre homozygote et l'état hétérozygote, et augmente l'efficacité de la cartographie génétique et les études de génétique des populations (Melake, 2000).

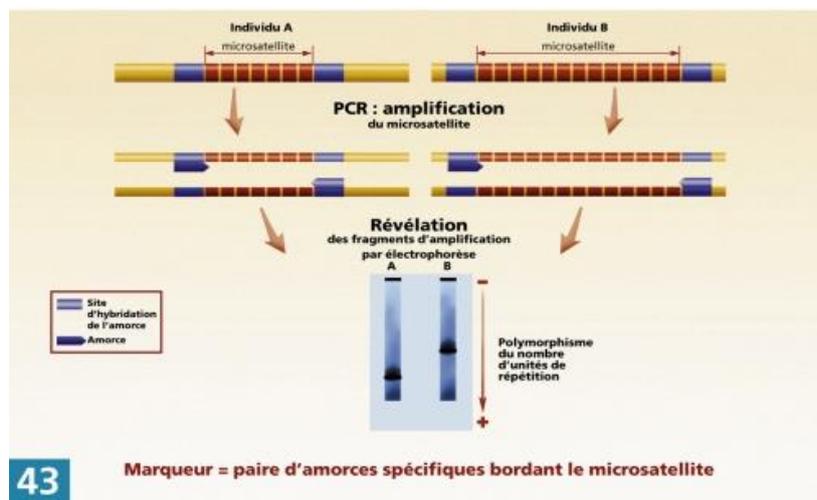


Figure 5 : *Etapes de la technique du marqueur moléculaire SSR.*

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 (figure 5). En effet, chaque microsatellite est bordé par des séquences uniques qui lui sont propres. Les fragments d'amplification sont ensuite révélés par électrophorèse sur le gel d'acrylamide.

2. Amplification d'ADN par la technique de PCR

2.1.Définition

La Polymerase Chain Reaction (PCR) est une technique permettant d'amplifier in vitro des séquences d'ADN par répétition de réactions d'élongation en présence d'amorces nucléotidiques spécifiques et d'une ADN polymérase (Tagu et Moussard, 2003). Cette technique, créée par Saiki et al. (1985), est devenue la base de nombreux marqueurs moléculaires. Son principe est relativement simple, basé sur une amplification enzymatique de l'ADN (White et al. 1989; Vekemans et Jacquemart, 1997, Claros et Quesada, 2000).

2.2.Principe

La technique PCR utilise les éléments de base de la duplication naturelle de l'ADN, mais en réalisant seulement la duplication et l'amplification de courts fragments de la molécule d'ADN, dans une simple solution qui permet l'amplification.

Le processus démarre avec une augmentation de température généralement entre 90 et 95°C pour dénaturer ou séparer les deux brins d'ADN. Puis la température est ramenée approximativement entre 35 et 70°C, afin que les amorces trouvent les emplacements cibles. Une fois l'hybridation réalisée, la copie par la Taq polymérase commence. La température est ensuite remontée pour entamer un nouveau cycle, lequel sera répété un certain nombre de fois selon les nécessités de l'étude et la technique à employer. On obtient finalement un produit spécifique amplifié, lequel sera révélé par électrophorèse sur le gel d'acrylamide (Vekemans et Jacquemart, 1997, De Vienne 1998, McPherson et Moller, 2000).

2.3. Etapes de la technique

Les étapes nécessaires pour doubler la quantité d'ADN cible constituant un cycle sont (Figure 6) :

- La dénaturation : Cette étape s'effectue à une température de 94°C (T° de dénaturation) A cette température les ADN double-brin se dénaturent en ADN simple-brin (ADN monocaténares).
- L'hybridation : En abaissant la température, les amorces spécifiques s'hybrident sur les molécules simples brin d'ADN. Les amorces sont constituées de courtes séquences d'ADN complémentaires de la séquence de l'ADN à amplifier.

La diminution de la température permet aux liaisons hydrogène de se reformer et donc aux brins complémentaires de s'hybrider.

- L'élongation : Elle s'effectue généralement à 72°C, c'est une température optimale de la synthèse de l'ADN par la taq polymérase (Mullis et Fannola, 1987). la Taq polymérase se lie aux ADN monocaténares amorcés et catalyse la répllication en utilisant les désoxyribonucléosides triphosphates (dNTPs) présents dans le milieu réactionnel.

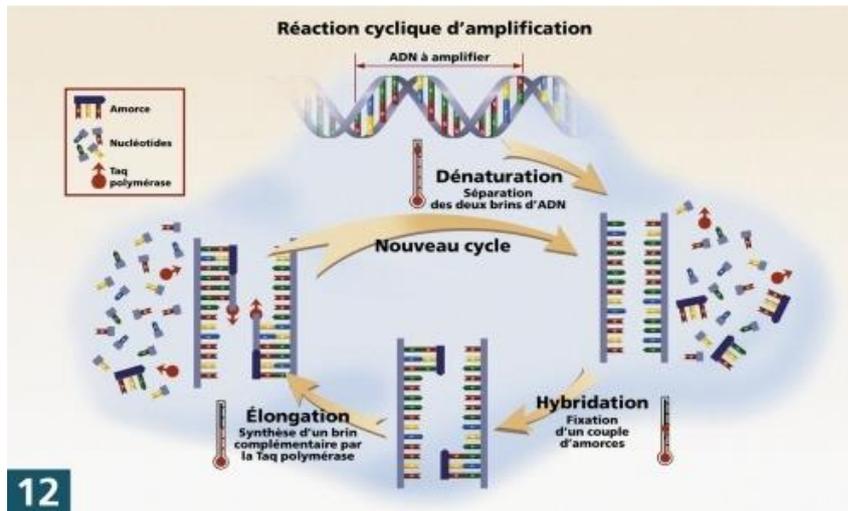


Figure 6 : *Etapes d'amplification de l'ADN.*

Chaque cycle va théoriquement doubler la quantité d'ADN présente au cours du cycle précédent. Il est inutile d'augmenter le nombre de cycle au-delà de 35 cycles car l'amplification cesse d'être exponentielle et atteint rapidement un plateau.

D'une manière théorique, le nombre de copies obtenu devrait être égal à 2^n , (n) étant le nombre de cycle.

Il est recommandé de rajouter un cycle final d'élongation à 72°C pendant 5 min, notamment lorsque la séquence d'intérêt est de grande taille.

Chapitre II : Matériel & Méthodes

I. Analyses phénotypiques des accessions de la lentille

Le matériel végétal utilisé comprend 16 accessions de la lentille (*Lens culinaris*). Ces accessions sont exclusivement des populations mondiales (Tableau 5), présentes au champ du centre Régionale de la Recherche Agronomique de Rabat.

Tableau 5 : Différentes accessions étudiées.

Num	Nom	Origine	Num	Nom	Origine
1	ILL_4164	Inde	11	PI_374117_LSP	Maroc
2	PI_431731_LSP	Iran	14	PI_211052_LSP	Afghanistan
3	PI_432286_LSP	Egypte	15	PL_426797_LSP	Pakistan
4	PI_299237_LSP	Chili	17	CDC_Robin	Canada
6	ILL_5209	Jordan	18	PI_181771_LSP	Liban
7	PI_518731_LSP	Brésil	22	PI_297787_LSP	Russie
8	PI_297767	Grèce	23	PI_320953_LSP	Allemagne
10	CN_108369	Libye	25	PI_299126_LSP	Mexique

L'étude phénotypique est basée sur l'observation au niveau des plantes de ces accessions (Figure 7) plus précisément :

- La formation des vrilles : Ce sont des organes spécialisés permettant aux lentilles de s'accrocher à des supports divers.
- Floraison : C'est un stade facilement observable et, il permet d'estimer le cycle de la plante. La floraison est le début de la phase reproductrice avec l'apparition des organes reproducteurs.
- Fructification : Correspond à la formation du fruit (gousse) qui va contenir les graines (lentilles).
- Le stade 50% des gousses.
- Maturation : Cela est examiné par la couleur doré des gousses.
- La mesure de la hauteur de la plante mature : Cette étape consiste à mesurer premièrement la hauteur de toute la plante à partir du début de la tige jusqu'au la pointe de la plante et deuxièmement il faut mesurer la hauteur de la plante à partir du début de la tige jusqu'à la 1^{ère} gousse.

- La couleur des fleurs.
- Nombre de gousses / pédoncule.



Figure 7 : *Différentes caractéristiques phénotypiques étudiées chez la lentille.*

II. Analyses moléculaires des accessions de la lentille

1. Collecte des échantillons étudiés

Les accessions étudiées sont exclusivement des populations mondiales collectées au champ du centre Régionale de la Recherche Agronomique de Rabat, La collecte des échantillons du matériel végétal a eu lieu le 25 avril 2019. Les échantillons sont mis dans un lyophilisateur afin de faciliter le broyage.

2. Extraction de l'ADN à partir des feuilles de la lentille

L'extraction de l'ADN est faite en utilisant la technique de céthyl bromure de triméthyl ammonium (CTAB) (Saghai-Marooof et al., 1984), modifié par (Udupa et al., 1999) (Figure 8) dont les étapes sont indiquées ci-dessus :

- Un broyage de la feuille lyophilisée de lentille a été effectué à l'aide d'un broyeur à bille qui permet l'écrasement totale de la feuille.
- Une quantité de 1,5 mL de la solution 2 x CTAB mélangé avec le β -mercapto-éthanol 0,2% à 65°C est ajoutée au broyat, ce qui permet la lyse membranaire

et la séparation des protéines des acides nucléiques et minimise l'activité de l'ADNase en augmentant le pH à 8. Les tubes sont placés dans un bain marie à 65°C pendant une heure avec une agitation manuelle toutes les 15 min.

- Cette opération est suivie par l'ajout de 500 µL d'une solution de chloroforme / isoamyl alcool, pour précipiter tous ce qui est organique, avec une agitation vigoureuse pendant 15 min, et ensuite une centrifugation à 13000 rpm à température ambiante pendant 15 min.
- Le surnageant récupéré (1 mL) est précipité avec 666 µL d'Isopropanol à température ambiante pendant 30 min puis une centrifugation à 13000 rpm à 4°C pendant 10 min est ensuite réalisée.
- L'ADN est précipité, le surnageant est éliminé, tandis que le culot obtenu est lavé avec 1 mL d'éthanol 70% pour éliminer toute trace d'Isopropanol et de NaCl. Une centrifugation à 13000 rpm à 4°C pendant 5 min est ensuite réalisée.
- Le surnageant est éliminé, après séchage sous la hotte, les culots sont additionnés de 100 µL d'eau purifiée et placés à 4°C.
- 24 h après, nous centrifugeons de nouveau à 4°C. Le contenu est récupéré dans des tubes de 1,5 ml. Ces derniers sont alors marqués comme stock d'ADN.



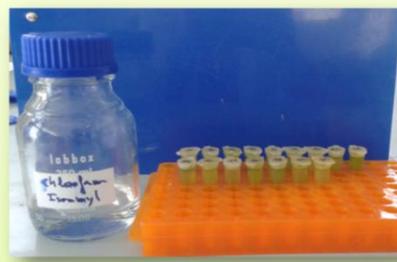
Broyage des feuilles lyophilisées



Ajout de CTABx2



Incubation pendant 1h dans un bain marie



Ajout de Chloroforme/Isoamyle

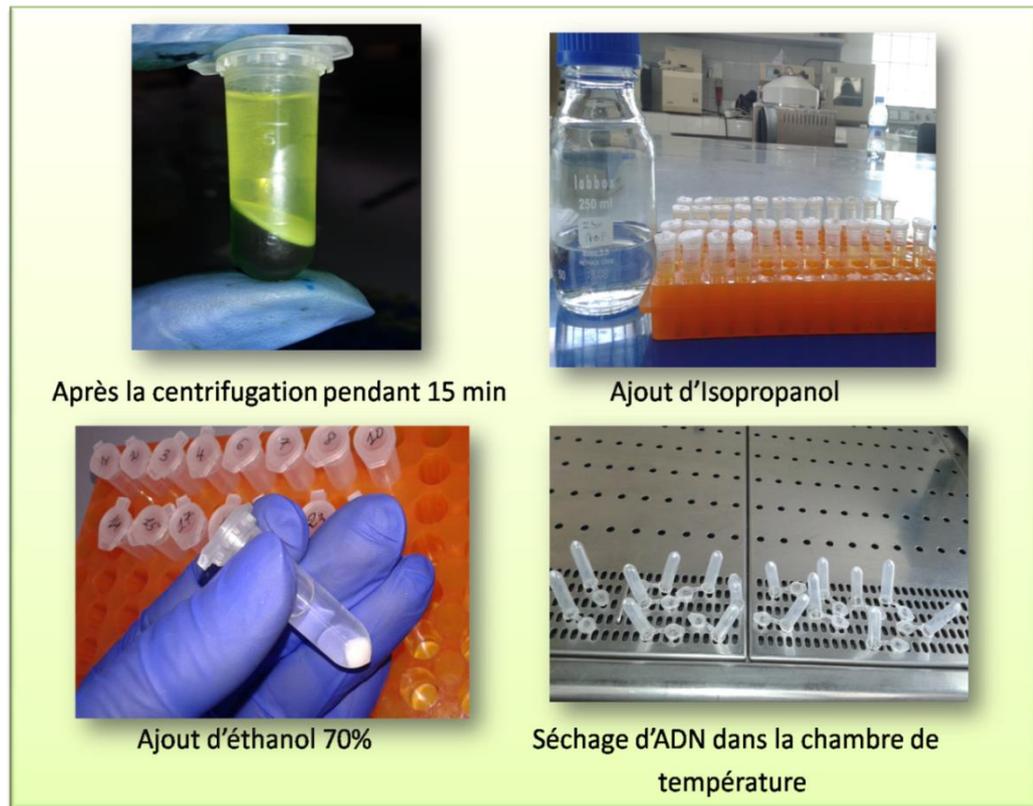


Figure 8 : *Etapes de l'extraction d'ADN, suivant la technique de CTAB x2 (Udupa et al.1999).*

3. Électrophorèse sur le gel d'agarose

L'électrophorèse sur gel d'agarose est communément utilisée pour séparer des molécules en fonction de leur charge, leur taille et leur forme. Il s'agit d'un moyen de séparation particulièrement efficace pour des biomolécules chargées telles que l'ADN, l'ARN et les protéines.

Un gel d'agarose à 1,2 % est préparé en portant à ébullition l'agarose dans la solution tampon (TBE 0,5%). La solution est ensuite refroidie, puis versée dans la cuve où elle se solidifie. Un peigne est placé à l'extrémité de la cuve pour permettre la formation des puits dans lesquels sera déposée la solution d'ADN. La cuve est alors submergée dans un appareil d'électrophorèse à électrodes contenant de la solution tampon (TBE 0,5%) (Figure 9).

Dans chaque puits sont déposés :

- 4 μL d'eau distillée stérile
- 3 μL de bleu de charge
- 3 μL d'ADN

L'appareil d'électrophorèse est branché à une source de courant continu direct et mis sous tension. Le générateur est réglé à 60 V, après 15 min, le voltage est augmenté à 90 V. La

fixation et la coloration des bandes d'ADN se fait après la migration en mettant le gel dans une solution de BET à 1 µg/mL pendant 20 min avec une agitation. Ensuite rincer le gel dans de l'eau distillée pendant 10 min avant de visualiser les bandes sous les rayons ultraviolets (UV).

L'observation des bandes permet de déduire la quantité d'acides nucléiques déposée et d'estimer un facteur de dilution afin d'obtenir une concentration finale d'ADN de 20 ng.

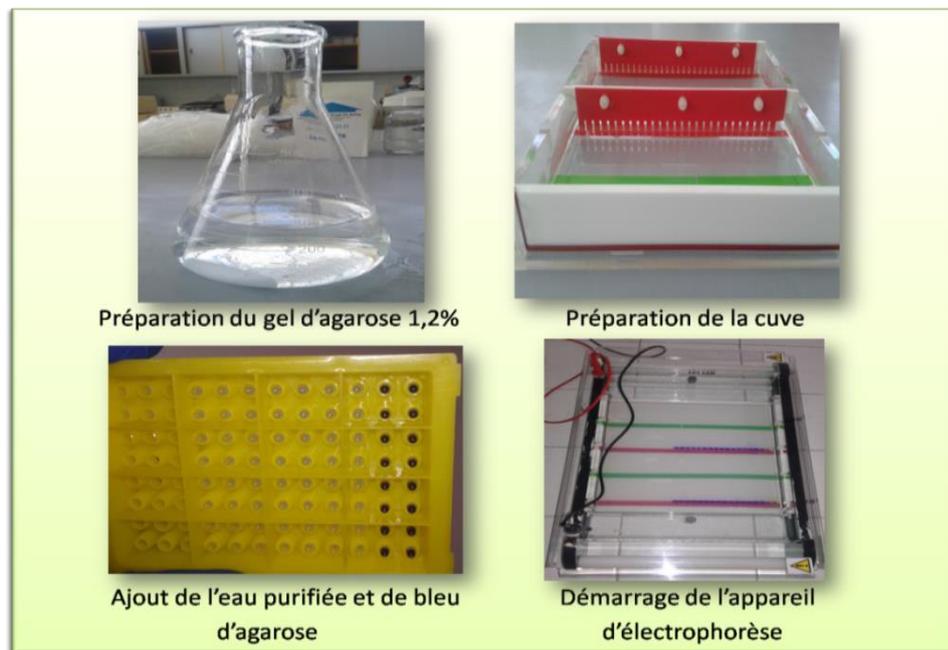


Figure 9 : Etapes de la technique d'électrophorèse sur le gel d'agarose.

4. Amplification d'ADN extrait dans la PCR par les microsatellites

A la suite de l'électrophorèse sur gel d'agarose, une dilution est réalisée à partir de la solution « ADN stock ». La solution « ADN dilué » obtenue va servir pour réaliser une PCR. La réaction d'amplification de l'ADN a été effectuée dans un volume réactionnel de 10 µL (8 µL du mixte + 2 µL d'ADN), le mixte est préparé comme suit (Tableau 6 ; Figure 10):

Tableau 6 : Composantes du mixte de la réaction PCR :

Master Mixte	Pour une réaction	Pour 17 réactions
Eau purifiée	3,95 µL	67,15 µL
5x Tampon (5x)	2 µL	34 µL
dNTPs (2mM)	1 µL	17 µL
Amorce (10uM)	1 µL	17 µL
Tap polymerase (5U)	0,05 µL	0,85 µL

Le mixte est ajouté à 2 μ l d'ADN pour chaque accession. La réaction débute dans un thermocycleur suivant ce programme ci-dessous :

- 94°C pour 3 min
 - 94°C pour 30 secs
 - X °C pour 35 sec
 - 72°C pour 60 secs
 - 72°C pour 5 min
- } 35 cycles

Avec X°C est la température d'hybridation de différentes amorces utilisés (Tableau 7) :

Tableau 7 : Séquences d'amorce directes et inverses et température d'hybridation utilisées pour l'amplification de 7 locus microsatellites : Aladdin Hamwiah et al., (2009)

Nom d'amorce	Séquence amont	Séquence aval	Tm en (°C)	Taille prévue (Pb)	Microsatellite motif
SSR-207	GAGAGATACGTCAGAGTAG	GATTGTGCTTCGGTGGTTC	55	227	(CA) ₂₂
SSR-28	GAGGGCATAAATTCAGATTC	GGACAACGCACATTTGATG	53	383	(TG) ₁₅
SSR-34-2	CGGCGGATGAAACTAAAG	CATTTCTTCACAAACCAAC	53	185	(GT) ₂₂
SSR-202	CAACCTCACTTACCTTAC	GCTCTTTATCATCATTCTAC	52	220	(CA) ₈ (CCA) ₆ (CA) ₅

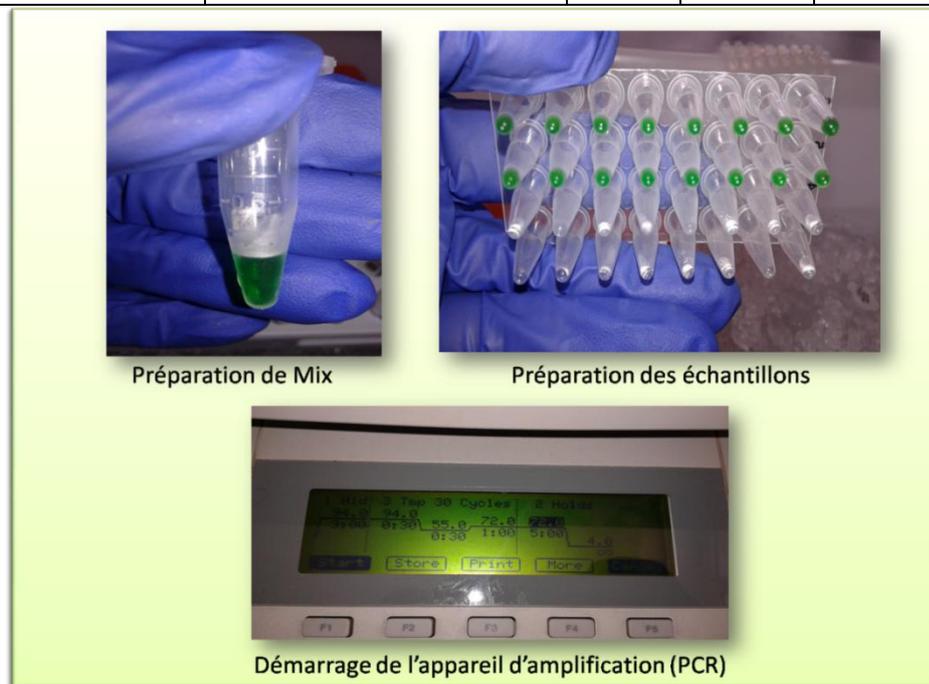


Figure 10 : Etapes de la technique d'amplification d'ADN par la PCR.

5. Électrophorèse sur le gel d'acrylamide 6%

Un gel d'acrylamide est une matrice de séparation utilisée en électrophorèse de biologie moléculaire, assure la séparation des protéines et des petits fragments d'ADN. Ce gel possède un pouvoir résolutif de 10 paires de bases. Par contre le gel d'agarose ne peut pas la faire.

Le gel d'acrylamide est constitué d'acrylamide qui est l'unité de base, de bis-acrylamide (N, N méthylène-bisacrylamide) qui est l'agent pontant (fixateur) et de la solution de TBE 5x. En fonction des différents taux de ces substances, on obtient différents maillages et donc différentes densités de gel.

La réaction de polymérisation se fait grâce à l'ajout de deux substances réactives : le TEMED (Tetra-Méthyl-EthylèneDiamine : cofacteur de polymérisation) et le persulfate d'ammonium (APS à 25 % : agent polymérisateur).

Un gel d'acrylamide à 6 % est préparé. Après l'ajout de 5 μ L du bleu de charge aux différents échantillons (ADN + (Mix) ,7 μ L du produit PCR sont déposés dans les puits. Le marqueur de taille utilisé est celui de 100 bp.

L'appareil d'électrophorèse est branché à une source de courant continu direct et mis sous tension. Le générateur est réglé à 300 V.

La fixation et la coloration des bandes d'ADN se fait après la migration en mettant le gel dans une solution de BET à 10 mg/mL pendant quelques minutes avec une agitation manuelle, ensuite dans de l'eau distillée pour rincer le gel avant de visualiser les bandes sous les rayons ultraviolets (UV). (Figure 11).

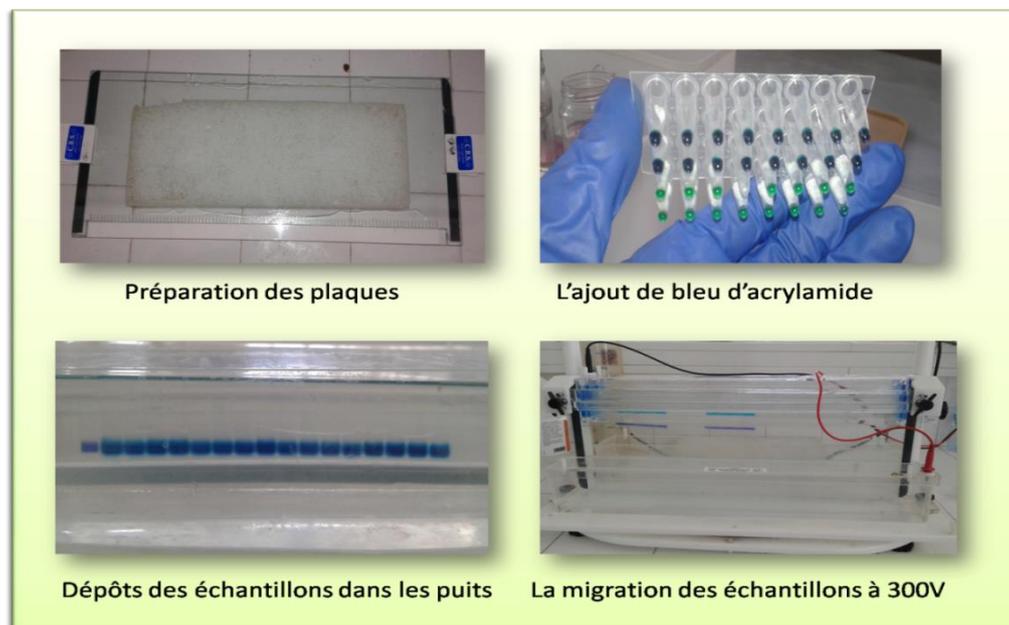


Figure 11 : *Étapes de la technique d'électrophorèse sur le gel d'acrylamide 6%.*

6. Analyses des données

La distance génétique entre les différentes accessions étudiées, est calculée à partir de la matrice des individus en réponses aux marqueurs utilisés. Elle a été déterminée à l'aide d'un logiciel appelé Power Marker. Il s'agit d'un ensemble complet de méthodes statistiques pour l'analyse de différentes données génétiques de marquage, spécialement conçu pour les SSR/SNP (liu, 2004), pour le calcul de la distance génétique ainsi que pour la réalisation du dendrogramme, en utilisant la méthode de Nei (Nei et al., 1987).

Pour décrire la diversité génétique, nous avons calculé deux paramètres principaux : le contenu de l'information polymorphe (PIC) et l'indice de diversité (H), en utilisant la formule de Nei, (1987):

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

Dont: - n est le nombre des échantillons - p est la fréquence de l'allèle.

La distance génétique entre chaque paire de variété a été mesurée en calculant la fréquence d'allèle partagé (Jin et Chakraborty, 1993).

Ce type de distance permet d'évaluer la relation entre les populations étudiées et le niveau de rapprochement génétique entre elles.

Le programme Power Marker (Version 3.0; Liu et Muse, 2005) a été utilisé pour construire un arbre «dendrogramme » phylogénétique à partir des distances génétiques calculées.

Chapitre III : Résultats & Discussion

I. Analyses phénotypiques des accessions de la lentille

La lentille (*lens culinaris*) fait partie de la famille des Fabacées. Ce légume rustique mesure de 25 à 45 cm de haut. Ses feuilles possèdent des vrilles pour s'accrocher, elles sont de couleur vert clair, mais c'est un caractère qui peut être absent chez quelques accessions.

La lentille fleurit en petites fleurs à long pédoncule en différentes couleurs.

Les graines comestibles sont à l'intérieur de petites gousses plates.

Les résultats de l'observation d'évolution des plantes étudiées sont indiqués dans le tableau et les histogrammes suivants (Tableau 8, Figures 12,13).

Tableau 8 : Suivi des étapes d'évolution des plantes étudiées :

Nom	Origine	Vrille	Floraison	Formation de gousse	Graine forme 50% de gousse	50% de maturation
ILL_4164	Inde	65	64	70	77	95
PI_431731_LSP	Iran	77	78	84	92	98
PI_432286_LSP	Egypte	-	-	-	-	-
PI_299237_LSP	Chili	78	81	86	94	100
ILL_5209	Jordan	65	63	72	79	86
PI_518731_LSP	Brésil	65	73	80	90	91
PI_297767	Grèce	69	71	84	96	98
CN_108369	Libye	65	66	73	88	101
PI_374117_LSP	Maroc	63	64	73	83	85
PI_211052_LSP	Afghanistan	65	71	80	89	100
PL_426797_LSP	Pakistan	-	68	73	83	85
CDC_Robin	Canada	65	71	78	94	73
PI_181771_LSP	Liban	84	78	88	94	102
PI_297787_LSP	Russie	66	73	80	86	99
PI_320953_LSP	Allemagne	63	66	74	80	86
PI_299126_LSP	Mexique	59	60	63	73	76

Nom	Origine	Taille de la plante	Taille de première gousse	Couleur des fleurs	Nbr de gousses/pédoncule
ILL_4164	Inde	26 cm	8 cm	Blanches violacées	1
PI_431731_LSP	Iran	31 cm	10 cm	Blanches violacées	2
PI_432286_LSP	Egypte	-	-	-	-
PI_299237_LSP	Chili	28 cm	9 cm	Blanches	2
ILL_5209	Jordan	33 cm	9 cm	Blanches	2
PI_518731_LSP	Brésil	25 cm	8 cm	Blanches violacées	2
PI_297767	Grèce	34 cm	11 cm	Blanches violacées	3
CN_108369	Libye	31 cm	11 cm	Blanches	3
PI_374117_LSP	Maroc	24 cm	12 cm	Blanches violacées	3
PI_211052_LSP	Afghanistan	40 cm	16 cm	Violettes	2
PL_426797_LSP	Pakistan	28 cm	8 cm	Violettes	3
CDC_Robin	Canada	43 cm	20 cm	Blanches violacées	3
PI_181771_LSP	Liban	38 cm	20 cm	Violettes	2
PI_297787_LSP	Russie	33 cm	17 cm	Blanches violacées	4
PI_320953_LSP	Allemagne	42 cm	21 cm	Blanches	3
PI_299126_LSP	Mexique	29 cm	9 cm	Blanches violacées	3

1. Jours de formation des vrilles

Les observations ont montré que les accessions PL_426797_LSP et PI_432286_LSP n'ont pas formé de vrilles. Alors que toutes les autres accessions ont formé les vrilles entre 59 à 84 jours.

2. Jours de la floraison

Les observations de la floraison ont montré une seule accession qui n'a pas formé les fleurs, il s'agit de PI_432286_LSP. Alors que 43,75% ont formé les fleurs dans un stade précoce entre 60 et 70 jours, il s'agit des accessions : ILL_4164, ILL_5209, CN_108369, PI_374117_LSP, PL_426797_LSP, PI_320953_LSP, et PI_299126_LSP. Les autres accessions ont formé les fleurs dans un stade moyen entre 71 et 81 jours.

3. Jours de formation des gousses

Après les observations des accessions, il a été constaté que l'accession PI_432286_LSP n'a pas formé des gousses alors que l'accession PI_299126_LSP les a formés dans un stade rapide, à 63 jours. 43,75% des accessions ont formé les gousses entre 70 et 78 jours, et 43,75% les ont formés entre 80 et 88 jours.

4. Jours de remplissage 50% de la gousse

Les observations ont montré que les 3 accessions ILL-4164, ILL-5209, PI-29912-LSP ont rempli 50% de leurs gousses dans un temps compris entre 73 et 79 jours. Alors que 37,5% des accessions ont pris un temps entre 80 et 89 jours. Et le reste des accessions ont rempli 50% de leurs gousses entre 90 et 96 jours.

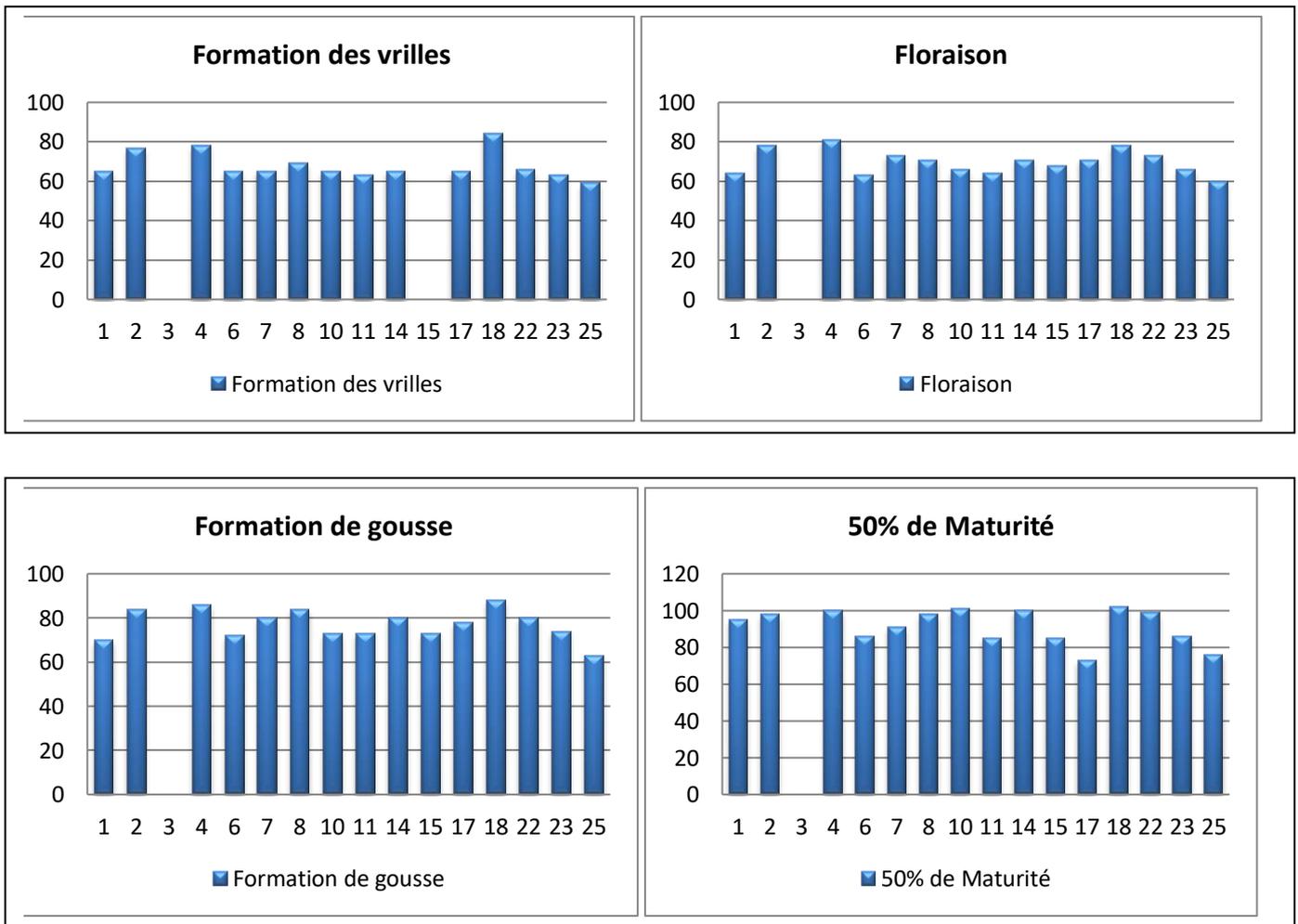


Figure 12 : Représentations graphiques de la variation du temps des différents stades de la formation de vrilles jusqu'à 50% de maturité chez les accessions étudiées.

5. Jours 50% de maturité

Les observations phénotypiques ont montré que les 6 accessions sont arrivées à la maturité entre 76 et 86 du premier jour de leur culture. Mais 56,25% des accessions sont devenues matures entre 91 et 102 jours.

6. Mesure de la hauteur

6.1. Hauteur de la plante

La hauteur des différentes accessions a varié de 20 à 43 cm. La plus petite accession est PI-432286-LSP tandis que la plus grande variété est CDC Gold.

6.2. Hauteur de 1^{ère} gousse

Les mesures de la hauteur à partir du début de la tige jusqu'au la formation de la 1^{ère} gousse ont montré que la plus grande hauteur a été de 21cm trouvé chez PI-320953-LSP. Les accessions PI-518731-LSP, PI-426797-LSP ont des hauteurs qui sont petites, alors que l'accession PI-432286-LSP n'a pas eu de formation des gousses.

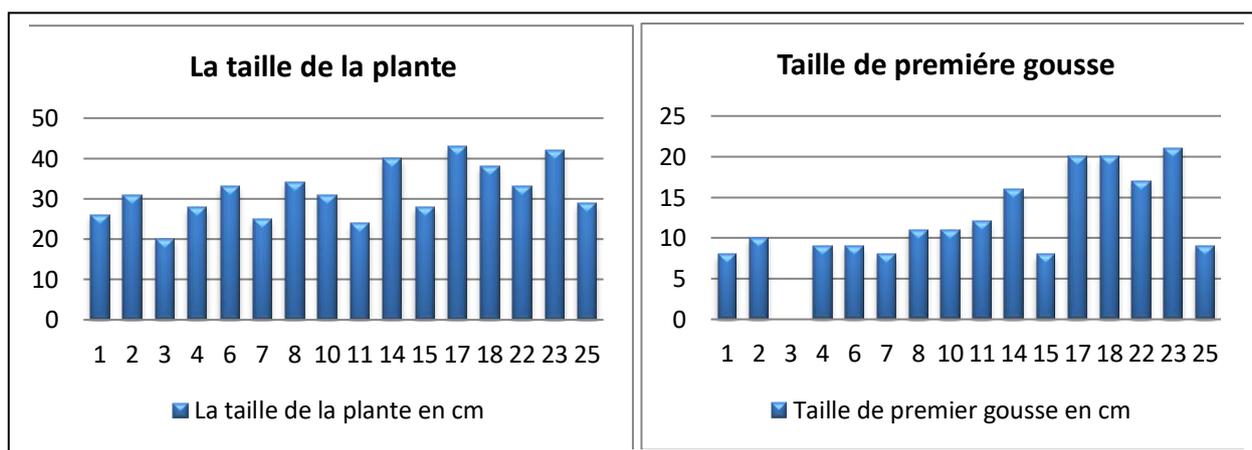


Figure 13 : Représentations graphiques des différentes mesures de la hauteur chez les accessions étudiées.

Alors d'après les résultats phénotypiques, il est difficile de caractériser les plantes sur ce critère seulement à partir de l'observation. C'est pour cela, il est nécessaire d'étudier la diversité génétique au niveau moléculaire.

II. Analyses moléculaires des accessions mondiales de lentille

1. Extraction de l'ADN génomique et test sur le gel d'agarose

L'étude du polymorphisme moléculaire de la lentille commence tout d'abord par l'extraction d'ADN suivant le protocole décrit dans "matériel et méthodes". Afin de s'assurer de la présence de l'ADN génomique dans les extraits, un test qualité a été effectué pour voir la qualité de l'ADN ainsi que leur concentration en se basant sur le marqueur de taille et l'intensité de la bande. Le profil électrophorétique réalisé pour les 16 échantillons de la

lentille sur un gel d'agarose de 1,2% montre la présence de bandes alignées au même niveau, avec une taille supérieure à la taille de la bande 21000 Pb du marqueur moléculaire « Lambda Marker ». Cela signifie que l'ADN génomique est en général intact et peut être considéré de bonne qualité (Figure 14).

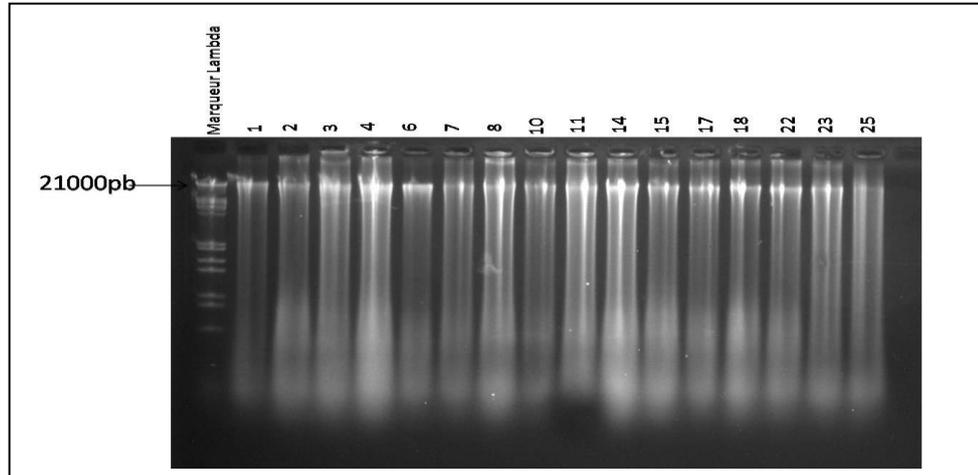
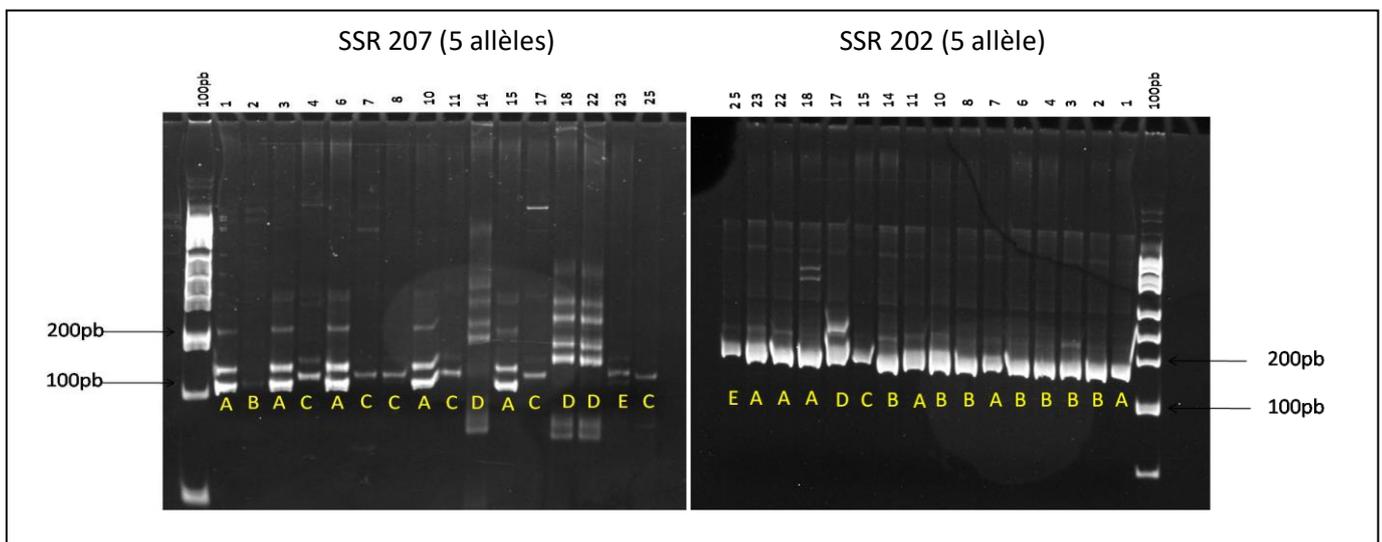


Figure 14 : Profil électrophorétique d'ADN total extrait à partir de 16 accessions de la lentille sur gel d'agarose 1,2%.

Par ailleurs, les bandes obtenues ne présentent pas en général la même intensité de fluorescence, ce qui signifie que la quantité d'ADN n'est pas toujours la même pour tous les échantillons analysés. On peut conclure que les extraits d'ADN peuvent être utilisés pour les étapes suivantes de l'étude de la diversité génétique. À partir de ce test, des dilutions sont réalisées de façon à avoir une concentration finale de 20 ng.

2. Amplification d'ADN extrait dans la PCR par les microsatellites sur le gel d'acrylamide

L'analyse des produits d'amplification par les 4 amorces étudiées a donné les profils électrophorétiques suivants (Figure 15):



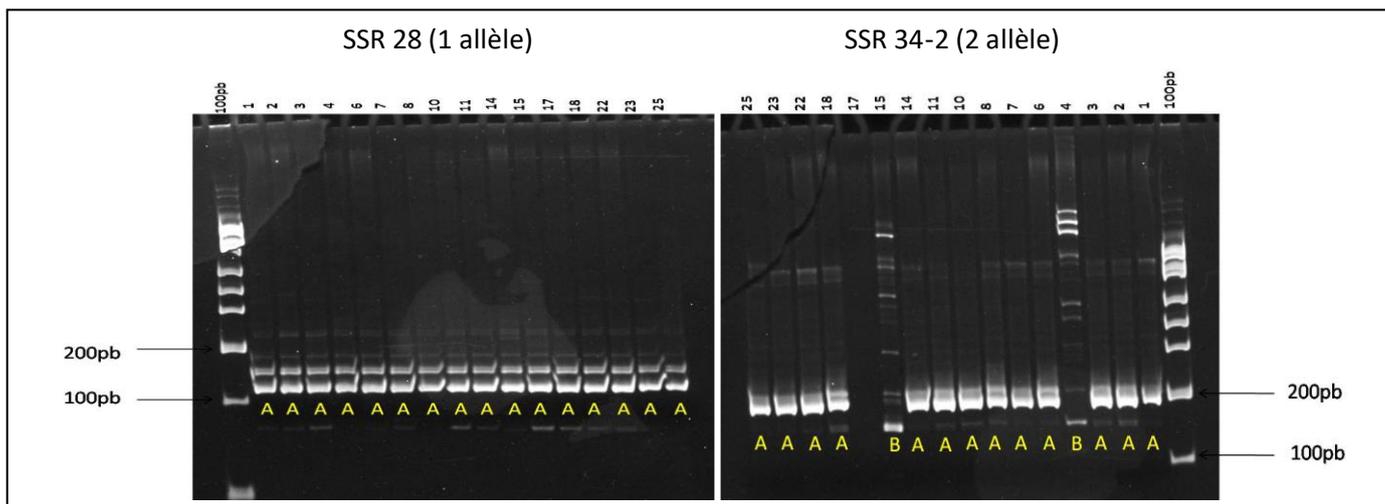


Figure 15 : Profils électrophorétiques sur gel d'acrylamide des accessions étudiées de la lentille après amplification par PCR-SSR.

Le nombre d'allèles est de 5 pour les amorces SSR 207 et SSR 202, de 2 pour l'amorce SSR 34-2 et un seul allèle pour l'amorce SSR 28. Les marqueurs microsatellites utilisés dans cette étude ont également montré différents niveaux de diversité génétique. Une moyenne de diversité génétique (H) a été calculée pour les 4 marqueurs, ainsi la diversité génétique pour ces microsatellites varie de 0,000 (SSR 28) à 0,719 (SSR 207) avec une moyenne de 0,402. Ces résultats révèlent que les amorces choisies étaient suffisamment efficaces sauf SSR 28, pour détecter la diversité dans les cultivars de lentilles, et que les microsatellites SSR 207 et SSR 202 étaient les plus informatifs et ont montré les valeurs les plus élevées (0,719 et 0,656 respectivement) avec un PIC de 0,670 et 0,595, respectivement (tableau 9).

Tableau 9 : Diversité génétique calculé chez les accessions étudiées de lentille.

Marqueur	Nombre d'allèles	Indice de diversité génétique	PIC
SSR 207	5	0.719	0.670
SSR 202	5	0.656	0.595
SSR 28	1	0	0
SSR 34-2	2	0.231	0.204
Totale	13	-	-
Moyenne	3.25	0.402	0.367

*PIC : contenu de l'information polymorphe (Polymorphism Information Content)

Le taux de polymorphisme étant basé sur l'indice de la diversité génétique. Plus l'indice de la diversité est important plus que le PIC est important.

3. Distance génétique

Les résultats obtenus (Tableau 10) montrent que la distance génétique la plus faible (0), a été révélée entre 18 et 22 / 3 et 10 / 6 et 10 / 3 et 6 / 7 et 11. Ceci indique que ces accessions sont étroitement liées les unes aux autres. La distance génétique la plus élevée (0,75), a été observée entre (11, 14, 18, 2, 22, 23, 25, 7) et l'accession (15) et entre (1, 18, 22, 23) et l'accession 4.

Tableau 10 : Distance génétique entre les accessions étudiées.

OTU	1	10	11	14	15	17	18	2	22	23	25	3	4	6	7	8
1	0															
10	0.25	0														
11	0.25	0.5	0													
14	0.5	0.25	0.5	0												
15	0.5	0.5	0.75	0.75	0											
17	0.67	0.67	0.33	0.67	0.67	0										
18	0.25	0.5	0.25	0.25	0.75	0.67	0									
2	0.5	0.25	0.5	0.25	0.75	0.67	0.5	0								
22	0.25	0.5	0.25	0.25	0.75	0.67	0	0.5	0							
23	0.25	0.5	0.25	0.5	0.75	0.67	0.25	0.5	0.25	0						
25	0.5	0.5	0.25	0.5	0.75	0.33	0.5	0.5	0.5	0.5	0					
3	0.25	0	0.5	0.25	0.5	0.67	0.5	0.25	0.5	0.5	0.5	0				
4	0.75	0.5	0.5	0.5	0.5	0.33	0.75	0.5	0.75	0.75	0.5	0.5	0			
6	0.25	0	0.5	0.25	0.5	0.67	0.5	0.25	0.5	0.5	0.5	0	0.5	0		
7	0.25	0.5	0	0.5	0.75	0.33	0.25	0.5	0.25	0.25	0.25	0.5	0.5	0.5	0	
8	0.5	0.25	0.25	0.25	0.75	0.33	0.5	0.25	0.5	0.5	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25	0

4. Dendrogramme

Les relations génétiques entre les accessions ont été étudiées en utilisant l'analyse de cluster basée sur Neighbour joining. Toutes les accessions étaient rassemblées dans trois groupes majeurs (G-I, G-II, G-III) (Figure 16). Dont le 2^{ème} groupe était principalement séparé dans des sous-groupes (a1, a2, a3). Tandis que les groupes I et III sont composés des accessions 6, 3 et 10, et ce sont les trois accessions qui présentent la plus faible distance génétique (0) entre eux dans ce travail, ainsi que les accessions (18 – 22) et (7 – 11) dans le groupe II, à cause des marqueurs moléculaires utilisés qui n'étaient pas suffisants pour distinguer ces accessions les unes aux autres. Alors que les sous-groupes a1 et a3 sont composés des accessions qui présentent une distance génétique de (0,25) entre les accessions

de chaque sous-groupe. Tandis que la plus grande distance génétique (0,75) est marquée chez l'accèsion 15 dans le sous-groupe (a2) avec la plupart des accèsions des autres sous-groupes (a1 et a3). Ainsi chez l'accèsion 4 dans le sous-groupe (a2) avec les accèsions 1, 18, 22 et 23 présentées dans le sous-groupe (a3).

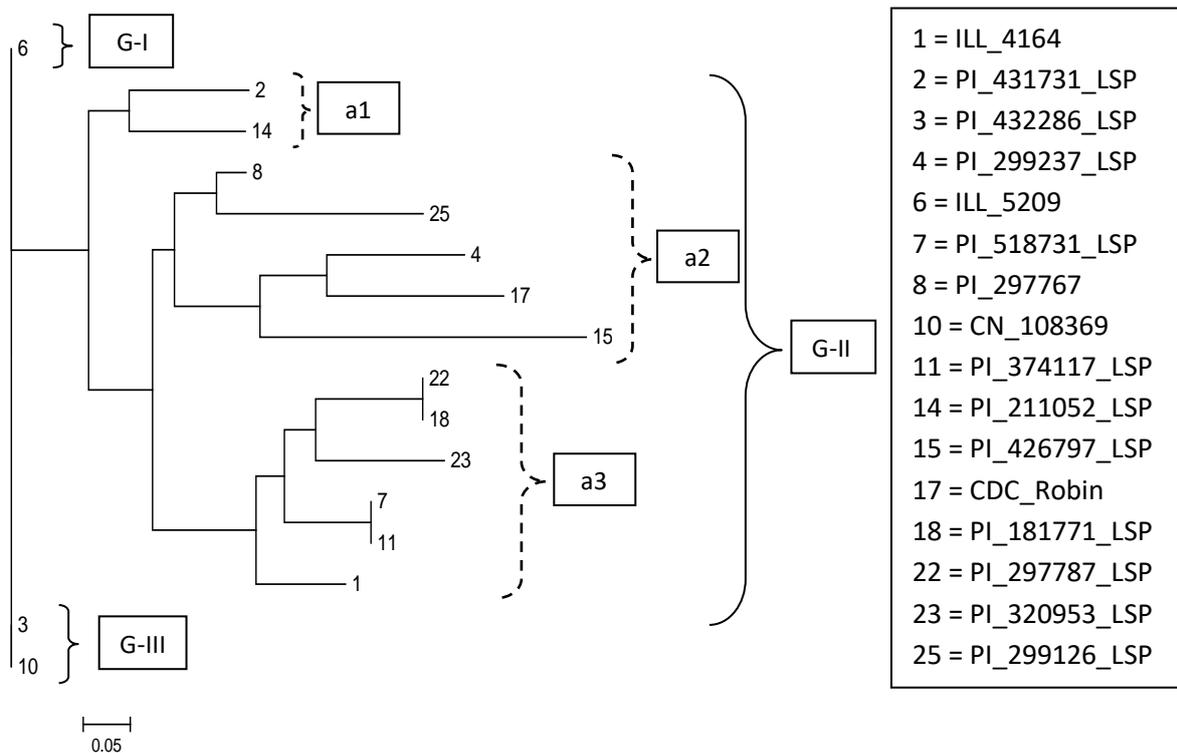


Figure 16 : Dendrogramme généré sur la base des données SSR des accèsions de la lentille.

Conclusion

L'étude de la diversité génétique des 16 accessions de différentes origines pourrait constituer les nouveaux matériaux pour les futurs programmes de sélection systématique des lentilles. Ainsi, les génotypes les mieux notés pourraient être recommandés pour la culture des agriculteurs pour un meilleur rendement. Donc il faut accroître les connaissances sur la variation génétique et les relations entre les accessions pour comprendre la variabilité génétique disponible et son utilisation dans les programmes de sélection. Ca permet également de choisir les génotypes à privilégier pour la conservation (Thormann et al., 1994). Au cours de ce travail, 16 accessions de lentilles ont été caractérisées du point de vue morphologique et moléculaire.

Dans ce contexte plusieurs caractères phénotypiques analysés chez les accessions de lentilles, il s'agit du temps de floraison, le temps de la formation des vrilles, le temps de la formation des gousses, le temps d'atteindre 50% de la gousse, ainsi que le temps de 50% de maturité. Il a été constaté que les premières accessions ayant germé sont CDC-Robin (Canada), PI-299126-LSP (Mexique), PI-181771-LSP (Liban), et PI-374117-LSP (Maroc), PI-426797-LSP (Pakistan), et ILL-5209 (Jordan).

L'accession PI-426797-LSP (Pakistan) n'a pas formé des vrilles, mais elle est parmi les accessions ayant fleuri et atteint la maturité au premier dans un temps de 85 jours.

L'accession PI-432286-LSP (Egypte) n'a pas formé des vrilles ni des fleurs et des gousses. Cette accession prend beaucoup de temps pour grandir et pour passer le stade végétatif, elle doit être plantée plutôt que la date de culture (20 février).

Les différences signalées dans le cycle biologique des accessions analysées peuvent être liées aux conditions environnementales spécifiques d'adaptation.

Un ensemble de 4 marqueurs microsatellites ont été utilisés pour l'identification, la caractérisation et l'analyse de la diversité des 16 accessions de *Lens culinaris*. En utilisant les amorces sélectionnées par Hamwiah et al. (2009), un ensemble de 13 allèles ont été détectés avec une moyenne de 3,25 par locus. SSR 207 et SSR- 202 (5 allèles) a produit le plus grand nombre d'allèles, suivi de SSR 34-2 (2 allèles) et SSR 28 (1 allèle). En Comparant aux résultats de Hamwiah et al. (1994) qui ont identifié 16 allèles au maximum produit par SSR 207, suivi par SSR 197 et SSR 66 (14 allèles). Alors que Jin et al. (2008) ont utilisé d'autres amorces SSR sur *Lens culinaris*. Ils ont trouvé 13 allèles au maximum par SSR 33 par locus, suivi de psab 111, SSR 156 et SSR 204 (10 allèles pour chacun). Les résultats montrent que les amorces utilisées dans notre travail et par Hamwiah et al. (1994) sont efficaces, ainsi il y a

une grande corrélation entre la distribution éco-géographique et les informations données par ces marqueurs SSR.

Le dendrogramme généré suite à l'utilisation des marqueurs SSR, a séparé les accessions de lentilles en 3 groupes. Les distances génétiques sont enregistrées entre les accessions de Pakistan et celles du Maroc, Afghanistan, Liban, Iran, Russie, Allemagne, Brésil et Grèce, et entre les accessions de Chili et celles de l'Inde, Liban, Russie et Allemagne.

Donc ces 2 accessions n'ont pas la même origine, en se basant sur ces résultats on peut considérer qu'elles sont très intéressantes pour un programme de croisement et d'amélioration génétique et un programme de sélection méthodique et raisonné vise en général à améliorer les plantes de lentilles.

Donc des parents génétiquement très divergents peuvent être utilisés dans les programmes de croisement et d'amélioration génétique de la lentille pour un meilleur rendement.

L'ensemble des résultats fournis par ce travail, vont ainsi servir à développer la culture des lentilles au Maroc.

Références bibliographiques

- Ahlawat, I. P. S. (2012).** Agronomy – rabi crops, Lentil. Division of Agronomy Indian Agricultural Research Institute, New Delhi – 110 012 Agronomy.
- Anonyme . (1999).** Filière des Légumineuses Alimentaires: Situation Actuelle et Plan d'Action.
- Anonyme1 (2012).** Taxonomical database. United States Department of Agriculture, Natural Resources Conservation Service. Retrieved from <http://plants.usda.gov>.
- Aladdin Hamwiah (2009).** Development of new microsatellite markers and their application in the analysis of genetic diversity in lentils
- Blair M.W., Panaud O. & McCouch S. R. (1998).** Inter-simple sequence repeat (ISSR) amplification for analysis of microsatellite motif frequency and fingerprinting in rice (*Oryza sativa* L.). *Theor. Appl. Genet.* 98: 780-792.
- Beckmann J. S. & Soller M. (1986).** Restriction fragment length polymorphisms and genetic improvement of agricultural species. *Euphytica* 35: 111-124.
- Benzecri J.P. (1973).** L'analyse des données. Tome 2: L'analyse des correspondances.
- Claros G.M. & Quesada,, A.R. 2000.** PCR as a specific, sensitive and simple method suitable for diagnostics. In : *Biochemistry and Molecular Biology Education*, 28: 223-226.
- Cokkizgin A, et Shtaya MJY (2013)** Lentil: Origin, Cultivation Techniques, Utilization an Advances in Transformation. *Agricultural Sciences* 1 (1):55-62.
- Costa E., Canudas, S., Garcia-Bassets I., Perez S., Fernandez I., Giralte E., Azorin F., Espinas M.L. (2006).** Drosophila dSAP18 is a nuclear protein that associates with chromosomes and the nuclear matrix, and interacts with pinin, a protein factor involved in RNA splicing. *Chromosome Res.* 14(5): 515--526.
- Cubero J. I. (1981).** Origin, domestication and evolution. In C. Webb and G. C. Hawtin (Eds.), *Lentils* (pp. 15-38). Commonwealth Agricultural Bureau, Slough, UK.
- De Vienne M., Chausse A., Maurice & S. Santoni (1998).** Les marqueurs moléculaires et leurs utilisations. 95ème Edition, 1-5.
- FAO (2019).** Faostat, Fao Statistical Database. Retrieved from <http://www.fao.org>
- Ferreira M.Y. & Grattapaglia D. (1998).** Introducción al uso de Marcadores Moleculares en el

Análisis Genético. Embrapa-cenargen. Brasília, DF, Brasil. 221 p.

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

Hanelt P. (2001). Lens Mill. In P. Hanelt (Ed.), *Mansfeld's encyclopedia of agricultural and horticultural crops* (Vol. 2, 849–852). *Lens culinaris Medicus Vorl. Churpf. Phys.-Okon. Ges.*, 2, 361 (1787).

Hartl D.L. (1988). *A primer of population genetics*. 1st edition. Sinauer Associates, Sunderland, 305 p.

Imrani H. et El-Harti A. (1999). La valorisation des légumineuses alimentaires au Maroc. In: Anonyme. *Filière des Légumineuses Alimentaires. Situation Actuelle et Plan d'Action*. Document établi conjointement par le MADRPM et la GTZ. Rabat, Maroc. pp. 67-76.

Khalidi R., Zekri S., Maatougui M.E.H. & Ben Yassine A. (2002). *l'économie des légumineuses alimentaires au Maghreb et dans le monde*. Proceeding du 2 ème séminaire du réseau remafeve/remala. « le devenir des légumineuses alimentaires dans le Maghreb ». Hammamet, Tunisie, 100p.

Kochert G. (1994). RFLP technology, In: Phillips R.L. and Vasil I.K. (Eds.), *DNA-based Markers in Plants*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht. 8-38.

McPherson M.J. & Moller S.G., (2000). *The Basics PCR*. BIOS. Springer-Verlag New York Inc. USA, 276p.

Melake B. (2000). Molecular marker techniques, In: *International Institute of Tropical Agriculture (IITA)*, Ibadan, Nigeria, 13-15.

Morgante M. & Olivieri A.M. (1993). PCR-amplified microsatellites as markers in plant genetics. *The plant journal: cell and molecular biology*. 3(1):175-82.

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

Muehlbauer, and Tullu. (1997). Production and breeding of lentil. *Advances in Agronomy*, 54: 283-332.

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

Plomion C. (2003). Marqueurs génétiques moléculaires.. *Principes des techniques de*

biologie moléculaire, In : Tagu D., Moussard C., éds 2ème édition. INRA Editions, Paris, France, 143-146.

Powel W., Morgante M., Andre C., Hanafey M., Vogel J. & Tingey S. (1996). A comparison of RFLP, RAPD, AFLP and SSR markers for germplasm analysis. *Mol Breed* 2:225-238.

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

Saghai-Marouf M.A., Soliman K.M., Jorgensen R.A. & Allard R.W. (1984). Ribosomal DNA spacer length polymorphisms in barley: Mendelian inheritance, chromosomal location and population dynamics. *Proc Natl Acad Sci USA* 81: 8014-8018.

Santoni S., Rampant P., Prado E. & Prat D. (2000). Marqueurs moléculaires pour l'analyse des ressources génétiques et l'amélioration des plantes. *Cahiers Agricultures*, 9: 311-327.

Saiki R.K., Scharf S., Faloona F., Mullis K.B., Horn G.T. & Erlich H.A. (1985). Enzymatic amplification of β -globin genomic sequences & restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. In: *Sciences*, 1350-1354.

Sehirali, S. (1988). Grain legume crops. Ankara University, Faculty of Agricultural Engineering, Ankara, Turkey 1089 (314), p. 435.

Swynghedauw B. (2000). Biologie et génétique moléculaire. Aide-mémoire. 2e édition. Dunod, Paris. France, 156p.

Tagu D. & Moussard C. (2003). Principes des techniques de biologie moléculaire. 2ème édition. INRA, Paris, 176p.

Tanksley S.D., Young N. D., Paterson A. H. & Bonierbale M. (1989). RFLP mapping in plant breeding: New tools for an old science. *Biotechnology* 7: 257-264.

Udupa S.M., R.S. Malhotra & M. Baum (1999). Tightly linked di- and tri-nucleotide microsatellites do not evolve in complete independence: evidence from linked (TA)_n and (TAA)_n microsatellites of chickpea (*Cicer arietinum* L.) 97: 299-307.

Vekemans X. & Jacquemart A.L. (1997). Perspectives on the use of molecular markers in plant population biology. *Belgian Journal of Botany*, 129: 91-100.

Vos P., Hogers R., Bleeker M., Reijjas M., Van de Lee T. & Hornes M. (1995). AFLP: A new technique for DNA fingerprinting. *Nucleic Acids Res.* 23: 4407-4414.

Welsh J. & McClelland M. (1990). Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers.
Nucleic acid Research, 18: 7213-7218.

White T.J., Arnheim N. & Erlich H. (1989). The polymerase chain reaction. Trends in:
Genetics, 5: 185-188.

Williams J.G.K., Rubelik A.R., Livak K.J., Rafalski J.A., Tingey S.V. (1990). DNA
polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers.
Nucleic Acids Research, 18: 6531- 6535.

Yadav, S. S., McNeil, D., & Stevenson, P. C. (Eds.). (2007). Lentil: An ancient crop for modern
times. Springer Science & Business Media.

webographie

<https://www.mon-jardin-potager.com/guide-pratique/culture-lentille/>

https://www.passeportsante.net/fr/Nutrition/EncyclopedieAliments/Fiche.aspx?doc=lentille_nu

<http://www.legume-sec.com/qualites-nutritionnelles/#super-fruit-3>

<https://agronomie.info/fr/classification-taxonomie-de-lentille/>

<https://agronomie.info/fr/donnees-botaniques-genetiques-lentille/>

www.inra.org.ma

<http://www.fao.org/faostat/fr/#data/QC>

<http://www.agriculture.gov.ma/>

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

<http://www.fiches.arvalis->

infos.fr/fiche_accident/fiches_accidents.php?mode=fa&type_cul=2&type_acc=12&id_acc=269

<https://www.gnis-pedagogie.org/biotechnologie-biologie-amplification-fragment-adn.html>

<http://benaz1.e-monsite.com/blog/le-cycle-de-vegetation-d-une-plante.html>

Annexe 1

Solutions nécessaires 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 (Amresco)	18,6 g
Eau distillée	Compléter jusqu'à 100 mL

Ajuster le pH avec les pélettes de NaOH jusqu'à pH 8.

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

2x CTAB	Volume final de 50 mL	Volume final 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 / Isoamyl alcool:

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

Annexe 2

Produits nécessaires pour la PCR

- Préparation de 2 mM dNTPs :

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

- Préparation de l'amorce 10 pmol/ μ L :

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

Annexe 3

Solutions stock pour les gels

- Tampon de migration 5 X TBE:

5 X 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%
Agarose (Promega)	3,6 g	4,5 g
5 X 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	1,34 g	3,35 g
Eau distillée	Jusqu'à 50 mL	Jusqu'à 100 mL	Jusqu'à 250 mL

- Solution de 6% acrylamide natif:

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

- Préparation d'ammonium persulfate (APS):

Solution 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% natif :

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

- Préparation du bleu d'agarose :

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

- Préparation du bleu d'acrylamide :

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

Annexe 4

Solutions pour la coloration des gels

- Solution de bromure d'éthidium (BET):

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

Annexe 5

Figures des marqueurs de taille utilisés

